

Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью

**Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Л.Н., Литвинова С.А.,
Гайдуков И.О., Воронина Т.А., Гудашева Т.А.**

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. В настоящей работе осуществлён дизайн и синтез нового производного оксима 4-бензоилпиридина – ГИЖ-298 (оксалат O-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина). Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком (МЭШ) и коразолом в дозах 0,5–100 мг/кг у грызунов внутрибрюшинно. LD₅₀ при внутрибрюшинном введении для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту.

Ключевые слова: противосудорожные средства, оксимы бензоилпиридинов, тест максимального электрошока, тест антагонизма с коразолом

Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with anticonvulsant activity

Zhmurenko L.A., Mokrov G.V., Nerobkova L.N., Litvinova S.A., Gaydukov I.O.,
Voronina T.A., Gudasheva T.A.

Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow

Resume. Novel derivative of benzoylpyridine oximes – GIZH-298 (4-benzoylpyridine O-(2-morpholinoethyl) oxime oxalate) was designed and synthesized in this work. This compound has a broad spectrum of anticonvulsant effects, eliminating primary generalized seizures in maximal electroshock (MES) and corazol antagonism tests in rodents in the doses of 0,5-100 mg/kg. LD₅₀ for compound GIZH-298 is 316 mg/kg intraperitoneally (mouse). GIZH-298 has a large therapeutic breadth.

Keywords: anticonvulsant drugs, benzoylpyridine oximes, maximal electroshock test, corazol antagonism test

Автор, ответственный за переписку:

Мокров Григорий Владимирович – к.х.н., заведующий лабораторией тонкого органического синтеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; +7 (495)601-22-46; e-mail: g.mokrov@gmail.com

Введение

Распространённость эпилепсии в разных странах, по данным ВОЗ, варьирует в очень широком диапазоне – от 1,5 до 50 случаев на 1 000 населения [1, 2], а в Российской Федерации составляет 2,98 на 1 000 человек населения [3].

Для лечения эпилепсии применяется значительное количество противоэпилептических препаратов (ПЭП), таких как леветирацетам, топирамат, карбозепин, финлепсин, дифенин и другие, однако продолжается их активный поиск и совершенствование, что связано с тем, что современные ПЭП не удовлетворяют в полной мере требованиям клиники. Несмотря на широкий спектр противосудорожных средств около 20–30% больных остаются резистентными к лечению основными противосудорожными препаратами. Кроме того, отмечаются случаи провокации судорожных проявлений на фоне терапии ПЭП, обусловленных многообразием механизмов генерации судорог, что создаёт трудности подбора противосудорожной терапии [4, 5].

Целью настоящей работы явилось создание новых соединений, обладающих противосудорожной активностью.

Дизайн и синтез

Для конструирования новых соединений, обладающих противосудорожной активностью, был использован фармакофорный подход, основанный на структурах известных препаратов, относящихся к классу селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Известно, что основным эффектом данной группы препаратов является антидепрессивное действие, однако у ряда представителей этого класса наблюдается выраженная противосудорожная активность. Так, антиконвульсивным действием обладает зимелидин [6] и флуоксетин [7] (рис. 1).

Анализ структур зимелидина и флуоксетина позволил сделать предположение о фармакофорных элементах, необходимых для наличия противосудорожной активности (рис. 2А). В молекуле должны быть два ароматических фармакофора и аминоксодержащий фармакофор. Указанные группы должны соединяться при помощи линкера, в состав которого должны входить не менее трёх атомов. На основании предложенной фармакофорной модели была сконструирована группа аминоксодержащих производных оксимов 4-бензоилпиридина (рис. 2Б).

