

УДК: 547.791.6:547.461.3:615.213

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ АНТИКОНВУЛЬСАНТОВ – ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,3-ТРИАЗОЛА И 1,3,4-ОКСАДИАЗОЛА

Т.Л. РЫБАЛЬЧЕНКО
С.Ю. ШТРЫГОЛЬ
В.А. ГЕОРГИЯНЦ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

e-mail: t_ribalchenko@ukr.net

С целью определения спектра антиконвульсивных свойств новые производные 1,2,3-триазола и 1,3,4-оксадиазола изучены на моделях экспериментальных судорог с разным патогенезом. Выявлено, что в реализации противосудорожного эффекта исследуемых соединений ключевую роль играют ГАМК-ергические и глицинергические механизмы.

Ключевые слова: эпилепсия, судороги, производные 1,2,3-триазола, производные 1,3,4-оксадиазола.

Эпилепсия – распространенное, полиморфное по клиническим проявлениям заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с не до конца изученным патогенезом [8, 12]. Фармакотерапия – основной метод лечения эпилепсии и симптоматических судорог. Длительность и непрерывность лекарственной терапии, индивидуальный подбор препарата для каждого пациента, высокая частота возникновения неблагоприятных побочных реакций, а также распространенность фармакорезистентных форм заболевания делают эпилепсию одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [9]. Поэтому остро стоит вопрос разработки новых антиконвульсантов с влиянием на разные механизмы возникновения и развития судорожных состояний [10, 11].

С этой целью исследовано 46 синтезированных в Национальном фармацевтическом университете (г. Харьков, Украина) оригинальных производных 1,2,3-триазола и 1,3,4-оксадиазола, у которых установлена высокая активность на модели тиосемикарбазидных судорог [1, 2, 4, 5, 6].

Цель. Определить спектр антиконвульсивного действия лидеров скрининга, изучить их активность на моделях коразоловых, пикротоксиновых, стрихниновых и камфорных судорог [7].

Материалы и методы. Объектами исследования выбраны лидеры предварительного скрининга: 3-хлор-4-метоксианилид 1-(2'-фторфенил)-5-метил-1,2,3-триазол(1H)-4-карбоновой кислоты (соединение I) и 2-(5-феноксиметил-[1,3,4]оксадиазол-2-илсульфанил)-N,N-дифенилацетамид (соединение II) [1, 2].

Опыты проводили на 96 белых беспородных мышках-самцах массой 20-30 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Центральной научно-исследовательской лаборатории Национального фармацевтического университета (НФаУ) (заведующий – доктор мед. наук, проф. Штрыголь С.Ю.) в соответствии с санитарно-гигиеническими нормами (природный световой режим «день-ночь», $t = 19-24^{\circ}\text{C}$, влажность не более 50%) в пластиковых клетках на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде.

При выполнении эксперимента соблюдали нормы и принципы, утвержденные Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (2000 г.) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

На модели коразоловых и пикротоксиновых судорог изучали наличие ГАМК-ергических свойств выбранных соединений. Механизм судорожного действия коразола обусловлен угнетающим влиянием на ГАМК_A-сайт, в то время как пикротоксин блокирует хлорный ионофор ГАМК-барбитурат-бензодиазепинового комплекса, что приводит к ослаблению ГАМК-ергических тормозных процессов в ЦНС. Модель стрихниновых судорог выбрана для изучения глицинергических свойств новых веществ, камфорные судороги – с целью анализа влияния исследуемых соединений на обмен моноаминов в головном мозге [7, 8].

Для каждой судорожной модели экспериментальные животные (24 мыши) были рандомизированы на четыре группы (n=6): 1 – контрольная патология; 2 и 3 – мыши, которым вводили соединения I и II соответственно; 4 – группа сравнения, животные которой получали референс-препарат.

Животные экспериментальных групп 2 и 3 получали внутрибрюшинно исследуемые фармакологические препараты. Соединение I вводили в виде тонкой водной суспензии, стаби-



лизированной твином-80, соединение II – в виде водного раствора в дозе 100 мг/кг в профилактическом режиме однократно за 30 мин до введения судорожного яда. Группа сравнения на моделях коразоловых, пикротоксиновых и камфорных судорог получала внутривенно антиконвульсант вальпроевую кислоту в условно эффективной дозе 300 мг/кг [2], а на модели пароксизмов, вызванных стрихнином, судорожное действие которого связано с угнетением глицинергического торможения [3] – внутривенно водный раствор глицина в дозе 50 мг/кг в таком же режиме. Животным групп контрольной патологии вводили внутривенно воду очищенную в аналогичном объеме (0,1 мл на 10 г массы тела).

