

К.П. Шабельник, С.В. Павлов, С.І. Коваленко, І.Ф. Белєнічев

АНТИОКСИДАНТНА ТА АНТИАМНЕСТИЧНА АКТИВНІСТЬ АМІДІВ (6-*R*-4-ОКСО-4*H*-ХІНАЗОЛІН-3-ІЛ)ОЦТОВИХ КИСЛОТ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтові кислоти, аміди, антиоксидантна та антиамнестична активність.

Ключевые слова: (6-*R*-4-оксо-4*H*-хиноазолин-3-ил)уксусные кислоты, амиды, антиоксидантная и антиамнестическая активность.

Keywords: (6-*R*-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-yl)acetic acids, amides, antioxidant and antiamnesic activity.

Аміди (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтової кислоти на моделях інгібування супероксид- та пероксинітритрадикалу, ферментативного та неферментативного ініціювання ВРО проявляють значну антиоксидантну активність. Сполуки з високою антиоксидантною активністю введені експериментальним тваринам у дозах 10,0 мг/кг до навчання проявляють виражений антиамнестичний ефект, попереджуючи при цьому розвиток амнезії УРПУ, конкуруючи або перевищуючи при цьому активність ноофену і тіотриазоліну.

Амиды (6-*R*-4-оксо-4*H*-хиноазолин-3-ил)уксусной кислоты на моделях ингибирования супероксид- и пероксинитрит-радикала, ферментативного и неферментативного иницирования СРО проявляют значительную антиоксидантную активность. Соединения с высокой антиоксидантной активностью введенные экспериментальным животным в дозах 10,0 мг/кг до обучения проявляют выраженный антиамнестический эффект, предупреждая при этом развитие амнезии УРПИ, конкурируя или превышая активность ноофена и тиотриазолина.

Amides of (6-*R*-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-yl)acetic acids in the inhibition models of superoxide and peroxy nitrates radical, enzymic and non-enzymic initiation of FRO exhibit substantial antioxidant activity. Compounds with a high antioxidant activity injected to the experimental animals in the dose of 10.0 mg/kg before the training result to a pronounced anti-amnesic effect that, in addition, prevents from amnesia of CPER, competes with or surpasses the efficiency of Noophen and Thiotriazoline.

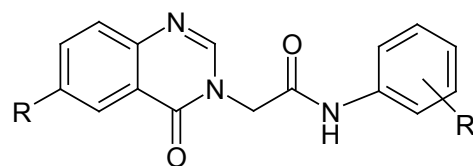
Цікавим і перспективним напрямком у створенні нейропротективних засобів на сьогодні є антиоксидантна стратегія [1-4]. Тісний взаємозв'язок нейродеструктивних патологій і гіперпродукції активних форм кисню (АФК), з наступною активацією ВРО відзначена вже давно. Так, основним ланцюгом утворення АФК при нейродеструкції є мітохондрії і значну функцію в цьому відіграє високий рівень кальцію (II) у клітині, що обумовлено активацією NMDA-рецепторів. Важливо відзначити, що АФК пошкоджують білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди, знижують збудливість і провідність нейрональних структур, чутливість рецепторів, селективність іонних каналів тощо. Аналіз наукової літератури щодо нейропротекторних сполук з антиоксидантним механізмом дії дозволяє виділити ряд ключових структур з високою біологічною активністю, а саме – семакс, мелатонін і його структурні аналоги тощо [5-8]. Подібні групи антиоксидантів, а саме амінокислоти та поліпептиди, є ефективними “пастками” АФК, проявляють нейропротекторну активність в гострий період нейродеструктивних патологій, реактивують антиоксидантну ферментну систему, нормалізують енергетичний обмін нейронів, знижують утворення прогизапальних цитокінів, гальмують окисну модифікацію білка, що є підтвердженням перспективності створення нейропротекторів шляхом дизайну молекул зазначених речовин. Таким чином, направлений пошук сполук з нейропротекторною активністю та антиоксидантним механізмом дії серед сполук, які містять амідний зв'язок, є актуальною проблемою.

