

УДК 615.217:615.213:547.853:001.891.5

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕКТРУ ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ НОВИХ ПОХІДНИХ ПІРАЗОЛО[3,4-D]ПІРИМІДИН-4-ОНУ

© Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. А. Георгіяни, Г. І. Северіна

Мета. Визначити діапазон ефективних доз трьох нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на базовій моделі пентилентетразолових судом та спектр антиконвульсивної дії на експериментальних моделях судом із різним патогенезом.

Матеріали та методи. Досліди проводили на 240 білих статевозрілих нелінійних мишах самцях масою 20–26 г. Дозозалежність вивчали на базовій скринінговій моделі пентилентетразолових судом у мишей. На другій загальноприйнятій моделі максимального електрошоку мишей піддавали впливу електричних стимулів тривалістю 0,2 с з частотою 50 Гц та силою 50 mA через корнеальні електроди. Нейромедіаторний профіль дії сполуки-лідера визначали на моделях судом, індукованих пікротоксином, тіосемікарбазидом, стрихніном і кофеїном. Сполуки та референс-препарат вводили внутрішньошлунково за 30 хв до підшкірного (для пікротоксину і стрихніну) або внутрішньоочеревинного (для кофеїну і тіосемікарбазиду) введення судомної отрути.

Результати. Найвиразніші протисудомні властивості на моделі пентилентетразолових судом виявляють сполука під шифром 78553 у дозі 200 мг/кг і сполука 78342 у дозі 100 мг/кг, які за ефектом не поступаються натрію вальпроату в дозі 300 мг/кг. У тесті максимального електрошоку лише сполука 78553 (1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4H-піразоло[3,4-d]піримідин-4-он) чинить помірний антиконвульсивний ефект. Ця сполука-лідер виявляє виразну активність на моделі судом, спричинених кофеїном, помірну активність – на моделі пікротоксिनних судом (лише при низькій дозі проконвульсанта) та незначну – на стрихніновій моделі. На індуковані тіосемікарбазидом судоми досліджувана сполука не впливає.

Висновки. При дослідженні спектру антиконвульсивної дії сполуки-лідера 78553 на різних за патогенезом моделях судом встановлено, що можливі механізми її дії включають стимулювальний вплив на ГАМК-ергічні процеси (антагонізм з пентилентетразолом), у тому числі за рахунок протидії блокаді хлорного каналу ГАМК-рецепторів (помірний антагонізм з пікротоксином), на аденозинергічну ланку (виразний антагонізм з кофеїном) та на проникність нейрональних мембран для натрію (помірне полегшення перебігу максимального електросудомного нападу). Незначну роль може відігравати гліцинергічна дія (помірна протидія конвульсивному ефекту стрихніну)

Ключові слова: похідні піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, протисудомна дія

Aim. To determine an effective dose range of three compounds of pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one derivatives in a basic pentylenetetrazole-induced seizure model and spectrum of anticonvulsant activity in experimental models of seizure with different pathogenetic mechanisms.

Materials and methods. The experiments were performed on 240 mature albino male mice weighing 19–29 g. The dose dependence was investigated on a basic screening model of pentylenetetrazole-induced seizures on mice. Mice were exposed to electrical stimuli lasting for 0.2 s (50 Hz, 50mA) using corneal electrodes in another conventional maximal electroshock seizure model. A neurotransmitter profile of the leading compound effect was determined in picrotoxin-, thiosemicarbazide, strychnine- and caffeine-induced seizure models. Compounds and reference-drug were administered intragastrically 30 min before a subcutaneous (for picrotoxin and strychnine) or an intraperitoneal (for caffeine and thiosemicarbazide) convulsant administration.

Results. Compound 78553 (200 mg/kg) and compound 78342 (100 mg/kg) have demonstrated the most marked anticonvulsant properties in the pentylenetetrazole-induced seizure model which effects are comparable to those of valproate sodium (300 mg/kg). Only compound 78553 (1-(4-methoxyphenyl)-5-{2-[4-(4-methoxy-phenyl)piperazine-1-yl]-2-oxoethyl}-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyridine-4-one) had a moderate anticonvulsant effect in maximal electroshock seizure test. In seizure models with different pathogenetic mechanisms the compound 78553 has demonstrated an obvious effect on caffeine-induced seizures, moderate effect on picrotoxin-induced seizures (at relatively low dose of anticonvulsant), and insignificant effect on strychnine-induced seizures.

