

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
факультет по подготовке иностранных граждан
кафедра фармацевтической химии**

КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

по теме: **«Определение механизма сопутствующей
противовоспалительной активности у нового противосудорожного агента
- производного пиразолопиримидина»**

Выполнил: соискатель высшего образования Фм18(5,0д)і-13
специальности 226 Фармация, промышленная фармация
образовательной программы Фармация
Айман БИКРИ

Руководитель: доцент заведения высшего образования
кафедры фармацевтической химии, д.фарм.н., доцент
Анна СЕВЕРИНА

Рецензент: профессор заведения высшего образования
кафедры фармакогнозии, д.фарм.н., профессор
Олег КОШЕВОЙ

Харьков – 2023 год

АННОТАЦИЯ

По результатам прогнозирования аффинности и детального анализа конформационного размещения и взаимодействия с аминокислотными остатками активных сайтов установлен механизм реализации противовоспалительного эффекта 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она как ингибитора циклооксигеназы 2 через сайт селективного ингибитора целекоксиба.

Работа состоит из вступления, 4 разделов, общих выводов и списка используемой литературы, который состоит из 187 источников. Работа изложена на 53 страницах и содержит 2 таблицы, 19 рисунков, 1 схему.

Ключевые слова: пиразолопиримидин, молекулярный докинг, противовоспалительная активность

ANNOTATION

Based on the results of affinity prediction and detailed analysis of conformational placement and interaction with amino acid residues of active sites, the mechanism of realization of anti-inflammatory effect of 1-(4-methoxyphenyl)-5-(2-(4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-yl)-2-oxo-ethyl)pyrazol[3,4-d]pyrimidine-4-one as cyclooxygenase 2 inhibitor through site-selective inhibitor of celecoxib was established.

The work consists of an introduction, 4 sections, general conclusions and a list of references. The paper is on 53 pages and contains 2 tables, 19 figures, 1 scheme.

Keywords: pyrazolopyrimidine, molecular docking, anti-inflammatory activity

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень условных обозначений	
Введение	7
РАЗДЕЛ 1 Роль нейровоспаления в патогенезе эпилепсии и агенты для его коррекции (Обзор литературы)	10
1.1 Роль нейровоспаления в эпилептогенезе	10
1.2 Малые молекулы как противовоспалительная терапия	12
1.2.1 Ингибиторы циклооксигеназы	12
1.2.2 Антагонисты рецепторов простагландинов	16
1.2.3 Ингибиторы синтеза IL-1 β и антагонисты интерлейкиновых рецепторов	18
1.2.4 Ингибиторы сигнализации трансформирующего фактора роста бета	20
1.2.5 Ингибиторы НАДФН-оксидаза 2 (NOX2)	21
1.2.6 Другие потенциальные противовоспалительные мишени	23
1.2.6.1 Липооксигеназа	23
1.2.6.2 Микросомальная простагландин Е синтаза-1	23
1.2.6.3 Толл-подобный рецептор 4	24
1.2.6.4 Фактор некроза опухоли	25
1.2.6.4 Интерлейкин 6	25
1.3 Обобщение данных	26
Выводы к разделу 1	28
РАЗДЕЛ 2 Материалы и методы исследования 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она	29
2.1 Синтез 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она	29
2.2 Исследование фармакологических свойств 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она	31

2.2.1	PTZ судороги	31
2.2.2	МЭШ-судороги	32
2.2.3	Результаты острой токсичности	33
2.2.4	Исследование влияния на координацию движения и тонус мышц	34
2.2.5	Тест «открытое поле»	34
2.2.6	Результаты исследования противовоспалительной активности эпимидина	35
2.3	Определение аффинности методом молекулярного докинга	36
	Выводы к разделу 2	37
РОЗДЕЛ 3	Определение степени аффинности 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она к сайтам ингибиторов циклооксигеназы-2	38
3.1	Обоснование целесообразности изучения противовоспалительной активности эпимидина	38
3.2	Молекулярный докинг эпимидина в сайт целекоксиба циклооксигеназы 2	39
3.3	Молекулярный докинг эпимидина в сайт мелоксикама циклооксигеназы 2	42
	Выводы к разделу 3	47
РАЗДЕЛ 4	Прогнозирование аффинности 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она к другим противовоспалительным биомишеням	48
4.1	Докинг 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она IL-1 β превращающий фермент	48
	Выводы к разделу 4	51
	Выводы	53
	Список используемой литературы	54

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- AT1 - рецептор для ангиотензина II
- COX-2 - циклооксигеназа-2
- D2 - дегидрогеназа простагландинов D2
- EP1, EP2, EP3 и EP4 - рецепторы простагландинов
- GPCRs - рецепторы, связанные с белками G
- HMGB1 - высокомолекулярная группа связывания 1
- ICE - каспаза-1, фермент
- IL-1 - интерлейкин 1
- IL-1b - интерлейкин-1 бета
- IL-1R - интерлейкиновый рецептор типа 1
- IL-6 - интерлейкин 6
- in silico - методы исследования с применением математических
- in vivo - методы исследования в живом организме
- LOX - липоксигеназа
- mPGES-1/2 - микросомальная простагландин E2 синтаза-1/2
- NADPH - Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- NF-kB - фактор ядерного фактора каппа-B
- NMDA-рецепторы - N-метил-D-аспаратные рецепторы
- NMDA-рецепторы - рецепторы N-метил-D-аспартата
- NOXs - НАДФ оксидазы
- PGD2 - простагландин D2
- PGE2 - простагландин E2
- PGE2 - простагландин E2
- PGES - простагландин E2 синтаза
- PGF2 - простагландин F2
- PGI2 - простагландин I2 (тромбоксан A2)
- RAGE - рецептор для конечных продуктов расширенного гликирования
- RNS - реактивные азотные виды
- ROS - реактивные кислородные виды

Src - тирозинкиназа Src

TGF- β - трансформирующий ростовой фактор бета

TLR4 - толл-подобный рецептор 4

TNF - фактор некроза опухоли

TNF- α - фактор некроза опухоли- α

TXA₂ - тромбоксан A₂

АФИ - активный фармацевтический ингредиент

в/в - внутривенное введение

ГМ - головной мозг

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДМСО - диметилсульфоксид

ДФФ- диизопропилфторфосфата

мг/кг - миллиграмм на килограмм

МЭШ - максимальный электрошок

расчетных методов

ЦНС - центральная нервная система

ЭС - эпилептический статус

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В патофизиологии эпилепсии, как хронического заболевания мозга, широко обсуждается участие нейровоспаления. Повторные приступы эпилепсии связаны с повышенным уровнем иммунных медиаторов, которые играют ключевую роль в их запуске. Нейроны, глии и эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) участвуют в таких воспалительных процессах, экспрессируя рецепторы соответствующих медиаторов через аутокринную и паракринную стимуляцию внутриклеточных сигнальных путей. В связи с этим у пациентов с эпилептическим профилем наблюдаются повышенные уровни цитокинов в сыворотке крови и тканях головного мозга. Следует отметить, интерлейкин (IL)-1 β , IL-6 и фактор некроза опухолей-альфа (TNF- α) являются провоспалительными цитокинами, которые в литературе чаще всего ассоциируются с патогенезом эпилепсии. Поэтому определение влияния нового активного фармацевтического ингредиента как потенциального противосудорожного агента на процессы воспаления на сегодня является неотъемлемой частью доклинических исследований. А вектор исследований по поиску и разработке новых лекарств с мультитаргетным противовоспалительным и противосудорожным действием является актуальным.

Цель исследования является определение молекулярных механизмов противовоспалительного действия 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она как противосудорожного агента.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- проанализировать литературные данные относительно роли нейровоспаления в эпилептогенезе, ознакомиться с существующими активными фармацевтическими ингредиентами с выраженными противовоспалительным и противосудорожным

действием; определить наиболее перспективные таргеты для *in silico* исследований перспективного лиганда;

- Проанализировать имеющиеся данные синтетических и фармакологических экспериментов 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она и оценить перспективность исследования его противовоспалительных свойств;
- валидировать методологию докинга процедурой ре-докинга нативных референс-лигандов в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 и IL-1 β превращающего фермента, рассчитать значение TRSD;
- процедурой молекулярного докинга определить аффинность исследуемого лиганда к выбранным противовоспалительным биомишеням;
- сформулировать выводы о возможных молекулярных механизмах реализации противовоспалительного действия 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она сопоставив их с результатами *in vivo* эксперимента.

Объект исследования - таргетированный молекулярный докинг и прогнозирование фармакологических свойств.

Предмет исследования - производное 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она, противовоспалительные мишени и лиганды к ним.

Методы исследования – виртуальные эксперименты проведены с использованием программы BioviaDraw2017, Biovia Discovery Studio2021, AutoDock Vina, AutoDock Tools, OpenBabel. Стандартные методики изучения биологической активности.

Практическое значение полученных результатов.

Результатом работы стало доказательство целесообразности исследования 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она на *in vivo* моделях противовоспалительного действия (уксуснокислый корчей) и нецелесообразность проведения цитокиновых моделей скрининга. Это заключение поможет уберечь животных и сэкономить временной и денежный ресурсы. Валидированные методологии докинга в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 и IL-1 β превращающего фермента могут стать важным инструментом для дальнейшего рационального поиска противовоспалительных веществ.

Структура и объем квалификационной работы.

Работа состоит из введения, четырех разделов, общих выводов, списка литературы. Работа изложена на страницах, иллюстрирована схемами, таблицами, рисунками. Перечень использованных литературных источников содержит наименований, из которых - иностранных авторов

РАЗДЕЛ 1

РОЛЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭПИЛЕПСИИ И АГЕНТЫ ДЛЯ ЕГО КОРРЕКЦИИ

(Обзор литературы)

Как важный компонент врожденного иммунитета мозга, нейровоспаление изначально способствует восстановлению и поддержанию нейронной ткани. Однако хронические воспалительные процессы внутри мозга и связанное с ними нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) часто вызывают нейротоксичность и повышенную возбудимость. Все больше исследований указывает на взаимосвязь между воспалением и эпилептогенезом, предполагая, что блокирование нежелательного воспалительного процесса внутри головного мозга может обеспечить новые стратегии лечения судорог и эпилепсии. Нейровоспаление в первую очередь характеризуется повышением уровня провоспалительных медиаторов в эпилептогенных очагах, среди которых циклооксигеназа-2 (COX-2) /простагландин E2 (PGE2), интерлейкин-1b (IL-1b), трансформирующий фактор роста-b (TGF-b), толл-подобный рецептор 4 (TLR4), высокомолекулярная группа белка 1 (HMGB1) и фактор некроза опухоли-a (TNF-a). Многие малые молекулы, специфически нацеленные на эти ключевые провоспалительные агенты, были оценены на противосудорожный и противэпилептогенный эффект в *in vivo* экспериментах, что позволило сформулировать новое представление о регуляции воспаления в мозге эпилептиков. Поэтому актуальным является вектор по поиску и разработке новых лекарств с мультитаргетным противовоспалительным и противосудорожным действием.

1.1 Роль нейровоспаления в эпилептогенезе

Воспаление – это последовательность биологических реакций на патогенные вызовы, которые на периферии часто проявляется местным покраснением, лихорадкой, отеком, болью и потерей функции. Воспалительные процессы можно классифицировать по времени как острые или хронические. Во время острой фазы воспаления белки плазмы и

лейкоциты из кровеносных сосудов быстро экстравазируются к местам повреждения и запускают серию биохимических и клеточных процессов, в которых участвуют иммунная система, сосудистая система и локальные клетки. Являясь ключевым компонентом врожденного иммунитета, острое воспаление представляет собой попытку устранить вредные раздражители и начать процесс заживления [1]. Острое воспаление обычно проходит через несколько дней, однако в некоторых случаях воспаление сохраняется и становится хроническим. Хотя заживление тканей продолжается на хронической стадии воспаления, чрезмерные воспалительные процессы способствуют развитию сложной сети молекулярных и клеточных сигнальных путей, которые связаны с такими изнурительными состояниями, как ревматоидный артрит, боль, рак, сосудистые заболевания, воспаление кожи, диабет, болезни сердца и легких [2]. В отличие от нашего исторического представления о том, что центральная нервная система (ЦНС) имеет иммунную привилегию благодаря тесному сужению кровеносного барьера, воспаление в головном мозге - или нейровоспаление - стало характерной чертой практически всех неврологических заболеваний, и предложено способствовать прогрессированию заболеваний в ЦНС (рис. 1.1)

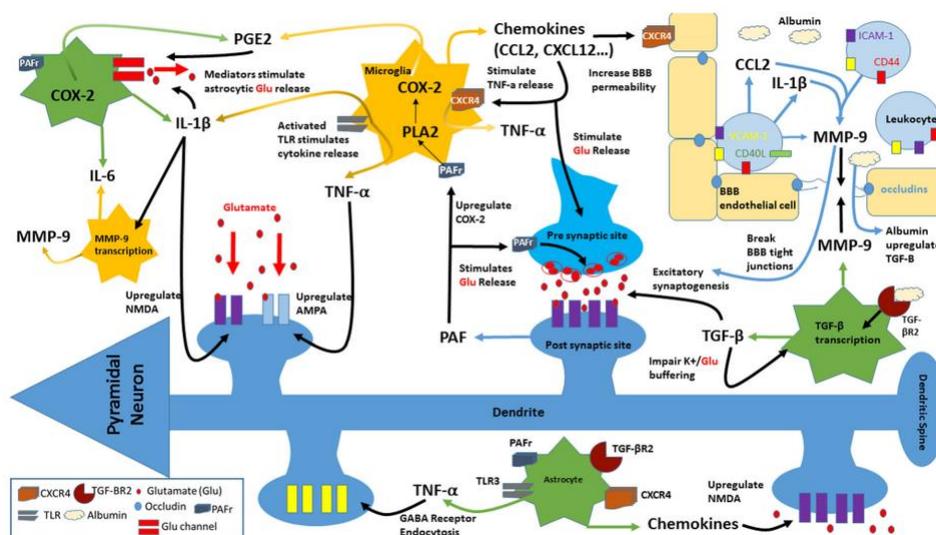


Рис. 1.1 Молекулярные механизмы воспаления и эпилептогенеза

За последнее десятилетие все больше клинических и доклинических данных указывают на участие воспаления в патофизиологии острых мозговых травм и последующего эпилептогенеза - процесса, при котором нормальный мозг становится эпилептическим [3-6], и предлагается использовать противовоспалительные препараты, направленные на ключевые воспалительные компоненты, для лечения приступов и эпилепсии [7-13].

1.2 Малые молекулы как противовоспалительная терапия

Малые молекулы – это синтетические химические соединения с низкой молекулярной массой (<900) и размером порядка нанометра. Эти органические соединения составляют подавляющее большинство существующих на рынке лекарств. Благодаря своему небольшому размеру, они широко распространяются по организму после введения и могут пересекать биологические мембраны, тем самым модулируя широкий спектр внутриклеточных и внеклеточных молекулярных мишеней. Они обычно недорогие, стабильные, неиммуногенные, легко характеризуются и модифицируются, доступны перорально и способны проникать в ткани [14]. На сегодняшний день несколько низкомолекулярных соединений, избирательно изменяющих ключевые воспалительные сигнальные пути, были оценены на предмет терапевтического эффекта в животных моделях судорог и эпилепсии, и еще большее количество находится в стадии разработки или будет протестировано. Большинство из этих соединений обладают достаточными фармакодинамическими и фармакокинетическими свойствами – другими словами, потенцией, селективностью, биодоступностью, периодом полураспада *in vivo*, проникновением в мозг - и значительно безопасны при соответствующей дозировке и парадигме дозирования, и, таким образом, имеют огромный трансляционный потенциал, а некоторые соединения продвигаются до клинических исследований.

1.2.1 Ингибиторы циклооксигеназы

Циклооксигеназа (ЦОГ) является лимитирующим ферментом в синтезе простагландинов – D2 (PGD2), PGE2, PGF2/, PGI2 и тромбоксан A2 (TXA2). ЦОГ имеет две изоформы: ЦОГ-1, которая постоянно экспрессируется в организме для поддержания гомеостатического уровня простагландинов, которые важны для многих нормальных физиологических функций; ЦОГ-2, которая обычно не обнаруживается в большинстве нормальных тканей, но сильно индуцируется при инфекциях, лихорадке, воспалении и других стимулах, такими как факторы роста и чрезмерная активность нейронов, и обычно считается основным провоспалительным медиатором. Именно ЦОГ-2 быстро и значительно индуцируется в мозге после судорог как у пациентов, так и у экспериментальных животных [15-17]. Хроническое повышение уровня ЦОГ-2 поддерживает и усиливает нейровоспаление и, таким образом, вносит свой вклад в патофизиологию острых и хронических приступов. Первое представление о патогенной роли ЦОГ-2 в судорогах было получено из экспериментальных данных о том, что сверхэкспрессия ЦОГ-2 на нейронах облегчает вызванные каином судороги и увеличивает смертность, связанную с судорогами, у мышей [18]. Также на пилокарпиновой модели у мышей удаление ЦОГ-2 из ограниченной популяции нейронов переднего мозга уменьшила нейровоспаление и вторичную нейродегенерацию [16], а также незначительно улучшила память [21]. Множество селективных и неселективных ингибиторов ЦОГ-2 – аспирин, целекоксиб, эторикоксиб, индометацин, нимесулид, парекоксиб, рофекоксиб и другие (рис. 1.2), были оценены на предмет противосудорожного и антиэпилептогенного действия, нейропротекции и улучшения поведенческих и когнитивных нарушений на хемотоксических моделях судорог и судорог вызванных максимальным электрошоком острых припадков и хронической эпилепсии [22-37].

