

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОПОВА ЛАРИСА ВАСИЛІВНА

УДК: 615.214+615.46+547.893

**НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ НООТРОПНОЇ
І СНОДІЙНОЇ ДІЇ ГАМК-ЕРГІЧНИХ СПОЛУК – ПОХІДНИХ
1,4-БЕНЗДІАЗЕПІНУ ТА 1,3,4-БЕНЗТРИАЗЕПІНУ**

14.03.05-фармакологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Одеса-2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Карасьова Тамара Леонідівна, Фізико-хімічний інститут ім.
О.В. Богатського НАН України, м. Одеса, провідний науковий
співробітник відділу медичної хімії.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Воскресенський Олег**

Миколайович, Інститут стоматології АМН України, м. Одеса,
завідувач лабораторії фармакології та токсикології

доктор біологічних наук, професор **Жук Ольга Вікторівна**,
Одеський національний університет

ім. І.І. Мечникова МОН України, м. Одеса, професор кафедри
мікробіології.

Провідна установа Інститут фармакології та токсикології АМН України,
відділ нейрофармакології, м. Київ.

Захист відбудеться "05" квітня 2006 року о 11.00 годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 41.600.01 при Одеському державному медичному університеті МОЗ
України (65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 2).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського державного ме-дичного
університету МОЗ України за адресою: 65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 3.

Автореферат розісланий "03" березня 2006 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к. мед. н., доцент

В.В. Годован

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми За даними ВООЗ, на сьогодні кожна друга доросла людина планети страждає від тих чи інших порушень сну. Відомо, що ГАМК-ергічні препарати (барбітурати, бенздіазепіни та ін.) широко використовуються як снодійні засоби у клінічній практиці. На жаль, більшість снодійних препаратів, які застосовуються для лікування різноманітних розладів сну, змінюють фізіологічну структуру природного сну, викликають звикання, а їх відміна супроводжується так званим "синдромом віддачі", вираженість якого залежить від тривалості застосування та дози препарату (M. Siegal, 2003). У зв'язку з цим, особливу увагу привертають снодійні засоби, які мінімально впливають на структуру сну і викликають сон, близький до природного. Таким вимогам відповідають препарати третього покоління ГАМК-ергічних снодійних засобів, до яких відносять зопіклон та ін. Однак, вплив зопіклону та інших ГАМК-ергічних препаратів третього покоління на структуру сну, зокрема на парадоксальний сон, у літературі вивчений недостатньо, а дані є неоднозначними, що викликає труднощі при їх вивченні у порівняльному аспекті з іншими препаратами (Горьков В.А., 2005).

У літературі з'являються відомості про те, що ГАМК-ергічна система може здійснювати вплив на покращення когнітивних процесів, тобто пам'яті та навчання. Як відомо, вплив препаратів бенздіазепінової структури на здатність до навчання і на процеси пам'яті неоднозначний. У літературі є дані про те, що під впливом деяких бенздіазепінових транквілізаторів у низьких дозах відбувається полегшення цих процесів, однак при збільшенні дози ефект поліпшення пам'яті зникає (Вороніна Т. А., 2005, Weingartner H.J., 2004). Проблема пошуку препаратів з ноотропною активністю і вивчення їх механізмів дії обумовлена необхідністю корекції вроджених і набутих неврологічних дефіцитів у похилому віці та відновлення затримки розумового розвитку у дітей. На сьогодні невіршеним залишається питання про нейрофізіологічні механізми дії ноотропів.

Тому актуальним є пошук і розробка нових ГАМК-ергічних препаратів з ноотропною та снодійною дією, які не змінюють структури сну, серед похідних 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну, а також вивчення механізмів їх дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною планової науково-дослідницької роботи Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України виконується за Постановою бюро Відділення хімії НАН України за темами: "Молекулярні механізми дії і конструювання біологічно активних речовин" (нейротропних, противірусних, протимікробних). (№ державної реєстрації – 0102U001629) та "Порівняльний аналіз властивостей циназепаму і зопіклону" (№ державної реєстрації – 0103U001122). Дисертант є співвиконавцем цих тем.

Метою дослідження є пошук нових речовин з ноотропною активністю у рядах нових похідних 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну, порівняльна оцінка гіпноседативних властивостей циназепаму і зопіклону.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Вивчити спектр фармакологічної активності похідних 1,3,4-бензтриазепіну (протисудомну, антидепресивну, седативну), визначити значення (ED_{50}) за основними видами дії, встановити гостру токсичність (LD_{50}).
2. Здійснити пошук речовин з ноотропною активністю за методом "дискримінації образів у просторі" серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну.
3. Вивчити за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження вплив на пам'ять найбільш активного похідного 1,3,4-бензтриазепіну, у порівнянні з ноотропілом у дослідах на щурах.

4. Здійснити пошук речовин, що полегшують пам'ять серед препаратів, анксиолітиків 1,4-бенздіазепінового ряду (циназепам, гідазепам, алпразолам), вивчити їх антиамнестичну і антигіпоксичну дію, у порівнянні з ноотропілом.
5. Вивчити у порівняльному аспекті гіпнosedативні, антиамнестичні, антигіпоксичні властивості циназепаму і зопіклону.
6. Вивчити за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження вплив на структуру сну циназепаму, у порівнянні з зопіклоном.

Об'єкт дослідження: пошук та фармакологічне вивчення нових ноотропних та снодійних засобів.

Предмет дослідження: аналіз ноотропної і снодійної активності ГАМК-ергічних сполук - похідних 1,4-бенздіазепінового і 1,3,4-бензтриазепінового ряду.

