

С. В. Холодняк, Н. В. Бухтіярова, К. П. Шабельник,
Г. Г. Берест, І. Ф. Бєленічев, С. І. Коваленко

Спрямований пошук протисудомних агентів серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4] тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим фрагментом

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: спіропохідні, 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліни, коразолові судоми, коразоловий кіндлінг, протисудомна активність, нейропротекція

Дослідження останніх років в області біоорганічної, біологічної та медичної хімії сприяли прогресу в розумінні більшості молекулярних механізмів дії протисудомних засобів. Так, сьогодні синтезовані та з успіхом застосовуються в медичній практиці препарати, які активують ГАМК-ергічну передачу (вальпроат натрію, вігабатрин, фенобарбітал та ін.), впливають на синтез та вивільнення збуджувальних амінокислот і чутливість до них рецепторів постсинаптичних мембран (ламотриджин та ін.), відновлюють властивості нейрональних мембран у епілептичному осередку в результаті збереження потенціалу спокою, блокують натрієві канали, пригнічують автоматизм нейронів у синаптичному осередку, знижують енергетичний обмін нейронів (дифеніл, карбамазепін та ін.) [1–3]. Виходячи з цього, для ефективного лікування хворого надзвичайно важливою умовою є відповідність механізму дії протисудомних засобів особливостям патогенезу епілепсії в кожному окремому випадку. Необхідність безперервної фармакокорекції зазначених станів та наявність значних побічних ефектів у існуючих протисудомних препаратів спонукає дослідників постійно розширювати їх арсенал [2, 3].

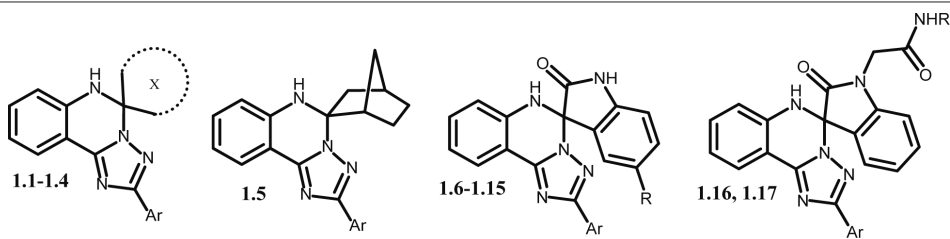
Останнім часом виявлено, що гетероциклічні системи, сполучені С α -С α -зв'язками з іншими циклічними фрагментами (спіропохідні), мають аффіність до аденозинових, ГАМК-, м-холіно- та Н₁-гістамінових, глутамінових рецепторів і, як наслідок, проявляють проти-

судомну активність [4–9]. Подібні структурні фрагменти наявні в уперше синтезованих спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом.

Мета дослідження – первинний скринінг протисудомної активності спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом на моделі коразолових судом та подальше дослідження «сполук-лідерів» на експериментальній моделі хронічного судомного синдрому.

Матеріали та методи. Для дослідження протисудомної активності використані нові спіропохідні з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом (1.1–1.16), які синтезовані на кафедрі органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри професор С. І. Коваленко) [10]. Принципову будову зазначених сполук наведено на рисунку 1.

Для первинної оцінки протисудомної дії синтезованих сполук використано 120 білих безпородних щурів вагою 150–160 г, які отримані з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Тривалість карантину тварин складала 14 днів. Протягом даного періоду щодобово спостерігали за поведінкою та загальним станом тварин, двічі на 1 день тварин спостерігали в клітках (захворюваність та смертність). Клітки з тваринами розміщені в окремих кімнатах, світловий режим – 12 год. Температуру повітря підтримували в інтервалі 19–25 °С, відносну вологість – 50–70 %. Температуру та вологість повітря реєстрували щоденно. Режим вентиляції – 15 об'ємів повітря приміщення за 1 год. Тварини знаходились у стандартних клітках (400 × 320 × 160 мм), по 6 у кожній.



