

Пошук речовин з антигістамінною активністю в ряду похідних імідазо[1,2-а]піразину

О.О.Завада, О.Ю.Кошева, І.О.Журавель, Л.В.Яковлева

Національний фармацевтичний університет України
Харків, Україна

З використанням експертного програмного продукту PASS проведено профілювання біологічної активності ряду синтетично доступних похідних імідазо[1,2-а]піразину. Здійснено синтез 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-а]піразину, будову якого доведено за допомогою спектральних методів досліджень. Досліджено антигістамінну дію синтезованої речовини за допомогою тесту «офтальморекція».

Ключові слова: імідазо[1,2-а]піразини, протиалергійна активність, антигістамінна дія.

ВСТУП

В останні десятиліття у світі спостерігається прогресуюче зростання різних видів алергічної патології. Алергія перетворилася на глобальну медико-соціальну проблему сучасного суспільства. На сьогодні відомо більше 20 000 алергенів, їх кількість продовжує зростати, саме це змушує розцінювати ситуацію як епідемічну.

В арсеналі сучасної фармакології існує велика кількість препаратів, що дозволяють контролювати алергічний процес. Особливе місце серед них займають антигістамінні засоби – блокатори рецепторів гістаміну. У даний час розрізняють три підгрупи гістамінових рецепторів: H_1 -, H_2 - і H_3 -рецептори. У клінічній практиці широке застосування знаходять у першу чергу H_1 - та H_2 -блокатори. Слід зазначити, що більша частина сучасних антигістамінних препаратів мають різноманітні побічні ефекти, які обмежують їх використання. З іншого боку, у зв'язку з необхідністю тривалого застосування протиалергічних засобів поряд з ефективністю та безпекою цих препаратів, ве-

ликого значення набуває їх ціна та доступність для пацієнтів. Моніторинг українського фармацевтичного ринку показав, що все більш актуальним постає питання створення вітчизняних лікарських засобів цієї групи.

Враховуючи вищенаведене, наша робота була спрямована на пошук хімічних сполук, яким притаманна антигістамінна дія.

Метою дослідження було вивчення біологічної активності нових сполук в ряду конденсованих похідних імідазолу, отриманих цілеспрямованим синтезом, як потенційних антигістамінних засобів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

За результатами комп'ютерного прогнозування похідних імідазо[1,2-а]піразину з використанням експертного програмного продукту PASS для проведення біологічного скринінгу нами обрано 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-а]піразин **5**, який отримували реакцією каталітичного відновлення 2,3-диметилімідазо[1,2-а]піразину **4** в присутності Pd(C). Будову продукту доведено за допомогою спектральних методів досліджень. Визначення антигістамінної дії 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-а]піразину **5** проводили на мурчаках світлої масті за допомогою тесту «офтальморекція» [1] на базі Центральної науково-дослідницької лабораторії НФаУ під керівництвом проф. Л.В.Яковлевої. Принцип методу полягає у здатності гістаміну швидко підвищувати проникність стінок капілярних судин та викликати, таким чином, обмежений набряк у місці введення. Закапування в око тварині 1 краплі 2% водного розчину солянокислого гістаміну через 2-3 хв. призводить до розвитку набряку кон'юнктиви та повік (хемоз). Максимальний набряк реєструється через 10-15 хв. Дослід і контроль ставили на одній тварині (контрольна реакція на одному оці,

в інше око проводиться повторне закапування гістаміну після введення тварині засобу, що досліджується), що усуває залежність результатів досліду від реактивності тварин на гістамін. Досліджувану речовину вводили в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг і 20 мг/кг перорально у вигляді водного розчину. Ступінь хемозу оцінювали за бальною системою: виражений набряк ока та гіперемія – 3 бали; середній набряк ока та гіперемія – 2 бали; набряк ока легкого ступеня та гіперемія – 1 бал.

Отримані експериментальні дані виражали в квартилях (Me (Q25;Q75) та обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica 6,0». Для отримання статистичних висновків застосовували критерій Манна-Уїтні (для даних, які не підлягають нормальному закону розподілення) [2-4]. При порівнянні статистичних виборок був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$.