МЕТОЮ даної **РОБОТИ** є спрямований пошук сполук з антиамнестичною активністю та антиоксидантним механізмом дії серед амідів (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтових кислот.

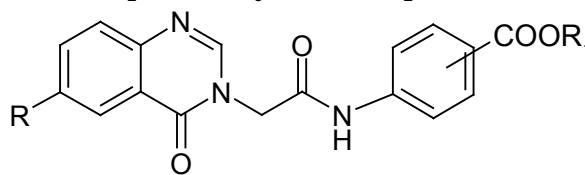
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження є аміди (6-*R*-4-оксо-4*H*-

хіназолін-3-іл)оцтових кислот, які синтезовані на кафедрі фармацевтичної хімії ЗДМУ (зав. кафедрою, професор, д.фарм.н. Мазур І.А.).



1.1 R=H, R1=H; **1.2** R=H, R1=2-Me; **1.3** R=H, R1=3-Me; **1.4** R=H, R1=2-OH; **1.5** R=H, R1=3-OH; **1.6** R=H, R1=4-OH; **1.7** R=H, R1=2-OMe; **1.8** R=H, R1=3-Cl; **1.9** R=H, R1=4-Cl; **1.10** R=H, R1=CF₃; **1.11** R=H, R1=5-Cl, 2-OMe; **1.12** R=H, R1=3-NO₂; **1.13** R=H, R1=4-NO₂; **1.14** R=NO₂, R1=H; **1.15** R=NO₂, R1=4-OH; **1.16** R=NO₂, R1=2-OMe; **1.17** R=NO₂, R1=3-Cl; **1.18** R=NO₂, R1=4-Cl; **1.19** R=NO₂, R1=3-CF₃; **1.20** R=NO₂, R1=5-Cl, 2-OMe



2.1 2-COOH, R=H, R1=H; **2.2** 3-COOH, R=H, R1=H; **2.3** 2-COOH, R=H, R1=Me; **2.4** 3-COOH, R=H, R1=Me; **2.5** 4-COOH, R=H, R1=Et; **2.6** 4-COOH, R=H, R1=(CH₂)₂N(C₂H₅)₂; **2.7** 2-COOH, R=NO₂, R1=H; **2.8** 3-COOH, R=NO₂, R1=H; **2.9** 4-COOH, R=NO₂, R1=Et

Рисунок. Принципова будова амідів (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтових кислот

Антиоксидантна активність синтезованих сполук на моделях інгібування супероксидрадикалу та пероксинітрирадикалу

Оцінку АОА сполук у дослідах *in vitro* проводили на моделях інгібування супероксидрадикалу та пероксинітрирадикалу, ферментативного та неферментативного ініціюванні ВРО в гомогенаті головного мозку щурів [10]. Досліджувані сполуки та еталони порівняння (емоксипін, тіотриазолін, тіосечовина) згідно моделей визначали в дозах 10^{-6} М.

Дослідження антиамнестичної активності проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар обох статей, вагою 180-220 г, одержаних з віварію Інституту фармакології і токсикології АМН України. Для оцінки антиамнестичної дії використовували методику умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [11-14]. З цією метою тварини помішали у світлий відсік двокамерної установки і реєстрували латентний період заходу в темний відсік камери, де щури одержували однократний удар струмом через електродну підлогу (навчання). Безпосередньо після навчання тваринам внутрішньочеревинно вводили атропін у дозі 2,5 мг/кг, як амнезуючий фактор. Відтворення рефлексу здійснювали через 24 години після навчання. Досліджувані сполуки вводили *per os* за 60 хвилин до навчання у дозах 1,0 та 10,0 мг/кг, тіотриазолін – 50 мг/кг, семакс – 300 мг/кг та ноофен – 250 мг/кг.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Результати фармакологічних досліджень *in vitro* (табл. 1) показали, що АОА амідів (6-R-4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл)оцтових кислот (**1.1-1.20**) залежить і визначається природою замісника. Необхідно відзначити, що сполука **1.1** та **1.14** за силою дії конкурує (інгібування супероксидрадикалу) або наближається (інгібування пероксинітрирадикалу) до еталонів порівняння. Активність інших функціональних похідних (**1.2-1.13**, **1.15-1.20**) визначається замісником в анілідній субституенті. Так, найбільшу активність на зазначених моделях проявляють сполуки **1.8**, **1.10**, які містять замісники з вираженими електроноакцепторними властивостями (табл. 1). Відзначимо, що АРА даних сполук вище еталону порівняння – тіосечовини. Введення замісника (нітрогрупа) до положення 6 хіназолонного циклу (**1.15-1.20**), приводить до зниження АОА. Найбільшу АОА серед зазначених сполук на моделях інгібування супероксид- та пероксинітрирадикалу проявляють речовини **1.15**, **1.16**, наближаючись за силою ефекту до антиоксиданту тіотриазоліну.