Conclusions. The spectrum of anticonvulsant activity results of the leading compound 78553 in the seizure models with different pathogenesis has shown its potential mechanisms to include a stimulated effect on GABAergic processes (antagonism to pentylenetetrazole), as well as antagonism to blocking GABA-activated chloride channels (moderate antagonism to picrotoxin), on the adenosinergic link (marked antagonism to caffeine) and on the

neural membrane permeability to sodium (moderate reduction of a maximum electroconvulsive seizure). Glycineric action (moderate antagonism to strychnine convulsive effect) may play a minor role. The study compound has produced no effect on thiosemicarbazide-induced seizures

Keywords: pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one derivatives, anticonvulsant activity

1. Вступ

Епілепсія є одним з найпоширеніших неврологічних захворювань, які щороку прогресують. За даними ВООЗ майже 1 % світової популяції страждає на епілепсію, і захворюваність невпинно зростає. Загальновідомо, що лікування епілепсії є досить тривалим, нерідко позитивним. У більшості випадків фармакотерапія залишається єдиним методом лікування, проте лише 70 % пацієнтів отримують задовільну терапію [1].

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

Згідно з даними останніх досліджень, спостерігається зростання питомої ваги епілепсії у структурі захворювань нервової системи з 0,5 % до 0,8–1,2 %, що зумовлює актуальність розробки нових ефективних методів лікування [2]. Сучасні протиепілептичні засоби не завжди відповідають вимогам високої ефективності, великої широті терапевтичної дії, низької токсичності, відсутності кумуляції та фармакорезистентності. Тому триває пошук нових класів сполук, представників яких за результатами доклінічних та клінічних досліджень можна вважати перспективними у лікуванні епілепсії.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор

Похідні піримідину останнім часом привертають увагу завдяки широкому спектру біологічної активності, в тому числі антиконвульсивної [3, 4]. Можливість варіації замісників, уведення до структури молекули додаткових гетероциклічних фрагментів дозволяє цим сполукам взаємодіяти з різноманітними структурами головного мозку. В цьому відношенні перспективними є похідні піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону із загальною формулою, наведеною нижче (рис. 1), які синтезовано на кафедрі фармацевтичної хімії НФаУ [5]. 35 оригінальних похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону згідно з PASS-прогнозом мали досить високу ймовірність протисудомного ефекту ($P_{a} \geq 0,50$).

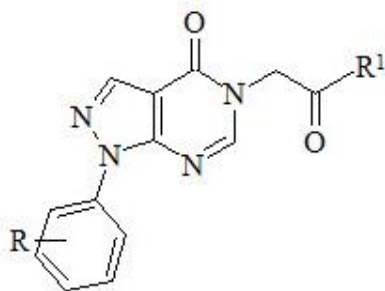


Рис. 1. Базова структура похідних піразоло [3,4-d]піримідин-4-ону, використаних для дослідження протисудомної дії

У попередньому скринінговому дослідженні на моделі індукованих пентилентетразолом судом виявлено виразні антиконвульсивні властивості трьох похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону [6].

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття

Залишається невідомою залежність антиконвульсивного ефекту сполук-лідерів від дози, діапазон ефективних доз та спектр протисудомної дії в умовах моделей судом із різним патогенезом, що важливо для попереднього судження щодо можливих механізмів дії, широти терапевтичного ефекту та експериментального обґрунтування доцільності використання потенційного протисудомного препарату при різних клінічних формах епілепсії.

5. Формулювання цілей (завдання) статті

Визначити діапазон ефективних доз трьох найактивніших похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на базовій моделі пентилентетразолових судом і спектр антиконвульсивної дії на експериментальних моделях судом із різним патогенезом.

6. Виклад основного матеріалу дослідження (методів та об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів

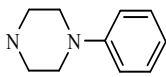
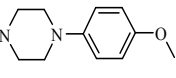
Досліджено лідери попереднього скринігу [6] – похідні піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону (рис. 1) під шифрами 78303, 78342 та 78553 (табл. 1), які синтезовано за описаною раніше методикою [5]. Їх фізико-хімічні характеристики відповідають відповідним описаним у літературі.

Досліди проводили на 240 білих статевозрілих нелінійних мишах самця масою 20–26 г, яких утримували в стандартних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ згідно з санітарно-гігієнічними нормами та принципами Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.) і «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Дозозалежність протисудомної дії вивчали на моделі пентилентетразолових судом. Методом випадкового вибору мишей розділили на 13 груп. Перша з них – група контрольної патології ($n=7$), тваринам якої моделювали судом шляхом підшкірного введення пентилентетразолу (коразолу) («Sigma», США) у дозі 90 мг/кг [7, 8]. Тваринам другої групи ($n=6$) вводили препарат порівняння вальпроат натрію («Депакін», серія 472, Sanofi-Aventis, Франція) у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково за 30 хв до конвульсанта. Інші групи склали тварини ($n=5-7$), яким в аналогічному режимі вводили кризь зонд у шлунок суспензії сполук 78303, 78342 та 78553 у твіні-80 у дозах 100, 150 та 200 мг/кг, а сполуку 78553 також у дозах 50 та 250 мг/кг.