Методи дослідження: фармакологічні, нейрофізіологічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено пошук речовин з ноотропною активністю серед 17 сполук похідних 1,3,4-бензтриазепіну і 1,4-бенздіазепіну. Вперше серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну виявлено речовини з атомом сірки, які покращують пам'ять у відносно низькій дозі (10 мг/кг). Вивчено їх фармакологічні властивості (протисудомні, антидепресивні, седативні, ноотропні), проведено нейрофізіологічний аналіз їх дії, у порівнянні з ноотропілом. Вперше показано, що вони в значно нижчих дозах мають подібний до ноотропілу (400 мг/кг) вплив на спектр фізіологічних ритмів кори та гіпокампу мозку щурів - викликають збільшення потужності активуючих бета-1, альфа- та тета-ритмів кори та гіпокампу мозку щурів. Вперше проведені порівняльні фармакологічні дослідження гіпнosedативних властивостей циназепаму і снодійного препарату третього покоління – зопіклону і встановлено, що циназепам не поступається зопіклому, а має суттєві переваги. Вперше у порівняльному аспекті вивчено нейрофізіологічну дію циназепаму і зопіклону, їх вплив на структуру сну. На основі аналізу результатів встановлено, що обидва препарати збільшують загальну тривалість сну. Під впливом циназепаму збільшується тривалість як повільнохвильового (ортодоксального), так і парадоксального сну, при цьому не змінюється фізіологічна структура сну. На відміну від циназепаму зопіклон збільшує загальну тривалість сну за рахунок збільшення тривалості ортодоксальної фази і практично не впливає на парадоксальну фазу сну.

Практичне значення одержаних результатів. На основі експериментальних досліджень обґрунтована доцільність подальшого пошуку і вивчення речовин з ноотропною активністю у рядах похідних 1,3,4-бензтриазепіну і 1,4-бенздіазепіну. Результати роботи також можуть бути використані в навчальному процесі при викладанні курсів з фармакології, медичної хімії, фізіології. Вивчено у порівняльному аспекті фармакологічні властивості зопіклону і перспективного снодійного препарату циназепаму, розробленого в ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України, який проходить останню стадію доклінічних випробувань.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно визначені методичні підходи та виконані всі експериментальні дослідження. Проведено математичну обробку одержаних результатів, оформлено їх у вигляді таблиць і графіків, зроблено аналіз результатів, сформульовано висновки роботи та опубліковано основні положення дисертації у фахових журналах. Автор висловлює вдячність за допомогу у виконанні даного розділу роботи зав. кафедри біофізики, інформатики та медичної апаратури ОДМУ, д.мед.н., проф. Л.С. Годлевському.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на XIX Українській конференції з органічної хімії (Львів, 2001); на Міжнародній конференції "Chemistry of nitrogen containing heterocycles", (Kharkiv, 2003);

IV науково-практичному семінарі Координаційної ради відділення хімії НАН України з проблеми "Наукові основи створення лікарських засобів" (Гурзуф, 2003); XX Українській конференції з органічної хімії (Одеса, 2004); III Конференції українського товариства нейронаук (Донецьк, 2005); VI Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2005).

Публікації. За темою дисертації було опубліковано 12 наукових праць, з яких 6 в журнальних статтях, в тому числі 4 статті у фахових журналах затверджених ВАК України, та тези 6 доповідей у збірниках наукових конференцій.

Структура й обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, аналітичного огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел із 160 найменувань (59 вітчизняних і країн СНД та 101 іноземних). Робота викладена на 130 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 23 рисунками і 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали та методи дослідження. У ході роботи використовувались сполуки похідні 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну – гетероаналоги 1,4-бенздіазепінів, а також препарати похідні 1,4-бенздіазепіну: гідазепам, феназепам, алпразолам. Раніше у ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України був розроблений новий снодійний засіб - циназепам

(3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(орто-хлор)феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он) (1), (Андро-наті С.А., 1990). Ці сполуки були синтезовані у Фізико-хімічному інституті НАН України ім. О.В. Богатського НАН України у відділі медичної хімії (зав. відділом академік НАН України С.А. Андронаті).

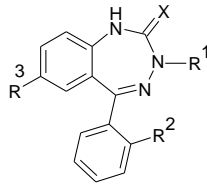
Досліди проведені на 750 безпородних мишах-самцях масою 18-25 г та 400 білих щурах лінії Вістар масою 180-380 г розведення віварію Одеського державного медичного університету.

Досліджувані речовини вводилися одноразово внутрішньоочеревинно (в/о) в ізотонічному розчині NaCl (0,9%) з розчинником Твін-80. Тваринам контрольних груп у відповідних об'ємах вводили фізіологічний розчин. Дослідження проводились у порівнянні з відомими препаратами: ноотропілом у дозі 400 мг/кг ("Пліва", Краків) і гіпнотиком третього покоління – зопіклоном у дозах 2,5; 5; 7,5 мг/кг (Рон-Пуленк Рорер, Франція), які вводили в/о.

Вплив похідних 1,3,4-бензтриазепіну на орієнтовно-дослідницьку поведінку мишей вивчали за методом "відкритого поля" (Медведева О.Ф. та ін., 1996), протисудомну активність за методом "антагонізму з коразолом" (Вороніна Т.А. та ін., 1982), антидепресивну активність оцінювали за методом "форсованого плавання" у дослідах на мишах (Porsolt R.O. et al., 1979), вплив на пам'ять вивчали за методом "дискримінації образів у просторі" (сприйняття новизни) у дослідах на щурах (Megens A.H., 1991), механізми впливу на пам'ять вивчали за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ при застосуванні амплітудно-інтервального аналізу у дослідах на щурах (Дяденко, 1994), снодійні властивості вивчали за методом "пролонгування" і "потенціювання" снодійної дії барбітуратів", у дослідах на мишах (Гацура В.В., 1974). Вивчення механізмів снодійної активності здійснювали за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ при застосуванні Фур'є перетворення у дослідах на щурах (Shandra A.A., 1998). Антигіпоксичні властивості вивчали за методом "гіпоксії з гіперкапіцією у гермооб'ємі", наявність міорелаксації вивчали за методом "стрижню, що обертається", гостру токсичність вивчали за методом Літчфілда і Уіллоксона у дослідах на мишах (Вороніна, 1982).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за програмою Microsoft Excel за допомогою обчислення середнього арифметичного та його рівня значимості за критерієм достовірності Стьюдента (Лакін Г.Ф., 1990).

Результати досліджень та їх обговорення. В ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України у відділі медичної хімії (керівник академік НАН України С.А. Андронаті) було синтезовано різні похідні 1,3,4-бензтриазепінів з вираженими психофармакологічними властивостями, дія яких опосередкована їх зв'язуванням з бенздіазепіновими рецепторами (Андронаті С.А., 2004). З метою виявлення серед нових похідних 1,3,4-бензтриазепіну біологічно активних речовин (сполуки 1-7) було вивчено широкий спектр видів їх активності: рухова активність, антидепресивні властивості, протисудомна, а також встановлений рівень їх токсичності.