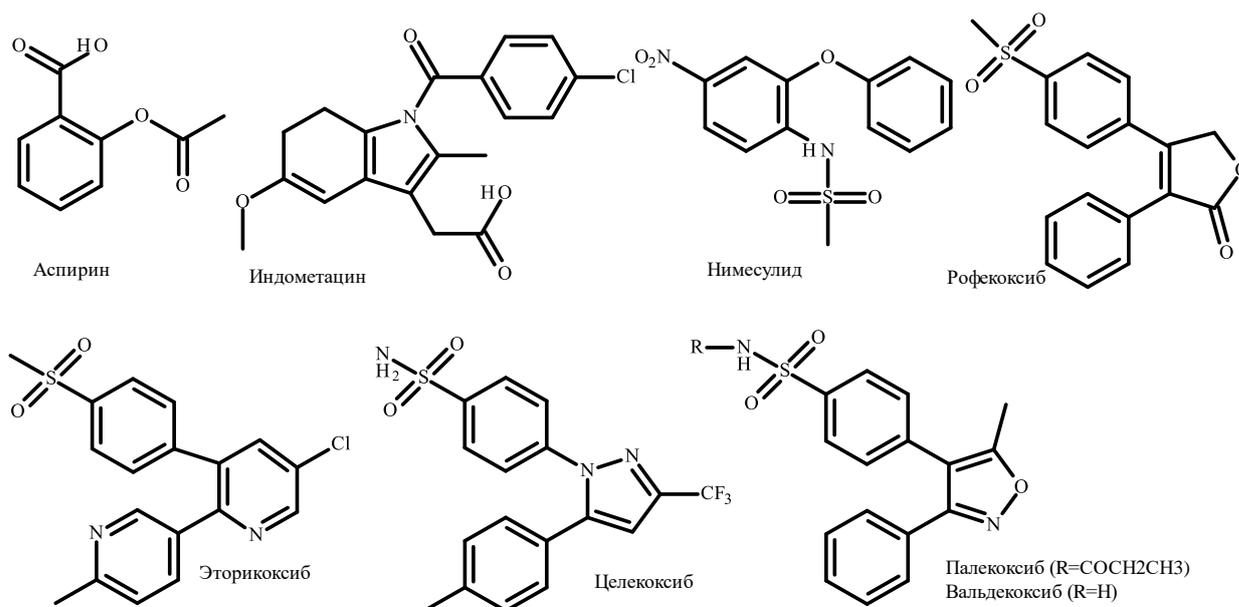


Рис. 1.2 Селективные и неселективные ингибиторы циклооксигеназы

Интересно, что лечение этими ингибиторами ЦОГ-2 обычно оказывает благоприятное воздействие, включая уменьшение повреждения нейронов, повторных припадков и отклонений в поведении. Неадекватные терапевтические результаты от предварительного назначения ингибиторов ЦОГ-2 в животных моделях ЭС известны уже почти два десятилетия [22]. Целекоксиб, первый селективный ингибитор ЦОГ-2, поступивший на рынок, при введении один раз в день в течение 5 дней после, но не до введения каината крысам, значительно ослабляет индукцию нейротрофического фактора мозга (BDNF) в гиппокампе и уменьшает дефицит обучения и поиска объектов в задаче водного лабиринта Морриса [26]. Неселективный ингибитор ЦОГ аспирином при введении через несколько часов после приступа, вызванного пилокарпином, уменьшает повреждение нейронов в гиппокампе и повторные припадки у крыс [23], в то время как предварительное лечение аспирином за 3 дня до введения пилокарпина не оказывает такого положительного эффекта, но увеличивает восприимчивость к припадкам у мышей [24]. Эти, казалось бы, противоречивые результаты до и после лечения ингибиторами ЦОГ-2 свидетельствуют о возможном двойном эффекте индукции ЦОГ-2 - ранней нейропротекции и поздней нейротоксичности, связанной с постоянным

воспалением после мозговых инсультов. Кроме того, дозировка, интервал дозирования, продолжительность дозирования, а также фармакодинамика и фармакокинетика тестируемых соединений и период полураспада *in vivo*, также могут потенциально влиять на терапевтические результаты.

Использование противоэпилептических препаратов (ПЭП) для купирования припадков наряду с ингибированием ЦОГ-2 в этих исследованиях на животных является еще одним потенциальным фактором, способствующим получению противоречивых результатов [31,32,36,37], поскольку большая продолжительность эпилептического статуса - до 10 часов в некоторых случаях – может препятствовать результатам ингибирования ЦОГ-2.

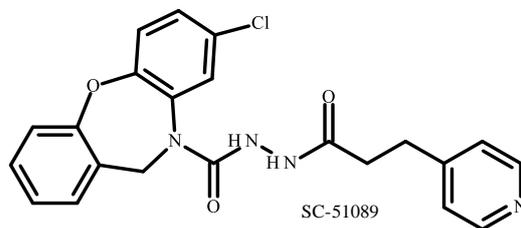
Помимо желаемого подавления синтеза простагландина E2 (PGE2), который в основном отвечает за воспаление, управляемое каскадом ЦОГ-2, ингибирование ЦОГ-2 также вызывает сопутствующее подавление эндотелиального ЦОГ-2 – производства простациклина (PGI2), создавая сосудистые риски, которые препятствуют клиническому использованию ингибиторов ЦОГ-2 [39]. Поэтому рофекоксиб и вальдекоксиб были отозваны с рынка США в 2004 и 2005 годах соответственно, а целекоксиб, менее ЦОГ-2-селективный, по-прежнему доступен для лечения хронических заболеваний, таких как артрит, боль и полипы, но с предупреждением о сердечно-сосудистой опасности. Тем не менее, краткосрочный прием селективных ингибиторов ЦОГ-2 в низких дозах в целом безопасен, о чем свидетельствуют их незначительные эффекты у контрольных животных, и может рассматриваться для лечения нейронального повреждения, вызванного судорогами [40]. Тем не менее, опасения по поводу безопасности ингибиторов ЦОГ-2 указывают на то, что воздействие на конкретную простагландинсинтазу или рецептор может предложить альтернативную стратегию борьбы с нейровоспалением и повреждением нейронов, связанными с судорогами и эпилепсией.

1.2.2 Антагонисты рецепторов простагландинов

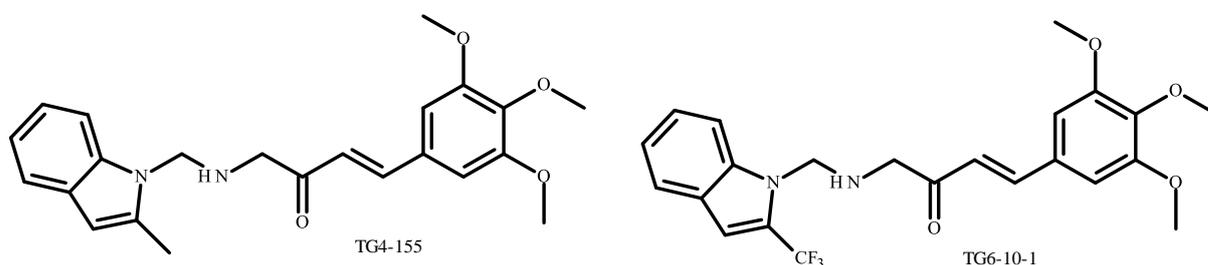
Как основной продукт работы ЦОГ-2 – простагландин E2 (PGE2) в настоящее время признан ведущим в нейровоспалении, повышенной возбудимости нейронов и эксайтотоксичности через содействие локальной вазодилатации, инфильтрации иммунных клеток и регуляции многих провоспалительных медиаторов в воспаленных областях мозга [40,41]. Интересно, что противосудорожное действие ингибитора ЦОГ-2 целекоксиба при судорогах, вызванных пентилентетразолом, может быть обращено интравентрикулярным введением PGE2 [28], что позволяет предположить, что ЦОГ-2 способствует развитию судорог через PGE2. И наоборот, другой простагландин, типа PGD2, оказывает противоэпилептическое действие через рецептор DP1 после введения пентилентетразола как у крыс, так и у мышей [42,43]. Таким образом, воздействие на специфические рецепторы PGE2 вместо самого фермента ЦОГ-2 может позволить избежать снижения PGD2- или PGF2/-опосредованных противосудорожных эффектов.

PGE2 действует на четыре простагландиновые рецептора, связанные с G-белками (GPCRs) – EP1, EP2, EP3 и EP4. За последнее десятилетие исследования показали, что генетическое удаление или фармакологическое ингибирование G/q-связанного рецептора EP1 является нейропротективным средством после экспериментальных ишемических повреждений [45-48]. Эти результаты, полученные на моделях ишемии, позволяют предположить, что рецептор EP1 может способствовать нейротоксичности, вызванной PGE2. Кроме того, активация рецептора EP1 играет важную роль в нарушении ГЭБ после ишемического инсульта [49]. Недавнее исследование показало, что глобальное удаление рецептора EP1 снижает порог судорожной активности, нейронных повреждений и провоспалительные ответы в гиппокампе после инъекции каината у мышей [50]. Более того, EP1-селективный антагонист SC-51089 может устранить увеличение экспрессии Р-гликопротеина, находящегося на барьере кровь-мозг у крыс, вызванное пилокарпиновыми судорогами, поэтому антагонизм рецептора EP1 малыми молекулами может

улучшить доступность и эффективность терапевтических средств, таких как фенитоин, путем восстановления целостности ГЭБ [51].



Накопившиеся данные подтверждают связь между активацией рецептора EP2 и вторичной нейротоксичностью в моделях хронического воспаления и нейродегенерации [52-54]. В последние несколько лет было разработано несколько мощных и селективных антагонистов рецептора EP2 [52,55] – соединение TG4-155, конкурентный антагонист EP2, и TG4-155, ослабляет индукцию ЦОГ-2 и других провоспалительных медиаторов, вызванную активацией EP2 рецепторов в микроглии крыс [53,56].



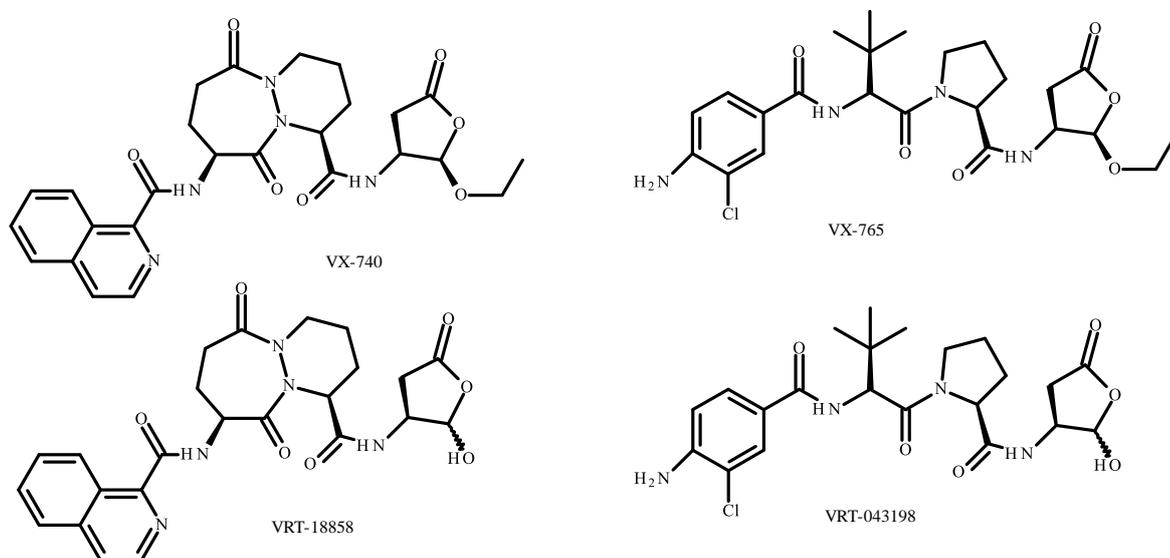
Другой антагонист EP2, TG6-10-1, был создан путем введения трифторметильной группы в метилиндольное кольцо TG4-155 с целью улучшения его фармакокинетики [58]. Эта химическая модификация действительно значительно улучшает период полураспада в плазме до 1,6 часов и соотношение мозг-плазма до 1,6 у мышей без заметного ухудшения селективности [9]. Кроме того, введение TG6-10-1 оказывает нейропротекторное действие и ускоряет восстановление функций у крыс после эпилептического статуса, вызванной острым воздействием диизопропилфторфосфата, аналога нервно-паралитического газа сарина [60]. Независимо, оказывают ли данные антагонисты рецепторов EP1 и EP2

влияние на хроническую эпилепсию или когнитивные нарушения послеэпилептического статуса, требуются дополнительные исследования с долгосрочной записью электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Тем не менее, эти предварительные исследования показывают, что сигнальные пути PGE2 через рецепторы EP1 и EP2 играют решающую роль в нейровоспалении и нейродегенерации после судорог, и указывают на антагонизм EP1 и/или EP2 в качестве возможной вспомогательной терапии - учитывая их доказанную нейропротекцию - для лечения эпилепсии вместе с базовой терапией ПЭП [11].

1.2.3 Ингибиторы синтеза IL-1b и антагонисты интерлейкиновых рецепторов

Провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины IL-1b, IL-6 и фактор некроза опухоли TNF- α , обычно определяются на низком базальном уровне в мозге и быстро повышаются в ответ на острые мозговые повреждения, такие как судороги. Повышенное содержание IL-1b, его рецептора типа 1 (IL-1R1), а также его биосинтетического фермента - каспазы-1/ интерлейкин-1 превращающий фермент (ICE) – было обнаружено как в глиальных клетках, так и в нейронах в очагах эпилепсии у человека при фармакорезистентных формах симптоматической эпилепсии и в экспериментальных моделях судорог и эпилепсии [68-70]. Фармакологические и генетические вмешательства в животных моделях показали, что этот цитокин вносит вклад в патофизиологию эпилепсии несколькими путями: повышает возбудимость нейронов через блокирование опосредованного астроцитами поглощения глутамата из синаптического пространства [71]; усиливает функцию NMDA-рецепторов через активацию тирозинкиназ и последующее фосфорилирование субъединицы NR2A/B [72]; изменяет ГАМК нейротрансмиссию [73]; модулирует ионные каналы, связанные с напряжением, и способствует развитию каналопатий [74]. Внутригиппокампальное введение антагониста рецептора IL-1 (IL-1RA) или его сверхэкспрессия в астроцитах подавляет поведенческие и электрографические судороги у мышей, вызванные введением каината или

бикукулина, а также электрической стимуляцией гиппокампа [79,80]. Более того, IL-1RA уменьшает усиление эпилептогенеза под действием липополисахарида (LPS) – классического индуктора иммунных и воспалительных реакций [82], что позволяет предположить, что блокирование сигнала IL-1b может предотвратить припадки и хроническую эпилепсию. VRT-18858 и VRT-043198 являются селективными ингибиторами каспазы-1/ICE, которая расщепляет предшественника IL-1b до активного зрелого IL-1b [83].



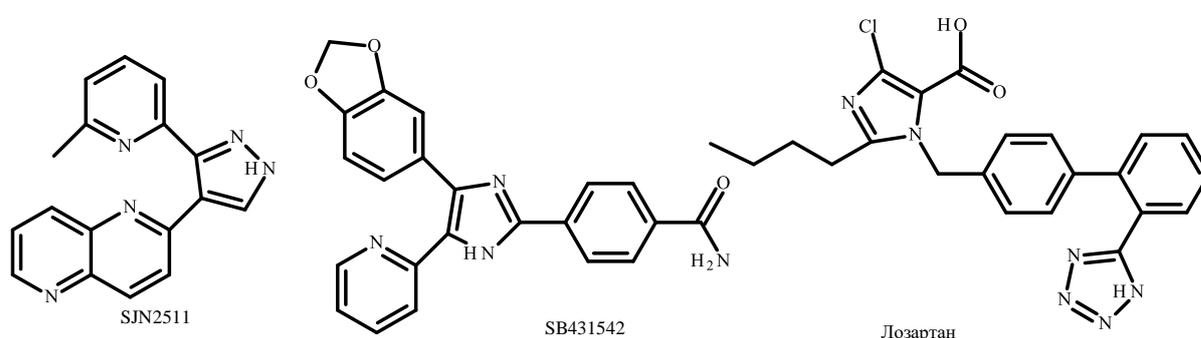
Про-препарат VX-765 может эффективно преобразовываться в VRT-043198 при системном введении мышам и ингибирует LPS-индуцированную секрецию IL-1b. VX-765 также снижает тяжесть заболевания ревматоидным артритом у мышей и секрецию цитокинов в мышинной модели воспаления кожи [86]. Эти исследования периферического воспаления у мышей позволяют предположить, что ингибирование синтеза IL-1b достаточно для блокирования чрезмерных воспалительных процессов. В ЦНС лечение препаратом VX-765 уменьшает симптомы депрессии, вызванной хроническим стрессом, у мышей и снижает уровень IL-1b в сыворотке крови и гиппокампе [87]. Интересно, что введение VX-740 или VX-765 уменьшает вызванную судорогами продукцию IL-1b в гиппокампе, задерживает наступление

припадка и сокращает продолжительность судорог у крыс при интрагиппокампальном введении каината. Эти благоприятные эффекты связаны с ингибированием каспазы-1 и блокадой биосинтеза IL-1b в мозге и повторяются у мышей, у которых отсутствует каспаза-1 [88]. Более того, системное введение VX-765 проявляет мощную антиконвульсантную активность на острой форме судорог и у мышей с хронической эпилептической формой, которые не поддаются традиционной терапии противосудорожными препаратами в зависимости от дозы [90]. Эти результаты в совокупности убедительно показывают, что фармакологическое ингибирование каспазы-1 селективными малыми молекулами представляет собой возможную терапевтическую стратегию для подавления острых судорог и развития эпилепсии [13].