Таблиця 1

Хімічна структура похідних
піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону та PASS-прогноз їх протисудомної
активності (Pa)

Шифр	R	R ₁	Назва сполуки	Брутто-формула	Pa
78303	4-OMe		1-(4-метоксифеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	C ₂₄ H ₂₄ N ₆ O ₃	0,501
78342	2-Cl	NMePh	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₂	0,524
78553	4-OMe		1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	C ₂₅ H ₂₆ N ₆ O ₄	0,530

На другій загальноприйнятій моделі максимального електрошоку (МЕШ) досліджували здатність сполук-лідерів в умовно ефективній дозі попереджувати розвиток первинно-генералізованих судом [7, 8]. Мишей піддавали впливу електричних стимулів тривалістю 0,2 с з частотою 50 Гц та силою 50 mA через корнеальні електроди. Досліди проводили на 50 тваринах, яких розділили на 5 груп: 1) контрольна патологія – миші, які отримували внутрішньошлунково воду очищену в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла; 2) група препарату порівняння карбамазепіну («Фінлепсин», серія 16016212, ТЕВА, Ізраїль/Польща), який вводили за 30 хв до МЕШ інтрагастрально в дозі 40 мг/кг у вигляді суспензії у твіні-80; 3) групи тварин, які отримували в аналогічному режимі сполуки 78303, 78342 та 78553 у дозах, найефективніших на пентилентетразоловій моделі (відповідно 200 мг/кг, 100 мг/кг і 200 мг/кг).

Нейромедіаторний профіль дії сполуки-лідера визначали на моделях судом, індукованих пікротоксином, тіосемікарбазидом, стрихніном і кофеїном. Пікротоксин (Sigma, США) вводили мишам у вигляді водного розчину в дозах 3 мг/кг та 4 мг/кг підшкірно; тіосемікарбазид (Sigma, США) – водного розчину в дозі 25 мг/кг внутрішньочеревинно; стрихнін (Sigma, США) – водного розчину в дозі 1,2 мг/кг підшкірно; кофеїн (кофеїн-бензоат натрію, серія 31014, "Дарниця") – водного розчину в дозі 650 мг/кг внутрішньочеревинно [7–9]. Як реферанс-препарати на моделях пікротоксинових і тіосемікарбазидних судом використовували натрію вальпроат (сироп «Депакін», серія 472, "Санofi-Авентіс", Франція) в дозі 300 мг/кг внутрішньощлунково, на стрихніновій моделі – водний розчин гліцину (Sigma, США) в дозі 50 мг/кг внутрішньочеревинно [10], на кофеїновій – водний розчин інозину («Рибоксин», серія 621215, "Артеріум", Україна) в дозі 1000 мг/кг внутрішньочеревинно [10] за 30 хв до судомної отрути, як і досліджувані сполуки. Вибір гліцину та інозину зумовлено тим, що вони є агоністами рецепторів, які блокують відповідно стрихнін (постсинаптичні гліцинові) та кофеїн (аденозинові).

Реєстрували латентний період судом, кількість клоніко-тонічних пароксизмів на 1 мишу, кількість тварин із клонічними та тонічними нападами, тяжкість пароксизмів у балах, час судомного періоду, час загибелі та летальність. На більшості моделей спостерігали за тваринами протягом 1 год. Якщо судом не наставали, вважали, що латентний період дорівнює 60 хв (крім тіосемікарбазидних судом із повільним розвитком, де спостереження тривало 4 години). Тяжкість судом визначали в балах: 1 – здригання, 2 – маневний біг, 3 – клонічні напади, 4 – клоніко-тонічні судоми з бічним положенням, 5 – тонічна екстензія, 6 – тонічна екстензія із загибеллю тварини [10].

Кількісні дані обробляли статистично за допомогою програми STATISTICA 8.0 for Windows із розрахунком середнього та його стандартної похибки. Достовірність міжгрупових відмінностей оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (за нормального розподілу), непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні за його відсутності, кутовим перетворенням Фішера (при обліку в альтернативній формі: виживання-загибель). Відмінності вважали достовірними при p<0,05.