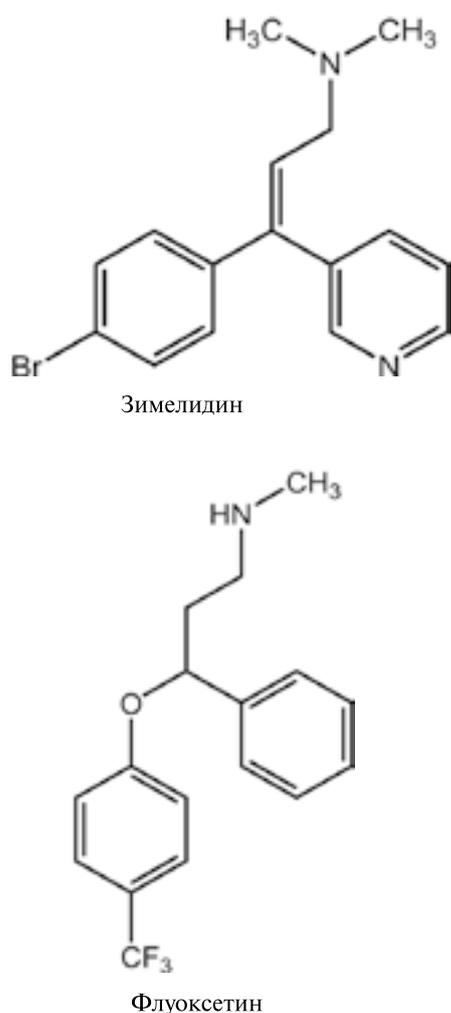


Рис. 1. Соединения, обладающие противосудорожной активностью, использовавшиеся для дизайна новых структур

Нами был получен ряд представителей предложенной группы, и в качестве наиболее перспективного соединения было отобрано вещество ГИЖ-298. Это соединение было синтезировано по следующей схеме (рис. 3).

Оксим 4-бензоилпиридина, который получают в соответствии с методикой [8], вводят во взаимодействие с хлорэтилморфолином в ДМФА в присутствии гидроксида натрия. Основание O-(2-морфолиноэтил) оксима 4-бензоилпиридина превращают в оксалат действием щавелевой кислоты в этаноле. Выход конечного соединения составляет 75%. Т.пл. 154–155°C (из этанола). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 2,83 (4H, м, -CH₂-N-CH₂- (морфолина)); 3,10 (2H, т, CH₂N); 3,67 (4H, м, -CH₂-O-CH₂- (морфолина)); 4,39 (2H, т, CH₂O); 5,10 устр. (HDO и (COOH)₂); 7,35 (2H, м, 3- и 5-H Py); 7,37–7,51 (5H, м, ArH), 8,71 (2H, м, 2- и 6-H Py). Данные элементного анализа соответствуют расчётной брутто формуле C₁₈H₂₁N₃O₂·H₂C₂O₄.