Судорожные яды вводили в зависимости от модели: коразол – в виде водного раствора в дозе 80 мг/кг подкожно, пикротоксин – в виде водного раствора в дозе 2,5 мг/кг подкожно, стрихнин – в виде водного раствора в дозе 1,2 мг/кг подкожно, камфору – в виде раствора в персиковом масле в дозе 1000 мг/кг внутривенно [7].

Противосудорожное действие оценивали по следующим показателям: латентный период судорог, количество клонико-тонических пароксизмов на 1 мышшь, количество животных с клоническими и тоническими конвульсиями, тяжесть пароксизмов в баллах, время судорожного периода, время гибели и летальность. Если судороги не наступали в течение 1 ч, считали, что латентный период составляет 60 мин. Тяжесть судорог определяли в баллах: 1 – вздрагивание, 2 – маневный бег, 3 – клонические приступы, 4 – клонико-тонические судороги с боковым положением, 5 – тоническая экстензия, 6 – тоническая экстензия, завершившаяся гибелью животного [7].

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с использованием среднего значения и его стандартной ошибки. Достоверность различий между группами сравнения определяли с использованием параметрического критерия Стьюдента (t) и углового преобразования Фишера (при учете показателей, выраженных в альтернативной форме), различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Тест антагонизма с пентилентетразолом (коразолом) является одной из основных методик в первичном исследовании противосудорожных препаратов [7]. Результаты исследования на коразоловой модели приведены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние исследуемых соединений на течение коразоловых судорог у мышей (M±m)

Показатели	Контроль (n=6)	Соединение I, 100 мг/кг (n=6)	Соединение II, 100 мг/кг (n=6)	Вальпроевая кислота, 300 мг/кг (n=6)
Латентный период судорог, мин	6,5±1,2	51,3±8,7***	4,5±0,9**	42,9±10,8**
Тяжесть судорог, баллы	3,5±0,5	0,7±0,7**	5,0±0,6**	1,0±0,6*
Число клонических и тонических пароксизмов на 1 мышшь	2,0±0,6	0,2±0,2*	3,3±0,7**	0,3±0,2*
Количество мышей с судорогами, %:				
клоническими	100	16,7***	100###	33,3***
тоническими	16,7	16,7	83,3***/###	0
Время гибели, мин.	34,5 (n=1)	-	12,3±3,3 (n=5)	-
Летальность, %	16,7	0	83,3***/###	0

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – относительно группы контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – относительно группы сравнения (вальпроевая кислота)

Как видно из таблицы 1, соединение I в дозе 100 мг/кг проявляло выраженный антагонизм с коразолом: достоверно относительно контроля увеличивался латентный период конвульсий в 7,8 раза, уменьшалась тяжесть судорог и число приступов на 1 мышшь в 5,2 и 11,8 раза соответственно, а также статистически значимо снижалось количество мышей с клоническими пароксизмами. В целом соединение I не уступало, а по отдельным показателям (количество мышей с клоническими судорогами) в 2 раза превышало по эффективности препарат сравнения – классический антиконвульсант вальпроевую кислоту [2, 3, 9]. Соединение II в аналогичных условиях выявляло проконвульсивные свойства: его применение сопровождалось недостоверным относительно контроля снижением латентного периода пароксизмов в 1,4 раза, увеличением тяжести и числа приступов на 1 мышшь в 1,4 и 1,7 раза соответственно. Кроме того, соединение II статистически достоверно увеличивало количество мышей с тоническими пароксизмами и летальность в группе в 5 раз относительно контроля.

Результаты исследования на модели пикротоксиновых судорог приведены в таблице 2.