$R^1=CONHC_6H_5$; $R^2=H$; $R^3=Cl$; $X=O$	1
$R^1=CONHC_6H_5$; $R^2=H$; $R^3=Br$; $X=O$	2
$R^1=H$; $R^2=Cl$; $R^3=Br$; $X=O$	3
$R^1=H$; $R^2=H$; $R^3=Br$; $X=O$	4
$R^1=H$; $R^2=H$; $R^3=Br$; $X=S$	5
$R^1=H$; $R^2=H$; $R^3=CH_3$; $X=S$	6
$R^1=H$; $R^2=H$; $R^3=CH_3$; $X=O$	7

Відомо, що похідні 1,3,4-бензтриазепіну можуть проявляти антидепресивну активність (Concas A., 2004). З усіх вивчених речовин тільки сполука 6 має антидепресивні властивості за методом Порсолта: час іммобілізації (пози відчаю) у мишей зменшується на 35 %, у порівнянні з контролем. Вивчення протисудомної активності за тестом антагонізму з коразолом показало, що із усіх сполук найбільш виражену протисудомну активність проявляють сполуки 3; 4 і 5, які містять атом бром у сьомому положенні гетероциклу з $ED_{50}=3$; 3 і 10 мг/кг, відповідно. При вивченні рухової активності мишей за тестом "відкрите поле" серед 1,3,4-бензтриазепінів виявлено сполуки, які проявляють як седативну, так і активуючу дію. Сполуки 2; 3 і 7 знижують в 2 рази загальну рухову активність мишей, тобто здійснюють седативний ефект, у порівнянні з контролем. На відміну від цих сполук, сполуки 5 і 6 (з атомом сірки у 2-ому положенні гетероциклу) не проявляють седативної активності, а навпаки, мають активуючу дію, збільшуючи при цьому загальну рухову активність. Слід зазначити, що найбільш виражений активуючий ефект здійснює сполука 6. Вивчення гострої токсичності синтезованих сполук при в/о введенні показало, що їх LD_{50} більше 400 мг/кг.

Таким чином, проведені дослідження вказують на перспективність пошуку нових речовин з різноманітним спектром фармакологічної активності серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну з різними замісниками в гетероциклі (седативної, антидепресивної, психостимулюючої, протисудомної).

За методом "дискримінації образів у просторі" серед похідних 1,2-дигідро-3Н-1,3,4-бензтриазепіну (сполук 1–7) у дослідах на щурах, встановлено, що сполуки 5 і 6 у дозі 10 мг/кг покращують пам'ять у щурів через 120 хв з коефіцієнтом дискримінації (DI) 0,28 і 0,20 відповідно, що в 4 і 3 рази вище у порівнянні з контрольними значеннями (рис. 1).

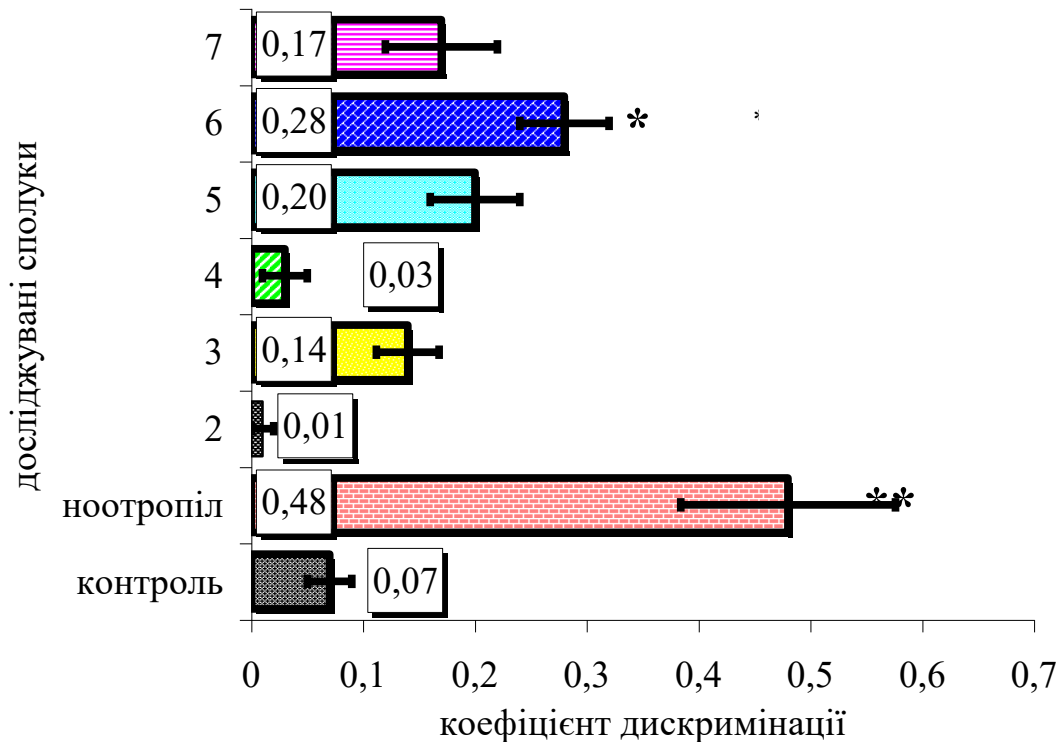


Рис. 1. Вплив нових похідних 1,3,4-бензтриазепінового ряду (10 мг/кг) і ноотропілу (400 мг/кг) на пам'ять у щурів, у порівнянні з контролем * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – достовірність відмінностей порівняно з інтактними щурами

Сполуки 3 і 7 у дозі 10 мг/кг також поліпшують пам'ять, їх коефіцієнт дискримінації становить 0,14 і 0,17 відповідно, однак за вираженістю ноотропного ефекту вони поступаються сполукам 5 і 6. Сполуки 2 і 4 не поліпшують пам'ять у експериментальних тварин, їх коефіцієнт дискримінації становить 0,01 і 0,03 відповідно. Слід відзначити, що широко застосований у медичній практиці ноотропний препарат "Ноотропіл" полегшує вилучення пам'ятного сліду у щурів у дозі 400 мг/кг з коефіцієнтом дискримінації 0,48.

Таким чином, серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну вперше виявлено ноотропну активність у сполук 5-7. Показано, що серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну найбільш виражений ефект поліпшення процесів пам'яті виявляють сполуки 5 і 6 у дозі 10 мг/кг.