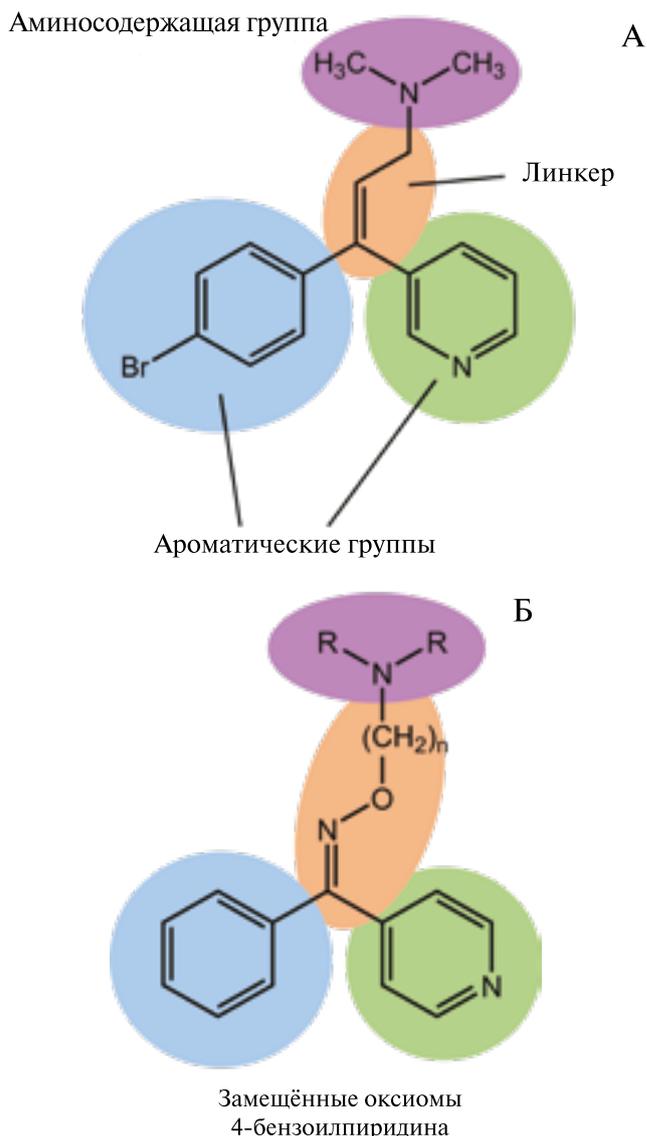


Рис. 2. Фармакофорная модель строения бис-арильных соединений, обладающих противосудорожной активностью (на примере зимелидина) (А) и соответствии предложенных соединений этой фармакофорной модели (Б)

Материалы и методы

Животные

Экспериментальных животных получали из питомника «Столбовая» ГУ НЦБМТ (Московская область). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утверждённым Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. № 1045-73 и Приказом МЗ и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

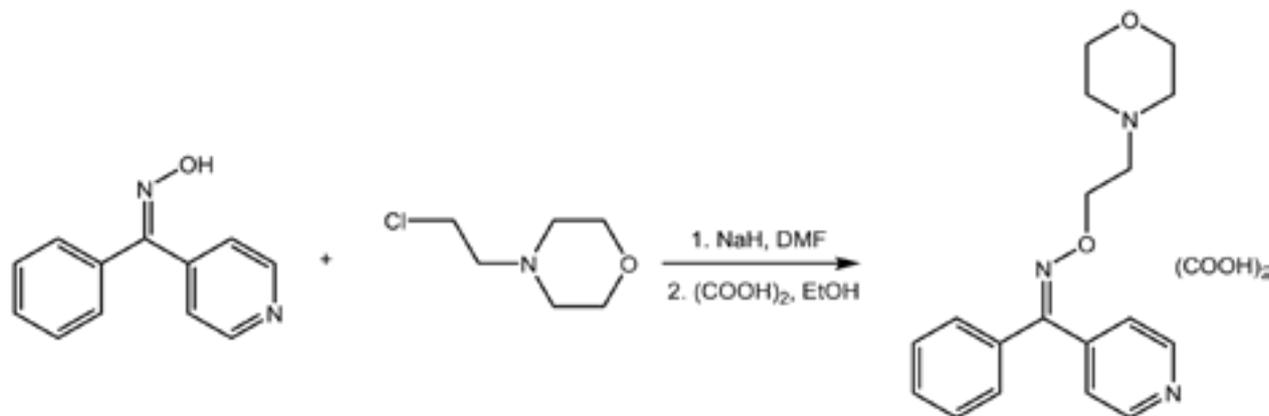


Рис. 3. Схема синтеза соединения ГИЖ-298

Изучение противосудорожного действия ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных максимальным электрошоком

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 20–26 г. Каждая доза соединения исследовалась на 8–10 животных. Методика максимального электрошока (МЭШ) моделирует первично-генерализованные судороги – так называемые «большие» (Grant mal) судорожные припадки и является базисным тестом при оценке действия веществ с противосудорожной активностью [9–11].

Максимальный электросудорожный припадок (МЭШ) создавали с использованием сертифицированной установки «Rodent Shocker RS», type 221 (Harvard Apparatus, GmbH, Германия). Животные получали через специальные корнеальные электроды электрические стимулы (режим 500/300 V/mA: 144 mA, длительностью 0,3 с). Регистрировали следующие показатели: тоническую экстензию задних и передних конечностей, а затем, клонические судороги и гибель животных. Противосудорожный эффект заявляемых соединений оценивали по способности предупреждать развитие тонической экстензии и гибель животных. Соединения вводили внутривентриально за 40 мин до проведения МЭШ. Для определения ЭД₅₀ (эффективной дозы вещества, оказывающей противосудорожный эффект у 50% животных) использовался метод пробит-анализа (метод Финни) с помощью программного пакета StatplusV5 рассчитывали ЭД₁₆, ЭД₅₀, ЭД₈₄ – дозы, при введении которых противосудорожный эффект наблюдался, соответственно, у 16, 50 и 84% животных.