1.2.4 Ингибиторы сигнализации трансформирующего фактора роста бета

TGF- β является многофункциональным цитокином, который играет важную роль в пролиферации и дифференцировке клеток, апоптозе, эмбриогенезе и воспалительных реакциях [91]. Недавние исследования доказывают, что TGF- β сигнализация участвует в эпилептогенезе после травмы мозга, связанной с разрушением ГЭБ [94]. Вскоре после нарушения функции ГЭБ альбумин начинает поступать во внеклеточное пространство мозга [95] и вызывает активацию TGF- β сигнализации в астроцитах, вызывая астроцитарную активацию, нарушение калиевой буферизации и метаболизма глутамата, регуляцию провоспалительных цитокинов и синаптогенеза, что в конечном итоге приводит к повышению возбудимости нейронов и спонтанным судорогам [96-98]. Интересно, что синаптогенез и судорожная активность, вызванные альбумином, могут быть устранены SJN2511 – мощным и селективным ингибитором TGF- β /ALK5 [99]. Кроме того, ингибиторы ALK5 – SJN2511 или SB431542 блокируют альбумин-индуцированное увеличение TGF- β и связанное с ним фосфорилирование

SMAD2/3 [100]. Более того, лозартан, одобренный FDA антагонист рецептора ангиотензина II типа 1 (AT1), который, как сообщалось, блокирует периферическую TGF- β сигнализацию, может эффективно подавлять вызванную альбумином активацию TGF- β в мозге и предотвращать последующие спонтанные судороги [100]. Эти результаты укрепляют представление о том, что воздействие на TGF- β сигнализацию является реальной стратегией для модификации и профилактики заболевания эпилепсией.



1.2.5 Ингибиторы НАДФН-оксидазы 2

Окислительный стресс в мозге вызван дисбалансом между генерацией и детоксикацией реактивных форм кислорода и азота (ROS/RNS), которые атакуют клетки мозга и, таким образом, играют важную роль в воспалении, старении и дегенерации мозга [101]. Активированные кислородсодержащие метаболиты (NOXs) – семейство, включающее NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, двойную оксидазу 1 (DUOX1) и DUOX2 - являются основным источником ROS путем переноса электронов от внутриклеточного NADPH через биологическую мембрану, а затем к внеклеточному кислороду, генерируя супероксид [103]. Среди этих семи изоферментов NOX2 является прототипической формой и играет центральную роль в нейровоспалении, нейродегенерации и связанных с ними функциональных нарушениях при таких неврологических заболеваниях, как травма спинного мозга, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [107], рассеянный склероз [109] и эпилепсия [110].

Данные свидетельствуют о том, что нейронное повреждение, вызванное эпилептическими судорогами в гиппокампе крыс, связано с индукцией ROS после инъекции пилокарпина, характеризующейся снижением уровня сниженного глутатиона и увеличением содержания нитритов и липидной перекиси [111]. Аналогично, эпилептические судороги, вызванные кайнатом у крыс, приводят к временно-зависимой транслокации субъединиц NOX из цитозола гиппокампа на мембрану, где собирается активный комплекс NOX. Интересно, что активация NOX, вызванная эпилептическими судорогами, совпадает с активацией микроглии в гиппокампе [112]. Кроме того, ROS, образованные NOX, способствуют нейродегенерации у крыс, получивших пилокарпин, что значительно подавляется апоцинином - селективным ингибитором NOX2 [113]. Апоцинин и другие ингибиторы NOX2, включая дифенилиодоний (DPI), часто вызывают сомнения в связи с их внебелковыми активностями (рис. 1.4). Например, апоцинин проявляет выраженную активность по захвату ROS и ингибированию киназ, в то время как DPI является общим ингибитором флавопротеинов.

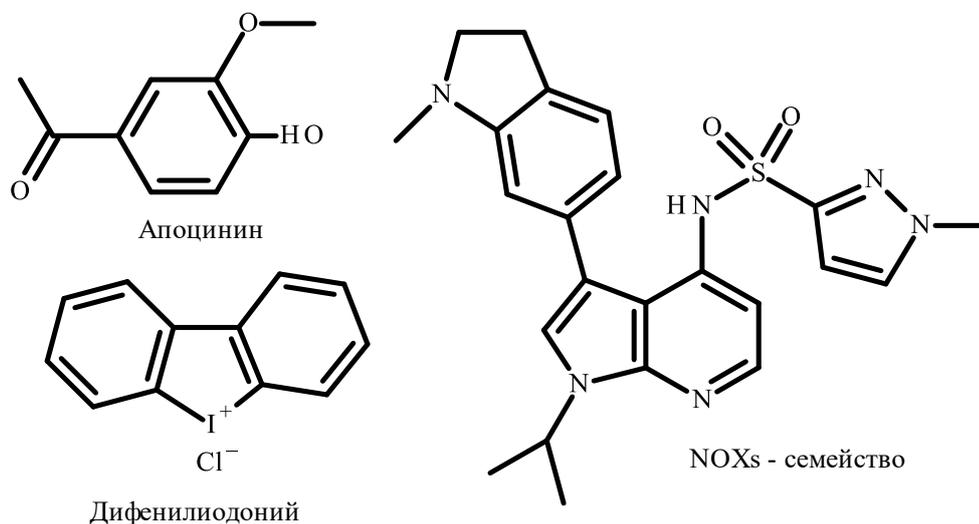


Рис. 1.3 Классические ингибиторы NOX

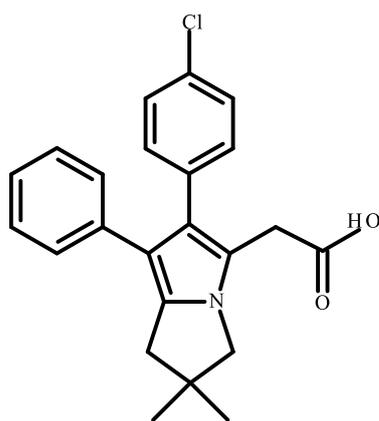
Благодаря последним достижениям в области химической биологии и HTS было выявлено несколько новых классов низкомолекулярных ингибиторов NOX с улучшенной специфичностью [115-117]. Однако вопрос о

том, проявят ли эти новые ингибиторы NOX2 противоэпилептический или противоэпилептогенный эффект в животных моделях, требует изучения.

1.2.6 Другие потенциальные противовоспалительные мишени

1.2.6.1 Липооксигеназа

Лейкотриены, вырабатываемые под воздействием липооксигеназы (LOX) из арахидоновой кислоты, также являются провоспалительными и увеличивают проницаемость микрососудов; поэтому препараты, способные ингибировать как COX, так и LOX, были предложены для лечения состояний, связанных с воспалением, в связи с их двойным действием [118]. Например, флавоноиды природного происхождения, содержащие байкалин и катехин, демонстрируют нейропротекцию при эксайтотоксичности, вызванной каинатом, снижая активность как ЦОГ-2, так и 5-LOX [119]. Аналогичным образом, ликофелон, двойной ингибитор ЦОГ/LOX, который недавно был одобрен в качестве эффективного средства для лечения остеоартрита, демонстрирует противосудорожное действие в мышинной модели судорог с пентилентетразолом [120].



Ликофелон

1.2.6.1 Микросомальная простагландин Е синтаза-1 (mPGES-1)

Микросомальная простагландин Е синтаза-1 (mPGES-1) – это фермент, который образует простагландин E₂ (PGE₂) из простагландина H₂, молекулы-предшественника, непосредственно синтезируемой ЦОГ, и имеет три

изофермента: mPGES-1, mPGES-2 и цитозольный PGES [40]. mPGES-1 способствует воспалительным и болевым реакциям через синтез PGE₂ в модели заболевания ревматоидного артрита человека [121]. mPGES-1 также активно индуцируется у мышей после судорог, вызванных пилокарпином, и усугубляет гибель нейронов, вызванную каинатом, что позволяет предположить участие mPGES-1 в патогенезе, вызванном судорогами [126,127]. Также было показано, что mPGES1 усиливает эпилептические припадки и глиоз гиппокампа в мышинной модели судорог, вызванных пентилентетразолом [128]. Первое клиническое исследование ингибитора mPGES-1 LY3023703 показало более мощное ингибирование синтеза PGE₂, чем ингибитор COX-2 целекоксиб [129]. Таким образом, блокада mPGES1 малыми молекулами должна быть изучена в качестве противовоспалительной терапии эпилепсии в будущем [130].

1.2.6.2 Толл-подобный рецептор 4

Толл-подобный рецептор 4 (TLR) – мембранный белок, который является важным компонентом врожденного иммунитета [131]. TLR4 может быть активирован амфотерином (HMGB1) – эндогенным сигнальным белком опасности, выделяемым иммунными клетками, нейронами и глиями в ЦНС в ответ на повреждение клеток или повышенную возбудимость нейронов. Интересно, что и HMGB1, и TLR4 повышены в образцах мозга пациентов с эпилепсией и в тканях мозга животных с хроническими судорогами [132]. HMGB1, особенно активная дисульфидная форма, усиливает функцию NMDA-рецепторов, а также усугубляет судороги, вызванные каинатом, активируя TLR4 в нейронах гиппокампа [76,78]. С другой стороны, HMGB1 также активирует рецептор для конечных продуктов расширенного гликирования (RAGE), способствуя повышенной возбудимости и проконвульсантному эффектам, которые не зависят от TLR4 [77]. Антагонист эриторан, недавно не прошел международное клиническое исследование фазы

III для лечения тяжелого сепсиса. В качестве альтернативной стратегии были разработаны ингибиторы (например, TAK-242), которые направлены на TLR4.

1.2.6.3 Фактор некроза опухоли

Фактор некроза опухоли (TNF- α) является важным провоспалительным цитокином, принадлежащим к суперсемейству лигандов TNF. Они участвуют в активации, дифференциации, пролиферации и инфильтрации иммунных клеток в ЦНС во время системной воспалительной реакции [137]. Системное введение TNF- α через 24 ч после миндального киндлинга у крыс облегчает поведенческие судороги и увеличивает эпилептоформные разряды, в то время как электрическая стимуляция значительно повышает уровень TNF- α как в крови, так и в мозге, что свидетельствует о взаимодействии между судорожными и провоспалительными цитокинами [138]. TNF- α играет двойственную роль в патофизиологии судорог и эпилепсии - проявляя проконвульсивный эффект через рецептор TNFR1 и антиконвульсивный эффект через рецептор TNFR2, в зависимости от клеточного контекста [139–142]. Поэтому ингибирование TNFR1 и/или активация TNFR2 представляет собой новую стратегию лечения неврологических заболеваний, включая эпилепсию. Малые молекулы, которые специфически модулируют TNFR1 или TNFR2 с соответствующей фармакодинамикой и фармакокинетикой, недоступны.

1.2.6.4 Интерлейкин 6

Интерлейкин 6 (IL-6) регулирует воспалительные и иммунные реакции через свой рецептор, который связан с gp130. Как и другие прототипичные провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β и TNF- α , IL-6 также могут индуцировать COX-2 для синтеза PGE2 через активацию транскрипционного сигнала NF- κ B [147]. Индукция IL-6 широко наблюдается у пациентов с эпилепсией и в животных моделях экспериментальной эпилепсии [148]. Последние данные, полученные в клинических условиях и экспериментальных моделях, свидетельствуют об активной роли IL-6 в возникновении и обострении приступов эпилепсии [149]. Будущие усилия

должны быть направлены на разработку мощных и селективных малых молекул, направленных на синтез IL-6 или его рецептора IL6R, и оценку их противоэпилептического и антиэпилептогенного действия на животных моделях.

1.3. Обобщение данных

Современные противовоспалительные методы лечения эпилепсии ограничиваются иммунодепрессантами, такими как адренкортикотропный гормон, иммуноглобулин, плазмаферез, моноклональные антитела и кортикотропные стероидные гормоны. Однако эти редко используемые методы лечения имеют ограниченную эффективность при некоторых специфических типах эпилепсии, например, связанных с тяжелым энцефалитом и аутоиммунными заболеваниями, а механизм их действия остается практически неизвестным. Выявление ключевых провоспалительных медиаторов, участвующих в эпилепсии, и разработка мощных и проницаемых для мозга малых молекул, которые специфически изменяют их воспалительные функции, может привести к созданию новых противоэпилептических и противоэпилептогенных методов лечения. Эти усилия привели к проведению ряда исследований по фармакологическому ингибированию нескольких общепризнанных провоспалительных медиаторов с помощью малых молекул в животных моделях острых припадков и эпилепсии, и многие из них находятся на стадии завершения. В частности, участие нескольких известных провоспалительных медиаторов – COX-2, PGE2, IL-1b, IL6, TNF-a, TGF-b, NOX2, HMGB1 и TLR4 – в первичных припадках и хронической эпилепсии было широко изучено, и их патогенная роль в эпилептическом мозге становится очевидной. Однако необходимо провести дополнительные исследования, чтобы определить, смогут ли малые молекулы, нацеленные на эти провоспалительные медиаторы, успешно превратиться в клинические инновации [154,155].

Активация каскада ЦОГ-2 и простагландинов индуцирует провоспалительные цитокины, включая IL-1b, IL-6 и TNF- a, которые в свою

очередь усиливают транскрипцию ЦОГ-2, вовлекая путь NF-κB, и таким образом закрепляют воспалительные реакции как на периферии, так и в мозге [156]. Ингибирование ЦОГ-2 с помощью малых молекул может разорвать этот самоподкрепляющийся круг, тем самым уменьшая хроническое воспаление и последующие последствия. Исследования нескольких ингибиторов ЦОГ-2 в моделях судорог и эпилепсии дали некоторые положительные результаты, но есть и некоторые противоречия. Некоторые ингибиторы ЦОГ-2, если не все, при правильном применении оказывают противосудорожное действие и уменьшают повреждение нейронов, развивающееся после припадков, хотя их умеренное влияние на поведенческие и когнитивные изменения нуждается в дальнейшем изучении.

Как маркер нейровоспаления IL-1b повышается при судорогах и инициирует NF-κB-зависимую транскрипцию многих провоспалительных генов, включая COX-2, и тем самым способствует последующему развитию хронической эпилепсии. VX-765, небольшая молекула, которая селективно блокирует синтез IL-1b, показывает многообещающие терапевтические эффекты в нескольких моделях хронической эпилепсии у грызунов. В качестве альтернативного подхода к ингибированию синтеза IL-1b, блокирование IL-1R1 - эффектора воспалительного действия IL-1 - может представлять собой другую противовоспалительную стратегию.

В целом, накапливающиеся доказательства из предклинических и клинических исследований указывают на то, что направленность на воспалительные сигнальные пути представляет собой дополнительный подход к текущей симптоматической терапии ПЭП. Терапевтическая стратегия решения воспаления в мозге может увеличить судорожный порог и снизить вероятность спонтанных повторяющихся судорог, тем самым обеспечивая профилактику или изменение заболевания, а не только симптоматическое облегчение. Однако, перевод анти-воспалительных стратегий в клиническую практику представляет собой сложную задачу и требует дополнительной осторожности, обусловленной сложностью воспалительных сетей, которые

одновременно регулируются множеством компонентов и сигналов, которые часто укрепляют друг друга.

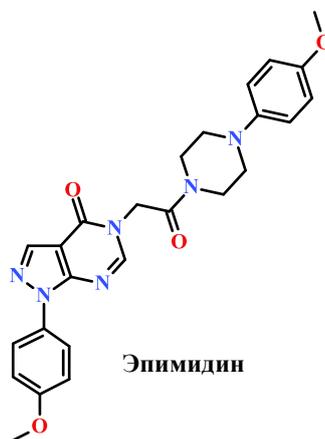
Выводы к разделу 1

В первом разделе рассмотрены все возможные провоспалительные агенты, которые по результатам исследований играют роль в эпилептогенезе, а также рассмотрены существующие лиганды среди класса «малых молекул» для коррекции нейровоспаления. Определены ключевые таргеты и векторы для последующих *in silico* исследований «малых молекул», которые являются более реалистичными кандидатами для этой терапевтической стратегии благодаря своим преимуществам в производстве, доставке и фармакокинетике, и представляют собой будущее направление в разработке новых терапевтических средств для эпилепсии.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 1-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-5-(2-(4-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-2-ОКСО-ЭТИЛ)ПИРАЗОЛ[3,4-d]ПИРИМИДИН-4-ОНА

Объектом исследования выбран 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-он (Эпимидин) (рис. 2.1), который был получен на кафедре фармацевтической химии НФаУ под руководством доктора фармацевтических наук, доцента Севериной А.И.

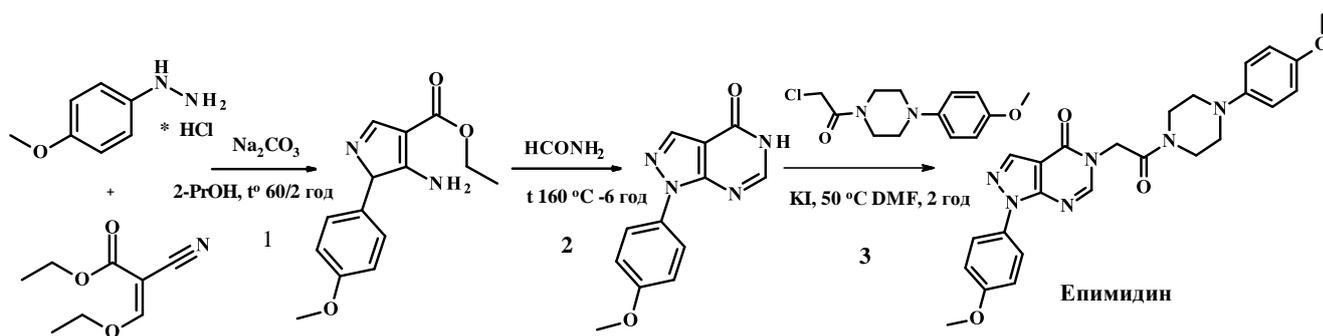


2.1 Синтез 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она

Первая стадия – синтез этил 5-амино-1-(4-метоксифенил)-1H-пиразол-4-карбоксилата

К раствору 1,57 мл (0,01 моль) (2E)-этил-2-циано-3-этоксиакрилата в 5 мл изопропанола добавляют 1,75 г (0,01 моль) 4-метоксибензилгидразина гидрохлорида и 1,53 мл триэтиламина (0,011 моль) и нагревают в течение двух часов при температуре 60 °С. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, изопропиловый спирт упаривают под вакуумом, а остаток разводят 20 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат.

Схема 2.1



Вторая стадия – синтез 1-(4-метоксифенил)-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-она

2,61 г (0,01 моль) этил 5-амино-1-(4-метоксифенил)-1Н-пиразол-4-карбоксилата нагревают в 2,0 мл (0,03 моль) формамида при 120°C в течение 48 часов. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры. Выделившийся осадок 1-(4-метоксифенил)-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-она отфильтровывают, разводят изопропиловым спиртом, фильтруют и сушат при $60\text{--}70^\circ\text{C}$ 12 часов.