Всі карбоксіаніліди (6-R-4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл)оцтових кислот (**2.1-2.9**) активні по відношенню до супероксид- та пероксинітрирадикалу, причому за силою ефекту наближаються до тіотриазоліну, а деякі із них (**2.6**, **2.8**, **2.9**) до ефекту емоксипіну (табл. 1). Важливо відзначити, що більш активними виявились сполуки, в яких залишок карбоксильної групи модифіковано до відповідних ефірів (**2.3-2.6**, **2.9**). Так, сполука **2.9** (стиловий ефір 4-[2-(6-нітро-4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл)ацетиламіно]бензойної кислоти) проявляє АРА яка перевищує активність емоксипіну на 28,0% на моделі інгібування супероксидрадикалу.

№№ сполук	Інгібування супероксидрадикалу		Інгібування пероксинітрирадикалу	
	Оптична густина	АРА, %	Оптична густина	АРА, %
Інтакт	–	–	–	–
Контроль	0,4±0,003	-	0,41±0,003	-
2.1	0,26±0,002*	35,0	0,25±0,002*	39,0
2.2	0,33±0,002*	17,4	0,31±0,002*	24,3
2.3	0,22±0,002*	45,0	0,2±0,001*	51,2
2.4	0,24±0,003*	40,0	0,23±0,002*	42,5
2.5	0,26±0,003*	35,0	0,21±0,002*	48,7
2.6	0,2±0,001*	50,0	0,2±0,003*	50,0
2.7	0,22±0,002*	45,0	0,23±0,001*	42,5
2.8	0,21±0,002*	47,5	0,2±0,001*	50,0
2.9	0,1±0,002*	75,0	0,18±0,002*	56,0
Контроль	0,52±0,006	-	0,38±0,001	-
1.1	0,27±0,004*	48,0	0,18±0,002*	52,0
1.2	0,41±0,005*	21,1	0,3±0,002*	21,0
1.3	0,34±0,003*	34,6	0,24±0,002*	36,8
1.4	0,33±0,002*	36,5	0,26±0,001*	31,5
1.5	0,42±0,001*	19,2	0,3±0,002*	21,0
1.6	0,37±0,002*	28,8	0,22±0,002*	42,1
1.7	0,3±0,002*	42,3	0,2±0,001*	47,3
1.8	0,2±0,001*	61,5	0,13±0,003*	65,7
1.9	0,37±0,003*	28,8	0,18±0,002*	52,6
1.10	0,24±0,002*	53,8	0,11±0,002*	71,0
1.11	0,41±0,001*	21,1	0,165±0,004*	56,5
1.12	0,39±0,002*	25,0	0,21±0,001*	44,7
1.13	0,3±0,004*	42,3	0,27±0,002*	28,9
1.14	0,34±0,001*	34,6	0,26±0,002*	31,5
1.15	0,39±0,002*	44,2	0,19±0,001*	50,0
1.16	0,3±0,001*	42,3	0,21±0,001*	44,7
1.17	0,38±0,004*	26,9	0,25±0,002*	34,2
1.18	0,41±0,003*	21,1	0,27±0,002*	28,9
1.19	0,44±0,002*	15,3	0,3±0,001*	21,0
1.20	0,37±0,004*	28,8	0,25±0,004*	34,2
Контроль	0,52±0,006	–	0,38±0,001	–
Емоксипін	0,27±0,002*	48,0	0,16±0,002*	57,8
Тіотриазолін	0,3±0,001*	42,3	0,18±0,002*	52,6
Тіосечовина	0,26±0,001*	50,0	0,14±0,001*	63,1
Контроль	0,28±0,01	–	0,40±0,001	–
N-АЦЦ	–	–	0,20±0,001	50,0