- 1.1 Ar=C₆H₅, X=cyclopentyl; 1.2 Ar=C₆H₅, X=cyclohexyl; 1.3 Ar=C₆H₅, X=2',3',5',6'-tetrahydropyran-4-yl;
 1.4 Ar=C₆H₅, X=1-methylpiperidine-4-yl; 1.5 Ar=C₆H₅; 1.6 Ar=C₆H₅, R=H; 1.7 Ar=C₆H₄, R=Cl;
 1.8 Ar=C₆H₄, R=Br; 1.9 Ar=4-FC₆H₅, R=H; 1.10 Ar=4-FC₆H₄, R=Cl; 1.11 Ar=4-FC₆H₄, R=Br;
 1.12 Ar=2-CH₃OC₆H₅, R=H; 1.13 Ar=2-CH₃OC₆H₄, R=Cl; 1.14 Ar=2-CH₃OC₆H₄, R=Br;
 1.15 Ar=4-BrC₆H₄, R=Br; 1.16 Ar=3-FC₆H₄, R=3-CH₃OC₆H₄CH₂-; 1.17 Ar=4-CH₃OC₆H₄, R=4-CH₃OC₆H₄

Рис. 1. Принципова будова спірооксіндових з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом (1.1–1.16).

Раціон харчування – фуражне зерно, хліб, коренеплоди (бурак, морква) [13, 14]. Перед початком дослідження тварини, які відповідали критеріям включення в експеримент, були розподілені на групи методом рандомізації [12]. Тварини, що не відповідали критеріям, були виключені з експерименту протягом карантину. Маніпуляції провели згідно з вимогами щодо використання тварин у біомедичних дослідках [11]. Судомний стан у тварин моделювали шляхом одноразового підшкірного введення коразолу (пентилентетразол, виробник «Ніжфарм», Російська Федерація) у дозі 80 мг/кг на 0,9 % розчині натрію хлориду. Судомну дію оцінювали за характером, тривалістю латентного періоду судом (хв), а також за показником летальності. Інтенсивність судомного нападу оцінювали за допомогою 5-бальної шкали: 0 – відсутність судомної активності; 1 – гіперкінезія; 2 – тремор; 3 – клонічні судоми передніх кінцівок з підйомом на задні кінцівки; 4 – виражені тоніко-клонічні судоми, завалювання тварини на бік, наявність фази тонічної екстензії; 5 – повторні клоніко-тонічні судоми, втрата пози та загибель тварини [15–17].

Досліджувані сполуки вводили тваринам одноразово, внутрішньошлунково за допомогою металічного зонда в дозі 10 мг/кг у вигляді водної суспензії (стабілізатор Твін-80) за 1 год до введення конвульсанта. Як референт-препарат використовували ламотриджин – блокатор NMDA-підтипу глутамінових рецепторів. Ламотриджин вводили аналогічно досліджуваним сполукам. Тварини

контрольної групи одержували аналогічний об'єм води з Твіном-80, внутрішньошлунково. Кожну експериментальну групу формували з 6 тварин.

Оцінку активності «сполук-лідерів» проводили на експериментальній моделі хронічного судомного синдрому (ХСС) – коразоловий кіндлінг [17–19]. ХСС формували 6-разовим внутрішньочеревинним (в/о) введенням коразолу (виробник «Ніжфарм», Російська Федерація) у дозі 40 мг/кг на 0,9 % розчині натрію хлориду з інтервалом 48 год. ХСС – адекватна та найчастіше використовувана модель, яка подібна до клінічного стану хворих на епілепсію. Досліджувані сполуки та препарати порівняння вводили профілактично 1 раз на добу внутрішньошлунково за 60 хв до введення коразолу у дозах: сполуки 1.6 та 1.11 – 10 мг/кг, ламотриджин – 50 мг/кг, карбамазепін – 125 мг/кг. Кожну експериментальну групу формували з 10 тварин.

Наприкінці дослідження тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під тіопенталовим наркозом (доза 40 мг/кг) [16]. Тканини головного мозку гомогенізували на холоді в ізотонічному розчині (0,15 моль/л KCl) за температури +4 °С, з використанням скляного гомогенізатора, співвідношення тканина : ізотонічний розчин 1:20. Мітохондріальну та цитозольну фракції розділяли методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» (Германія) за температури +4 °С у 10-разовому об'ємі середовища, яке вміщує 250 ммоль сахарози, 20 ммоль трис-НСl-буфера,

1,0 ммоль ЕДТА (рН 7,4). Попередньо проводили центрифугування протягом 7 хв при 1000 g, а супернатант додатково центрифугували – 20 хв при 17000g [22].