Результати вивчення дозозалежності протисудомної дії на моделі пентилентетразолових судом наведено в табл.2. Найвиразніший ефект мали сполука 78342 у дозі 100 мг/кг та сполука 78553 в дозах 200 мг/кг та 250 мг/кг, достовірно подовжуючи латентний період перших нападів, зменшуючи кількість судом на 1 мишу, кількість мишей з тонічними судомами, тяжкість пароксизмів і тривалість судомного періоду (табл. 2), а також інтегральний показник ефективності – летальність.

Антиконвульсивний ефект сполуки 78553 спостерігався в дозі 50 мг/кг і зростав при збільшенні дози. Летальність як основний критерій ефективності достовірно зменшувалась починаючи з дози 150 мг/кг. У дозі 200 мг/кг сполука 78553 діяла на рівні препарату порівняння вальпроату натрію в дозі 300 мг/кг. Оскільки дози 200 та 250 мг/кг мали однакову ефективність, досліджувати вищі дози було недоцільно.

Отже, сполука 78533 характеризується близьким до лінійного характером залежності протисудомного ефекту від дози із досить широким діапазоном ефективних доз.

Сполука 78342, навпаки, має малий діапазон антиконвульсивних доз. Протисудомний ефект на рівні вальпроату натрію виявлено лише в дозі 100 мг/кг. Збільшення дози до 150 мг/кг знижувало ефект (достовірно подовжувався лише латентний період), а в дозі 200 мг/кг він зникав.

Сполука 78303 не виявила протисудомну дію у дозах 100 та 150 мг/кг, а в дозі 200 мг/кг показала слабку активність, значуще подовжуючи латентний період, майже в 6 разів та зменшуючи кількість нападів на 1 мишу вдвічі без впливу на летальність.

На основі вивчення дозозалежності ефекту обрано умовно ефективні дози, які використано в наступних експериментах: для сполуки 78553 – 200 мг/кг, для сполуки 78342 – 100 мг/кг, для сполуки 78303 – 200 мг/кг.

Таблиця 2

Дозозалежний вплив похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на коразолові судоми у мишей.

Група тварин, сполуки	n	До-за, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	% мишей із судомами		Тяжкість судом, бали	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічними	тонічними				
Контроль	7	–	3,29±0,28	3,14±0,34	100	100	5,43±0,37	14,43±2,88	17,05±4,00	71,4
Вальпроат натрію	6	300	19,73±8,24**	1,50±0,43*	83,3	33,3**	3,17±0,79*	5,86±2,64*	18,45 (1)	16,7*
Сполука 78303	5	100	7,12±4,08	3,60±0,60	100	100	5,60±0,40	14,58±3,96	19,25±5,39	80,0
	5	150	3,96±0,72	2,40±0,51	100	100	6,00±0,00	11,67±1,66	15,63±1,90	100
	5	200	17,95±10,55**	1,60±0,62*	80,0	80,0	4,40±1,17	6,53±3,63	12,51±5,10	60,0
Сполука 78342	5	100	8,75±3,17**	1,20±0,20**	100	60,0**	4,00±0,52*	1,96±1,62*	13,01 (1)	20,0*
	5	150	7,06±1,52*	2,20±0,37	100	100	6,00±0,00	7,54±2,69	14,59±3,37	100
	5	200	4,33±1,02	3,00±0,55	100	80,0	5,40±0,60	11,00±3,77	18,13±4,33	80,0
Сполука 78553	5	50	4,09±0,82	2,00±0,32*	100	80,0	4,60±0,60	7,94±2,19	12,96±3,44	40,0
	5	100	15,94±11,04*	1,80±0,58	80,0	60,0**	4,20±1,20	9,02±3,59	19,42±1,78	60,0
	7	150	5,99±1,10*	2,71±0,29	100	85,7	4,57±0,43	11,83±1,70	17,10±1,79	28,6*
	5	200	16,80±10,82*	1,20±0,37**	80,0	40,0**	3,20±0,97*	4,32±2,43*	18,43 (1)	20,0*
	5	250	6,78±1,83*	1,60±0,24*	100	100	4,40±0,40	4,21±2,24*	9,67 (1)	20,0*

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності відносно контролю: * – $p \leq 0,05$; ** – $p < 0,01$.

2. У дужках – кількість тварин, що вижили.

У тесті МЕШ усі досліджувані сполуки не продемонстрували виразні антиконвульсивні властивості (табл. 3). Відносно контролю лише сполука 78553 достовірно зменшувала тривалість судомного періоду в 1,83 разу, а також тенденційно зменшувала летальність на 7,5 %, кількість мишей з бічним положенням – на 30 %, тяжкість пароксизмів – на 0,45 балу. Сполуки 78303 та 78342 не мали достовірних відмінностей у порівнянні з контролем, проте простежувалася тенденція до зменшення тривалості перебування мишей у боковому положенні майже на 25 %, але ця різниця не досягала рівня статистичної значущості.