Третья стадия – получение 2-хлоро-1-[4-(4-метоксифенил)-пиперазин-1-ил]-этанон

К раствору 19,2 (0,1 моль) 1-(4-метоксифенил)пиперазина в 25 мл диоксана на ледяной бане добавляют каплями 9,6 мл (0,12 моль) раствор хлорацетилхлорида. После завершения реакции раствор разводят четырехкратным количеством воды и фильтруют, сушат и используют в дальнейших исследованиях без дополнительной очистки.

Четвертая стадия – получение 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она (Эпимидин)

К раствору 0,01 моль (2,4 г) 1-(4-метоксифенил)-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-она 4 в 100 мл диметилформамида добавляют

0,015 моль (1,26 г) натрий гидрокарбоната и 0,01 моль (2,4 г) 2-хлоро-1-(4-фенилпиперазин-1-ил)этанона 7 и нагревают 5 часов при 70°C. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, выделившийся осадок разводят изопропиловым спиртом, фильтруют и сушат. При необходимости кристаллизуют из изопропанола.

2.2 Исследование фармакологических свойств 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она

Перспективность свойств 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она как инновационного противосудорожного агента была доказана масштабными *in vivo* исследованиями, в соответствии с международными подходами к поиску новых ПЭП [173, 174]

Скрининг противосудорожного действия 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она проводили на моделях PTZ и МЭШ-индуцированных судорог [175].

2.2.1 PTZ судороги. Для изучения антиконвульсантной активности на PTZ-модели судорог эпимидин вводили интрагастрально. Противосудорожную активность изучали на взрослых мышах и крысах двух полов. Животных содержали в стандартных условиях вивария ЦНИЛ Национального фармацевтического университета. Во время опытов животные находились в виварии при t=19-24 °C, влажности не более 60 %, естественном световом режиме "день/ночь" в полипропиленовых клетках на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводили с соблюдением принципов Директивы 210/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС "О защите животных, используемых в научных целях" (Брюссель, 2010), "Общих этических принципов экспериментов на животных" (Киев, 2001), Закона Украины "О защите животных от жестокого обращения" №3477-IV от 21.02.2006 г. с изменениями и Приказа

Министерства молодежи и спорта Украины "Об утверждении Порядка проведения научными учреждениями опытов, экспериментов на животных" №249 от 01.03.2012 г. Тяжесть течения судорожного приступа оценивали в баллах от 1 до 6, где: 1 - вздрагивание конечностей; 2 - манежный бег; 3 - приступ клонических судорог; 4 - приступ клонико-тонических судорог, при котором лабораторное животное занимает боковое положение; 5 - тоническая экстензия; 6 - тонические судороги, приводящие к гибели животного.

Выраженную противозепилептическую активность продемонстрировал 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она представлена на рис. 2.2.

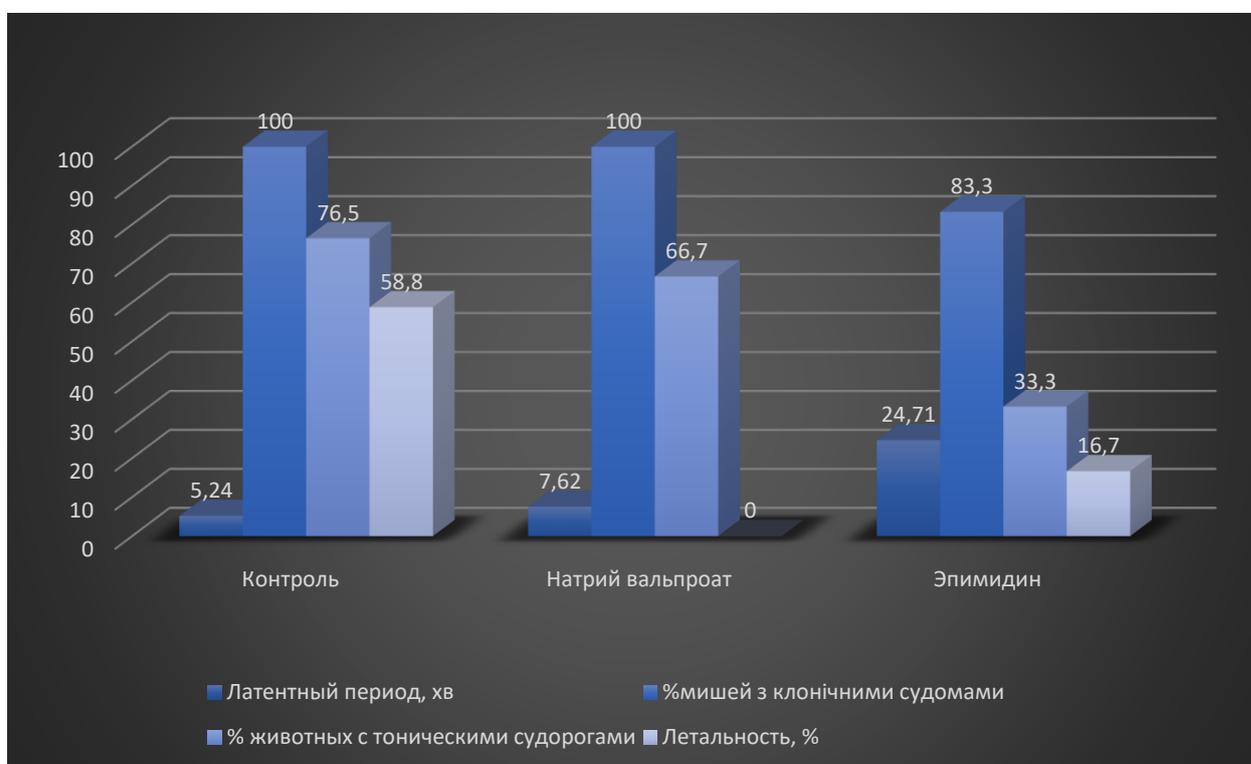


Рис. 2.2 Результаты исследования эпимидина на PTZ-модели судорог

2.2.2 МЭШ-судороги. Эпимидин оценивали по влиянию на продолжительность клонических судорог и тонической экстензии, учитывая показатели среднего количества лабораторных животных с тоническими и клоническими судорогами, а также по показателю летальности лабораторных животных, а также тяжесть судорог в баллах, время гибели лабораторных животных, количество животных с боковым положением и время пребывания в нем. Для статистического определения противосудорожного потенциала

были учтены период судорожного приступа и показатель летальности лабораторных мышей. Электрические приступы судорог индуцировали с помощью прибора Ugo-Basile ECT Unit 57800, который оснащен корнеальными электродами. Мышей подвергали воздействию электрических стимулов продолжительностью 0,2 с частотой 50 Гц и силой 50 мА. Исследование проведено на нелинейных мышах обоих полов массой 25-28 г. Животные были объединены в 10 групп по 8 животных в каждой. 1 группа служила контролем, мыши которой получали внутривенно воду очищенную в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. Результаты представлены на рис. 2.3.



Рис. 2.3 Противосудорожная активность эпимидина на модели МЭШ

2.2.3 Результаты острой токсичности. Безопасность применения 1-(4-метоксифенил)-5-(2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксоэтил)-1,5-дигидро-4Н-пирозоло[3,4-d]пиримидин-4-она (эпимидина) была оценена экспресс-методом Т. В. Пастушенко [176]. Определить среднесмертельную дозу не удалось: даже максимальная доза в 5000 мг/кг не вызывала гибели животных в течение 14 суток с момента введения. Введение эпимидина в дозах 1000, 2500, 4000 и 5000 мг/кг, которые, соответственно, превышают терапевтическую в 5, 12, 20 и 25 раз, вообще не сказалось на поведении животных (рис. 2.4). Таким образом, эпимидин относится к V классу

токсичности по классификации Hodge и Sterner - практически нетоксичные вещества ($LD_{50} > 5000$ мг/кг) [177].

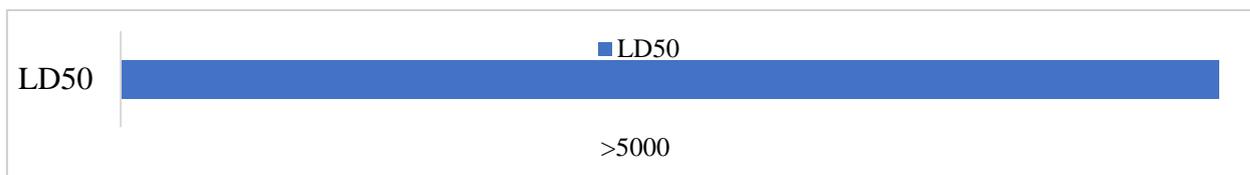


Рис. 2.4 LD_{50} перспективного антиконвульсанта Эпимидина

2.2.4 Исследование влияния на координацию движения и тонус мышц

Основным методом был "ротарод-тест", который позволяет выявить нейротоксическое влияние на моторную функцию подопытных животных. Эпимидин в "ротарод-тесте" продемонстрировал абсолютное отсутствие как миорелаксантного действия, так и негативного влияния на координацию движений, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий с контролем (рис. 2.5). Полученные данные позволяют утверждать, что антиконвульсивное действие эпимидина является избирательным без нарушений тонуса мышц.

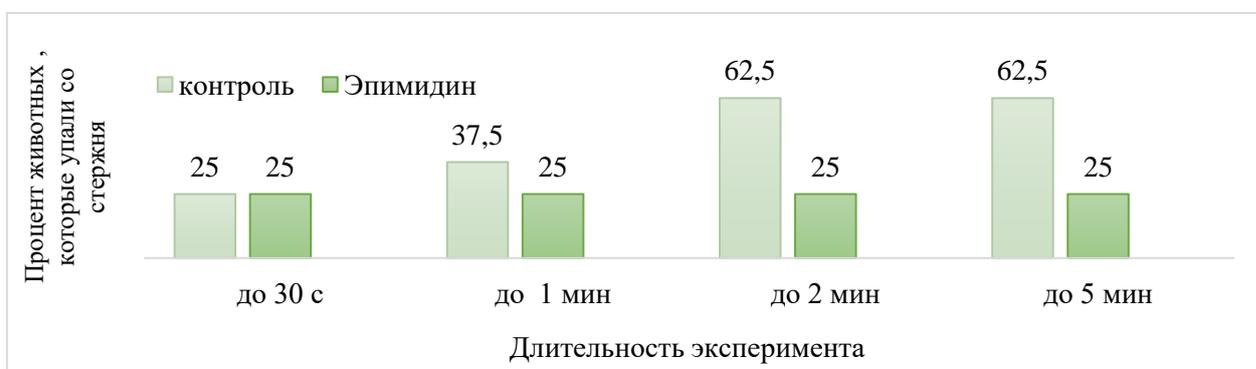


Рис. 2.5 Результаты воздействия Эпимидина на тонус мышц в «ротарод-тесте»

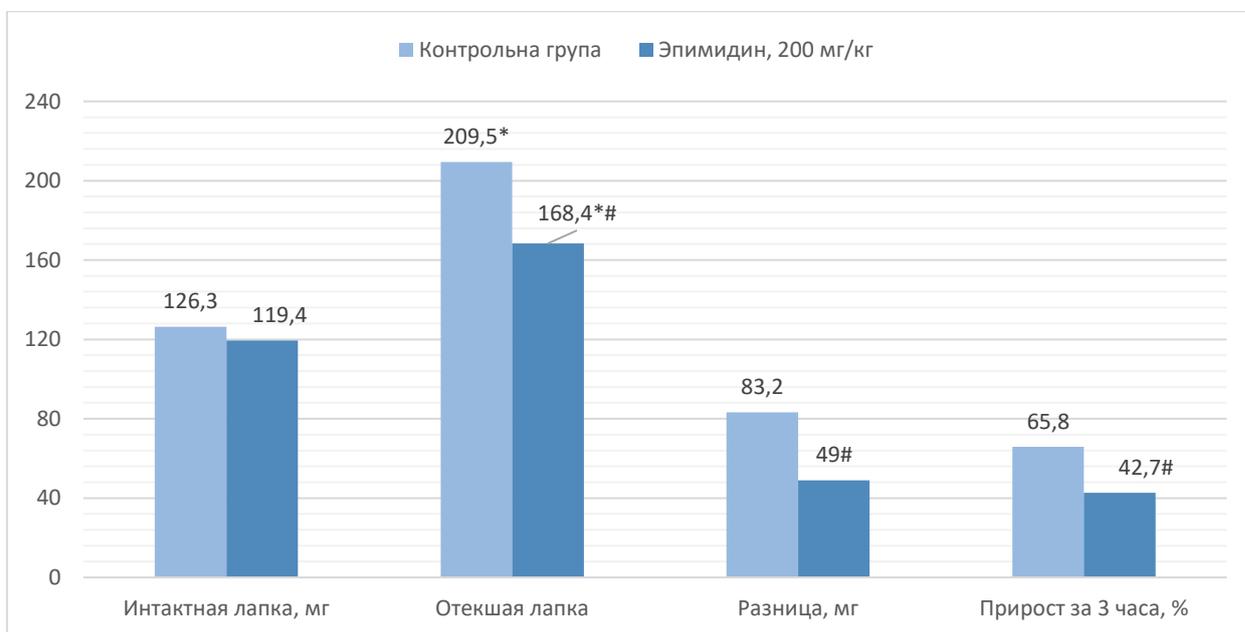
2.2.5 Тест «открытое поле». Эпимидин несколько подавлял двигательную активность, уменьшая количество пересеченных отверстий на 38%, что свидетельствует о преобладании процессов торможения в ЦНС над возбуждением (рис. 2.6). Наблюдали незначительную тенденцию к уменьшению показателей эмоциональности, маркером чего являются урикации и болюсы. В совокупности это свидетельствует о слабом седативном эффекте эпимидина.



Рис. 2.6 Результаты влияния Эпимидина на психоэмоциональное состояние

2.2.6 Результаты исследования противовоспалительной активности эпимидина

Исследование эпимидина на противовоспалительную активность проводили на модели каррагенинового отека у мышей по сравнению с контрольной группой. Результаты приведены на рис.2.7.



Статистически значимые различия:

* между массой интактной и отежной лапки контрольной группы, $p < 0,01$;

между массой отежной лапки в контрольной и группе эпимидина, а также между разницей массы отежной и интактной лапки в этих группах, $p < 0,05$.

Рис. 2.7 Противовоспалительная активность эпимидина на модели каррагенинового отека лапы крыс

Как видно из приведенной диаграммы (рис. 2.7), эпимидин достаточно сильно подавляет развитие отека: противовоспалительная активность составила 41%, тогда как значимым уровнем для использованной модели считается уже >20% [178]. На фоне введения эпимидина прирост массы лапки был в 1,5 раза меньше контрольной патологии [179].

2.3 Определение аффинности методом молекулярного докинга

Для молекулярного докинга и определения аффинности к противовоспалительным таргетам использована программа AutoDock Vina. В качестве белковых макромолекул были использованы структуры выкачанные из Protein Data Bank [180]: CASP1 – PDB ID 6PZP; COX-2 – PDB ID 3LN1.

Подготовку лигандов осуществляли с помощью программы BIOVIADraw 2021. Конструирование структур осуществляли с помощью программы BIOVIADraw 2021, формат .mol. Оптимизация структуры – программа HyperChem Relise с использованием MM2 b geometric optimization. Программа OpenBabel для конвертирования в формат .pdb, с помощью AutoDockTools-1.5.6 преобразованы в .pdbqt [181].

Discovery Studio Visualizer 2017/R2 использовали для удаления растворителя и нативного лиганда из молекулы протеина, сохранены в формате .pdb. В AutoDockTools-1.5.6 к структуре белка добавлены полярные водороды и сохранены в формате .pdbqt.

Размер Grid box и координаты его центров определяли по нативным лигандам:

COX-2 (PDB ID 3LN1): $x = 18,84$, $y = -52,89$, $z = 53,81$; размер $x = 22$, $y = 18$, $z = 20$;

COX-2 (PDB ID – 4M11): $x = -16,47$, $y = 44,11$, $z = 34,56$; размер $x = 26$, $y = 18$, $z = 24$. CASP1(PDB ID 6PZP): $x = -1,17$, $y = -32,76$, $z = 7,85$; размер $x = 26$, $y = 24$, $z = 28$.

Расшифровку результатов и интерпретацию данных стыковки осуществляли программой Discovery Studio 2021.

Выводы к разделу 2.1

1. Описаны методы синтеза исследуемого соединения – 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она (Эпимидин).
2. Охарактеризован фармакологический потенциал эпимидина как перспективного антиконвульсанта с благоприятным профилем безопасности и сопутствующими противовоспалительными свойствами.
3. Обоснован выбор программ и алгоритмов используемых для *in silico* экспериментов с целью определения степени аффинности к противовоспалительным биомишеням и обозначения молекулярных механизмов реализации эффекта.

РОЗДЕЛ 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ АФФИННОСТИ 1-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-5-(2-(4-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-2-ОКСО-ЭТИЛ)ПИРАЗОЛ[3,4-d]ПИРИМИДИН-4-ОНА К САЙТАМ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ

3.1 Обоснование целесообразности изучения противовоспалительной активности эпимицина

Как описывалось в обзоре литературы подавление развития воспаления является важным направлением предотвращения или подавления эпилептогенеза, развития хронической эпилепсии, а в ряде случаев и резистентных ее форм. Квон и его сотрудники протестировали комбинированную терапию противовоспалительными препаратами - ингибитором интерлейкина-1 (IL-1) и ингибитором ЦОГ-2 у крыс в течение 3 недель, и оценили ее влияние на эпилептогенез развития вторично-генерализованных судорог. Авторы обнаружили, что такая комбинация уменьшает развитие вторичных спонтанных судорог, что доказывает целесообразность противовоспалительной терапии при эпилепсии [182]. На данный момент окончательно установлена роль интерлейкина-1 β в эпилептогенезе. Угнетение биосинтеза интерлейкина 1 β селективным ингибитором VX-765 уменьшает тонико-клонические приступы и предотвращает хроническую резистентную эпилептическую активность у мышей (модели киндлинга) [183]. Кроме того, доказана способность останавливать судороги и предотвращать их повторное появление на скрининговых моделях у животных антагониста IL-1 β -рецептора - анакинры, рекомбинантного белка человека одобренного для лечения ревматоидного артрита [184].