Отримані результати вказують на перспективність пошуку серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну нових речовин, які поліпшують пам'ять.

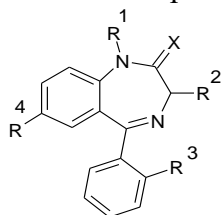
Серед вивчених сполук найбільш виражений ефект на процеси пам'яті здійснював -7-метил-5-феніл-1,3-дигідро-3Н-1,3,4-бензтриазепін-2-тіон (сполука 6). Вивчено вплив сполуки 6, у порівнянні з ноотропілом, на ЕКоГ щурів у досліджах *in vivo*. Встановлено, що під впливом сполуки 6 у дозі 10 мг/кг, починаючи з 95-ої хв дослідження, спостерігається збільшення розрахункової потужності бета-1, альфа-, тета- ритмів діапазону частот у корі та гіпокампі мозку щурів. Аналогічний ефект збільшення потужності бета-1, альфа-, тета-ритмів виявлено під впливом ноотропілу (400 мг/кг), також починаючи з 95-ої хв дослідження, при цьому спостерігалось зниження гамма-1, бета-2 ритмів діапазону частот, що співпадає з даними, які є в літературі (Крапівін, 1989).

Проведені нами дослідження показали, що кисневий аналог сполуки 6, також покращує пам'ять за тестом "дискримінації образів у просторі" і проявляє антидепресивні

властивості за тестом "форсованого плавання" за Порсолтом. Встановлено, що сполука 6 у дозі 10 мг/кг має подібний до ноотропілу (400 мг/кг) вплив на спектр фізіологічних ритмів кори та гіпокампу мозку щурів. Можна припустити, що така сполука може бути перспективною як ноотропний засіб.

Як відомо, вплив препаратів бенздіазепінової структури на здатність до навчання і на процеси пам'яті неоднозначний. У літературі є дані про те, що під впливом деяких бенздіазепінових транквілізаторів у низьких дозах відбувається поліпшення цих процесів, однак при збільшенні дози ефект поліпшення пам'яті зникає (Вороніна Т.А., 2005).

Вивчено вплив анксиолітиків: феназепаму, гідазепаму, алпразоламу, а також нових похідних 1,4-бенздіазепінового ряду нищеприведеної структури на процеси пам'яті у дослідах на щурах за умови їх введення після навчання (тобто вивчали їх вплив на збереження енграми пам'яті) за методикою "дискримінації образів у просторі".



$R^1=H; R^2=H; R^3=Cl; R^4=Br; X=O$ (феназепам) 1

$R^1=H; R^2=OCO(CH_2)_2COOH; R^3=Cl; R^4=Br; X=O$ (циназепам) 2

$R^1=H; R^2=N$  $R^3=Cl; R^4=Br; X=O$ 3

$R^1=CH_2CONHNH_2; R^2=H; R^3=H; R^4=Br; X=O$ (гідазепам) 4

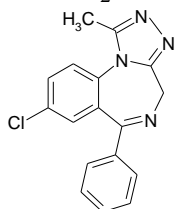
$R^1=(CH_2)_3COOCH_3; R^2=H; R^3=Cl; R^4=Br; X=O$ 5

$R^1=CH_2CONHNH(2,4-(NO_2)_2-C_6H_3); R^2=H; R^3=Cl; R^4=Br; X=O$ 6

$R^1=CH_2CONHNH(2,4-(NO_2)_2-C_6H_3); R^2=H; R^3=H; R^4=Cl; X=O$ 7

$R^1=CH_2CONHN=CH[3,4,5-(OCH_3)_3C_6H_2]; R^2=H; R^3=H; R^4=CH_3; X=O$ 8

$R^1=CH_2CONHN=CH[3,4,5-(OCH_3)_3C_6H_2]; R^2=H; R^3=H; R^4=CH_3; X=O$ 9



(алпразолам)

10

Введений відразу після навчання гідазепам у дозі 0.5 мг/кг полегшує вилучення пам'ятного сліду у щурів через 120 хв з коефіцієнтом дискримінації (DI) 0.40, що в 5,7 рази вище у порівнянні з контрольними значеннями (рис. 2).

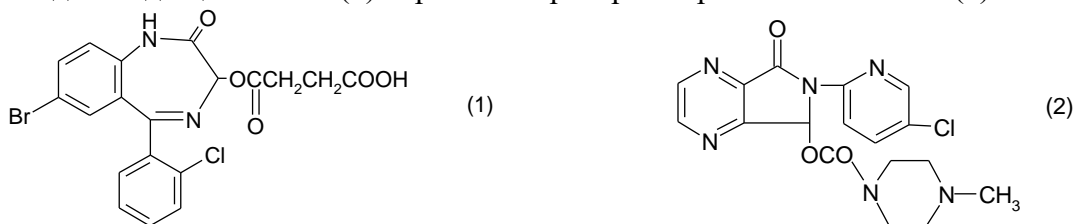
Як показали наші дослідження, алпразолам і феназепам у дозі 0.5 мг/кг, за умови введення їх після навчання, не впливають на процес пам'яті, їх середній DI < 0.2 і становить 0.09 і -0.04 відповідно. Слід відзначити, що згідно з отриманими даними на даній моделі, ноотропний препарат ноотропіл полегшує вилучення пам'ятного сліду у щурів у дозі 400 мг/кг з DI 0,48, а гідазепам у значно нижчій дозі (0,5 мг/кг) має DI 0,40 мг/кг і за вираженістю ноотропного ефекту не поступається ноотропілу.

Відомо, що для ноотропів характерним є не тільки покращення пам'яті, але й антигіпоксична дія (Вороніна Т.А., 1992). Нами було встановлено, що із всіх досліджуваних речовин 1-10 у дозі 0,5 мг/кг найбільш виражений антигіпоксичний ефект здійснював тільки циназепам. Він збільшував тривалість життя тварин в умовах гіпоксії з гіперкапнією в 1,5 рази, у порівнянні з контрольною групою тварин. Циназепам у дозі 0,5

мг/кг за тестом "гіпоксії з гіперкапнією у гермооб'ємі" проявляє антигіпоксичні властивості. На відміну від нього зопіклон у дозі 0,5 і 7,5 мг/кг за тестом "гіпоксії з гіперкапнією у гермооб'ємі" не проявляє антигіпоксичних властивостей, у порівнянні з контрольною групою тварин. На відміну від циназепаму препарати гідазепам (4), феназепам (1), зопіклон і сполуки 3, 5-9 не проявляють антигіпоксичних властивостей у дозі 0,5 мг/кг, у порівнянні з контрольною групою.