Из таблицы 2 видно, что соединение I в дозе 100 мг/кг, как и препарат сравнения вальпроевая кислота в дозе 300 мг/кг [2, 5], повышало латентный период конвульсий, уменьшало тяжесть пароксизмов, число приступов на 1 мышшь, а также количество мышшей с клоническими и тоническими судорогами, однако за счет большой дисперсии эта разница не достигала уровня статистической значимости. Все показатели экспериментальной группы, в которой животные получали соединение II в дозе 100 мг/кг, не отличались от аналогичных группы контроля.

Таблица 2

Влияние исследуемых соединений на судорожный синдром у мышшей, вызванный введением пикротоксина (M±m)

Показатели	Контроль (n=6)	Соединение I, 100 мг/кг (n=6)	Соединение II, 100 мг/кг (n=6)	Вальпроевая кислота, 300 мг/кг (n=6)
Латентный период судорог, мин	30,0±9,6	49,1±7,0	30,9±6,3 [#]	53,1±6,9
Тяжесть судорог, баллы	2,5±0,9	0,5±0,5	2,5±0,5 [#]	0,5±0,5
Число клонических и тонических пароксизмов на 1 мышшь	0,7±0,2	0,3±0,2	0,8±0,2	0,3±0,3
Количество мышшей с судорогами, %:				
клоническими	50	16,7	83,3	16,7
тоническими	16,7	0	0	0
Время гибели, мин.	1,1 (n=1)	-	-	-
Летальность, %	16,7	0	0	0

Примечание. [#] – p<0,05 – относительно группы сравнения, животные которой получали вальпроевую кислоту.

Для оценки влияния исследуемых соединений на глицинергические механизмы патогенеза судорожного синдрома у мышшей использовали модель судорог, вызванных стрихнином (табл. 3).

По результатам, приведенным в таблице 3, соединение I проявляло ярко выраженные антиконвульсивные свойства, оказывая 100%-ный защитный эффект на данной экспериментальной модели. Соединение II в аналогичных условиях также демонстрировало значительную противосудорожную активность: достоверно увеличивало латентный период конвульсий в 4,8 раза, снижало тяжесть приступов и число пароксизмов на 1 мышшь в 4 раза по отношению к контролю. К тому же соединение II в 3 раза уменьшало количество мышшей с клоническими судорогами и в 6 раз – с тоническими, а также в 6 раз статистически достоверно снижалась летальность в группе относительно контроля. Препарат сравнения - глицин - в дозе 50 мг/кг [3] на данной модели также оказывал противосудорожный эффект, что проявлялось в удлинении латентного периода первых конвульсий в 3 раза (p>0,05), достоверном снижении тяжести приступов в 2,2 раза, количества мышшей с клоническими и тоническими судорогами (в 2 и 1,5 раза соответственно), тенденцией к уменьшению числа пароксизмов на 1 мышшь в 1,7 раза. Кроме того, препарат сравнения достоверно снижал летальность животных в 1,5 раза относительно контроля. Однако по выраженности эффекта глицин значительно уступал как соединению II, так и соединению I.

Таблица 3

Влияние исследуемых соединений на течение стрихниновых судорог у мышшей (M±m)

Показатели	Контроль (n=6)	Соединение I, 100 мг/кг (n=6)	Соединение II, 100 мг/кг (n=6)	Глицин, 50 мг/кг (n=6)
Латентный период судорог, мин	9,1±0,6	60,0±0,0 ^{***/#}	43,5±10,5 ^{**}	27,1±10,5
Тяжесть судорог, баллы	6,0±0,0	0,0±0,0 ^{***/#}	1,5±1,0 ^{**}	2,7±0,8 ^{**}
Число клонических и тонических пароксизмов на 1 мышшь	2,0±0,0	0,0±0,0 ^{***/#}	0,5±0,3 ^{**}	1,2±0,4
Количество мышшей с судорогами, %:				
клоническими	100	0 ^{***/###}	33,3 ^{***/#}	50 ^{**}
тоническими	100	0 ^{***/###}	16,7 ^{***/#}	66,7 [*]
Время гибели, мин.	9,3±0,5	-	10,3 (n=1)	10,7±1,6 (n=4)
Летальность, %	100	0 ^{***/###}	16,7 ^{***/#}	66,7 [*]

Примечание. * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – относительно группы контроля; # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001 – относительно группы сравнения, животные которой получали глицин.



На модели камфорных судорог анализировали влияние исследуемых соединений на пароксизмы, вызванные нарушением обмена церебральных катехоламинов (табл. 4).