Очевидно, что наличие у перспективной противосудорожной субстанции сопутствующей противовоспалительной активности является желательным и эффективным сочетанием. Исходя из патогенеза каррагенинового отека из-за активации циклооксигеназного звена

метаболизма арахидоновой кислоты, возможным механизмом реализации противовоспалительного действия эпимидина является ингибирующее влияние на провоспалительные эффекты простагландинов.

С целью прогнозирования и дополнительного доказательства молекулярных механизмов, проведен докинг в сайты ингибиторов циклооксигеназы-2 (COX-2) – целекоксиба и мелоксикама.

3.2 Молекулярный докинг эпимидина в сайт целекоксиба циклооксигеназы 2

Кристаллическая структура COX-2 в конформации с селективным высокоаффинным ингибитором целекоксибом (PDB ID - 3LN1) представляет собой гомотетрамерный белок, каждый гомодимер которого содержит активный сайт ингибитора (рис. 3.1) [185].

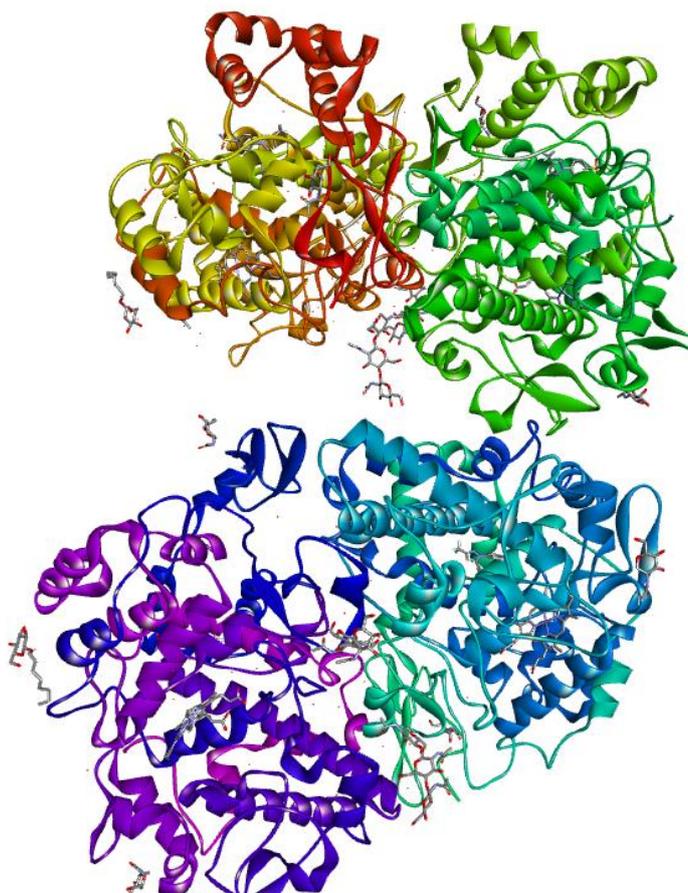


Рис. 3.1 Макромолекула циклооксигеназы-2 с целекоксибом в активном сайте

По экспериментальным данным, селективность целекоксиба обусловлена 12-ю прочными и короткими гидрофобными связями со

следующими аминокислотными остатками: Arg106, 499, Phe504, Ser339, Val335, 509, Leu345, 370, Met508, Tyr341, Trp373, Ala513. Валидация используемого алгоритма докинга продемонстрирована на рис. 3.2 и подтверждает высокую аффинность целекоксиба к COX-2 по рассчитанной энергии связывания (-12,1 ккал/мол). Визуализируются абсолютно все взаимодействия, установленные рентгеноструктурным анализом в эксперименте.

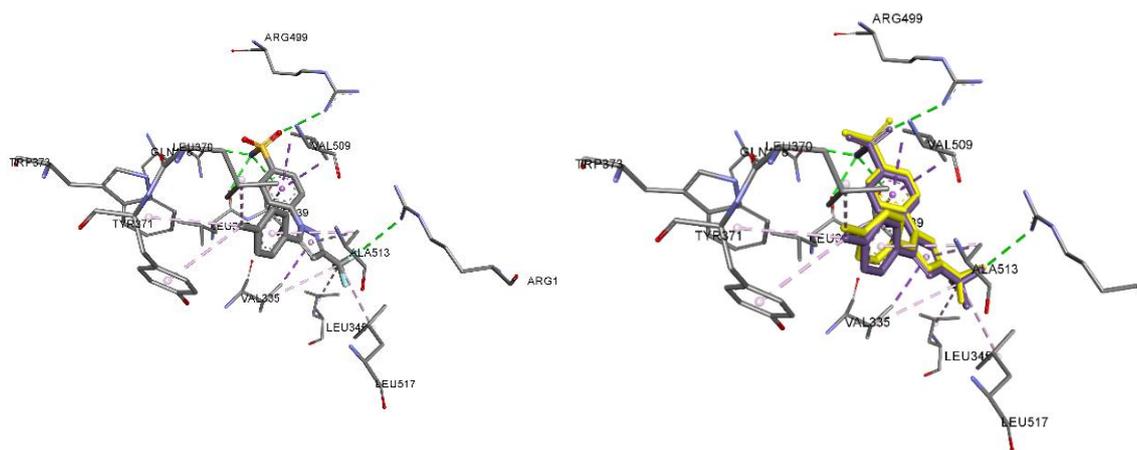


Рис. 3.2 3D визуализация размещения и взаимодействие с аминокислотными остатками активного сайта COX-2 нативного целекоксиба (а) [185] и совместного размещения с референс-лигандом целекоксибом (желтая молекула) (б)

При докинге Эпимидина рассчитано значение энергии связывания на уровне -8.9 ккал/моль, что несколько хуже нативного лиганда. Детализация аминокислотных взаимодействий демонстрирует значимые взаимодействия с аминокислотами активного сайта и целых пятнадцати возможных гидрофобных связей. Остатки четырех аминокислот не входят в состав активного сайта – гистамина (His75), серина (Ser339), валина (Val102), лейцина (Leu338), и связывают 4-метокифенилпиперазиновый фрагмент, хотя для пиперазина визуализируются и связи с активным сайтом (рис. 2.3, табл. 3.1).

Таблица 3.1

Результаты молекулярного докинга эпимидина и референс-лигандов в активные сайты противовоспалительных биомишеней

Таргет	Энергия связывания ккал/моль	Гидрофобные связи	Водородные связи	Референс лиганд, ккал/моль
COX-2	-8.9	Val509*, Ala513*, His75, Val102, Leu345*, Leu517 Tyr341*, Val335*, Leu338, Val335*, Ser339	–	-12,1 Целекоксиб
COX-2	-8.2	Leu352, Gly526, Ala527(3), Arg120(2), Leu531, Val116*, Leu359, Val349*	Ser530(2), Met522	-10.5 Мелоксикам

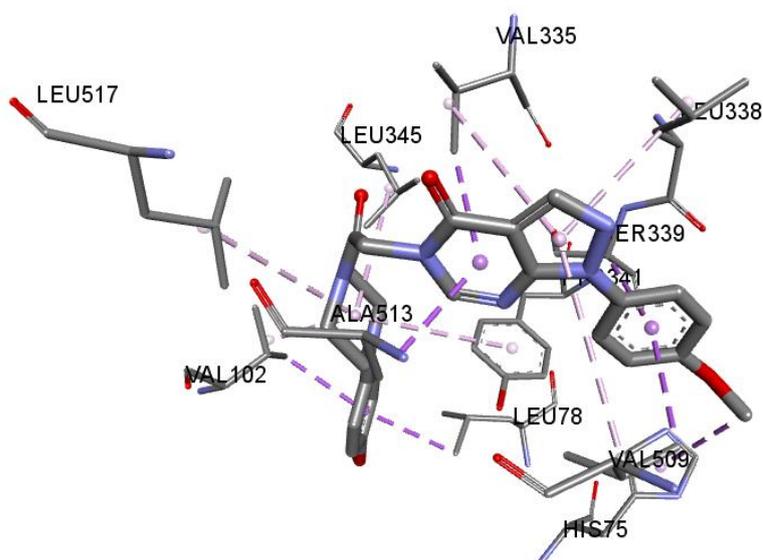


Рис. 3.3 3D визуализация взаимодействия эпимидина с аминокислотными остатками активного сайта целекоксиба в COX-2

Совместная конформация эпимидина и целекоксиба свидетельствует о достаточно похожем размещении лигандов в полости, идентичной фиксации фенильными фрагментами и гетероциклическими пиримидином и пиразолом, остается сомнительной фиксация фенилпиперазинового "хвоста" и ее влияние на стабильность конформационного размещения.

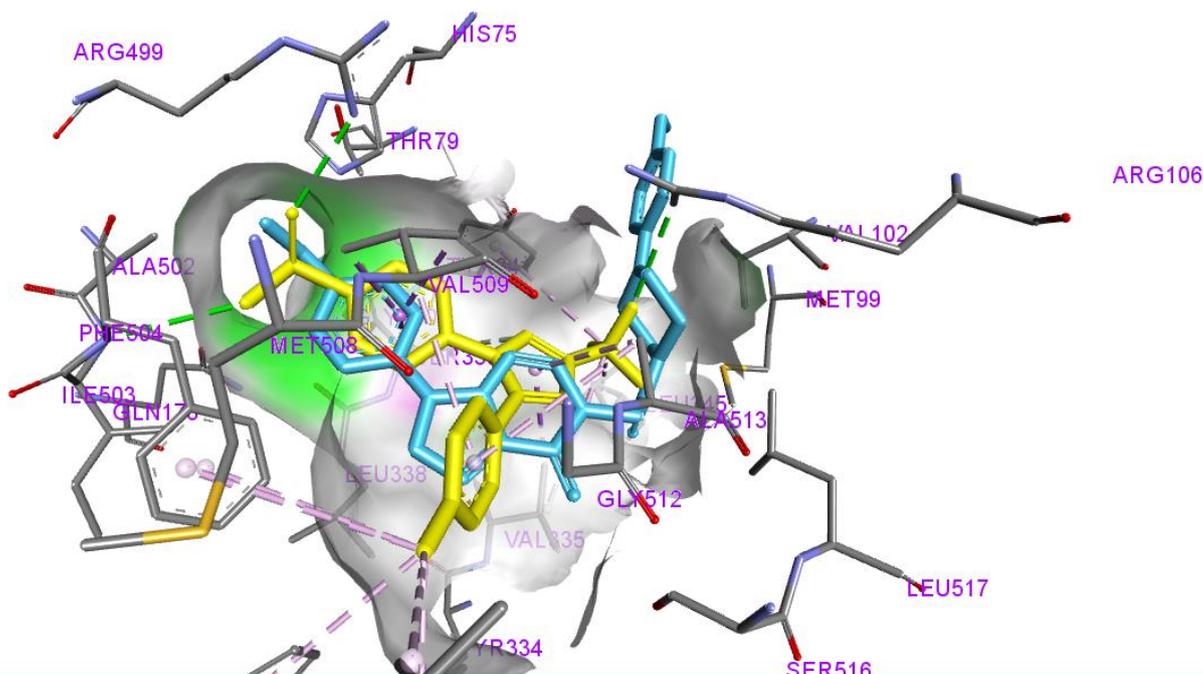


Рис. 3.4 3D визуализация совместная конформация целекоксиба и эпимицина в активном сайте COX-2

Итак, по результатам докинга считаем все же возможным проявление противовоспалительной активности через ингибирование COX-2.

3.3 Молекулярный докинг эпимицина в активный сайт мелоксикама циклооксигеназы 2

Для прогнозирования возможного механизма фармакологического действия эпимицина осуществлен его молекулярный докинг в сайт связывания селективного ингибитора циклооксигеназы-2 (COX-2) - мелоксикама. Мелоксикам имеет собственный карман связывания в верхней части канала энзима COX-2, чем объясняют его более высокое сродство именно к COX-2, чем к COX-1, по сравнению с другими оксикамами [186] и в отличие от коксибов, которые фиксируется в боковой части макромолекулы [185].

Для молекулярного докинга была использована макромолекула фермента COX-2, кристаллизованная в конформации с мелоксикамом [186]. Гомотетрамерная структура энзима COX-2 состоит из EGF-подобного домена, мембрано-связывающего домена и каталитического домена, каждая из четырех субъединиц которого содержит сайт связывания мелоксикама (рис.

3.5). Для определения аффинности исследуемого лиганда была использована субъединица А.

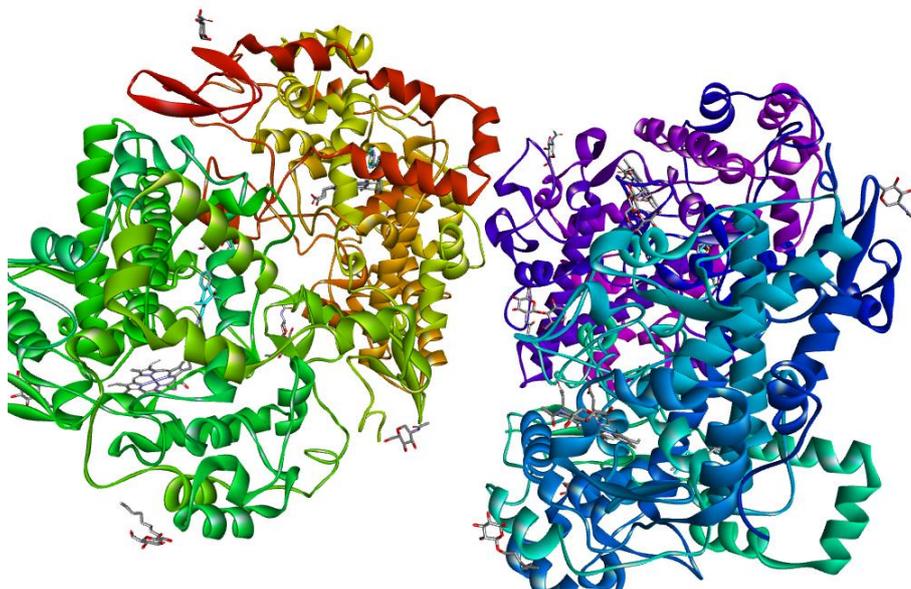


Рис. 3.5 Макромолекула циклооксигеназы с мелоксикамом

Особенностями размещения мелоксикама в активном сайте COX-2 считается некоторая его конформационная гибкость за счет водородных связей с серином (Ser530) и со скоординированной молекулой воды в комплексе с аргинином и тирозином (Arg120/Tyr-355) через атом азота тиазинового цикла и атом кислорода карбоксамидного фрагмента молекулы мелоксикама. Поскольку методология гибкого молекулярного докинга предусматривает удаление молекул воды из структуры макромолекулы при ее подготовке к стыковке, оценить возможность образования именно такого вида взаимодействия в *in silico* эксперименте не представляется возможным. Поэтому при оценке конформационного размещения исследуемого бензотиазин-3-карбоксиамида в кармане связывания COX-2, аминокислотные остатки аргинина (Arg120) и тирозина (Tyr355) считали остатками активного сайта. Магистральной аминокислотой, которая доказано определяет ключевое отличие гидрофобной фиксации мелоксикама от других оксикамов в активном сайте является аминокислота лейцин (Leu531), которая фиксирует бензеновый цикл мелоксикама.

Способность использованного алгоритма и параметров докинга воспроизводить экспериментально установленные данные по размещению мелоксикама в активном сайте приведены в табл. 3.1 и рис. 3.6, 3.7.

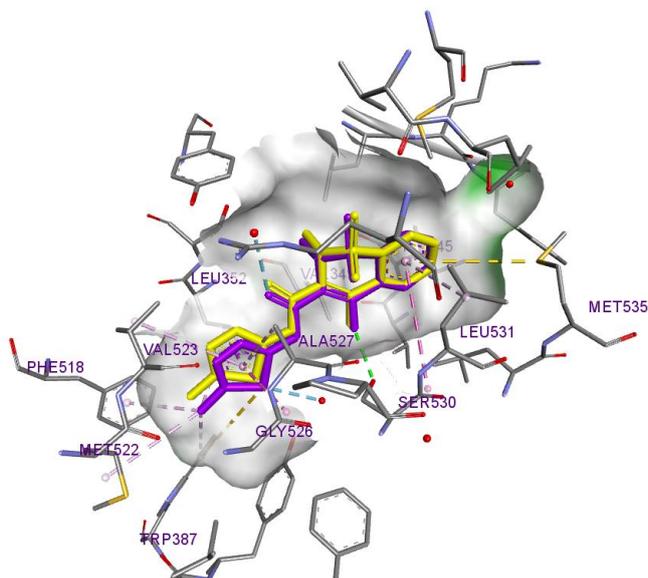


Рис. 3.6 3D визуализация совместного конформационного размещения нативного и референс-мелоксикама в активном сайте COX-2.

При референс-взаимодействии четко воспроизводится конформационное размещение в пространстве мелоксикама относительно нативного положения (рис 3.6), а также все виды взаимодействий с аминокислотами активного сайта COX-2 (рис. 3.7).

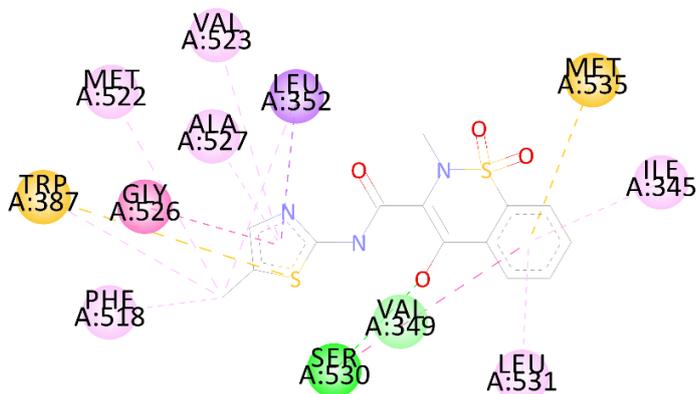


Рис. 3.7 2D визуализация референс-взаимодействия мелоксикама с аминокислотными остатками активного сайта COX-2

Энергия связывания мелоксикама составила -10.5 ккал/моль, что соответствует известной высокой аффинности к энзиму COX-2.