Рис. 2. Коефіцієнт дискримінації через 120 хв після введення анксиолітиків похідних 1,4-бенздіазепінового ряду (0,5 мг/кг) і ноотропілу (400 мг/кг)
 **P<0,01 – достовірність відмінностей порівняно з інтактними щурами

Проведені дослідження у дослідах на мишах з використанням стандартних методів фармакологічної оцінки гіпноседативних засобів показали, що за вираженістю і глибиною снодійної дії циназепам (1) переважає препарат порівняння зопіклон (2).



Гіпноседативна дія циназепаму проявляється у здатності цієї речовини пролонгувати ефекти гексеналу у мишей. Під впливом невисоких доз циназепаму 0,15-0,5 мг/кг спостерігається значне збільшення тривалості гексеналового сну у мишей, при цьому скорочується латентний період засинання і збільшується тривалість сну. ЕД₅₀ для циназепаму складає 0,4 мг/кг, а для зопіклону - 7,5 мг/кг (рис. 3).

За тестом пролонгування снодійної дії гексеналу (80 мг/кг) загальна тривалість гексеналового сну при введенні циназепаму у дозах 1 і 5 мг/кг складала 103 хв (214 %) і 188 хв (392 %) у порівнянні з контролем – 48 хв (100 %). На відміну від циназепаму, зопіклон збільшував тривалість гексеналового сну в 1,8 рази, у порівнянні з контролем, тільки у дозі 5 мг/кг (рис. 4).

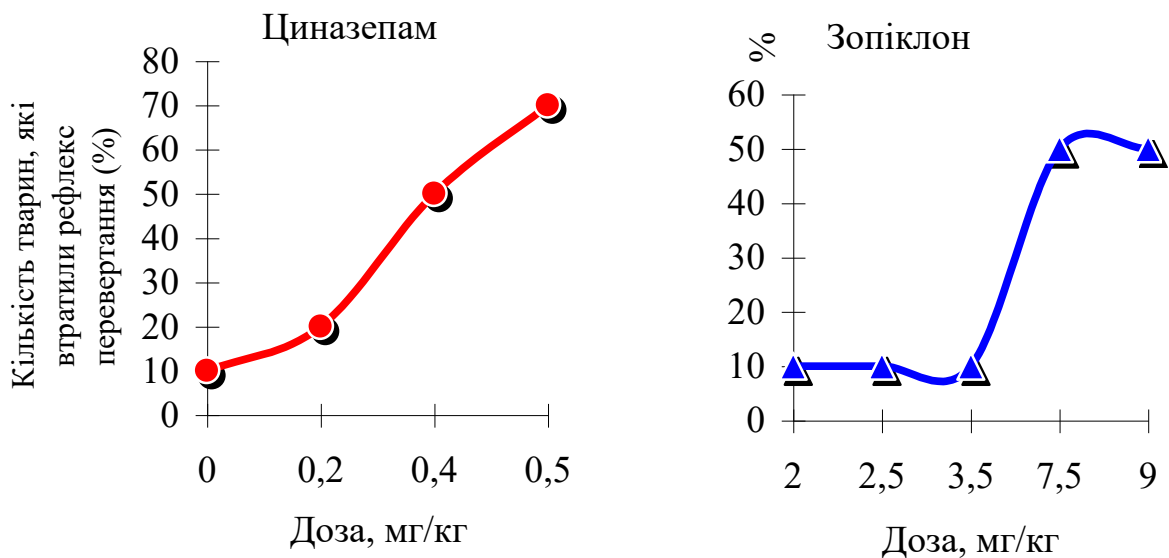


Рис. 3. Вплив циназепаму і зопіклону на потенціювання снодійної дії барбітуратів.

Рис. 4. Вплив циназепаму і зопіклону на пролонгування снодійної дії гексеналу (80 мг/кг) у дослідах на мишах
 $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ – достовірність відмінностей порівняно з інтактними мишами.

Необхідно відзначити, що при введенні циназепаму у дозі 5 мг/кг латентний період початку сну скорочується в 2 рази, у порівнянні з контролем, тобто препарат сприяє більш швидкому засинанню. У цій дозі зопіклон виявився неефективним.

Порівняльні дослідження по вивченню впливу циназепаму і зопіклону на порушення координації рухів (міорелаксації) за тестом "стрижню, що обертається", показали, що ED_{50} циназепаму складає 2,5 мг/кг, ED_{50} зопіклону – 10 мг/кг. Вивчення міорелаксації протягом 3 год показало, що протягом перших 2 год (коли переважає повільнохвильовий дельта-сон) циназепам має більш сильний м'язеворозслаблюючий ефект, ніж зопіклон, але вже через 2 год міорелаксантий прояв різко знижується як у циназепаму, так і у зопіклону, і продовжує знижуватись надалі, а через 150 хв для обох препаратів він вже знаходиться на одному рівні.

Протисудомну активність циназепаму, у порівнянні з зопіклоном, оцінювали у дослідах на мишах за методом "антагонізму з коразолом". Проведені дослідження показали, що ED_{50} для циназепаму за методом "антагонізму з коразолом" складає 0,05 мг/кг, а для зопіклону ED_{50} - 1,6 мг/кг, тобто за вираженістю протисудомної активності циназепам в 32 рази переважає препарат порівняння зопіклон.

Гостру токсичність циназепаму вивчали у порівнянні з зопіклоном у дослідах на мишах. Дослідження показали, що для циназепаму $LD_{50} = 650$ мг/кг, а для зопіклону $LD_{50} = 340$ мг/кг, тобто циназепам майже в два рази є менш токсичним, ніж зопіклон.

Встановлено, що індекс широти специфічної терапевтичної дії для циназепаму становить 6,3, а для зопіклону – 1,3.