Примітка: * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Найбільшу АОА на моделі неферментативного ініціювання проявляють аніліди (**1.1-1.20**) які у арильній субституенті містять замісники з вираженими електроноакцепторними (**1.10-1.13**) властивостями (табл. 2).



Таблиця 2

Антиоксидантна активність синтезованих сполук на моделях неферментативного та ферментативного ініціювання ВРО методами *in vitro*

№№ сполук	Неферментативне ініціювання ВРО		Ферментативне ініціювання ВРО	
	МДА, мкмоль/л	АОА, %	МДА, мкмоль/л	АОА, %
Інтакт	0,05±0,001*	–	0,07±0,003*	–
Контроль	0,7±0,002	–	0,62±0,002*	–
2.1	0,12±0,005*	82,5	0,11±0,005*	79
2.2	0,14±0,003*	80	0,16±0,004*	74,1
2.3	0,3±0,002*	57,1	0,33±0,002*	46,7
2.4	0,34±0,002*	51,4	0,3±0,002*	51,6
2.5	0,26±0,002*	62,8	0,22±0,002*	64,5
2.6	0,24±0,001*	65,7	0,33±0,004*	46,7
2.7	0,45±0,003*	35,7	0,5±0,003*	19,3
2.8	0,4±0,003*	42,8	0,34±0,004*	45,1
2.9	0,18±0,004*	74,2	0,16±0,002*	74,1
Інтакт	0,05±0,001*	–	0,07±0,003*	–
Контроль	0,54±0,003	–	0,65±0,002*	–
1.1	0,33±0,001*	38,8	0,41±0,003*	37,5
1.2	0,37±0,001*	31,4	0,4±0,002*	38,4
1.3	0,44±0,003*	18,5	0,55±0,002	15,3
1.4	0,38±0,002*	29,6	0,39±0,004*	40
1.5	0,31±0,001*	42,5	0,4±0,02*	38,4
1.6	0,39±0,001*	38,4	0,45±0,003*	30,7
1.7	0,3±0,002*	44,4	0,37±0,004*	43
1.8	0,34±0,001*	37,0	0,36±0,005*	44,6
1.9	0,12±0,002*	77,7	0,18±0,002*	72,3
1.10	0,27±0,001*	50	0,3±0,001*	53,8
1.11	0,11±0,004*	79,6	0,19±0,003*	70,7
1.12	0,13±0,001*	75,9	0,2±0,004*	69,2
1.13	0,25±0,002*	53,3	0,37±0,001*	43,0
1.14	0,3±0,002*	44,4	0,36±0,002*	44,6
1.15	0,37±0,002*	29,6	0,45±0,001*	30,7
1.16	0,35±0,003*	34,8	0,4±0,002*	38,4
1.17	0,4±0,002*	25,9	0,38±0,003*	41,5
1.18	0,42±0,002*	22,2	0,48±0,001*	26,1
1.19	0,35±0,001*	34,8	0,5±0,002*	23,0
1.20	0,44±0,003*	18,5	0,47±0,004*	27,6
Інтакт	0,05±0,001*	–	0,07±0,003*	–
Контроль	0,54±0,003	–	0,65±0,002*	–
Емоксипін	0,16±0,002*	70,3	0,25±0,001*	61,5
Тіотриазолін	0,21±0,001*	61,1	0,3±0,004*	53,8
Тіосечовина	0,18±0,003*	66,6	0,21±0,002*	67,6