Оценку результатов докинга исследуемого лиганда Эпимидина проводили по параметру энергии связывания (ккал/моль) относительно референс-лиганда, по виду и количеству взаимодействия с аминокислотными остатками активного сайта и по пространственному положению в полости гидрофобного кармана.

По показателю энергии связывания, количественно выражающему степень аффинитета, исследуемый пиразолопиримидиновый лиганд несколько уступал нативному мелоксикаму: - 8,2 против -10,5 ккал/моль, соответственно (табл. 3.1). Однако, значение энергии связывания является достаточно низким, чтобы прогнозировать высокое сродство лиганда к сайту ингибитора энзима COX-2.

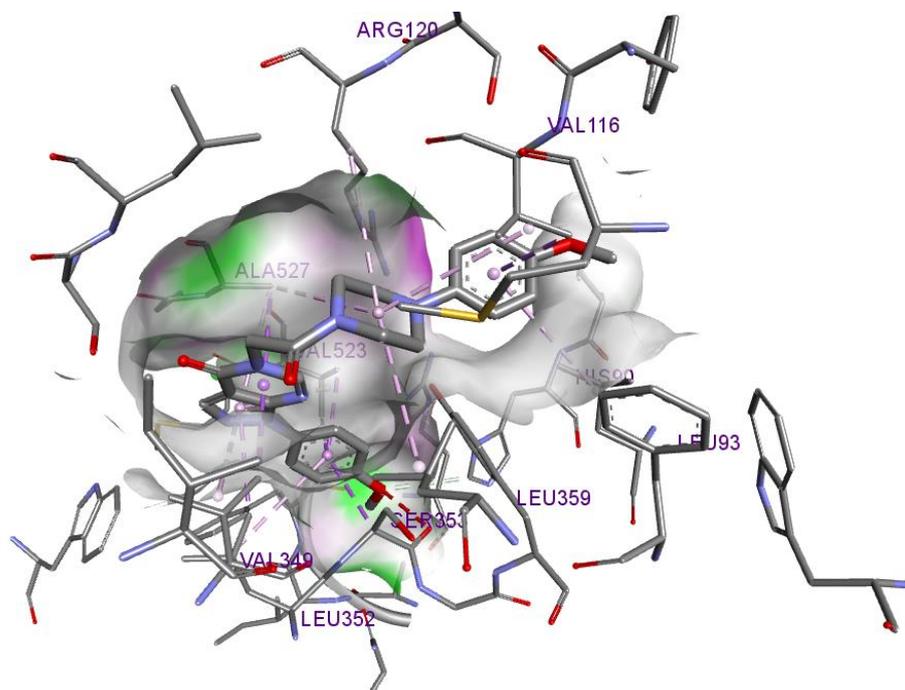


Рис. 3.8 3D и 2 D визуализация взаимодействия исследуемого лиганда с аминокислотными остатками активного сайта ингибитора COX-2

При анализе характера и количества взаимодействий с аминокислотными остатками становится очевидной возможность образования прочной конформации лиганд-энзим за счет шестнадцати гидрофобных взаимодействий (рис. 3.8). Между пиразолопиримидиновым циклом образуется тетраэдрическая сетка связей и аланином (Ala527(2)),

бидентантная с валином (Val349*) и с алкильным радикалом лейцина (Leu352). 1-Метоксифенильный фрагмент фиксируется серином (Ser353) и лейцином (Leu352), а также две связи с метильными группами валина (Val116*). Пиперидиновый фрагмент фиксируется сеткой связей с остатком лейцина (Leu359), аргинина Arg120(2), аланина (Ala527) и валина Val116*.

Дополнительная стабилизация конформации возможна за счет формирования водородной связи между метоксигруппой в 1 положении фенильного фрагмента и имидазольным циклом гистидина (His90).

Однако, детализация совместной конформации исследуемого эпимидина и нативного мелоксикама (рис. 3.9) демонстрирует не возможность полного и глубокого погружения исследуемого лиганда в гидрофобный карман активного сайта.

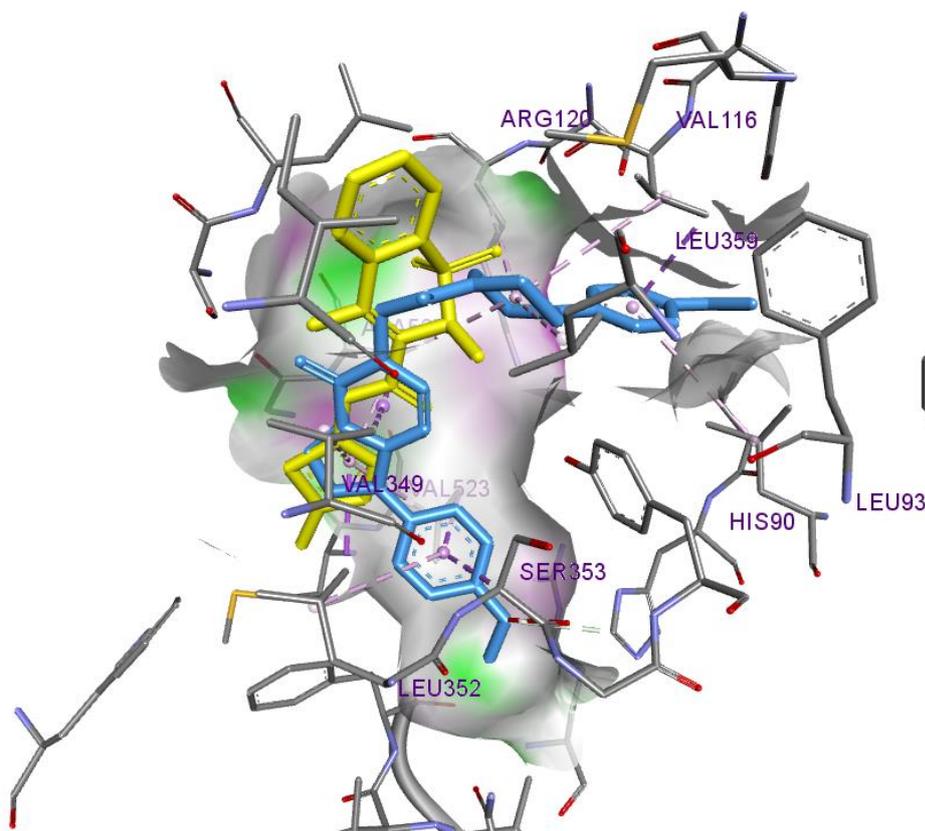


Рис. 3.9 3D визуализация совместного конформационного размещения экспериментального мелоксикама и исследуемого лиганда в активном сайте COX-2.

Метоксифенильный фрагмент в первом положении и 4-метоксифенилпиперидиновый фрагмент размещаются вне полости активного

сайта, что свидетельствует о малой вероятности существования такой конформации.

Выводы к разделу 3.1

1. Обоснована целесообразность изучения противовоспалительной активности 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она;
2. Процедурой ре-докинга референс-лигандов в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 валидированы методики молекулярного докинга – значение TRSD не превышало 2.
3. По результатам молекулярного докинга 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она в активные сайты циклооксигеназы-2 определено:
 - значение скоринговой функции к сайту целекоксиба - 9.2 ккал/моль относительно -12.1 ккал/моль;
 - значение скоринговой функции к сайту мелоксикама -8.2 ккал/моль относительно -10.5 ккал/моль;
4. По результатам прогнозирования аффинности и анализа конформационного размещения в активных сайтах относительно нативных референс-лигандов установлен механизм реализации противовоспалительного эффекта 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она как ингибитора циклооксигеназы 2 через сайт целекоксиба.

РАЗДЕЛ 4

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ АФФИННОСТИ 1-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-5-(2-(4-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-2-ОКСО-ЭТИЛ)ПИРАЗОЛ[3,4-d]ПИРИМИДИН-4-ОНА К ДРУГИМ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ БИОМИШЕНИЯМ

4.1 Докинг 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она IL-1 β превращающий фермент

Для докинга использовали белок IL-1 β превращающий фермент (CASP1) с селективным ингибитором VX-765 в активном сайте (PDB ID 6PZP) [187]. Провоспалительный энзим CASP1 был использован для оценки способности эпимидина его ингибировать и, соответственно, предотвращать синтез IL-1 β .

Активный сайт образован большинством полярных положительно заряженных аминокислот аргинином и гистидином: Arg179, Arg341(3), His237(3) формируют водородные связи, а Arg383, Arg179, Arg341 His342 - электростатические взаимодействия. Неполярные аминокислоты валин и пролин (Val338, Pro343) и ароматический триптофан (Trp340) вступают в гидрофобное взаимодействие с VX-765, водородные связи также формируют глицин (Gly238) и полярные заряженные остатки глутамина и серина (Gln283, Ser339). Валидность предложенного алгоритма докинга и воспроизводимость экспериментальных данных продемонстрирована на рис. 5.46. Визуализируются почти все связи, установленные в эксперименте, исключением является одно электростатическое взаимодействие с аргинином (Arg179) и водородная связь с серином (Ser339), хотя аминокислоты находятся в ближайшем окружении, что доказывает правильное конформационное размещение референс-лиганда.

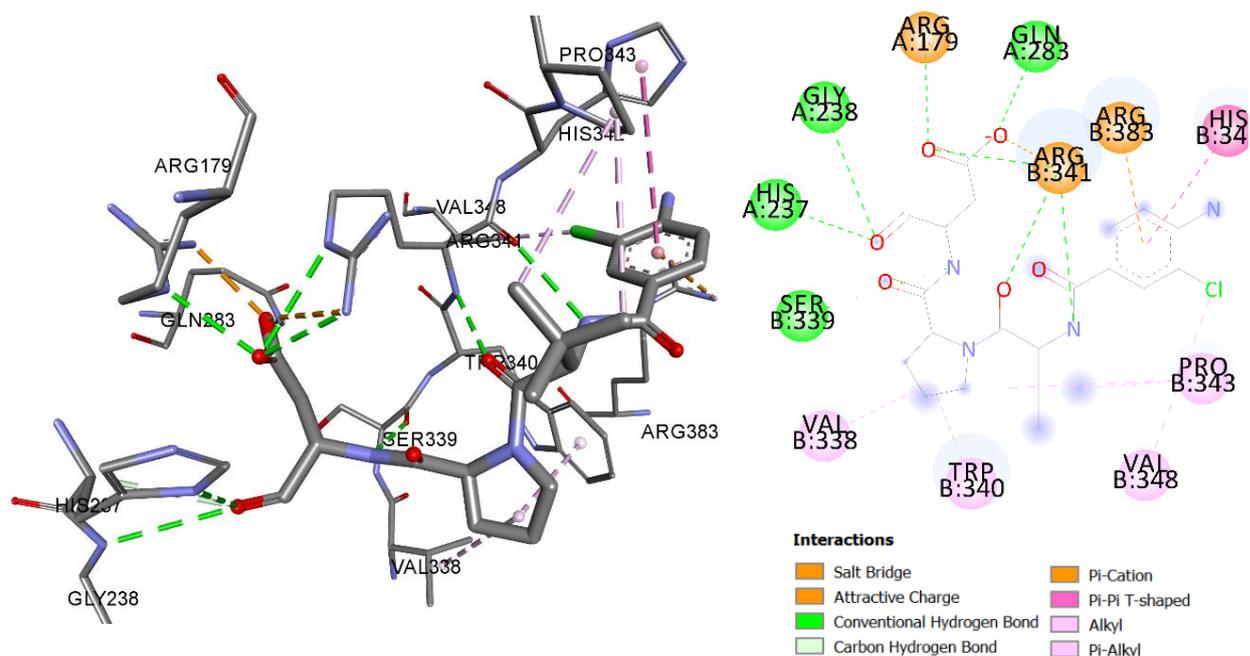


Рис. 4.1 Визуализация экспериментальной и референс-конформации селективного ингибитора ИЛ-1 β превращающего фермента – VX-765

Эпимидин продемонстрировал высокий уровень аффинитета к активному сайту интерлейкин-превращающего фермента (CASP1): значение скоринговой функции аналогично значению препарата сравнения и составляет -7,2 ккал/моль (табл. 3.1).

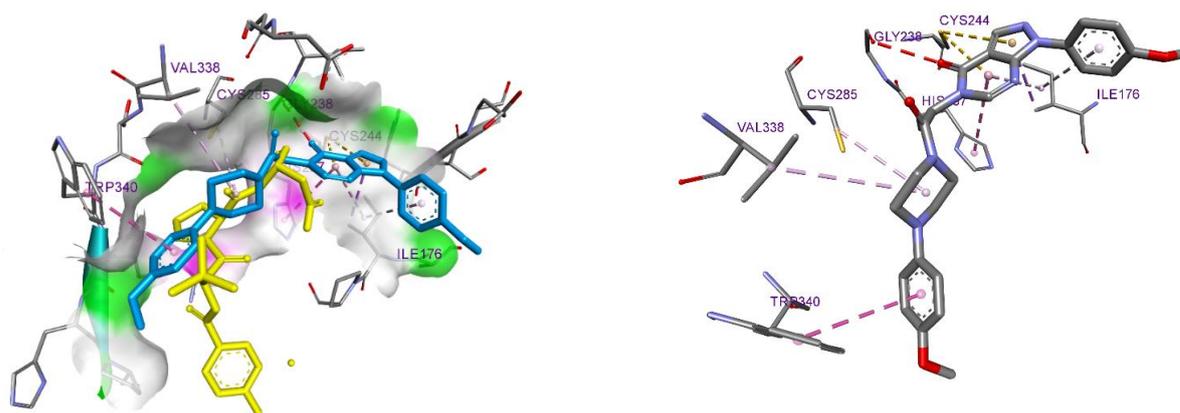


Рис.4.2 Визуализация размещения эпимидина в активном сайте фермента CASP1: а) совместная конформация селективного ингибитора (желтая молекула) и эпимидина (голубая молекула); б) взаимодействие с аминокислотами

Таблица 3.1

Результаты молекулярного докинга эпимидина и референс-лигандов в активные сайты противовоспалительных биомишеней

Таргет	Энергия связывания ккал/моль	Гидрофобные связи	Водородные связи	Референс лиганд, ккал/моль
CASP1	-7,2	Ile176 (4), Cys244(2)*, His237(2)* Trp340 *, Cys285* Val338*	–	-7,2 VX-765

Анализируя конформацию эпимидина при совместной визуализации с нативным лигандом в активном сайте CASP1, следует отметить (рис. 4.2), что он не способен глубоко погрузиться в достаточно полярную полость активного сайта. Эпимидин прочно фиксируется в полости гидрофобными связями 4-метоксифенилпиперазинового фрагмента с индольным циклом триптофана (Trp340), бидентантной связью с валином и цистеином (Val338, Cys285), а также двумя связями между пиримидиновым циклом и имидазольным циклом гистидина (His237). Два Pi-Sulfur взаимодействия возможны между пиразолопиримидиновым циклом и тиогруппой цистеина (Cys244). В то же время 1-метоксифенилпиразольный фрагмент образует 4 связи с изолейцином (Ile176), который не входит в активный сайт. К тому же, нативный лиганд в эксперименте формирует сетку из 7 водородных связей, положение же эпимидина и его структура не являются приемлемыми для их образования.

Итак, подытоживая можно сказать, что реализация благоприятного для угнетения эпилептогенеза противовоспалительного эффекта, через ингибирование интерлейкин-1 β преобразующего фермента, для эпимидина является маловероятной, а следовательно и проведение цитокиновых моделей скрининга абсолютно не целесообразно.

Выводы к разделу 4

1. Валидировано методику молекулярного докинга процедурой ре-докинга нативного лиганда – селективного ингибитора VX-765 в макромолекулу IL-1 β превращающего фермента;
2. Определен высокий уровень аффинитета эпимидина к активному сайту интерлейкин-превращающего фермента (CASP1): значение скоринговой функции аналогично значению препарата сравнения -7,2 ккал/моль;
3. По данным конформационного анализа установлена не способность эпимидина глубоко погрузиться в полярную полость активного сайта, что свидетельствует о невозможности реализации противовоспалительного эффекта через ингибирование IL-1 β превращающего фермента.