Біохімічні дослідження проводили в цитозольній фракції гомогенату головного мозку тварин. Уміст тіольних груп (SH-груп) у біологічному матеріалі визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіо-біс-7-нітробензойною кислотою [20, 22]. Активність глутатіонредуктази (ГР) визначали за методикою в тесті з окисненим глутатионом [20]. Відновлений та окиснений глутатіон визначали флюориметрично по реакції з фталевим ангідридом [21]. Показники окисної модифікації білка (ОМБ) визначали за методом В. Halliwell, що базується на взаємодії окиснених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразиним (2,4-ДНФГ) [22]. Утворені альдегідфенілгідрозони (АФГ) та карбоксилфенілгідрозони (КФГ) визначали спектрофотометрично при довжинах хвиль 274 нм та 363 нм відповідно. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів у реакції Грісса, активність NOS – флюориметрично, за різницею швидкості окиснення NADPH у двох паралельних зразках, у один з яких додавали інгібітор NOS – N-нітро-L- аргінін [22].

Результати дослідження оброблені за допомогою статистичного пакета програм «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Kolmogorov-Smirnov (D) та Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). У випадку розподілення, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували U. Mann-Whitney для двох не пов'язаних вибірок та для більшого числа вибірок – критерій Kruskal-Wallis H з подальшим порівнянням за Games-Howell. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць зв'язаності. Дані представлені у вигляді арифметичної та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінними проводили, використовуючи процедуру бінарного регресійно-

го аналізу. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при рівні значущості не менше ніж 0,05 [23].

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що введення коразолу призводило до розвитку епілептоподібних судом з вираженою тоніко-клонічною фазою, що завершувалася 100 % летальністю тварин. Так, у контрольній групі латентний період судом склав у середньому 6,22 хв, а тривалість тоніко-клонічних нападів – 7,87 хв. Судомний синдром, що розвивався у тварин цієї групи, мав виражені тоніко-клонічні напади, які періодично повторювались, була присутня чітко виражена фаза тонічної екстензії (опісготонус). Уведення досліджуваних сполук призводило до достовірного збільшення латентного періоду судом, зниження тривалості клоніко-тонічної фази, інтенсивності судом у балах та зменшення летальності. Так, введення тваринам 2-феніл-6H-спіро[циклопентан-5,1'-[1,2,4]тріазоло[1,5-c]хіназоліну] (**1.1**) призводило до збільшення латентного періоду судом на 34,88 хв та зменшення тривалості клоніко-тонічних судом на 3,65 хв (табл. 1). Важливо, що розширення спіроциклу до циклогексанового (сполука **1.2**), його заміна на тетрагідропірановий (**1.3**) або 1-метилпіперидиновий (**1.4**) цикли призводить до суттєвої втрати протисудомної активності, яка виражається в зменшенні латентного періоду, збільшенні тривалості клоніко-тонічної фази та летальності експериментальних тварин порівняно зі сполукою **1.1** (табл. 1). Крім того, при введенні сполук **1.2** та **1.4** у тварин спостерігали деякі прояви судомного стану, а саме: тремтіння, стрибки, тонічні скорочення передніх кінцівок.

Заміна вищезазначених спіросполучених циклічних фрагментів у положенні 5 [1,2,4]тріазоло[1,5-c]хіназоліну на біцикло[2.2.1]гептан (**1.5**) призводила до позитивних змін, а саме: до збільшення латентного періоду в 4,9 рази, зменшення тривалості клоніко-тонічної фази в 2,8 рази та летальності на 70 % порівняно з контролем.

Протисудомна активність досліджуваних сполук, $M \pm t$ ($n = 6$)