Отримані результати показали, що на відміну від зопіклону, який у дозах 0,4-7,5 мг/кг не впливає на пам'ять, циназепам у дозі 0,5 мг/кг сприяє полегшенню вилучення пам'ятного сліду у експериментальних тварин, тобто покращує пам'ять за тестом "дискримінації образів у просторі", у порівнянні з контрольною групою тварин. У дозах 0,05-0,4 мг/кг циназепам сприяє покращенню пам'яті у щурів, збільшуючи коефіцієнт дискримінації в 4 рази,

Застосування циназепаму в дозі 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о) викликало збільшення тривалості фази глибокого повільнохвильового і парадоксального сну в 1,2 рази і в 1,7 рази, відповідно. За цих умов також спостерігалось скорочення тривалості фази неспаня – в порівнянні з контрольними значеннями (рис. 5) в 1,2 рази і фази поверхневого повільнохвильового сну (в 1,7 рази), у порівнянні з контрольною групою.

Циназепам у дозі 5,0 мг/кг значно (в 2,2 рази порівняно з контрольною групою) знижував рівень неспаня у експериментальних тварин (рис. 6). За цих умов спостерігається пропорційне збільшення в 1,4 рази тривалості поверхневого повільнохвильового, глибокого повільнохвильового та парадоксального сну, у порівнянні з контрольною групою. Дослідження впливу зопіклону (2,5 мг/кг, в/б) показало відсутність його сомногенних ефектів.

Рис. 5. Коефіцієнт дискримінації циназепаму 0,05; 0,2; 0,4 і 0,5 мг/кг порівняно з зопіклоном 0,4; 0,5 і 7,5 мг/кг
 $*P < 0,05$ – достовірність відмінностей порівняно з інтактними щурами

Рис. 6. Вплив циназепаму і зопіклону у дозі 5 мг/кг на тривалість фаз

циклу "сон-неспанн" за даними ЕКОГ за чотирьохгодинний період дослідження

Н - неспанн; ПП - поверхневий повільнохвильовий сон;

ГП - глибокий повільнохвильовий сон; ПР – парадоксальний сон

*P<0,05, **P<0,01 - достовірність відмінностей порівняно з інтактними щурами

За цих умов спостерігалось достовірне, у порівнянні з контролем, подовження тривалості фази неспанн в 1,4 рази, а також скорочення фази глибокого повільнохвильового сну в 1,7 разів. У дозі 5,0 мг/кг зопіклон викликав помірні сомногенні ефекти, які проявлялися у достовірному зниженні тривалості фази неспанн в 1,3 рази, і в збільшенні тривалості фази глибокого повільнохвильового сну – в 1,2 рази. Використання зопіклону в дозі 7,5 мг/кг супроводжувалось зниженням тривалості фази неспанн в 1,5 рази у порівнянні з контролем. Слід відзначити, що за цих умов зопіклон не впливає на вираженість поверхневої повільнохвильової фази сну, а також парадоксального сну, але збільшує тривалість глибокої фази повільнохвильового сну – в 1,4 рази, у порівнянні з контролем.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що під впливом циназепаму (2,5-5 мг/кг) спостерігаються дозозалежні ефекти стимулювання циклу сон-неспанн, які проявляються у скороченні тривалості фази неспанн, пропорційному видовженні фаз як повільнохвильового, так і парадоксального сну, при цьому не змінюється фізіологічна структура сну.

Разом з тим, отримані результати свідчать про те, що під впливом циназепаму спостерігалось збільшення тривалості фази парадоксального сну – ефект, який має протилежну тенденцію при активації бенздіазепінами рецепторів типу ГАМК_A (Gottesmann С. 2002; Корр С., 2003).

Таким чином, отримані експериментальні результати вказують на перспективність подальшого пошуку речовин з ноотропною і снодійною дією серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну і 1,4-бенздіазепіну, які можуть знайти застосування в медицині для лікування розладів сну та пам'яті.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено експериментальне і теоретичне обґрунтування дії нових похідних 1,3,4-бензтриазепінового і 1,4-бенздіазепінового ряду, які відкривають перспективу подальшого розширення галузей застосування і впровадження їх у медичну практику для лікування розладів сну, а також для корекції вроджених і набутих неврологічних дефіцитів (втрата пам'яті) у похилому і літньому віці, так і при затримці розумового розвитку у дітей.

1. Серед нових похідних 1,3,4-бензтриазепіну виявлені сполуки, які в інтервалі доз 1-10 мг/кг мають широкий спектр нейротропної активності, що включає протисудомні, активуючі, антидепресивні, ноотропні та інші ефекти. Досліджувані сполуки нетоксичні, їх LD₅₀ при внутрішньоочеревинному введенні >400 мг/кг.

2. Встановлено вплив на ЕКОГ щурів найбільш активного похідного 1,3,4-бензтриазепіну – сполуки 6 (7-метил-5-феніл-1,3-дигідро-3Н-1,3,4-бензтриазепіну-2-тіону), який у дозі 10 мг/кг, введений одразу після навчання, полегшує пам'ять у експериментальних тварин і має подібний до ноотропілу (400 мг/кг) вплив на спектр фізіологічних ритмів: спостерігається збільшення потужності активуючих бета-1, альфа- та тета-ритмів кори та гіпокампу.

3. Встановлено, що серед анксиолітиків, препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду (феназепаму, гідазепаму і алпразоламу), тільки гідазепам, який введено у дозі 0.5 мг/кг одразу після навчання, поліпшує пам'ять у щурів з коефіцієнтом дискримінації 0.40, що в 5.7 разів вище у порівнянні з контролем, і за вираженістю ноотропного ефекту не поступається ноотропілу (400 мг/кг) з коефіцієнтом дискримінації 0,48.

4. За вираженістю і глибиною снодійного ефекту циназепам має деякі переваги перед препаратом порівняння зопіклоном. За потенціюванням снодійного ефекту барбітуратів ED₅₀ циназепаму 0.4 мг/кг, а зопіклому – 7.5 мг/кг. Циназепам у дозах 1 і 5 мг/кг збільшує загальну тривалість сну у мишей в 2 і 4 рази відповідно, у порівнянні з контролем, а зопіклон у дозі 5 мг/кг – в 1.8 разів. Циназепам (5мг/кг) на відміну від зопіклому (5 мг/кг) скорочує латентний період початку сну мишей у 2 рази, у порівнянні з контролем.

5. Встановлено, що циназепам у дозах 0.05-0.4 мг/кг, який введено одразу після навчання, покращує пам'ять у щурів за методом "дискримінації образів у просторі" в 3,9-4,2 рази збільшує коефіцієнт дискримінації, на відміну від зопіклому (7.5 мг/кг), який не впливає на пам'ять, у порівнянні з контролем.