ВЫВОДЫ

1. По результатам литературного обзора обобщены основные данные в понимании роли провоспалительных агентов в реализации эпилептогенеза; охарактеризованы существующие «малые молекулы» с выраженными противовоспалительными и противосудорожными эффектами; определены главные таргеты для последующих *in silico* исследований перспективного лиганда.
2. Обобщены данные синтетических и фармакологических экспериментов и обозначена перспективность 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она для изучения на противовоспалительную активность.
3. Процедурой ре-докинга референс-лигандов в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 и $\text{IL-1}\beta$ превращающего фермента валидированы методики молекулярного докинга: значение TRSD не превышало 2.
4. По результатам прогнозирования аффинности и анализа конформационного размещения в активных сайтах относительно нативных референс-лигандов установлен механизм реализации противовоспалительного эффекта 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она как ингибитора циклооксигеназы 2 через сайт целекоксиба.
5. Определена не способность ингибировать циклооксигеназу 2 через сайт мелоксикама и $\text{IL-1}\beta$ превращающего фермента через сайт селективного ингибитора VX-765.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orsini A. et al. The role of inflammatory mediators in epilepsy: Focus on developmental and epileptic encephalopathies and therapeutic implications. *Epilepsy Res.* 2021. Vol. 172. P. 106588.
2. Aoki T., Narumiya, S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. Vol. 33. P.304–311
3. The role of inflammation in epilepsy / A. Vezzani et al. *Nat. Rev. Neurol.* 2011. Vol. 7. P. 31–40.
4. Aronica E., Crino P.B. Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia.* 2011. Vol. 52 (3). P. 26–32.
5. Inflammatory pathways of seizure disorders / N. Marchiet al. *Trends Neurosci.* 2014. Vol. 37. P. 55–65
6. Wilcox K.S., Vezzani A. Does brain inflammation mediate pathological outcomes in epilepsy? *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014. Vol. 813. P. 169–183
7. D’Ambrosio R. et al. Novel frontiers in epilepsy treatments: preventing epileptogenesis by targeting inflammation. *Expert Rev. Neurother.* 2013. Vol. 13. P. 615–625
8. Loscher W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. Vol. 12. P. 757–776.
9. Rojas A. et al. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia.* 2014. Vol. 55. P. 17–25.
10. Vezzani A. Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? *Expert Opin. Drug Saf.* 2015. Vol. 14. P. 583–592.
11. Varvel N.H. et al. Candidate drug targets for prevention or modification of epilepsy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. Vol. 55. P. 229–247
12. Vezzani A. et al. Immunity and inflammation in status epilepticus and its sequelae: possibilities for therapeutic application. *Expert Rev. Neurother.* 2015. Vol. 15. P. 1081–1092
13. Iori V. et al. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2016. Vol. 26. P.118–123

14. Samanen J. Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics. In *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* (Ganellin, R. and Jefferis, S.R., eds), 2013, p. 161–203.
15. Desjardins P. et al. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochem. Int.* 2003. Vol. 42. P. 299–303
16. Serrano G.E. et al. Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. *J. Neurosci.* 2011. 31. P. 14850–14860
17. Jiang, J. et al. Therapeutic window for cyclooxygenase-2 related anti-inflammatory therapy after status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2015. Vol. 76. P. 126–136
18. Kelley K.A. et al. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am. J. Pathol.* 1999. 155, 995–1004
19. Takemiya T. et al. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003. 71, 205–216
20. Takemiya, T. et al. Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. *Neurosci. Res.* 2006. 56, 103–110
21. Levin J.R. et al. Reduction in delayed mortality and subtle improvement in retrograde memory performance in pilocarpinetreated mice with conditional neuronal deletion of cyclooxygenase-2 gene. *Epilepsia.* 2012. 53, 1411–1420
22. Baik E.J. et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res.* 1999. 843, 118–129
23. Ma L. et al. Aspirin attenuates spontaneous recurrent seizures and inhibits hippocampal neuronal loss, mossy fiber sprouting and aberrant neurogenesis following pilocarpineinduced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 2012. 1469, 103–113

24. Jeong K.H. et al. Influence of aspirin on pilocarpine-induced epilepsy in mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2013. 17, 15–21
25. Fischborn S.V. et al. Targeting the prostaglandin E2 EP1 receptor and cyclooxygenase-2 in the amygdala kindling model in mice. *Epilepsy Res.* 2010. 91, 57–65
26. Gobbo O.L., O'Mara, S.M. Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2004. 125, 317–327
27. Jung K.H. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2006. 23, 237–246
28. Oliveira, M.S. et al. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res.* 2008. 79, 14–21
29. Citraro R. et al. Antiepileptogenic effects of the selective COX-2 inhibitor etoricoxib, on the development of spontaneous absence seizures in WAG/Rij rats. *Brain Res. Bull.* 2015. 113, 1–7
30. Kunz T., Oliw, E.H. Nimesulide aggravates kainic acid-induced seizures in the rat. *Pharmacol. Toxicol.* 2001. 88, 271–276
31. Trandafir C.C. et al. Co-administration of subtherapeutic diazepam enhances neuroprotective effect of COX-2 inhibitor, NS-398, after lithium pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience.* 2015. 284, 601–610.
32. Polascheck N. et al. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 2010. 224, 219–233.
33. Kunz T., Oliw, E.H. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2001. 13, 569–575.

34. Akula K.K. et al. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy Res.* 2008. 78, 60–70.
35. Kawaguchi K. et al. Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus. *Brain Res.* 2005. 1050, 130–137
36. Holtman, L. et al. Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2009. 84, 56–66.
37. Holtman L. et al. Cox-2 inhibition can lead to adverse effects in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010. 91, 49–56
38. Du Y. et al. Defining the therapeutic time window for suppressing the inflammatory prostaglandin E2 signaling after status epilepticus. *Expert Rev.* 2016. *Neurother.* 16, 123–130
39. Funk C.D., FitzGerald, G.A. (2007) COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50, 470–479
40. Takemiya T. et al. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem. Int.* 2007. 51, 112–120
41. Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010. 91, 104–112
42. Kaushik M.K. et al. Prostaglandin D(2) is crucial for seizure suppression and postictal sleep. *Exp. Neurol.* 2014. 253, 82–90
43. Akarsu E.S. et al. Inhibition of pentylenetetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. *Epilepsy Res.* 1998. 30, 63–68.
44. Chung J.I. et al. Seizure susceptibility in immature brain due to lack of COX-2-induced PGF2alpha. *Exp. Neurol.* 2013. 249, 95–103.
45. Shimamura M. et al. Prostaglandin E2 type 1 receptors contribute to neuronal apoptosis after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013. 33, 1207–1214.

46. Zhou P. et al. Neuroprotection by PGE2 receptor EP1 inhibition involves the PTEN/AKT pathway. *Neurobiol. Dis.* 2008. 29, 543–551.
47. Kawano T. et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat. Med.* 2006. 12, 225–229.
48. Zhen G. et al. PGE2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2012. 33, 2215–2219
49. Frankowski J.C. et al. Detrimental role of the EP1 prostanoid receptor in blood–brain barrier damage following experimental ischemic stroke. *Sci. Rep.* 2015. 5, 17956
50. Rojas A. et al. The prostaglandin EP1 receptor potentiates kainate receptor activation via a protein kinase C pathway and exacerbates status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2014. 70, 74–89
51. Pekcec A. et al. Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. 330, 939–947.
52. Jiang J., Dingledine, R. Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013. 34, 413–423.
53. Quan Y. et al. EP2 receptor signaling pathways regulate classical activation of microglia. *J. Biol. Chem.* 2013. 288, 9293–9302.
54. Fu Y. et al. EP2 receptor signaling regulates microglia death. *Mol. Pharmacol.* 2015. 88, 161–170.
55. Jiang J. et al. Emory University. Prostaglandin receptor EP2 antagonists, derivatives, compositions, and uses related thereto, US20140179750A1.
56. Jiang J. et al. Small molecule antagonist reveals seizureinduced mediation of neuronal injury by prostaglandin E2 receptor subtype EP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. 109, 3149–3154.

57. Jiang J., Dingledine, R. Role of prostaglandin receptor EP2 in the regulations of cancer cell proliferation, invasion, and inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013. 344, 360–367
58. Hagmann W.K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 2008. 51, 4359–4369.
59. Jiang J. et al. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. 110, 3591–3596.
60. Rojas A. et al. Inhibition of the prostaglandin EP2 receptor is neuroprotective and accelerates functional recovery in a rat model of organophosphorus induced status epilepticus. *Neuropharmacology.* 2015. 93, 15–27.
61. Ganesh T. et al. Discovery and characterization of carbamothioylacrylamides as EP selective antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013. 4, 616–621.
62. Ganesh T. et al. Lead optimization studies of cinnamic amide EP2 antagonists. *J. Med. Chem.* 2014. 57. 4173–4184.
63. Ganesh T. et al. Development of second generation EP2 antagonists with high selectivity. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. 82, 521–535.
64. Kim Y.T. et al. Prostaglandin FP receptor inhibitor reduces ischemic brain damage and neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 2012. 48, 58–65.
65. Shi J. et al. Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 2012. 72, 788–798.
66. Ni H. et al. EP3, prostaglandin E2 receptor subtype 3, associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2015. 1–10.
67. Ravizza T., Vezzani, A. Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience.* 2006. 137, 301–308.
68. Ravizza T. et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 2008. 29, 142–160.

69. Boer K. et al. (2008) Inflammatory processes in cortical tubers and subependymal giant cell tumors of tuberous sclerosis complex. *Epilepsy Res.* 78, 7–21.
70. Henshall, D.C. et al. (2000) Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 55, 250–257.
71. Hu S. et al. (2000) Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation.* 7, 153–159.
72. Viviani B. et al. (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700.
73. Roseti C. et al. (2015) GABAA currents are decreased by IL-1beta in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. *Neurobiol. Dis.* 82, 311–320.
74. Vezzani A. and Viviani, B. (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology.* 96, 70–82.
75. Lamkanfi M. et al. (2010) Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J. Immunol.* 185, 4385–4392.
76. Maroso M. et al. (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* 16, 413–419.
77. Iori V. et al. (2013) Receptor for advanced glycation endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures. *Neurobiol. Dis.* 58, 102–114.
78. Balosso S. et al. (2014) Disulfide-containing high mobility group box-1 promotes N-methyl-D-aspartate receptor function and excitotoxicity by activating Toll-like receptor 4-dependent signaling in hippocampal neurons. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1726–1740.

79. Vezzani A. et al. (2000) Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11534–11539.
80. Vezzani A. et al. (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*. 43 (Suppl. 5), 30–35.
81. Marchi N. et al. (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 33, 171–181.
82. Auvin S. et al. (2010) Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat and may be partially reversed by IL1RA. *Epilepsia*. 51 (Suppl. 3), 34–38.
83. Braddock M. and Quinn, A. (2004) Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 330–339.
84. Rudolph K. et al. (2003) Pralnacasan, an inhibitor of interleukin 1 beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 11, 738–746.
85. Loher F. et al. (2004) The interleukin-1 beta-converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 583–590.
86. Wannamaker W. et al. (2007) (S)-1-((S)-2-([1-(4-amino-3-chlorophenyl)-methanoyl]-amino)-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-1 inhibitor, exhibits potent antiinflammatory activities by inhibiting the release of IL-1beta and IL-18. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 509–516.
87. Zhang Y. et al. (2015) NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18.
88. Ravizza T. et al. (2006) Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia*. 47. 1160–1168.

89. Ravizza T. et al. (2008) Interleukin converting enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL1beta production. *Neurobiol. Dis.* 31, 327–333.
90. Maroso M. et al. (2011) Interleukin-1beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics.* 8, 304–315.
91. Yingling J.M. et al. (2004) Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 1011–1022.
92. Yu, L. et al. (2002) TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 21, 3749–3759
93. He Y. et al. (2014) ALK5-dependent TGF-beta signaling is a major determinant of late-stage adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 17, 943–952
94. Cacheaux L.P. et al. (2009) Transcriptome profiling reveals TGFbeta signaling involvement in epileptogenesis. *J. Neurosci.* 29, 8927–8935
95. van Vliet E.A. et al. (2007) Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain.* 130, 521–534
96. Ivens S. et al. (2007) TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain.* 130, 535–547
97. Friedman A. et al. (2009) Blood–brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res.* 85, 142–149
98. Heinemann U. et al. (2012) Blood–brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia.* 60, 1251–1257
99. Weissberg I. et al. (2015) Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF-beta/ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 78, 115–125
100. Bar-Klein G. et al. (2014) Losartan prevents acquired epilepsy via TGF-beta signaling suppression. *Ann. Neurol.* 75, 864–875

101. Uttara B. et al. (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74
102. Panday A. et al. (2015) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 5–23
103. Bedard K., Krause, K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313
104. Khayrullina G. et al. (2015) Inhibition of NOX2 reduces locomotor impairment, inflammation, and oxidative stress after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation.* 12, 172
105. Wang Q. et al. (2015) Post-treatment with an ultra-low dose of NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium attenuates disease progression in multiple Parkinson's disease models. *Brain.* 138, 1247–1262
106. Chen, S.H. et al. (2016) Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Curr. Opin. Pharmacol.* 26, 54–60
107. Wilkinson B.L. et al. (2012) Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 197.e21–197.e32
108. Apolloni S. et al. (2013) The NADPH oxidase pathway is dysregulated by the P2X7 receptor in the SOD1-G93A microglia model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Immunol.* 190, 5187–5195
109. Fischer M.T. et al. (2012) NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain.* 135, 886–899.
110. Puttachary S. et al. (2015) Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed. Res. Int.* 2015, 745613.
111. Freitas R.M. et al. (2005) Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS J.* 272, 1307–1312

112. Patel M. et al. (2005) Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage. *J. Neurochem.* 92, 123–131
113. Pestana R.R. et al. (2010) Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are involved in neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Lett.* 484, 187–191
114. Kim J.H. et al. (2013) Post-treatment of an NADPH oxidase inhibitor prevents seizure-induced neuronal death. *Brain Res.* 1499, 163–172
115. Altenhofer S. et al. (2015) Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 406–427
116. Maraldi T. (2013) Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxidative Med. Cell. Longevity.* 2013, 271602
117. Hirano K. et al. (2015) Discovery of GSK2795039, a novel small molecule NADPH oxidase 2 inhibitor. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 358–374
118. Leone S. et al. (2007) Dual acting anti-inflammatory drugs. *Curr. Topics Med. Chem.* 7, 265–275
119. Minutoli L. et al. (2015) A dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase protects against kainic acid-induced brain injury. *Neuromolecular Med.* 17, 192–201
120. Payandemehr B. et al. (2015) A COX/5-LOX inhibitor licofelone revealed anticonvulsant properties through iNOS diminution in mice. *Neurochem. Res.* 40, 1819–1828
121. Trebino C.E. et al. (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9044–9049
122. Chaudhry U.A. et al. (2008) Elevated microsomal prostaglandinE synthase-1 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 4, 6–13
123. Akitake Y. et al. (2013) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in Alzheimer's disease and its deletion mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *J. Neurosci. Res.* 91, 909–919

124. Koeberle A. and Werz, O. (2015) Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders. *Biochem. Pharmacol.* 98, 1–15
125. Takeuchi C. et al. (2013) Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates inflammation and demyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurochem. Int.* 62, 271–280
126. Turrin N.P. and Rivest, S. (2004) Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 16, 321–334
127. Takemiya T. et al. (2010) Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate. *J. Neurosci. Res.* 88, 381–390
128. Shimada T. et al. (2014) Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm.* 2014, 901902
129. Jin Y. et al. (2016) Pharmacodynamic comparison of LY3023703, a novel microsomal prostaglandin e synthase 1 inhibitor, with celecoxib. *Clin. Pharmacol. Ther.* 99, 274–284
130. Koeberle A. et al. (2016) Design and development of microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitors: challenges and future directions. *J. Med. Chem.* 20, 2016.
131. Bowie A., O'Neill, L.A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514
132. Walker A. et al. (2015) Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: focus on inflammation. *Brain Behav. Immun.* 53, 138–158
133. Moses T. et al. (2009) TLR4-mediated Cox-2 expression increases intestinal ischemia/reperfusion-induced damage. *J. Leukoc. Biol.* 86, 971–980
134. Fukata M. et al. (2006) Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology.* 131, 862–877

135. Kuper C. et al. (2012) Toll-like receptor 4 activates NF-kappaB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 302, F38–F46.
136. Vezzani A. et al. (2011) IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav. Immun.* 25, 1281–1289.
137. Sonar S. and Lal, G. (2015) Role of tumor necrosis factor superfamily in neuroinflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 6, 364.
138. Shandra A.A. et al. (2002) The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci. Res.* 42, 147–153.
139. Balosso S. et al. (2005) Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann. Neurol.* 57, 804–812.
140. Weinberg M.S. et al. (2013) Opposing actions of hippocampus TNFalpha receptors on limbic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.* 247, 429–437.
141. Balosso S. et al. (2009) Molecular and functional interactions between tumor necrosis factor-alpha receptors and the glutamatergic system in the mouse hippocampus: implications for seizure susceptibility. *Neuroscience.* 161, 293–300.
142. Balosso S. et al. (2013) The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures. *Exp. Neurol.* 247, 267–271.
143. Kitagaki M. et al. (2012) Novel TNF-alpha receptor 1 antagonist treatment attenuates arterial inflammation and intimal hyperplasia in mice. *J. Atheroscler. Thromb.* 19, 36–46.
144. Fischer R. et al. (2011) A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE* 6, e27621.
145. Nakao S. et al. (2002) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)- induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 238, 11–18.

146. Medeiros R. et al. (2010) The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behav. Brain Res.* 209, 165–173.
147. Chikuma T. et al. (2009) Interleukin-6 induces prostaglandin E(2) synthesis in mouse astrocytes. *J. Mol. Neurosci.* 39, 175–184
148. Li G. et al. (2011) Cytokines and epilepsy. *Seizure* 20, 249–256
149. Vezzani A. et al. (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav. Immun.* 22, 797–803
150. Kalueff A.V. et al. (2004) Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 365, 106–110
151. De Luca G. et al. (2004) Susceptibility to audiogenic seizure and neurotransmitter amino acid levels in different brain areas of IL-6- deficient mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 75–81
152. Penkowa M. et al. (2001) Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience.* 102, 805–818
153. Samland H. et al. (2003) Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J. Neurosci. Res.* 73, 176–187
154. Quek A.L. et al. (2012) Autoimmune epilepsy: clinical characteristics and response to immunotherapy. *Arch. Neurol.* 69, 582–593
155. Vincent A. et al. (2010) The growing recognition of immunotherapy-responsive seizure disorders with autoantibodies to specific neuronal proteins. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 144–150
156. Laflamme N. et al. (1999) An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood–brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J. Neurosci.* 19, 10923–10930

157. Strengell T. et al. (2009) Antipyretic agents for preventing recurrences of febrile seizures: randomized controlled trial. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 163, 799–804
158. Bialer M. et al. (2013) Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI). *Epilepsy Res.* 103, 2–30
159. French J. et al. (2014) AES 2013 Annual Meeting – Online Abstract Supplement. *Epilepsy Curr.* 14, 1–475
160. Noe F.M. et al. (2013) Pharmacological blockade of IL-1beta/IL1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 59, 183–193
161. Kwon Y.S. et al. (2013) Neuroprotective and antiepileptogenic effects of combination of anti-inflammatory drugs in the immature brain. *J. Neuroinflammation.* 10, 30-37.
162. Yang C.Y. (2015) Identification of potential small molecule allosteric modulator sites on IL-1R1 ectodomain using accelerated conformational sampling method. *PLoS ONE* 10, e0118671.
163. Janigro D. (2012) Are you in or out? Leukocyte, ion, and neurotransmitter permeability across the epileptic blood–brain barrier. *Epilepsia.* 53 (Suppl. 1), 26–34.
164. Marchi N. et al. (2007) Seizure-promoting effect of blood–brain barrier disruption. *Epilepsia.* 48, 732–742.
165. Zattoni M. et al. (2011) Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 31, 4037–4050
166. Gorter J.A. et al. (2015) Status epilepticus, blood–brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy Behav.* 49, 13–16.
167. Levite M. (2002) Autoimmune epilepsy. *Nat. Immunol.* 3, 500
168. Bien C.G. et al. (2007) Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 69, 1236–1244.
169. Vezzani A. et al. (2016) Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol.* 131, 211–234.