Групи тварин (шифр сполуки)	Латентний період судом, хв	Тривалість клоніко-тонічної фази судом, хв	Летальність, %	Активність судомних нападів, бал
Контроль	6,22 ± 0,62	7,88 ± 0,77	100	7,30 ± 0,55
1.1	41,10 ± 3,20*	4,23 ± 0,32*	30*	4,70 ± 0,46*
1.2	22,70 ± 5,50*	7,70 ± 2,50	50*	5,71 ± 0,42
1.3	14,10 ± 1,20*	4,88 ± 1,70	70*	5,00 ± 0,32
1.4	16,30 ± 3,50*	8,70 ± 2,50	50*	5,71 ± 0,42
1.5	30,50 ± 5,30*	2,85 ± 0,51*	30*	4,20 ± 0,33*
1.6	33,10 ± 2,10*	2,32 ± 0,42*	10*	3,40 ± 0,67*
1.7	18,70 ± 1,20*	8,33 ± 1,30	70*	5,22 ± 0,67
1.8	17,70 ± 1,60*	6,70 ± 1,80	80*	6,12 ± 0,54
1.9	21,50 ± 1,20*	6,30 ± 1,00	60*	5,33 ± 0,45
1.10	19,30 ± 1,10*	5,70 ± 1,50	50*	5,22 ± 0,22
1.11	48,30 ± 5,80*	2,70 ± 0,52*	40*	2,65 ± 0,23*
1.12	23,20 ± 1,20*	4,71 ± 0,33	60*	5,77 ± 0,12
1.13	27,30 ± 6,30*	4,34 ± 0,33*	50*	5,10 ± 0,37*
1.14	22,30 ± 1,30*	5,65 ± 0,44*	50*	5,22 ± 0,33
1.15	45,80 ± 1,10*	2,70 ± 0,50*	40*	4,22 ± 0,22*
1.16	38,10 ± 4,70*	4,11 ± 0,55*	50*	5,40 ± 0,51
1.17	19,70 ± 1,00*	5,00 ± 2,10	80*	5,88 ± 0,51
Ламотриджин	31,20 ± 1,70*	2,77 ± 0,67*	20*	3,50 ± 0,75*

Примітка. *Відмінності достовірні ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою щурів.

Більш перспективними сполуками з протисудомною дією є похідні 2-арил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліну спіро-сполучені з індольним циклом (1.6-1.17). 2'-Феніл-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (1.6) достовірно зменшував летальність тварин до 90 % і, що важливо, скорочував тривалість клоніко-тонічної фази в 3,4 разу порівняно з контролем (табл. 1). Найвдалішою хімічною модифікацією сполуки 1.6, виявилася модифікація, яка передбачала одночасну заміну фенільного замісника 2 положення на 4-флуорофенільний та додаткове введення бромів до 5 положення індольного циклу (1.11). Так, застосування сполуки 1.11 збільшувало латентний період у 7,7 разу, зменшувало тривалість клоніко-тонічної фази в 2,9 разу та летальність на 60 % порівняно з контролем (табл. 1). Заміна 4-флуорофенільного (1.11) на 4-бромо-

фенільний (1.15) замісник не призводить до втрати протисудомної активності, але в тварин зберігається незначна судомна активність (тремор, судоми кінцівок).

Вдалою також виявилася модифікація сполуки 1.6 шляхом введення 3-метоксibenзилацетамідного залишку (1.16) за атомом азоту індольного циклу. Сполука 1.16, на тлі позитивної дії на судоми, поступається сполуці 1.6 за впливом на тривалість клоніко-тонічної фази та латентного періоду. Подальша модифікація молекули сполуки 1.6 шляхом введення галогенів (хлору або бромів) у положення 5 індольного фрагмента, заміщених арильних замісників до 2 положення тріазоло[1,5-с]хіназолінового циклу не призвела до посилення активності, сполуки 1.7–1.10, 1.12–1.14 та 1.17 помірно пригнічували судоми, поступаючись препаратом-порівняння Ламотриджину.

Отже, серед досліджених спіросполук з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]-тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом найактивніше впливали на картину судом сполуки **1.6** та **1.11**, які за силою дії перевищують ефект ламотриджину. Зазначені сполуки в подальшому були досліджені на моделі коразолового кіндлінгу.

Моделювання коразолового кіндлінгу призводить до значного збільшення активності NO-синтази та продукції стабільних метаболітів NO на тлі дефіциту тиольних сполук – сумарних відновлених тиолів та відновленого глутатіону в головному мозку (табл. 2). Крім того, у головному мозку суттєво знижується активність ГР і, як наслідок, підвищується вміст глутатіону окисненого. Такі зміни в системі NO/відновлені тиоли призводять до зниження біодоступності NO і його перетворення в пероксинітрил (ONOO^-) та інші цитотоксичні деривати (NO^+ , NO^- , N_2O_3). Це сприяє активації оксидативного стресу, про що свідчить підвищення вмісту маркерів окисної модифікації білка (АФГ та КФГ) у цитозольній фракції гомогенату головного мозку.