Карбамазепін в умовах тесту МЕШ виявив виразну антиконвульсивну активність, перевищуючі досліджувані сполуки. Цей антиконвульсант повністю усував тонічні судоми та бічне положення, а також попереджував загибель експериментальних тварин ($p < 0,05$).

Тест МЕШ показав, що досліджувані сполуки 78303 та 78342 не є ефективними щодо зменшення великих первинно-генералізованих пароксизмів, а сполука 78553 чинить слабкий захисний ефект. На підставі цих результатів та найвищої ефективності сполуки 78553 на моделі пентилентетразолових судом саме цю сполуку обрано для поглибленого дослідження спектру антиконвульсивної дії.

Таблиця 3

Вплив похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на перебіг судом, індукованих максимальним електрошоком у мишей

Показники	Контроль	Карба-мазепін, 40 мг/кг	Сполука 78303, 200 мг/кг	Сполука 78342, 100 мг/кг	Сполука 78553, 200 мг/кг
n	20	6	8	8	8
Доза, мг/кг	–	40	200	100	200
Кількість нападів на 1 мишу	1,05±0,05	1,00±0,0	1,00±0,0	1,13±0,13	1,00±0,0
% мишей із судомами: клонічними тонічними	100 95,0	66,7** 0**	100# 100#	100# 87,5#	100# 87,5#
Тяжкість судом, бали	4,70±0,18	2,7±0,2**	5,00±0,33##	5,00±0,42##	4,25±0,37##
Тривалість судомного періоду, с	25,85±4,47	11,5±3,2*	18,38±3,16	16,63±2,52	14,13±3,17*
% тварин із бічним положенням	80	0**	75##	75##	50##
Тривалість бічного положення, с	58,7±11,5	0,0±0,0**	45,3±22,4	46,2±19,8#	67,0±33,4
Час загибелі, с	188,8±177,1	–	15,33±2,19	15,25±1,49	19,0 (1)
Летальність, %	20	0*	37,5##	50,0##	12,5

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності відносно контролю: * – $p \leq 0,05$; ** – $p < 0,01$.
2. Статистично значущі відмінності відносно карбамазепіну: # – $p \leq 0,05$; ## – $p < 0,01$.
3. У дужках – кількість тварин, що вижили.

Результати дослідження впливу сполуки 78553 на судомний синдром, викликаний пікротоксином, наведено в табл. 4. Вони свідчать про неоднозначний вплив на цю модель судом, механізм яких пов'язано з блокадою хлорного каналу ГАМК_A-рецепторів [11, 12]. При введенні конвульсанта в дозі 3,0 мг/кг, яка не є летальною, сполука 78553 покращувала перебіг пароксизмів, достовірно зменшуючи кількість клоніко-тонічних нападів на 1 мишу та тривалість судомного періоду в 2 рази, виявляла тенденцію до зменшення латентного періоду та відсотку мишей з клонічними судомами. На тлі дози конвульсанта 4,0 мг/кг, яка викликала значно тяжчі судоми (табл. 4) і спричинила загибель 87,5 % мишей у контрольній групі, досліджувана речовина на відміну від вальпроату натрію не чинила захисного ефекту.

Результати дослідження впливу речовини 78553 на перебіг конвульсій, індукованих тіосемікарбазидом, який порушує утворення ГАМК із глутамату за рахунок інгібування глутаматдекарбоксілази

[13], наведено в табл. 5. Сполука 78553 не вплинула на перебіг судом. Мала місце лише недостовірна тенденція до зниження тривалості судомного періоду. Препарат порівняння вальпроат натрію виявив значні антиконвульсивні властивості, достовірно збільшуючи латентний період нападів на 70 %, зменшуючи кількість клоніко-тонічних пароксизмів на 1 мишу в 4 рази за рахунок пригнічення як клонічної, так і тонічної фази, тяжкість судом більш ніж у 3 рази та летальності на 87,5 % порівняно з контрольною групою та досліджуваною сполукою.

Як видно з табл. 5, на перебіг судом, спричинених стрихніном, сполука 78553 не виявила значущого впливу, крім достовірного зменшення тяжкості судом на 0,63 балу за рахунок загибелі тварин не в найнебезпечнішій фазі тонічної екстензії. Більш того, зниження тяжкості судом на 0,75 балу виявилось статистично значущим відносно препарату порівняння. На всі інші показники ані досліджувана сполука, ані референс-препарат гліцин не впливали.