Изучение противосудорожного действия ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных коразолом

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 20–26 г. Каждая доза соединения исследовалась на 8–10 животных. Тест антагонизма с коразолом (пентилентетразол, Sigma-Aldrich, США) – антагонистом ГАМК-А рецепторов, также

как и тест максимального электрошока, является базисной методикой при оценке действия веществ с противосудорожной активностью [9, 11]. В этой методике судороги вызываются химическим воздействием и моделируют первично-генерализованные судороги при так называемых «малых» (Petit mal) судорожных припадках.

Опытным группам внутривентриально вводили соединение ГИЖ-298, растворённое в физиологическом растворе в дозах 1,0 и 50,0 мг/кг за 40 мин до коразола. Контрольным животным внутривентриально вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме. Для получения судорожного припадка животным подкожно в область шейного отдела спины вводился коразол в дозе 95,0 мг/кг, вызывающей судороги у 97% мышей. Животные наблюдались в течение 30–60 мин после инъекции коразола. Регистрировали: латентный период первого генерализованного приступа с потерей рефлекса переворачивания (ЛП), время гибели и число погибших животных.

Изучение острой токсичности ГИЖ-298

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 22–26 г. Соединения вводили однократно, внутривентриально. Регистрацию гибели животных проводили через 24 часа и 14 дней после введения. Методом пробит-анализа (метод Финни) с помощью программного пакета Statplus V5 рассчитывали ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄ – доз, при введении которых погибало 16, 50 и 84% животных, соответственно.

Результаты и их обсуждение

Противосудорожное действие ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных максимальным электрошоком

Установлено, что проведение МЭШ вызывало тоническую экстензию и гибель 88–100% мышей. Соединение ГИЖ-298 в диапазоне доз от 0,5 до 10,0 мг/кг уменьшало (на уровне тенденции) число животных с тонической экстензией и увеличивало количество выживших животных по сравнению с контролем.

Таблица 1

Противосудорожная активность соединения ГИЖ-298 тесте максимального электрошока на мышах

Группа	Доза, мг/кг	Число выживших животных без судорог/ число животных в группе	Число выживших животных без судорог, %
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	0,5	2/8	25
Контроль, МЭШ	—	1/10	10
ГИЖ-298 + МЭШ	1	5/10	50
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	5,0	3/7	43
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	10,0	4/8	50
Контроль, МЭШ	—	0/9	0
ГИЖ-298 + МЭШ	20,0	6/9*	66,7*
	40,0	6/9*	66,7*
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	60,0	8/8*	100*
	80,0	8/8*	100*
Контроль, МЭШ	—	0/8	0
ГИЖ-298 + МЭШ	100,0	8/8*	100*

Примечание: *значимость отличий от контрольной группы, при $p \leq 0,05$ (точный критерий Фи)

Таблица 2

Влияние ГИЖ-298 на судороги, вызванные коразолом

Группа	Доза, мг/кг	Число выживших мышей/ число животных в группе, а.е.	Число выживших мышей, %	ЛП 1-го приступа, с	Время гибели, с
Коразол	95,0	0/8	0	32,8±7,2	361,0±129,3
ГИЖ-298 + коразол	20,0	1/8	12,5	180,3±37,4*	735,4±224,9
Коразол	95,0	2/10	20,0	53,7±12,5	355,5±105,2
ГИЖ-298 + коразол	60,0	2/10	20,0	91,4±10,1*	457,3±126,5

Соединение ГИЖ-298 в дозах от 20,0 до 150,0 мг/кг статистически достоверно уменьшало число животных с тонической экстензией и увеличивало количество выживших животных по сравнению с контролем. Так, в дозе 20 мг/кг устранение судорог и увеличение выживаемости наблюдалось у 67% животных, а в дозах 60,0; 80,0; 100,0 и 150 мг/кг — у 100% мышей (табл. 1).

Противосудорожное действие ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных коразолом

Установлено, что у контрольных животных после введения коразола в дозе 95,0 мг/кг судорожные проявления развивались в следующей последовательности.

1. Одно или более миоклонических подергиваний всего тела — 100% мышей.

2. Повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания — 100% мышей.

3. Генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания — 90% мышей.

4. Гибель животных — 80–100% мышей.