6. Циназепам у дозі 0.5 мг/кг проявляє антигіпоксичні властивості і в 1.5 рази збільшує тривалість виживання мишей в умовах гіпоксії, на відміну від зопіклому у дозах 0.5 - 7.5 мг/кг, у порівнянні з контролем. Встановлено, що циназепам в 2 рази є менш токсичним від зопіклому, для циназепаму LD₅₀=650 мг/кг, а для зопіклому - LD₅₀=340 мг/кг (при внутрішньоочеревинному введенні).

7. Застосування циназепаму (2.5-5.0 мг/кг) викликає дозозалежні зміни циклу "сон-неспанн", які полягають у скороченні фази неспанн і пропорційному видовженні глибокого повільнохвильового і парадоксального сну. За характером впливу на цикл "сон-неспанн" циназепам не поступається зопіклому (5-7.5 мг/кг), який скорочує тривалість фази неспанн, збільшує тривалість глибокого повільнохвильового сну, але не впливає на тривалість фази парадоксального сну.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Фармакологічні властивості 1,3,4-бензтриазепінів з різними замісниками / Попова Л.В., Власюк С.В., Павловський В.І., Карасьова Т.Л., Андронаті С.А. // Фармац. журн. – 2002. – № 2. – С. 89-92. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті до друку).

2. Пошук речовин, які поліпшують процеси пам'яті серед 1,2-дигідро-3Н-1,3,4-бензотриазепін-2-онів і –2-тіонів / Карасьова Т.Л., Попова Л.В., Власюк С.В., Павловський В.І., Андронаті С.А. // Фармац. журн. – 2003. – № 2. – С. 61-64. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів, оформлення статті).

3. Карасьова Т.Л., Попова Л.В., Андронаті С.А. Вивчення впливу анксиолітиків, похідних 1,4-бенздіазепінового ряду на процеси пам'яті в експериментах на щурах // Ліки. – 2003. – № 3-4. - С. 84-86. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

4. Вплив циназепаму на структуру циклу снання-неспанн у щурів / Годлевський Л.С., Карасьова Т.Л., Попова Л.В., Степаненко К.І., Андронаті С.А. // Досягнення біології та медицини. – 2005. - № 2. - С. 22-26. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

5. Андронаті С.А., Карасева Т.Л., Попова Л.В. ГАМК-ергические снотворные средства // Фармацевтична Україна. - 2004. - № 2. – С. 18-22. (Дисертантом проведені

експериментальні дослідження, статистична обробка, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку).

6. ГАМК-ергіческие снотворные средства / Андронати С.А., Карасева Т.А., Попова Л.В., Макан С.Ю., Бойко И.А. // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2004. - № 1 (5). – С. 6-17. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистична обробка, підготовка до друку).

7. Синтез та властивості гетероциклічних сполук на основі семікарбазонів 2-амінобензофенонів / С.В. Власюк, Л.В. Попова, Т.Л. Карасьова, В.І. Павловський // XIX Українська конференція з органічної хімії. - Львів, 2001. - С. 249. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

8. Andronati Study of the influence of 1,4-benzodiazepine anxiolytics on memory processes in rats / T.L. Karaseva, L.V. Popova, V.I. Pavlovsky, S.A. // Abstracts International conference chemistry of nitrogen containing heterocycles, - Kharkiv, - 2003. – С. 252. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

9. Андронати С.А., Карасева Т.Л., Попова Л.В. Новые ГАМК-ергические снотворные средства // IV научно-практический семинар "Научные основы создания лекарственных средств", Гурзуф, - 2003. – С. 3-10. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

10. Нейрофизиологический анализ ноотропных эффектов производных 1,3,4-бензтриазепина по сравнению с пирацетамом / Л.В.Попова, Т.Л. Карасева, Б.А. Лобасюк, В.И. Павловский // XX Украинская конференция с органической химии. - Одесса, 2004. – С. 551. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація результатів).

11. Влияние циназепам на структуру сна крыс (по данным электрокортикографии) / Андронати С.А., Карасева Т.А., Годлевский Л.С., Попова Л.В., Степаненко К.И. // Конференція Українського товариства нейронаук (з міжнародною участю) "Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти". - Донецьк, 2005. – Т. 1, № 1. – С. 6. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретація отриманих даних).

12. Карасьова Т.Л., Попова Л.В., Андронати С.А. Вплив ГАМК-ергічних снодійних засобів циназепаму і зопіклону на пам'ять у дослідях на щурах // VI Національний з'їзд фармацевтів України. - Харків, 2005. – С. 522-523. (Дисертантом проведені експериментальні дослідження, їх аналіз та оформлення публікації).

АНОТАЦІЯ

Попова Л.В. Нейрофармакологічний аналіз ноотропної і снодійної дії ГАМК-ергічних сполук – похідних 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Одеський державний медичний університет МОЗ України, Одеса, 2006.

Дисертація присвячена вивченню нейрофармакологічного спектру дії 17 сполук – похідних 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну з різними замісниками у гетероциклі. Вивчення фармакологічних властивостей похідних 1,3,4-бензтриазепіну показало, що серед досліджуваних сполук виявлено речовини, які мають психостимулюючі, депресивні, седативні, протисудомні і ноотропні ефекти. Серед цих сполук виявлені речовини, які в дозі 10 мг/кг покращують вилучення інформації із пам'ятного сліду, яка була отримана до введення речовин експериментальним тваринам. Отримані результати показали перспективу пошуку нових сполук з ноотропною активністю серед похідних 1,3,4-бензтриазепіну. Було вивчено порівняльні фармакологічні властивості циназепаму і

зопіклону (снодійна, міорелаксанта, протисудомна і ноотропна). Вивчення ноотропної активності 1,4-бенздіазепінових анксиолітиків – феназепаму, альпразоламу, гідазепаму, циназепаму і похідного циклопіролону – зопіклону показало, що тільки гідазепам у дозі 0,5 мг/кг і циназепам 0,05-0,5 мг/кг проявляють ноотропну активність. Зопіклон 7,5 мг/кг не має ноотропної активності. Результати отримані за допомогою аналізу ЕКоГ впливу циназепаму і зопіклону на структуру сну щурів. Показано, що обидва препарати збільшують час загальної тривалості сну. Під дією циназепаму пропорційно збільшується тривалість як повільнохвильового (ортодоксального), так і парадоксального сну. Зопіклон збільшує загальну тривалість сну за рахунок збільшення ортодоксального сну. Під дією зопіклону тривалість парадоксального сну практично не змінюється.