Таблиця 4

Вплив сполуки 78553 на перебіг судом, індукованих пікротоксином у мишей

Група тварин, сполуки	n	До-за, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	% мишей із судомами		Тяжкість судом, бали	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічними	точнічними				
Контроль – пікротоксин	8	3,0	16,56±1,19	2,00±0,33	100	62,5	3,63±0,18	3,65±1,74	–	0
Вальпроат натрію + пікротоксин	8	300+ +3,0	50,96±6,09**	0,25±0,16**	25,0**	12,5*	0,88±0,58**	0,18±0,05*	–	0
Сполука 78553 + пікротоксин	8	200+ +3,0	22,76±5,53##	1,00±0,19*##	87,5##	75,5##	3,38±0,50##	1,80±1,69*	–	0
Контроль – пікротоксин	8	4,0	8,19±1,28^^	4,5±0,8^	100	100^	5,63±0,26^^	7,47±1,13	15,0±1,84	87,5^^
Вальпроат натрію + пікротоксин	8	300+ +4,0	14,01±1,13**	3,13±0,58	100	62,5**	4,38±0,46*	21,0±3,03**	36,2±15,6**	25**
Сполука 78553+ пікротоксин	8	200+ +4,0	9,58±0,45##	3,5±0,63	100	100	6,0±0,0##	8,98±0,80##	18,6±1,14##	100##

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності відносно контролю: * – $p \leq 0,05$; ** – $p < 0,01$.
2. Статистично значущі відмінності відносно вальпроату натрію: # – $p \leq 0,05$; ## – $p < 0,01$.
3. Статистично значущі відмінності між ефектами пікротоксину в дозах 3 мг/кг і 4 мг/кг: ^ – $p \leq 0,05$; ^^ – $p < 0,01$.

Таблиця 5

Вплив сполуки 78553 на перебіг судом, індукованих тіосемікарбазидом, стрихніном або кофеїном у мишей

Група тварин, сполука	n	До-за, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	% мишей із судомами		Тяжкість судом, бали	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічними	точнічними				
Тіосемікарбазид (25 мг/кг)										
Контроль	8	–	60,22±3,04	2,13±0,13	100	100	6,0±0,0	20,06±1,62	80,3±3,28	100
Вальпроат натрію	8	300	106,63±7,13* *	0,50±0,27**	37,5**	25,0**	1,75±0,90**	1,52±1,14**	77,72 (1)	12,5**
Сполука 78553	8	200	66,27±3,78##	2,25±0,45##	100##	100##	6,0±0,0##	13,58±5,94#	79,8±6,28	100
Стрихнін (1,2 мг/кг)										
Контроль	8	–	5,93±0,86	1,13±0,13	100	100	5,88±0,13	1,5±0,61	7,43±0,86	100
Гліцин	8	50	5,70±0,55	1,25±0,16	100	100	6,00±0,0	0,94±0,25	6,64±0,59	100
Сполука 78553	8	200	5,82±1,07	1,0±0,0	100	100	5,25±0,31##	1,13±0,60	6,95±0,75	100
Кофеїн-бензоат натрію (650 мг/кг)										
Контроль	8	–	3,20±0,49	5,38±1,44	100	100	5,0±0,38	35,79±8,31	38,0±9,73	87,5
Інозин	8	1000	23,43±9,34* *	2,75±1,03	50**	25**	2,5±0,57**	13,40±7,74*	–	0**
Сполука 78553	8	200	32,33±10,46* *	0,62±0,24**#	75*	25**	1,75±0,67**	3,87±2,52**	15,2 (1)	12,5**

Примітки:

1. Статистично значущі відмінності відносно контролю: * – $p \leq 0,05$; ** – $p < 0,01$.
2. Статистично значущі відмінності відносно відповідного препарату порівняння: # – $p \leq 0,05$; ## – $p < 0,01$.
3. У дужках – кількість тварин, що вижили.

На моделі кофеїнових судом (табл. 5) сполука 78553 мала виразну антиконвульсивну дію, достовір-

но у 10 разів збільшуючи латентний період, зменшуючи кількість нападів (як клонічних, так і точнічних)

на 1 мишу у 9 разів, тяжкість судом у 3 рази, тривалість судомного періоду в 9 разів і летальність на 75 %. Порівняно з референт-препаратом інозином сполука 78553 краще знижувала кількість нападів на 1 мишу в 4,5 разу ($p < 0,05$) та виявляла тенденцію до збільшення латентного періоду, зменшення тяжкості судом та тривалості судомного періоду. Вона майже не поступилася за ефективністю референт-препарату інозину.