Установлено, что соединение ГИЖ-298 в дозах 20,0 и 60,0 мг/кг статистически достоверно увеличивает латентный период первого приступа (ЛП) на 148 и 59 с, соответственно, по сравнению с контрольной группой животных, но не предотвращает развитие вызванных коразолом судорог и гибель животных (табл. 2). Кроме того, было обнаружено, что ГИЖ-298 меняет картину судорожных проявлений, устраняя как тоническую экстензию задних конечностей, так и клонические судороги передних конечностей.

Острая токсичность ГИЖ-298

Установлено, что соединение ГИЖ-298 при введении в дозе 220 мг/кг через 24 ч вызывало гибель одного животного из десяти (10%). В течение последующих 14 дней после однократного введения соединения ГИЖ-298 гибели животных не зарегистрировано.

При введении соединения ГИЖ-298 в дозе 300,0 мг/кг наблюдалась гибель 40% животных (4 из 10) через 24 ч после введения; изменения показателя выживаемости через последующие две недели не наблюдалось. После введения соединения ГИЖ-298 в дозе 350,0 мг/кг через 24 ч погибло 50% животных (5 из 10), а в дозе 400,0 мг/кг – 90% животных (9 из 10); через 14 дней после введения соединения ГИЖ-298 дополнительной гибели крыс не наблюдалось. Расчётное значение ЛД₅₀ для соединения ГИЖ-298 составило 316 мг/кг.

Выводы

Таким образом, производное оксима 4-бензоилпиридина ГИЖ-298 обладает широким спектром противосудорожных эффектов, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком (МЭШ) и коразолом. Противосудорожный эффект соединения ГИЖ-298 наблюдается в широком диапазоне доз (от 20 до

100 мг/кг), не вызывающих побочных эффектов. В тесте максимального электрошока соединение ГИЖ-298 (60–100 мг/кг) предупреждает судороги и гибель 100% животных (ЭД₅₀ – составляет 15 мг/кг), а на модели антагонизма с коразолом статистически достоверно увеличивает латентный период развития первого приступа и меняет картину судорожных проявлений, устраняя как тоническую экстензию задних конечностей, так и клонические судороги передних конечностей.

ЛД₅₀ для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг. Рассчитанный по соотношению ЛД₅₀ к ЭД₅₀ терапевтический индекс составляет для соединения ГИЖ-298 21, что свидетельствует о том, что оксалат О-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина (соединение ГИЖ-298) имеет большую терапевтическую широту и относится к классу нетоксичных веществ. Полученные данные позволяют сделать вывод, что соединение ГИЖ-298 перспективно для дальнейших исследований с целью создания инновационного противосудорожного средства.

Литература

1. Сидоренко К.В., Даренская Е.Ю. Распространенность эпилепсии в мире. Успехи современного естествознания. 201; 6.
2. Hauser W.A. Epidemiology of epilepsy. X Всероссийский съезд неврологов с международным участием: материалы съезда. Нижний Новгород, 2012; 313–314.
3. Гехт В.А., Хаузер Л.Е. Мильчакова и др. X Всероссийский съезд неврологов 125с международным участием: материалы съезда. Нижний Новгород. 2012; 277.
4. Портер Р.Дж., Мелдрум Б.С. Противоэpileптические средства / В кн. Б.Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология: В 2 т. Т. 1. / Пер. с англ. 2-е изд., перераб. и доп. М.; СПб.: Изд-во Бинном, Изд-во «Диалект», 2007; 464–491.
5. Карлов В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин: руководство для врачей. М.: Медицина, 2010; 717.
6. D. Peričić, Štrac D.Š., Vlanić J. Zimelidine decreases seizure susceptibility in stressed mice. Journal of Neural Transmission. 113; 12: 1863–1871.

7. Favale E., Rubino V., Mainardi P., Lunardi G. and Albano C. Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans, Neurology October. 1995; 45: 10: 1926–1927
8. Kochhar M.M., Brown R.G., Delgado J.N. Anticholinergic heterocyclic ketoximino-ethers and -esters. J. Pharm. Sci. 1965; 54: 393–398.
9. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Часть. I. ФГБУ «НЦЭМСП». М.: Изд-во Гриф и К, 2012; 14: 235–250.
10. Loscher et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models, Epilepsy Res. 1991; 8: 79–94.
11. Swinyard E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods, Epilepsia. 1969; 10: 107–119.
12. Loscher et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazol seizure models. Epilepsy Res. 1991; 8: 171–189.