Таблица 4

Влияние исследуемых соединений на судорожный синдром у мышей, вызванный камфорой (M±m)

Показатели	Контроль (n=6)	Соединение I, 100 мг/кг (n=6)	Соединение II, 100 мг/кг (n=6)	Вальпроевая кислота, 300 мг/кг (n=6)
Латентный период судорог, мин	4,3±1,1	17,0±8,7	5,6±2,1	10,2±4,3
Тяжесть судорог, баллы	5,3±0,4	4,0±0,9	5,3±0,4 [#]	3,8±0,3 [*]
Число клонических и тонических пароксизмов на 1 мышшь	4,7±1,1	5,2±1,4	4,5±0,8	8,7±2,1
Количество мышшей с судорогами, %: клоническими тоническими	100 100	83,3 50 [†]	100 83,3	100 66,7 [*]
Время гибели, мин.	11,3±2,9	16,0±1,6	13,7±2,7	26,2±8,5
Летальность, %	100	83,3	100	66,7 [*]

Примечание. * – $p < 0,05$ – относительно группы контроля; [#] – $p < 0,05$ – относительно группы сравнения, животные которой получали вальпроевую кислоту.

Анализ таблицы 4 показывает, что соединение I обладало умеренными противосудорожными свойствами на данной экспериментальной модели: в 4 раза увеличивало латентный период конвульсий, в 1,3 раза снижало тяжесть приступов и количество мышшей с тоническими пароксизмами в 2 раза, однако лишь последний показатель достигал уровня статистической значимости. Соединение II в аналогичных условиях не оказывало фармакологического эффекта – все показатели находились на уровне группы контроля. Препарат сравнения - вальпроевая кислота - по выраженности противосудорожного действия превышало соединение I: на фоне его приема в 2,4 раза возрастал латентный период конвульсий ($p > 0,05$), а также достоверно снижалась тяжесть пароксизмов в 1,4 раза, количество мышшей с тоническими приступами и показатель летальности в 1,5 раза; число клонических и тонических пароксизмов на 1 мышшь увеличивались в 1,9 раза по сравнению с контролем, однако за счет высокой дисперсии показателя это значение не достигло уровня статистической значимости.

Обсуждение результатов. Ранее изучена фармакологическая активность производных 1,2,3-триазола и 1,3,4-оксадиазола [1, 2, 4, 5, 6]. PASS C&T-прогноз биологической активности (Prediction Activity Spectra for Substances: Complex & Training) показал возможность действия исследуемых веществ на ЦНС, противосудорожной и противосудорожной активности за счет влияния на ГАМК-рецепторы (вероятность от 0,591 до 0,841) [2, 4]. Результаты настоящего исследования подтверждают точность этого прогноза. У соединений I и II высокая противосудорожная активность сочетается с отсутствием миорелаксантного действия, что безусловно, является благоприятной особенностью их фармакодинамики [1, 2]. ЕД₅₀ этих соединений составляет 105-108 мг/кг [2]. Оба вещества практически не токсичны (ЛД₅₀=2950-3100). Для вальпроевой кислоты ЛД₅₀=670 [6]. Эти данные убедительно свидетельствуют о высоком терапевтическом индексе новых соединений и подтверждают их безопасность.

Механизм противосудорожного действия соединения I, судя по результатам фармакологического анализа, может быть связан с влиянием на ГАМК-, глицин- и катехоламинергические механизмы, что экспериментально обосновывает его эффективность при различных клинических формах эпилептических судорог. Механизм противосудорожного действия соединения II, очевидно, преимущественно связан с усилением глицинергических тормозных процессов.

Выводы:

1. Впервые установлена противосудорожная активность производных 1,2,3-триазола (3-хлор-4-метоксианилид 1-(2'-фторфенил)-5-метил-1,2,3-триазол(1H)-4-карбоновой кислоты) и 1,3,4-оксадиазола (2-(5-феноксиметил-[1,3,4]оксадиазол-2-илсульфанил)-N,N-дифенилацетамид) на экспериментальных моделях судорог с разным патогенезом.