Профілактичне 11-добове застосування тваринам, паралельно моделюванню ХСС, сполук **1.6** і, особливо, **1.11**, при-

зводить до зниження активності NO-синтази та продукції стабільних метаболітів NO у цитозолі головного мозку (табл. 2). Важливо, що більш виражено на показники системи оксиду азоту впливає сполука **1.11**, яка за ефективністю достовірно перевищує референс-препарати Ламотриджин та Карбамазепін. Зниження активності NO-синтази під дією синтезованих сполук і Ламотриджину призводить до гальмування реакцій оксидативного стресу, що проявляється в зменшенні вмісту продуктів окисної модифікації білка (АФГ і КФГ) у цитозольній фракції головного мозку експериментальних тварин. За ступенем зниження маркерів ОМБ сполуки **1.6**, **1.11** та лікарські засоби можна розташувати в наступній послідовності: **1.6–1.11** – Ламотриджин – Карбамазепін.

Висока активність досліджуваних сполук, особливо **1.11** та Ламотриджину щодо гальмування реакцій оксидативного стресу за умов ХСС пов'язана не тільки з пригніченням активності NO-синтази (табл. 2), але й з підвищенням активності тиол-дисульфідної системи (табл. 3). Так, профілактичне введення зазначених сполук забезпечило збереження відновлених еквівалентів тиол-дисульфідної системи на тлі

Таблиця 2

Маркери оксидативного стресу у головному мозку експериментальних тварин за хронічного судомного синдрому та впливу досліджуваних сполук, $M \pm m$ (n = 10)

Група тварин	Уміст продуктів окисної модифікації білка, у. о./г білка		Уміст метаболітів оксиду азоту (NO_2), мкмоль/г	Активність NO-синтази, нмоль/мг білка · хв
	АФГ	КФГ		
Інтактні тварини	0,37 ± 0,02	0,170 ± 0,020	4,84 ± 0,83	2,41 ± 0,37
Хронічний судомний синдром (контроль)	0,61 ± 0,05	0,350 ± 0,020	17,40 ± 1,20	6,12 ± 0,51
Хронічний судомний синдром + 1.6	0,41 ± 0,02	0,250 ± 0,030*	11,70 ± 0,72*	4,43 ± 0,41*
Хронічний судомний синдром + 1.11	0,38 ± 0,03*	0,190 ± 0,020*	8,67 ± 0,63*	2,43 ± 0,21*
Хронічний судомний синдром + ламотриджин	0,47 ± 0,03*	0,250 ± 0,015*	15,80 ± 1,50*	4,71 ± 0,35*
Хронічний судомний синдром + карбамазепін	0,57 ± 0,07	0,310 ± 0,040	16,40 ± 1,10	5,92 ± 0,73

Примітка. Тут і в табл. 3: *достовірність відносно тварин контрольної групи ($p < 0,05$).

Показники тіол-дисульфідної системи головного мозку експериментальних тварин за хронічного судомного синдрому та впливу досліджуваних сполук, $M \pm t$

Група тварин	Уміст SH-груп, мкмоль/г тканини	Активність глутатіон-редуктази, мкмоль/мг білка · хв	Уміст глутатіону відновленого, мкмоль/г тканини	Уміст глутатіону окисненого, мкмоль/г тканини
Інтактні тварини	57,30 ± 2,80	14,50 ± 0,82	4,73 ± 0,23	0,033 ± 0,008
Хронічний судомний синдром (контроль)	38,40 ± 1,62	8,20 ± 0,64	2,12 ± 0,11	0,056 ± 0,002
Хронічний судомний синдром + 1.6	43,20 ± 2,11*	11,70 ± 0,51*	3,11 ± 0,22*	0,032 ± 0,005*
Хронічний судомний синдром + 1.11	52,10 ± 3,17*	16,20 ± 0,73*	3,82 ± 0,31*	0,034 ± 0,001*
Хронічний судомний синдром + ламотриджин	48,60 ± 2,18*	13,50 ± 0,68*	3,14 ± 0,22*	0,035 ± 0,005*
Хронічний судомний синдром + карбамазепін	40,70 ± 4,11	7,30 ± 0,64	2,00 ± 0,33	0,057 ± 0,002

підвищення активності ГР порівняно з контрольною групою тварин. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи (загальні тіоли, глутатіон) суттєво обмежують цитотоксичність NO і його дериватів, тим самим збільшують шанси нейрону вижити в екстремальних умовах. Карбамазепін не впливає на показники тіол-дисульфідної системи головного мозку щурів з ХСС.