Ключові слова: похідні 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну, ноотропна і снодійна дія.

АННОТАЦІЯ

Попова Л.В. Нейрофармакологічний аналіз ноотропного і снотворного дії ГАМК-ергічних сполучень – похідних 1,4-бенздіазепіну і 1,3,4-бензтриазепіну. – Рукопись.

Дисертація на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Одесский государственный медицинский университет МЗ Украины, Одесса, 2006.

Дисертація посвящена изучению снотворного и ноотропного действия производных 1,4-бенздиазепина и 1,3,4-бензтриазепина. Как показали наши исследования, производные 1,3,4-бензтриазепина в интервале доз 1-10 мг/кг обладают широким спектром биологической активности (седативной, антидепрессивной, психостимулирующей, анорексигенной, противосудорожной). В результате изучения ноотропной активности новых соединений 1,3,4-бензтриазепинового ряда впервые выявлены соединения, которые улучшают память у крыс в низких дозах (10мг/кг). Проведен нейрофизиологический анализ их ноотропных эффектов в сравнении с ноотропилем по данным электрокортикограммы крыс. Установлено, что производное 1,3,4-бензтриазепина – 7-метил-5-фенил-1,3-дигидро-3Н-1,3,4-бензтриазепин-2-тион (10 мг/кг) обладает подобным ноотропилу (400 мг/кг) влиянием на спектр физиологических ритмов коры и гиппокампа мозга крыс (наблюдается увеличение расчетной мощности активирующих бета-1, альфа-, и тета-ритмов коры и гиппокампа). Полученные результаты указывают на перспективность поиска среди производных 1,3,4-бензтриазепина новых соединений, которые улучшают память. Установлено, что исследуемые соединения являются нетоксичными, их LD₅₀>400 мг/кг. Полученные данные по методу "дискриминации образов в пространстве" на крысах показали, что среди изученных нами анксиолитиков 1,4-бенздиазепинового ряда (гидазепам, феназепам, алпразолам), которые введены сразу после обучения в дозе 0.5 мг/кг только гидазепам (0.5 мг/кг) облегчает процессы памяти у крыс с коэффициентом дискриминации (DI) 0.40. Ноотропил, введенный сразу после обучения, оказывает аналогичный эффект у крыс в дозе 400 мг/кг с DI=0,48. Сравнительные фармакологические исследования гипноседативных свойств ГАМК-ергических препаратов циназепам и зопиклона продемонстрировали преимущество циназепам, как перспективного снотворного препарата. В сравнительном аспекте изучены нейрофизиологические особенности действия циназепам и зопиклона, их влияние на структуру сна. На основании анализа результатов ЕКоГ установлено, что циназепам (2,5-5мг/кг) вызывает дозозависимые изменения цикла сон-бодрствование, которые состоят в сокращении фазы бодрствования и пропорциональном удлинении глубокого медленноволнового и парадоксального сна. По характеру влияния на цикл

сон-бодрствование циназепам не уступает зопиклону (5-7,5 мг/кг), который, в отличие от циназепама, не влияет на длительность фазы парадоксального сна. Установлено, что циназепам (0,5мг/кг) проявляет также выраженные антигипоксические свойства в отличие от зопиклона (0,5-7,5 мг/кг) и других исследуемых производных 1,4-бенздиазепина (0,5 мг/кг), увеличивая длительность жизни животных в условиях гипоксии с гиперкапнией в 1,5 раза, в сравнении с контролем. Циназепам в 2 раза менее токсичен, чем зопиклон, его LD₅₀>650 мг/кг, а для зопиклона - LD₅₀=340 мг/кг. Следует отметить, что циназепам, введенный сразу после обучения в низких дозах (0,05-0,5 мг/кг), улучшает память у крыс (способствует сохранению энгаммы памяти), а зопиклон (7,5 мг/кг) - не влияет на память.

Ключевые слова: производные 1,4-бенздиазепина, 1,3,4-бензотриазепина, ноотропное и снотворное действие.

SUMMARY

Popova L.V. Neuropharmacological analyses of nootropic and hypnotic activity of GABA-ergic compounds – 1,4-benzodiazepine and 1,3,4-benzotriazepine derivatives. – Manuscript.

Thesis for a candidate's degree in Biological Sciences on speciality 14.03.05 – pharmacology. – Odessa State Medical University of Ministry of Public Health of Ukraine, Odessa, 2006.

The dissertation is devoted to studying of a neuropharmacological spectrum of action of 17 compounds – derivatives of 1,4-benzodiazepine and 1,3,4-benzotriazepines with different substituents in heterocycle. The study of pharmacological properties of 1,3,4-benzotriazepine derivatives has shown that among the investigated compounds are found the agents possessing stimulant, depressive, sedative, anticonvulsant and nootropic effects. Among these compounds were found the substances which at doses of 10 mg/kg facilitating the retrieval from memory the information presented just before their administration to experimental animals. The data obtained have shown the perspective of search for novel compounds with nootropic activity in 1,3,4-benzotriazepines row. The comparative pharmacological characteristics of cynazepam and zopiclone (hypnotic, miorelaxant, anticonvulsant, nootropic) were realized. The study of nootropic activity of 1,4-benzodiazepine anxiolytics – phenazepam, gidazepam, alprozalam, cynazepam and cyclopirolone derivative-zopiclone has shown that only gidazepam (0.5 mg/kg) and cynazepam (0.05-0.5 mg/kg) have possessed nootropic activity. Zopiclone (7.5 mg/kg) has no nootropic activity. Results obtained on EEG-analysis of influence of cynazepam and zopiclone on sleep structure of rats were shown that both agents increased total sleep time. Under cynazepam continuity of slow wake sleep (ortodoxical) as well as paradoxical sleep (PS) are proportionally increased. Zopiclone increased total sleep continuity at the expense of ortodoxical sleep, PS amount was not changed practically under zopiclone.

Key words: 1,3,4-benzotriazepines, 1,4-benzodiazepines, nootropic and hypnotic effects.