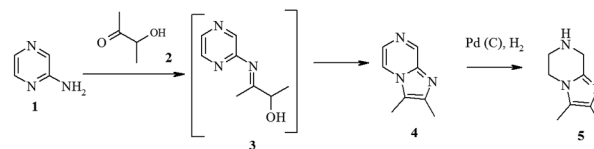
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Профілювання біологічної дії похідних імідазо[1,2-а]піразину. Для пошуку та цілеспрямованого синтезу сполук з певними характеристиками існує декілька підходів: тотальний скринінг, метод модифікації та віртуальний скринінг [6, 7, 11]. Одним із найбільш успішних та ефективних шляхів вирішення проблеми раціонального драг-дизайну є комп'ютерне прогнозування різноманітних властивостей хімічних сполук, яке на даному етапі розвитку органічної хімії можна вважати прикладним інструментом при плануванні експерименту. Метод віртуального скринінгу заснований на математичних моделях, що дозволяють встановлювати зв'язок між будовою молекул та їх біологічною дією, а також теоретично оцінювати комплекс

властивостей хімічних сполук ще на стадії тестування [5, 12]. Для визначення загального «біологічного потенціалу» молекули була створена комп'ютерна програма PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), яка дає можливість прогнозувати фармакологічні ефекти, механізми дії та специфічну токсичність сполуки [10]. PASS забезпечує прогнозування всього спектра активності сполуки, включаючи як основну дію, так і можливі побічні ефекти на відміну від інших методів аналізу зв'язку «структура – активність». Для програми PASS середня точність прогнозу в умовах змінного контролю складає близько 85%, що цілком достатньо для її застосування на практиці.

У межах пошуку нових сполук, що мають протиалергійну активність, була сформована база даних, що складається з 30 хімічних сполук. Після цього був виконаний загальний прогноз біологічної активності. Прогнозування біологічної активності отриманих нами нових гідрованих похідних імідазо[1,2-а]піразину за програмою PASS вказувало на високу вірогідність знаходження серед цього класу сполук речовин із протиалергійною активністю: індекс Ра для цього типу активності становив 0,52-0,57. За результатами комп'ютерного прогнозування для проведення біологічного скринінгу нами обрано 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-а]піразин.

Синтез 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-а]піразину здійснювали за наступною схемою:



У лабораторії органічного синтезу НФаУ було досліджено різні шляхи синтезу похідних імідазо[1,2-а]піразину [8, 9]. Для отримання

ТАБЛИЦЯ 1

Визначення антигістамінної активності сполуки 5 у тесті «офтальморекція» на мурчаках (Me (LQ; UpQ))

Групи тварин	Доза, мг/кг	Кількість тварин	Вираженість офтальморекції в балах
1	2	3	4
Негативний контроль	–	4	3 (2; 3)
Таблетки «Кларитин»	1,0	4	0,5 (0,25; 0,75) *
Сполука 5	5,0	4	0,25 (0; 0,5) *
	10,0	3	0,5 (0; 1) *
	15,0	3	0,5 (0; 1) *
	20,0	3	1 (0,5; 1) */**

Примітки: * – відмінності достовірні щодо негативного контролю; ** – відмінності достовірні щодо сполуки 5 у дозі 5 мг/кг.

2,3-диметилімідазо[1,2-*a*]піразину **4** нами реалізована схема з використанням реакції 2-амінопіразину **1** з 3-гідроксибутаном **2**. Реакцію проводили в кислому середовищі в атмосфері аргону. Реакційну суміш кип'ятили протягом 15 годин та отримували цільову сполуку. Утворення аннелюваної імідазо[1,2-*a*]піразинової структури підтверджено даними елементного аналізу, ^1H - та ^{13}C -ЯМР-спектроскопії. Відновлення воднем імідазо[1,2-*a*]піразину **4** у середовищі метанолу в присутності Pd(C) було синтезовано 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-*a*]піразин **5**, який не потребував додаткової очистки.

*Вивчення антигістамінної дії 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-*a*]піразину.*

З метою скринінгового вивчення антигістамінної дії сполуки 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-*a*]піразину **5** було проведено тест «офтальморекція на введення гістаміну», що дозволило визначити оптимальну дозу й обумовило подальше вивчення субстанції в цій дозі.

Як показали проведені дослідження, у тварин із групи негативного контролю закапування гістаміну в око призводило до розвитку хемозу: спостерігали виражений набряк кон'юнктиви та повік. Вже на 10-15-й хв. реакція посилювалася: набряк супроводжувався сильною сльозотечею, гіперемією кон'юнктиви і повік. Максимальний розвиток запальної реакції ока, яка тривала 1 год., спостерігали через 10-15 хв. після введення гістаміну. Вираженість реакції була оцінена в 2-3 бали (табл. 1).