Примітка: * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Так, сполука **1.9** з *n*-хлор замісником, проявляє найбільшу активність і її АОА перевищує таку еталонів порівняння – тіотриазоліну та тіосечовини. Не значно поступаються за силою дії сполуки які в арильній субституенті містяться замісники з негативним індуктивним та позитивним мезомерним (**1.12**, **1.13**) ефектами. Введення замісника (нітрогрупа) до положення 6 хіназолонного циклу (**1.14-1.20**), приводить до суттєвого зниження активності. Так,

найбільшу активність серед нітропохідних (**1.14-1.20**) проявляють сполуки **1.15**, **1.18** та **1.20**, які мають замісники в анілідній субституенті з вираженими негативними індуктивними ефектами. Залежність „структура-активність” анілідів (**1.1-1.20**) на моделі ферментативного ініціювання ВРО подібна до вищенаведеної.

Карбоксаніліди (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтових кислот (**2.1-2.9**) проявляють найбільшу АОА серед синтезованих сполук на обох моделях ініціювання ВРО (табл. 2). Найбільш активними виявились сполуки в яких замісник знаходиться у *n*-положенні, його переміщення в *o*- та *m*-положення приводить до зниження активності. Так, сполука **2.1** проявляє АОА яка перевищує активність класичного антиоксиданту емоксипіну на 12,2% і 17,5% відповідно моделей ініціювання ВРО, а також тіотриазолін на 21,4 і 25,2%, який за ствердженням авторів [7] активує антиоксидантну систему ферментів, гальмує накопичення продуктів ВРО в тканинах міокарда та головного мозку. Введення замісника до положення 6 хіназолонного циклу приводить до зниження активності карбоксанілідів **2.7**, **2.8** або підвищення АОА у сполуки **2.9** по відношенню до їх не заміщених аналогів (**2.1**, **2.2**, **2.5**).

Проведені дослідження на антиамнестичну активність показали (табл. 3), що призначення досліджуваних сполук, тіотриазоліну, семаксу та ноофену експериментальним тваринам до навчання, з наступним введенням атропіну, викликало значне збільшення латентного періоду рефлексу УРПУ у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення досліджуваних сполук експериментальним тваринам у дозах 1,0 мг/кг до навчання не приводило до значної антиамнестичної активності у порівнянні з контрольною (амнезія) групою тварин. Більш ефективною для синтезованих сполук виявилась доза 10 мг/кг. Так, похідні (4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтової кислоти (**1.1-1.20**) у зазначених дозах збільшували латентний період рефлексу при амнезії УРПУ, конкуруючи або перевищуючи при цьому активність ноофену і тіотриазоліну.

Значну антиамнестичну активність у дозі 10 мг/кг проявляють сполуки **1.8**, **1.9**, **1.10**, **1.11**, **1.12**, **1.13**. Важливим також є те, що у даному випадку спостерігається залежність «будова-дія», яка характерна для вивчення АРА та АОА на різноманітних моделях ініціювання ВРО *in vitro*.

Більш виражена антиамнестична активність, ніж у сполук **1.1-1.20** характерна для карбоксанілідів (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтових кислот (**2.1-2.9**). Необхідно відмітити, що серед даних сполук більш ефективними виявились речовини які містять залишки ефірів *n*-амінобензойної кислоти, ряд з них **2.5**, **2.6**, **2.9** за силою дії перевищували препарат „Ноофен”. Цікавим є те, що сполука **2.9** (етилловий ефір 4-[2-(6-нітро-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)ацетиламіно]бензойної кислоти) перевищує активність ноофену на 97,3%.

Таким чином, проведені дослідження показали що досліджувані сполуки у дозах 10,0 мг/кг введені до навчання, проявляють виражений антиамнестичний ефект, попереджаючи при цьому розвиток амнезії УРПУ, яку викликали введенням атропіну.