2. 1,2,3-триазол (3-хлор-4-метоксианилид 1-(2'-фторфенил)-5-метил-1,2,3-триазол(1H)-4-карбоновой кислоты) - проявляет выраженный эффект на моделях судорог, вызванных введением коразола и стрихнина, оказывает умеренный антиконвульсивный эффект на модели пикротоксиновых и камфорных судорогах, что свидетельствует о влиянии на ряд нейромедиаторных систем головного мозга (ГАМК-, глицин- и катехоламинергические процессы).

3. 1,3,4-оксадиазол (2-(5-феноксиметил-[1,3,4]оксадиазол-2-илсульфанил)-N,N-дифенилацетамид) – оказывает противосудорожное действие только на модели стрихниновых судорог, что позволяет предполагать глицинергические механизмы.

Литература

1. Георгіянц В.А. Синтез, фізико-хімічні властивості та протисудомна активність нових похідних 5-(4-метоксі)бензил-1,3,4-оксадіазол-2-іл-тіоацетатної кислоти / В.А. Георгіянц, Л.О. Перехода, Т.Л. Рибальченко [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2010. – № 6. – С. 26-32.
2. Глущенко А.В. Протисудомна активність похідних 1-заміщеного 5-метил(аміно)-1,2,3-триазолу / А.В.Глущенко, Т.Л.Рибальченко, С.Ю.Штриголь, [та ін.] // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – № 3 (8). – С. 28-34.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: РИА «Новая волна»: Издатель Умеренков, 2008. – 1206 с.
4. Перехода Л.О. QSAR-аналіз похідних 1,2,3-триазолу(1Н), що проявляють протисудомну активність // Вісник фармації. – 2012. – № 1. – С. 54-56 .
5. Перехода Л.О. Протисудомна активність диметилітових естерів 1-арил-1,2,3-триазол(1Н)-4,5-дикарбонових кислот та її залежність від молекулярної будови / Л.О.Перехода, В.А.Георгіянц, Т.Л. Рибальченко, [та ін.] // Клінічна фармація. – 2009. – Т.13. – №3. – С. 66-70.
6. Перехода Л.О. Синтез та фармакологічна активність диметилітових естерів 1-арил-1,2,3-триазол(1Н)-4,5-дикарбонових кислот / Л.О. Перехода, В.А. Георгіянц, С.В. Плис [та ін.] //Журнал орг. та фарм. хімії. – 2007. – Т. 5. – вип. 2 (18). – С. 45-48.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / [Под редакцией д.м.н. Миронова А.Н.]. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
8. Харкевич Д.А. Фармакология: учебник. – 9-е изд., перераб., доп. и испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 736 с: ил.
9. Genton P. Progress in pharmaceutical development presentation with improved pharmacokinetics: a new formulation for valproate / P.Genton // Acta Neurol Scand. – 2005. – № 182. – P. 26-32.
10. Gerlach A.C. Antiepileptic Drug Discovery and Development: What Have We Learned and Where Are We Going? / A.C. Gerlach, J.L. Krajewski // Pharmaceuticals. – 2010. – № 3. – P. 2884-2899.
11. Kaindl A. M. Antiepileptic drugs and the developing brain / A. M. Kaindl, S. Asimiadou, D. Manthey [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – № 63. – P. 399-413.
12. Majkowski J. Antiepileptic Drugs Combination Therapy and Interactions / J. Majkowski, F. Blaise, D. Bourgeois [et al.] // Cambridge University Press, 2005. – P. 54 – 60.

DEFINITION OF SPECTRUM OF THE ANTICONVULSANT ACTIVITY FOR THE NEW ANTICONVULSANTS – 1,2,3-TRIAZOLE AND 1,3,4-OXADIAZOLE DERIVATIVES

T.I. RYBALCHENKO
S.Y. SHTRYGOL
V.A. GEORGIYANTS

*National University of Pharmacy,
Kharkov, Ukraine*

e-mail: t_ribalchenko@ukr.net

The new derivatives of 1,2,3-triazole and 1,3,4-oxadiazole were studied on experimental models of seizures with different pathogenesis for determination of the spectrum of anticonvulsant properties. It is revealed, that GABA - and glycinergic mechanisms play a key role in realization of anticonvulsant effect of the studied compounds.

Key words: epilepsy, seizures, 1,2,3-triazole derivatives, 1,3,4-oxadiazole derivatives.