170. Dube C. et al. (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann. Neurol.* 57, 152–155.
171. Kovacs Z. et al. (2006) Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar albino Glaxo/Rijswijk rats. *Neuroscience.* 140, 731–742.
172. Auvin S. et al. (2010) Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. *Neurobiol. Dis.* 40, 303–310.
173. Stables J.P., Kupferberg H.J. The NIH anticonvulsant drug development (ADD) program: preclinical anticonvulsant screening project. In: Avanzini G, Tanganelli P, Avoli M (eds) *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd, 1997, London, England, 4–17.
174. Kehne J.H., Klein B.D., Raeissi S., Sharma S. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). *Neurochemical research.* 2017. Vol. 42(7). P.1894-1903.
175. Vogel H. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Berlin : Springer-Verlag, 2008. 2068 p.
176. Пастушенко Т. В., Маруший П. Б., Жуков А. А. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ. *Гигиена и санитария.* 1985. № 6. С. 46–49.
177. Hodge H. C., Sterner J. H. Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association quarterly.* 1943. Vol. 10, № 4. P. 93–96
178. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. Київ : Авіцена, 2001. 528 с.
179. Перспективний антиконвульсант 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он має протизапальну та знеболювальну активність та позбавлений адиктивного потенціалу / Д. П. Каврайський та ін. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2016. Т. 11, № 3. С. 52–62.
180. Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

181. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010. Vol. 31. P. 455–461
182. Neuroprotective and antiepileptogenic effects of combination of anti-inflammatory drugs in the immature brain / Y. S. Kwon et al. *J. Neuroinflammation.* 2013. Vol. 10. P. 30
183. Interleukin-1beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice / M. Maroso et al. *Neurotherapeutics.* 2011. Vol. 8. P. 304–315.
184. Librizzi L., Noe F., Vezzani A., De Curtis M., Ravizza T. Seizure-induced brainborne inflammation sustains seizure recurrence and blood–brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 2012. Vol. 72. P. 82–90.
185. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life / J. L. Wang et al. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010. Vol. 20. P. 7159–7163.
186. Xu S. et al. Oxicams Bind in a Novel Mode to the Cyclooxygenase Active Site via a Two-water-mediated H-bonding Network. *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 6799-6808.
187. Yang J., Liu Z., Xiao T.S. Crystal structure of caspase-1 in complex with VX765.2020. *Immunity.* Vol. 53. P.106-110.

DETERMINATION OF THE MECHANISM OF CONCOMITANT ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY IN A NEW ANTICONVULSANT AGENT - A PYRAZOLOPYRIMIDINE DERIVATIVE

Bikri A., Severina H.I.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

severina.ai@ukr.net

Introduction. The pathogenic processes of seizure generation and recurrence are the subject of intensive preclinical and clinical investigations as their identification would enable development of novel treatments that prevent epileptic seizures and reduce seizure burden. As a crucial component of brain innate immunity, neuroinflammation initially contributes to neuronal tissue repair and maintenance. However, chronic inflammatory processes within the brain and associated blood–brain barrier impairment often cause neurotoxicity and hyperexcitability. Mounting evidence points to a mutual facilitation between inflammation and epilepsy, suggesting that blocking the undesired inflammatory signaling within the brain might provide novel strategies to treat seizures and epilepsy. Neuroinflammation is primarily characterized by the upregulation of proinflammatory mediators in epileptogenic foci, among which cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1b (IL-1b), transforming growth factor- β , toll-like receptor 4, high-mobility group box 1, and tumor necrosis factor- α have been extensively studied. Clearly, the presence of concomitant anti-inflammatory activity in a anticonvulsant substance is a desirable and effective combination.

Aim. The aim is to determine the molecular mechanisms of the anti-inflammatory action of 1-(4-methoxyphenyl)-5-(2-(4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-yl)-2-oxo-ethyl)pyrazol[3,4-d]pyrimidin-4-one.

Materials and methods. Virtual experiments were conducted using BioviaDraw2021, Biovia Discovery Studio2021, AutoDock Vina, AutoDock Tools, OpenBabel. The biomolecular target was acquired from Protein Data Bank: COX-2 (PDB ID 3LN1 and 4M11), CASP1 (PDB ID 6PZP).

Results and discussion. The promising properties of 1-(4-methoxyphenyl)-5-[2-[2-[4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-yl]-2-oxo-ethyl]pyrazol[3,4-d]pyrimidin-4-one as a novel anticonvulsant agent have been proven by extensive *in vivo* studies, in line with international approaches to finding new AEDs. To predict the anti-inflammatory activity of a promising anticonvulsant drug, study its molecular mechanisms and determine the feasibility of an *in vivo* experiment, docking to cyclooxygenase-2 (COX-2) and IL-1 β -converting enzyme inhibitor sites was performed. Validation of the docking methodology was performed by a re-docking procedure for the reference ligands – celecoxib, meloxicam and VX-765, respectively. The following level of affinity of the investigated ligand was predicted: -8.9 kcal/mol versus -12.2 kcal/mol for celecoxib in COX-2, -7.2 kcal/mol versus -10.5 kcal/mol for meloxicam in COX-2; -7.2 kcal/mol which corresponds to the value of VX-765 in IL-1 β converting enzyme.

Conclusions. Detailed conformational placement of the ligand relative to the reference drugs showed a high probability of inhibiting cyclooxygenase 2 via the celecoxib site and a high degree of probability of anti-inflammatory activity, respectively.

Ministry of health of Ukraine
 Ministry of education and science of Ukraine
 National university of pharmacy
 Pharmaceutical chemistry department
 Medicinal chemistry department
 General chemistry department
 Analytical chemistry and analytical toxicology department



CERTIFICATE №015

This is to certify that

Bikri Aymane

participated in the International Internet Conference
'Modern chemistry of medicines'
 (duration - 8 hours)
 May 18, 2023, Kharkiv, Ukraine

Certificate of the State Scientific
 Institution 'Ukrainian Institute of
 Scientific and Technical Expertise and
 Information' No. 550 dated 19.12.2022

Acting rector of the NUPh, prof.

Vice-Rector for Research and
 Development, prof.



Alla KOTVITSKA

Inna VLADIMIROVA

Национальный фармацевтический университет

Факультет по подготовке иностранных граждан
Кафедра фармацевтической химии
Уровень высшего образования магистр
Специальность 226 Фармация, промышленная фармация
Образовательная программа Фармация

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
фармацевтической химии
Виктория ГЕОРГИЯНЦ
“24” августа 2022 года

ЗАДАНИЕ
НА КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ
СОИСКАТЕЛЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

Айман БИКРИ

1. Тема квалификационной работы: «Определение механизма сопутствующей противовоспалительной активности у нового противосудорожного агента - производного пиразолопиримидина», руководитель квалификационной работы: Анна Северина, д.фарм.н., доцент.

утвержденный приказом НФаУ от “6” февраля 2023 года № 35

2. Срок подачи соискателем высшего образования квалификационной работы: апрель 2023 г.

3. Исходные данные к квалификационной работе: фармакологическая активность и *in silico* исследование производного 1-(4-метоксифенил)-5-[2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-этил]пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она.

4. Содержание расчетно-пояснительной записки (перечень вопросов, которые необходимо разработать): проанализировать литературные данные относительно роли нейровоспаления в эпилептогенезе, ознакомиться с существующими активными фармацевтическими ингредиентами с выраженными противовоспалительным и противосудорожным действием; определить наиболее перспективные таргеты для *in silico* исследований перспективного лиганда; проанализировать имеющиеся данные синтетических и фармакологических экспериментов Эпимидина и оценить перспективность исследования его противовоспалительных свойств; валидировать методологию докинга процедурой редокинга нативных референс-лигандов в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 и PL-1 β превращающего фермента, рассчитать значение TRSD; процедурой молекулярного докинга определить аффинность исследуемого лиганда к выбранным противовоспалительным биомишеням; сформулировать выводы о возможных молекулярных механизмах реализации противовоспалительного действия Эпимидина сопоставив их с результатами *in vivo* эксперимента.

5. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):
таблиц – 2, рисунков – 19, схема – 1

6. Консультанты разделов квалификационной работы

Раздел	Имя, ФАМИЛИЯ, должность консультанта	Подпись, дата	
		здание выдал	здание принял
1	Анна Северина, доцент заведения высшего образования кафедры фармацевтической химии	20.09.2023	20.09.2023
2	Анна Северина, доцент заведения высшего образования кафедры фармацевтической химии	22.11.2022	22.11.2022
3	Анна Северина, доцент заведения высшего образования кафедры фармацевтической химии	28.01.2023	28.01.2023
4	Анна Северина, доцент заведения высшего образования кафедры фармацевтической химии	28.02.2023	28.02.2023

6. Дата выдачи задания: «24» августа 2022 года

7.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

№ з/п	Название этапов квалификационной работы	Срок выполнения этапов квалификационной работы	Примечание
1	Роль нейровоспаления в патогенезе эпилепсии и агенты для его коррекции (Обзор литературы)	Август-сентябрь 2022	выполнено
2	Материалы и методы исследования 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)пиразол[3,4-D]пиримидин-4-он	Октябрь 2022	выполнено
3	Прогнозирование аффинности 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-он к другим противовоспалительным биомишеням	Ноябрь-декабрь 2022	выполнено
4	Прогнозирование аффинности 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)пиразол[3,4-D]пиримидин-4-она к другим противовоспалительным биомишеням	Январь-февраль 2023	выполнено
5	Обобщение материалов и выводы, оформление работы	Март 2022	выполнено

Соискатель высшего образования

_____ АйманБИКРИ

Руководитель квалификационной работы

_____ Анна СЕВЕРИНА

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 35
По Національному фармацевтичному університету
від 06 лютого 2023 року

нижченаведеним студентам 5-го курсу 2022-2023 навчального року, навчання за освітнім ступенем «магістр», галузь знань 22 охорона здоров'я, спеціальності 226 – фармація, промислова фармація, освітня програма – фармація, денна форма здобуття освіти (термін навчання 4 роки 10 місяців та 3 роки 10 місяців), які навчаються за контрактом, затвердити теми кваліфікаційних робіт:

Прізвище студента	Тема кваліфікаційної роботи	Посада, прізвище та ініціали керівника	Рецензент кваліфікаційної роботи
• по кафедрі фармацевтичної хімії			
Бікрі Айман	Визначення механізму супутньої протизапальної активності у нового протисудомного агента – похідного піразолопіримідину	Determination of the mechanism of concomitant anti-inflammatory activity in a new anticonvulsant agent - pyrazolopyrimidine derivative	Северіна Г.І., д.ф.н., доц. Кошовий О.М., д.ф.н., проф.

Підстава: подання декана, згоду ректора

Ректор

Вірно. Секретар



ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 113098 від « 8 » травня 2023 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Бікрі Айман, 5 курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Визначення механізму супутньої протизапальної активності у нового протисудомного агента – похідного піразолопіримідину / Determination of the mechanism of concomitant anti-inflammatory activity in a new anticonvulsant agent - pyrazolopyrimidine derivative», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

1%

31%

ОТЗЫВ

научного руководителя на квалификационную работу уровня высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Аймана БИКРИ

на тему: «Определение механизма сопутствующей противовоспалительной активности у нового противосудорожного агента - производного пиразолопиримидина»

Актуальность темы. Эпилепсия – хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся стойкой склонностью к повторным спонтанным приступам, которые возникают вследствие чрезмерных нейрональных разрядов и приводят к нарушению нейробиологических, двигательных, вегетативных, умственных и психических функций. Все чаще появляются свидетельства воспалительного патогенеза развития эпилепсии. Первыми клиническими доказательствами роли воспаления в эпилепсии стала способность стероидов и других противовоспалительных средств проявлять антиконвульсивную активность, даже при наличии некоторых синдромов резистентных форм эпилепсии. Поэтому изучение сопутствующего противовоспалительного действия у инновационного противосудорожного агента безусловно является актуальной задачей.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность.

Результатом работы стало доказательство целесообразности исследования 1-(4-метоксифенил)-5-(2-(4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-этил)пиразол[3,4-d]пиримидин-4-она на *in vivo* моделях противовоспалительного действия (уксуснокислых корчей) и нецелесообразность проведения цитокиновых моделей скрининга. Это заключение поможет уберечь животных и сэкономить временной и денежный

ресурсы. Валидированные методологии докинга в сайты ингибиторов циклооксигеназы 2 и IL-1 β превращающего фермента могут стать важным инструментом для дальнейшего рационального поиска противовоспалительных веществ.

Оценка работы. Квалификационная работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне с использованием современных методов исследования. Все выводы и заключения, сделанные в работе, являются достоверными

Общий вывод и рекомендации о допуске к защите. Квалификационная работа Аймана БИКРИ может быть представлена к защите на получение уровня высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация.

Научный руководитель _____ Анна СЕВЕРИНА

"06" апреля 2023 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на квалификационную работу уровня высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Аймана БИКРИ

на тему: «**Определение механизма сопутствующей противовоспалительной активности у нового противосудорожного агента - производного пиразолопиримидина**»

Актуальность темы. Эпилепсия считается одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний в мире - по данным ВОЗ, количество людей с таким диагнозом достигает 50 миллионов, а пациентов с активной формой эпилепсии, то есть с регулярными приступами и необходимостью фармакокоррекции сейчас есть 4-10 случаев на 1000 человек. Нейротравмы, нейроинфекции, инсульты, судорожные приступы и другие состояния вызывают воспалительный процесс, что в свою очередь активизирует периферические иммунные клетки и сопутствующее выработку медиаторов воспаления с нарушением дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов. На сегодня перспективными считают только те противоэпилептические препараты, которые способны проявлять полифакторный механизм реализации противосудорожного действия с влиянием на различные биомишени. Поэтому поиск сопутствующих видов активности у инновационных противосудорожных агентов является безусловно актуальной задачей.

Теоретический уровень работы. В целом работа производит хорошее впечатление. Представленный в работе обзор литературы основательно освещает проблему нейровоспаления в эпилептогенезе, а также фармакологическую активность малых молекул в ее коррекции. В работе четко сформулирована цель, которая достигнута автором путем решения поставленных задач. Грамотное планирование эксперимента для каждого

этапа и использование комплекса современных *in silico* методов позволило достичь поставленных целей.

Предложения автора по теме исследования. На основе проведенных исследований рассчитаны степени аффинности Эпимидина и детализировано конформационное размещения в активных сайтах провоспалительных биомишеней, что позволило установить вероятные механизмы реализации противовоспалительного эффекта.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность. Валидация методологий докинга в активные сайты провоспалительных биомишеней относительно нативных референс-лигандов процедурой редокинга позволит использовать эти методики для дальнейшего рационального поиска новых противовоспалительных агентов и механизм их действия.

Недостатки работы. В работе встречаются грамматические ошибки и стилистически неудачные выражения, отдельные недостатки в оформлении рисунков и списка литературы, однако они незначительны и не снижают общей ценности работы.

Общий вывод и оценка работы. Представленная на рецензирование работа Аймана БИКРИ по объему и содержанию соответствует требованиям, предъявляемым к квалификационным работам уровня высшего образования магистр и может быть представлена к защите в Экзаменационной комиссии.

Рецензент _____

проф. Олег Кошевой

«13» апреля 2023 г.

ПРОТОКОЛ № 10
засідання кафедри фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університету
від 21 квітня 2023 р.

ПРИСУТНІ:

Георгіянц В. А. зав.каф., проф., Власов С. В. проф., Сидоренко Л. В. проф.,
Бевз Н. Ю. доц., Абу Шарк А. доц., Гарна Н. В. доц., Грудько В. О. доц.,
Головченко О. С. доц., Горохова О. В. доц., Гриненко В.В. доц., Колісник О.В.
доц., Северіна Г. І. доц., Михайленко О. О. доц., Григорів Г.В. асис.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ: заслухати звіти про стан виконання кваліфікаційних робіт.

СЛУХАЛИ: доповідь здобувача вищої освіти АйманаББІКРІ, студента фармацевтичного факультету на тему: "Визначення механізму супутньої протизапальної активності у нового протисудомного агента - похідного піразолопіримідину" керівник доцент закладу вищої освіти кафедри фармацевтичної хімії, к.ф.н. Ганна Северіна

УХВАЛИЛИ: рекомендувати кваліфікаційну роботу Аймана БІКРІ до офіційного захисту в ЕК.

Голова

Зав. кафедри, доктор фарм. наук, проф.

_____ Вікторія ГЕОРГІЯНЦ
(підпис)

Секретар

канд. фарм. наук, доц.

_____ Олена КОЛІСНИК

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОДАННЯ ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Направляється здобувач вищої освіти Айман Бікрі до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «Визначення механізму супутньої протизапальної активності у нового протисудомного агента - похідного піразолопіримідину».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Світлана КАЛАЙЧЕВА /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Айман БІКРІ провів літературний аналіз щодо ролі нейрозапалення в розвитку епілепсії, визначив пріоритетні прозапальні таргети для *in silico* досліджень перспективного протисудомного агента, здійснив валідацію методології докінгу до активних сайтів та провів молекулярний докінг експериментального ліганду. Зробив висновки щодо механізму реалізації фармакологічного ефекту Елімідину. Під час виконання кваліфікаційної роботи Айман Бікрі виявив здібності до наукового пошуку, аналізу та систематизації даних.

Керівник кваліфікаційної роботи

Ганна Северіна

«06» квітня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Айман Бікрі допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзменаційній комісії.

Завідувачка кафедри
фармацевтичної хімії

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

«21» квітня 2023 р.