Таблиця 3

Антиамнестична активність синтезованих сполук

№№ сполук**	Доза, мг/кг	Латентний період рефлексу при відтворенні УРПУ, сек.
Контроль без амнезії (n=6)	–	195,6±12,6
Контроль із амнезією (атропін) (n=6)	2,5	3,4±0,63
1.1	10,0	37,9±8,6
1.2	10,0	98,7±9,6
1.3	10,0	45,8±2,4
1.4	10,0	100,6±8,7
1.5	10,0	89,6±8,4
1.6	10,0	58,2±3,6
1.7	10,0	97,9±3,1
1.8	10,0	177,8±5,6*
1.9	10,0	121,5±4,3*
1.10	10,0	170±5,4*
1.11	10,0	110,2±3,2
1.12	10,0	133,9±4,5*
1.13	10,0	118,5±4,3*
1.14	10,0	54,7±7,6
1.15	10,0	89,7±6,4
1.16	10,0	100±3,2
1.17	10,0	33,5±2,1
1.18	10,0	12,1±3,3
1.19	10,0	43,1±2,1
1.20	10,0	78,9±5,4
2.1	10,0	123,8±3,5*
2.2	10,0	89,9±3,1
2.3	10,0	89,7±4,1
2.4	10,0	56,7±2,1
2.5	10,0	103,8±7,4
2.6	10,0	126,1±3,2
2.7	10,0	54,2±2,1
2.8	10,0	100,7±5,9
2.9	10,0	197,3±5,8*
Ноофен	250	100±7,9
Тіотриазолін	100	81±3,8
Семакс	300	268±4,6

Примітка: * – p>0,05 по відношенню до контролю;
** – в кожному досліді використано по 6 тварин.

Відомості про авторів:

Шабельник Костянтин Петрович, старший викладач кафедри фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, к.фарм.н.

Павлов Сергій Васильович, асистент кафедри фармакології, Запорізький державний медичний університет, к. біол. н.

Коваленко Сергій Іванович, д. фарм. н., професор, Запорізький державний медичний університет.

Беленічев Ігорь Федорович, завідувач кафедри фармакології, Запорізький державний медичний університет, д. біол. н., професор.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dawson V.L., Dawson T.M., Bartshley D.A. Mechanisms of nitric oxide – mediated neurotoxicity in primary brain cultures. // J. Neurosci. – 1993. – №13. – Р. 2651-2661.
2. Горбунов В.В. Активация образования окиси азота опосредованная метаболитотропными глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток-зерен мозжечка. // Бюллет. эксперим. Биологии и медицины. - 1995. - №7. - С.40-48.
3. Болдырев А.А., Куклей М.Л. Свободные радикалы в нормальном и ишемизированном мозге // Нейрохирургия. - 1996. - Т.13. - С.271-278.
4. Halliwell B. Molecular Biology of free Radicals in Human Diseases. - London: St. Lucia: OICA, 1999. - 352 p.
5. Андреев Б.В. Ноотропные средства // Мир Медицины. - 1998. - №8. - С. 25-28.
6. Бурчинский С.Г. Современные ноотропные средства // Журнал практического врача. - 1996. - № 5. - С. 42-45.
7. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные препараты, достижения и перспективы // Экспериментальная и клиническая фармакология, 1998, № 4, с. 3-9.
8. Воронина Т. А., Гарибова Т. Л., Островская Р. У. Поликомпонентный механизм действия новых веществ с ноотропным и нейропротективным действием // 3-я Междунар. конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». – Суздаль, 2001. – С. 41.
9. Побочные эффекты ноотропных средств / С. Ю. Штрыголь, Т. В. Кортунова, Д. В. Штрыголь // Провізор. – 2003. – №11. – С. 12-23.
10. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних речовин при ініціюванні вільно-радикальних процесів у дослідях in vitro / Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. // Метод. реком. – Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.
11. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. - М.: Медицина, 1991. - 248 с.
12. Головенко М.Я. Експериментальне вивчення ноотропної активності фармакологічних сполук. Методичні рекомендації. - Київ, 2002. - 27с.
13. Стефанов О.В. Доклиническое исследование лекарственных средств. Киев: ГФЦ МОЗ Украины, 2002. - 533с.
14. Дьюсбери Р. Изучение поведения животных. - М.: Наука, 1980. - 376с.