Підсумовуючі можливі механізми протисудомної дії сполуки 78553, слід підкреслити його стимулювальний вплив на ГАМК-ергічні процеси (про це свідчить антагонізм з пентилентетразолом), у тому числі за рахунок протидії блокаді хлорного каналу ГАМК-рецепторів (на користь цього припущення свідчить помірний антагонізм з пікротоксином при відносно низькій дозі проконвульсанта). Велике значення в механізмі антиконвульсантної дії сполуки 78553 може мати аденозинергічна ланка (на підставі виразного антагонізму з кофеїном, який блокує рецептори гальмівного нейротрансмітера аденозину). Незначна роль може відігравати гліцинергічна дія (на підставі помірної протидії конвульсивному ефекту стрихніну – блокатора гліцинових рецепторів). Неможна виключити також пригнічувальний вплив сполуки 78553 на проникність нейрональних мембран для натрію, оскільки вона помірно полегшує максимальний електросудомний напад. На процес утворення ГАМК із глутамату, виходячи з відсутності ефекту на моделі судом, викликаних тіосемікарбазидом, сполука 78553, очевидно, не впливає.

Результати експериментально обґрунтовують доцільність подальшого поглибленого дослідження сполуки 78553 (1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он) як перспективного антиконвульсанта, ефективного на різних за нейрохімічними механізмами моделях судом, що має досить широкий діапазон ефективних доз.

7. Висновки з проведеного дослідження і перспективи подальшого розвитку даного напрямку

Досліджено ефективність трьох похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону в дозах 50–250 мг/кг при інтрагастральному введенні на моделі пентилентетразолових судом у мишей. Найвиразніші протисудомні властивості сполуки під шифрами 78553 (1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он) виявляють у дозі 200 мг/кг та 78342 (2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід) у дозі 100 мг/кг, які за ефектом не поступаються натрію вальпроату в дозі 300 мг/кг.

У тесті максимального електрошоку лише сполука 78553 (200 мг/кг) чинить помірний антиконвульсивний ефект.

Сполука 78553 має широкий спектр антиконвульсивної дії, виявляючи виразний ефект на моделях судом, викликаних пентилентетразолом або кофеїном, незначний – на моделях, спричинених пікротоксином, стрихніном, максимальним електрошоком.

Це свідчить про різноманітність механізмів антиконвульсивної дії. На індуковані тіосемікарбазидом судом досліджувана сполука не впливає.

Сполука 78553 є перспективною для подальших поглиблених досліджень механізмів протисудомної дії та спектру супутніх нейротропних ефектів, а також з'ясування показників безпеки.

Література

1. Всемирная организация здравоохранения 2016 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/ru/>
2. Горачук, В. В. Медико-соціальні та економічні аспекти епілепсії [Текст] / В. В. Горачук // Укр. мед. Часопис. – 2011. – Т. 5. – С. 42–44.
3. Wang, S.-B. Synthesis of 5-alkoxythieno[2,3-e][1,2,4]triazolo[4,3-c]pyrimidine. Derivatives and evaluation of their anticonvulsant activities [Text] / S.-B. Wang, G.-C. Piao, H.-J. Zhang, Z.-S. Quan // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, Issue 1. – P. 6827–6843. doi: 10.3390/molecules20046827
4. Wang, S.-B. Synthesis and evaluation of anticonvulsant and antidepressant activities of 5-alkoxytetrazolo[1,5-c]thieno[2,3-e]pyrimidine derivatives [Text] / S.-B. Wang, X.-Q. Deng, Y. Zheng, Y.-P. Yuan, Z.-S. Quan, L.-P. Guan // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 56. – P. 139–144. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.027
5. Severina, A. I. Synthesis and alkylation of 1-aryl-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ones as possible anticonvulsant agents [Text] / A. I. Severina, V. A. Georgiyants, S. Yu. Shtrygol, D. P. Kavraiskiy // *Der Pharma Chemica J.* – 2015. – Vol. 7, Issue 11. – P. 43–48.
6. Пат. UA 103378 на корисну модель МПК (2015.01) А61К31/505 (2006.01) А61Р 21/00 5-R-1-арил-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-онів, що виявляють протисудомну активність [Текст] / Северіна Г. І., Каврайський Д. П., Штрыголь С. Ю., Георгіянц В. А.; Національний фармацевтичний університет. – № u2015 06663; заявл. 06.07. 2015; опубл. 10.12. 2015; Бюл. № 23. – 6 с.
7. Головенко, М. Я. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів [Текст] / М. Я. Головенко, Л. О. Громов. – К.: Авіценна, 2003. – 26 с.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 [Текст] / под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева и др. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
9. Marangos, P. J. The benzodiazepines and inosine antagonize caffeine-induced seizures [Text] / P. J. Marangos, A. M. Martino, S. M. Paul, P. Skolnick // *Psychopharmacology*. – 1981. – Vol. 72, Issue 3. – P. 269–273. doi: 10.1007/bf00431829
10. Штрыголь, С. Ю. Модуляция фармакологических эффектов при различных солевых режимах [Текст]: монография / С. Ю. Штрыголь. – Х.: Авіста-ВЛТ, 2007. – 360 с.
11. Силкина, И. В. ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного и нейропротекторного эффектов афабазола и пикамилаона [Текст] / И. В. Силкина, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2005. – Т. 68, № 1. – С. 20–24.
12. Newland, C. F. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurons of the rat [Text] / C. F. Newland, S. G. Cull-Candy // *The Journal of Physiology*. – 1992. – Vol. 447, Issue 1. – P. 191–213. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp018998
13. De Deyn, P. P. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of