Нейропротективна дія сполук **1.6** та **1.11** при ХСС може бути пояснена антиоксидантним механізмом дії. Так показано, що антиоксидантна дія сполук **1.6** та **1.11** реалізується шляхом підвищення активності глутатіон-залежних ферментів і вмісту відновлених тіолів (табл. 3). Зазначений ефект запобігає пошкодженню нейронів продуктами оксидативного стресу за умов ХСС, а також нормалізує біодоступність NO.

Отже, нами вперше виявлена висока противосудомна активність спіропохідних 2'-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолінів і встановлено, що на моделі коразолового кіндлінгу досліджувані сполуки **1.6** та **1.11** переважа-

ють за дією найчастіше застосовуваний в епілептології лікарський засіб Карбамазепін. Крім того, сполука **1.11** перевищує, а **1.6** має співставиму активність з антиконвульсантом останнього покоління Ламотриджином.

Висновки

- Уперше виявлено, що спіропохідні з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]-тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом проявляють високу протисудомну активність; сполуки **1.6** та **1.11** у дозі 10 мг/кг на моделі коразолових судом ефективно збільшують латентний період судом у 5,3 та 7,7 разу, зменшують тривалість клоніко-тонічної фази в 2,9 та 3,3 разу та летальність експериментальних тварин на 60 та 90 % відповідно.
- На моделі коразолового кіндлінгу «сполуки-лідери» **1.6** та **1.11** переважають за дією найзастосовуваніший в епілептології лікарський засіб Карбамазепін, а сполука **1.11** перевищує за дією антиконвульсант останнього покоління Ламотриджин.

- Нейропротекція і нейропластичність / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
- Беленичев І. Ф. Рациональне застосування антиконвульсантів для лікування больового синдрому в умовах еквівалентів епілепсії / Беленичев І. Ф., Опришко В. І., Носівець Д. С. // Інформаційний лист №328-2014: Протокол від 29.10.2014 № 5. – Київ, 2015. – 4 с.

3. Löscher W. New horizons in the development of antiepileptic drugs / Löscher W., Schmidt D. // *Epilepsy Res.* – 2002. – V. 50. – № 1–2. – P. 3–16.
4. Pat. WO 2007/047496 A2. Acylated spiro-piperidine derivatives as melanocortin-4 receptor modulators / Bakshi R.K., Dellufreicio J.P., Dobbelaar P.H. at all.; – Merck&CO, INC. (US); Filed: 18.10.2006; Posted: 26.04.2007.
5. Pat. WO 2013/107743 A1. Spiroindoline derivatives as gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists / Panknin O., Baurle S., Ring S. at all; – Bayer Intellectual property GMBH (DE); Filed: 15.01.2013; Posted: 16.01.2012.
6. Vinod G. Ugale. Quinazolines: new horizons in anticonvulsant therapy / Vinod G. Ugale, Sanjay B. Bari // *European Journal of Medical Chemistry.* – 2014. – V. 80. – P. 447–501. doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.072
7. Vikas Sharma. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review / Vikas Sharma, Pradep Kumar, Devender Pathak // *J. Heterocyclic Chem.* – 2010. – V. 47. – P. 491–502. doi 10.1002/jhet
8. Biological activities of isatin and its derivatives / Surendra Nath Pandeya, Sivakumar Smitha, Mayank Jyoti, Seshaiyan Krishnan Sridhar // *Acta Pharm.* – 2005. – V. 55. – P. 27– 46.
9. Girija S. Singh. Isatins as privileged molecules in desing and synthesis of spiro-fused cyclic frameworks / Girija S. Singh, Zelalem Y. Desta // *Chemical Reviews.* – 2012. – V. 112. – P. 6104-6155. dx.doi.org/10.1021/cr300135y
10. Позитивне рішення на патент (UA), МПК 2015.01, А61К 31/00. Заміщені 2'-алкіл-(циклоалкіл-, аралкіл-, арил-, гетарил-)-'Н-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1Н)-они, що проявляють протисудомну дію // Холодняк С. В., Шабельник К. П., Коваленко С. І. та ін.; - власник Запорізький державний медичний університет, Коваленко С. І. – № у 2015 05938; Заявл. 16.06.2015; Поз. рішення про видачу №18886/ЗУ/15 від 27.10.2015.
11. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
12. Наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 «Порядок проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів».
13. Науково-методичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ : Авіцена, 2002. – 156 с.
14. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др.]. – Киев, 1983. – 383 с.
15. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – Москва, 2005. – 832 с.
16. Доклинические исследования лекарственных средств; за ред. А. В. Стефанова. – Киев : Авицена, 2002. – 568 с.
17. Головенко М. А. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: Методичні рекомендації / Головенко М. А., Громов Л. О. – Київ : ДФЦ МОЗ України, 2003. – 46 с.
18. Messenheimer J. A. Sprouting fibres gain access to circuitry transsynaptically altered by kindling / J. A. Messenheimer, E. W. Herris, O. Steward // *Exp. Neurol.* – 2009. – V. 64, № 4. – P. 469– 481.
19. Кругликов Р. И. Судорожная активность / Р. И. Кругликов, М. С. Мыслободский, В. Л. Эзрохи. – Москва : Наука, 1970. – 147 с.
20. Лабораторные исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. – Москва : Медицина, 1987. – 365 с.
21. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
22. Доклиническое изучение специфической активности нейропротективных препаратов: методические рекомендации ГЭЦ МЗ Украины (протокол от 31.07.2014 № 7) / Беленичев И. Ф., Чекман И. С., Громов Л. А. [и др.]. – Киев, 2014. – 60 с.
23. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. – Киев : Морион, 2001. – 408 с.