Введення досліджуваної речовини у дозах 5-20 мг/кг сприяло пригніченню ефектів гістаміну. Найбільшу активність встановлено при застосуванні засобу у дозі 5 мг/кг: у 2 тварин з 4 офтальморекція оцінена в 0 балів, в останніх — в 0,5 балів, що свідчить про високу активність засобу в цій дозі. Меншу активність засіб виявив при застосуванні в дозі 20 мг/кг — офтальморекція у тварин цієї групи оцінена в 0,5-1 бал (табл. 1). Подальшого розвитку запального процесу не спостерігали. Вже після 30 хв. спостереження у тварин, яким вводили досліджуваний засіб всі явища офтальмічної реакції зникали. Отримані дані вказують на дозозалежний ефект досліджуваного засобу: з підвищенням дози ефект зменшується. Проте слід зазначити, що досліджуваний засіб виявив виразну антигістамінну дію навіть у дозі 20 мг/кг, знижуючи виразність реакції на гістамін на 67%.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методики та здійснено синтез 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-*a*]піразину; за допомогою методів ^1H - та ^{13}C -ЯМР-спектроскопії доведено структуру проміжних та кінцевого продуктів.

2. Доведено доцільність використання комп'ютерного прогнозування для вирішення проблеми раціонального драг-дизайну.

3. На моделі «офтальморекція на введення гістаміну» встановлено дозозалежний ефект 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагідроімідазо[1,2-*a*]піразину, який у дозі 5 мг/кг виявляє максимальну активність, практично повністю усуваючи офтальмічні ефекти гістаміну, що свідчить про його виражену антигістамінну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований / Под ред. Н.В.Лазарева — Гос. изд-во мед. лит-ры: МЕДГИЗ, ленинградское отделение, 1954. — 152 с.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel, 2001. — Моріон. — 320 с.
3. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-354.
4. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник. — М.: ООО Бином-Пресс, 2007. — 512 с.
5. Вцћm Н.-J. Virtual screening for bioactive molecules / Н.-J.Вцћm, G.Schneider. — Weinheim: Wiley-VCH, 2000.
6. Kubinyi. H. History and development of QSAR: Methods and principles in medicinal chemistry. — Weinheim: VCH, 1993. — P. 4-7.
7. Leach A.R. The in silico world of virtual libraries / A.R.Leach, M.M.Hann // Drug Disc. Today. — 2000. — Vol. 5. — №8. — P. 326-336
8. Pat. DE 2950291 FRG, C07D 417/04. Neue Cumarinverbindungen und Verfahren zur Herstellung von Cumarinverbindungen / H.Hagen, R.-D.Kohler; BASF AG.— №P 2950291.8; Anmel. 14.12.1979; Offen. 19.06.1981.
9. Pat. EP1970376 (A1), 17. 09.2008., K.Hee-Yeon, Y.Seung-Gak, Sh.Jung-Han, L.Chang-Ho, K.Hee-Joo.
10. Pat. US 2004/220189 (A1), 04.11.2004.,C.L. Sun; L.Congxin, H.Ping, H.G.Davis, G.Huiping.
11. Stahura F.L. Virtual screening methods that complement HTS / F.L.Stahura, J.Bajorath // Comb. Chem. High. Throughput Screen. — 2004. — Vol. 7. — №4. — P. 259-269.
12. Walters W.P. Virtual screening — an overview / W.P.Walters, M.T.Stahl, M.A.Murcko // Drug Disc. Today. — 1998. — Vol. 3. — P. 160-178.

О.А.Завада, Е.Ю.Кошечая, И.А.Журавель, Л.В.Яковлева. Поиск веществ с антигистаминной активностью в ряду производных имидазо[1,2-а]пиразина. Харьков, Украина.

Ключевые слова: имидазо[1,2-а]пиразин, противоаллергическая активность, антигистаминное действие.

С использованием экспертного программного продукта PASS проведено профилирование биологической активности ряда синтетически доступных производных имидазо[1,2-а]пиразина. Осуществлен синтез 2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагидроимидазо[1,2-а]пиразина, строение которого доказано с помощью спектральных методов исследований. Исследовано антигистаминное действие синтезированного вещества с помощью теста «офтальморреакция».

O.O.Zavada, E.J.Koshevaya, I.O.Zhuravel, L.V.Yakovleva. Search for substances with antihistamine activity in the series of imidazo[1,2-a]pyrazine. Kharkiv, Ukraine.

Key words: imidazo[1,2-a]pyrazine, antiallergic activity, antihistamine effect.

The spectra of biological activity of a number of synthetically available imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives was predicted with PASS expert software. The synthesis of 2,3-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyrazine was carried out and its structure was confirmed by spectral methods of analysis. An antihistamine effect of the substances obtained was studied with the «ophthalmo-reaction» test.

Надійшла до редакції 14.08.2012 р.