anticonvulsants [Text] / P. P. De Deyn, R. D'Hooge, B. Marescau, Y. Pei // *Epilepsy Research*. – 1992. – Vol. 12, Issue 2. – P. 87–110. doi: 10.1016/0920-1211(92)90030-w

References

1. The World Health Organization 2016. Fact Sheets. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/ru/>
2. Gorachuk, V. V. (2011). Medical, social and economic aspects of epilepsy. *Ukr. Med. Chasopys*, 5, 42–44.
3. Wang, S.-B., Piao, G.-C., Zhang, H.-J., & Quan, Z.-S. (2015). Synthesis of 5-Alkoxythieno[2,3-e][1,2,4]triazolo[4,3-c]pyrimidine Derivatives and Evaluation of Their Anticonvulsant Activities. *Molecules*, 20 (4), 6827–6843. doi: 10.3390/molecules 20046827
4. Wang, S.-B., Deng, X.-Q., Zheng, Y., Yuan, Y.-P., Quan, Z.-S., Guan, L.-P. (2012). Synthesis and evaluation of anti-convulsant and antidepressant activities of 5-alkoxytetrazolo[1,5-c]thieno[2,3-e]pyrimidine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 139–144. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.027
5. Severina, A. I., Georgiyants, V. A., Shtrygol, S. Yu., Kavraiskiy, D. P. (2015). Synthesis and alkylation of 1-aryl-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ones as possible anticonvulsant agents. *Der Pharma Chemica J.*, 7 (11), 43–48.
6. Severina, G. I., Kavrajs'kyj, D. P., Shtrygol', S. Ju., Georgijanc, V. A. (2015). Patent UA 103378 utility model IPC (2015.01) A61K31 / 505 (2006.01) 21/00 A61R 5-R-1-aryl-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-ones, which have anti-convulsant activity. № u2015 06663; appl. 06.07. 2015; publ. 10.12.2015; Byul. № 23, 6.
7. Golovenko, M. Ya., Gromov, L. O. (2003). Pre-clinical specific activity study of potential antiepileptic drugs. Kyiv: Avicenna, 26.
8. Mironov, A. N., Bunyatyan, N. D., Vasil'eva, A. N. et. al (Eds.) (2012). Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicine. Part I. Moscow: Grif and C, 944.
9. Marangos, P. J., Martino, A. M., Paul, S. M., Skolnick, P. (1981). The benzodiazepines and inosine antagonize caffeine-induced seizures. *Psychopharmacology*, 72 (3), 269–273. doi: 10.1007/bf00431829
10. Shtrygol', S. Yu. (2007). Pharmacological effects modulation at different salt regimens. Kharkiv: Avista – VLT, 360.
11. Sylkina, I. V., Gan'shina, T. S., Seredenin, S. B., Virzoyan, R. S. (2005). GABAergic mechanism of cerebrovascular and neuroprotective effects of afobazole and picamilon. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 68 (1), 20–24.
12. Newland, C. F., Cull-Candy, S. G. (1992). On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *The Journal of Physiology*, 447 (1), 191–213. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp018998
13. De Deyn, P. P., D'Hooge, R., Marescau, B., Pei, Y.-Q. (1992). Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research*, 12 (2), 87–110. doi: 10.1016/0920-1211(92)90030-w

Дата надходження рукопису 17.04.2016

Каврайський Дмитро Павлович, аспірант, кафедра фармакології та лікарської токсикології, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: kavraiskiy@gmail.com

Штриголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра фармакології та лікарської токсикології, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: shtrygol@mail.ru

Георгіянц Вікторія Акопівна, доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра фармацевтичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: farmchem@ukrfa.kharkov.ua

Северіна Ганна Іванівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра фармацевтичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: severina.anna@rambler.ru