С. В. Холодняк, Н. В. Бухтіярова, К. П. Шабельник, Г. Г. Берест, І. Ф. Беленічев, С. І. Коваленко

Спрямований пошук протисудомних агентів серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим фрагментом

Серед різних форм патології нервової системи одне з провідних – третє місце – займають епілептичні розлади, ступінь розповсюдження яких має чітку тенденцію до зростання. До недавнього часу лікування епілепсії було спрямоване загалом на усунення нападів. Сьогодні інтенсивний пошук протисудомних засобів з вираженою нейропротективною дією ведеться серед модуляторів глутамінових та ГАМК рецепторів. Безперечний інтерес у цьому відношенні представляють анельовані похідні хіназоліну. *Мета дослідження* – первинний скринінг протисудомної активності серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом на

моделі коразолових судом, виявлення «сполуки-лідера» для подальшої оцінки протисудомної та нейропротективної дії за умов коразолового кіндлінгу.

Введення досліджуваних сполук білим безпородним щурам внутрішньошлунково в дозі 10 мг/кг за 1 год до введення коразолу (80 мг/кг) призводило до достовірного збільшення латентного періоду судом, зниження тривалості клоніко-тонічної фази, інтенсивності судом у балах та зменшення летальності. Найактивнішими виявилися 2'-феніл-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.6**) і 5-бромо-2'-(4-фторофеніл)-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.11**), які за протисудомною дією перевищують референс-препарат – Ламотриджин. Сполуки **1.6** та **1.11** при профілактичному 11-добовому введенні тваринам, паралельно моделюванню коразолового кіндлінгу, проявляють нейропротективну дію, яка перевищує ефект референс-препаратів – Ламотриджину та Карбамазепіну.

Нейропротективна дія сполук **1.6** та **1.11** при коразоловому кіндлінгу може бути пояснена їхнім антиоксидантним механізмом. Показано, що антиоксидантна дія сполук **1.6** і **1.11** реалізується шляхом підвищення активності глутатіон-залежних ферментів, умісту відновлених тиолів у головному мозку тварин на тлі моделювання коразолового кіндлінгу. Вказаний ефект запобігає ушкодженню нейронів продуктами оксидативного стресу в умовах коразолового кіндлінгу, а також нормалізує біодоступність NO.

Ключові слова: спіропохідні, 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліни, коразолові судоми, коразоловий кіндлінг, протисудомна активність, нейропротекція

С. В. Холодняк, Н. В. Бухтиярова, К. П. Шабельник, Г. Г. Берест, И. Ф. Беленичев, С. И. Коваленко

Направленный поиск противосудорожных агентов среди спиропроизводных с 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолиновым фрагментом

Среди многообразных форм патологии ЦНС одно из ведущих – третье место – занимают эпилептические расстройства, степень распространения которых имеет четкую тенденцию к росту. До недавнего времени лечение эпилепсии было направлено в основном на ликвидацию приступов. В настоящее время ведется интенсивный поиск противосудорожных средств с выраженным нейропротективным действием среди модуляторов глутаминовых и ГАМК-рецепторов. Несомненный интерес в этом плане представляют аннелированные производные хиназолина. *Цель работы* – проведение первичного скрининга противосудорожной активности среди спиропроизводных 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолина на модели коразоловых судорог, выявление «соединения-лидера» для последующей оценки противосудорожного и нейропротективного действия в условиях коразолового кіндлінгу.

Введение исследуемых соединений белым беспородным крысам внутрижелудочно в дозе 10 мг/кг за 1 час до введения коразола (80 мг/кг) приводило к достоверному увеличению латентного периода судорог, снижению продолжительности клонико-тонической фазы, интенсивности судорог в балах и уменьшению летальности. Наиболее активными оказались 2'-феніл-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.6**) і 5-бромо-2'-(4-фторофеніл)-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.11**), которые по противосудорожному действию превосходят референс-препарат – Ламотриджин. Соединения **1.6** и **1.11** при профилактическом 11-суточном введении животным, параллельно моделированию коразолового кіндлінгу, оказывают нейропротективное действие, превышающее эффект референс-препаратів – Ламотриджина и Карбамазепина.

Нейропротективное действие соединений **1.6** и **1.11** при коразоловом кіндлінгу может быть объяснено их антиоксидантным механизмом. Показано, что антиоксидантное действие соединений **1.6** и **1.11** реализуется путем повышения активности глутатион-зависимых ферментов и содержания восстановленных тиолов в головном мозге животных на фоне моделирования коразолового кіндлінгу. Указанный эффект предотвращает повреждение нейронов продуктами оксидативного стресса в условиях коразолового кіндлінгу, а также нормализует біодоступність NO.

Ключевые слова: спиропроизводные, 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліни, коразоловые судороги, коразоловый кіндлінг, противосудорожная активність, нейропротекція

S. V. Holodniak, N. V. Buchtiyarova, K. P. Shabelnik, G. G. Berest, I. F. Belenichev, S. I. Kovalenko

Targeted search of anticonvulsant agents among spiro-derivatives with 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline fragment

Epileptic disorders take one of the leading place among the diverse forms of CNS pathology and has a clear upward trend. Recently, the treatment of epilepsy has been directed mainly at suppression of the attacks. Currently, an intensive search for anticonvulsant drugs with a significant neuroprotective effect held among modulators of glutamine and GABA receptors. Of great interest in this respect are annelated quinazoline derivatives. *This work was aimed* to conduct preliminary screening of 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline spiro-derivatives anticonvulsant activity on pentylenetetrazol-induced

convulsions model and to detect the «lead-compounds» for subsequent evaluation of anticonvulsant and neuroprotective action on rats kindled by repeated pentylenetetrazol administrations. It was shown, that administration of test compounds intragastrically to outbred white rats at a dose of 10 mg / kg 1 hour before administration of pentylenetetrazol (80 mg/kg) significantly increased the latency period, reduced the duration of the tonoclonic phase, convulsions activity, and lethality level. The most active were 2'-phenyl-6'-H-spiro[indol-3,5'-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline]-2(1H)-on (**1.6**) and 5-bromo-2'-(4-fluorophenyl)-6'-H-spiro[indol-3,5'-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline]-2(1H)-on (**1.11**), which were more effective in comparison with the reference drug – lamotrigine. Compounds **1.6** and **1.11** in the 11th day of preventive administration to animals, which were kindled by pentylenetetrazol revealed neuroprotective action, that were higher compared to reference drugs – lamotrigine and carbamazepine.

The neuroprotective effect of the compounds **1.6** and **1.11** on rats kindled by pentylenetetrazol can be explained by its antioxidant action. It is clear, that the antioxidant activity of the compounds **1.6** and **1.11** is due to an increasing activity of glutathione-dependent enzymes and content of reducing thiols in the brain of an animals on kindled by repeated pentylenetetrazol administration. This effect prevents neuronal damage by the products of oxidative stress in conditions on rats kindled with repeated pentylenetetrazol administrations, as well as normalize the bioavailability of NO.

Key words: spiro-derivatives, 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]-quinazolines, pentylenetetrazol-induced convulsion, pentylenetetrazol kindling, anticonvulsant activity, neuroprotective activity

Надійшла: 9 листопада 2015 р.

Контактна особа: Беленічев Ігор Федорович, професор, доктор біологічних наук, кафедра фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 612 34 27 41.