

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

СЕВРЮКОВ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ

УДК: 615.275.4:547.822.7:616.36-002:616.127

ПОШУК НОВИХ АНТИГІПОКСАНТІВ СЕРЕД ПОХІДНИХ 5,7-ДИГІДРО-
1Н-ПРОЛО[2,3-d]ПІРИМІДИНУ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХ ФАРМАКОДИНАМІКИ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі патологічної фізіології
Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
ВОЛКОВОЙ Валерій Аркадійович,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
професор кафедри патологічної фізіології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ДЕВ'ЯТКІНА Тетяна Олексіївна,
ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ
України (м. Полтава),
завідувач кафедри експериментальної
та клінічної фармакології
з клінічною імунологією та алергологією;

доктор фармацевтичних наук,
старший науковий співробітник
ГОРДІЄНКО Анатолій Дмитрович,
Харківська державна зооветеринарна
академія МОН України
професор кафедри фармакології і токсикології.

Захист відбудеться «23» березня _____ 2018 р. о 10 00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «22» лютого 2018 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Висока поширеність, тяжкість перебігу та інвалідизуючий характер патологій – інсультів, інфарктів, ішемічних станів різних органів, патогенетичним базисом яких є гіпоксія та асоційована з нею активація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО), визначають захист від гіпоксії та її наслідків як першорядне завдання медицини, а проблема, пов'язана з цим, набуває соціальної значущості (Л. Д. Лукьянова и соавт., 2004; Hady Felfly et al. 2011; D. A. Giussani et al., 2014; Д. В. Сосин и соавт., 2015; D. Vinnikov et al., 2016; M. Schoenhals et al., 2017).

В основі гіпоксії будь-якого генезу лежить дефіцит енергії, який призводить до якісно однотипних метаболічних та структурних змін у різних тканинах і органах (Е. Б. Манухина и соавт., 2007; В. С. Сухоруков, 2007; G. Solaini et al., 2010; Ю. М. Колесник и соавт., 2012). Незалежно від причин гіпоксії в міокарді та печінці відбуваються патологічні зміни – активується гліколіз, підвищується концентрація пірувату і лактату, що зумовлює виникнення процесів автоокиснення (Н. Kondoh, 2007; И. В. Зарубина, 2011; Т. А. Vairova et al., 2014). Ушкодження клітин різних органів (кардіоміоцитів, альвеолоцитів, нейроцитів, гепатоцитів та ін.) зумовлено не тільки гіпоксією і порушенням метаболічних процесів, а й утворенням вільних радикалів (ВР), що призводять до виснаження активності антиоксидантної системи (J. R. Dre-vet, 2006; I. I. Matalka et al., 2013; К.С. Jr. Bedi et al., 2016) і підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран клітин. Це, своєю чергою, призводить до порушення мембранних структур, роботи мембранопов'язаних ферментів, іонних каналів, рецепторів (Н. А. Цубанова, 2013; Д. В. Сосин и соавт., 2015; D. Vinnikov et al., 2016; M. Schoenhals et al., 2017).

Отже, при виникненні гіпоксії якнайшвидше потрібно застосовувати препарати, які здатні захистити клітини органів від гіпоксії, запобігають порушенню енергоутворення, зменшують продукцію ВР (Т. А. Воронина и соавт., 2010; И. С. Чекман и соавт., 2014; D. Varog et al., 2015), тобто проводити так звану «реанімацію» на клітинному рівні, суть якої полягає у використанні лікарських засобів, які проявляють виражені антигіпоксичні й антиоксидантні властивості. У наш час лікарські засоби, яким притаманні саме ці фармакологічні ефекти, широко застосовуються в практичній медицині. Пильна увага до антигіпоксиків, їх різнобічне експериментальне та клінічне дослідження зумовлені їхньою різноманітною метаболотропною дією, механізми якої включають регуляцію споживання кисню та вплив на енергетичний обмін; дію на процеси ВРО і проникність клітинних мембран; вплив на регуляторні фактори клітинної адаптації й інші процеси (С. А. Лебедева и соавт., 2014; В. В. Никонов и соавт., 2016). Перевагою таких препаратів є можливість їх застосування і з профілактичною, і з лікувальною метою.

Однак арсенал лікарських засобів із протигіпоксичною дією досить обмежений, широта й ефективність лікувальних доз невеликі. Крім того, протигіпоксична дія наявних у розпорядженні практичних лікарів препаратів виявляється не при всіх видах гіпоксії, а деякі антигіпоксиканти мають небажані побічні ефекти (в мексидолу й емоксипіну – помірне підвищення артеріального тиску, збудження або сонливість,

алергічні реакції), що обмежує їх застосування (Ю. И. Губский и соавт., 2007; Л. Д. Лукьянова и соавт., 2011). Тому пошук нових речовин із ширшою антигіпоксичною дією і відсутністю побічних ефектів є актуальним завданням експериментальної фармакології, що і було підставою для проведення наших досліджень.

У зв'язку з цим особливу увагу привертає група синтетичних сполук у ряду похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину, яким, за прогнозом PASS (Prediction Activity Spectra for Substances), притаманна антигіпоксична, антиоксидантна й антиексудативна активність. Оскільки ці сполуки раніше не вивчалися, було доцільним дослідити їхні фармакологічні властивості й обґрунтувати можливість застосування як антигіпоксантів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана в рамках затвердженої МОЗ України науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (№ держреєстрації 0114U000956). Автор є співвиконавцем цієї науково-дослідної теми.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження було експериментальне обґрунтування доцільності пошуку серед нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину перспективних антигіпоксичних лікарських засобів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі *завдання*:

1. Провести скринінг 15 нових сполук 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину на наявність антигіпоксичної, антиоксидантної й антиексудативної активності та визначити їхню гостру токсичність.
2. Проаналізувати залежність «структура-дія-токсичність» у ряду нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину.
3. Відібрати для подальшого вивчення сполуку-лідера з найбільш вираженою антигіпоксичною, антиоксидантною й антиексудативною дією, визначити її ЕД₅₀ за антигіпоксичною активністю, дослідити гостру і хронічну токсичність.
4. Дослідити антигіпоксичну активність сполуки-лідера на різних моделях гіпоксій.
5. Дослідити вплив сполуки-лідера на фактори про-/антиоксидантного балансу у міокарді, еритроцитах та сироватці крові за умов оксидативного стресу.
6. Оцінити ефективність сполуки-лідера на моделі гострого токсичного набряку легень.
7. Дослідити окремі механізми антирадикальної та антиокисної активності сполуки-лідера на моделях *in vitro*.

Об'єкт дослідження – фармакологічна корекція гіпоксичних станів.

Предмет дослідження – фармакологічні властивості нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину.

Методи дослідження. Фармакологічні (моделювання гіпоксії: гемічної, гістотоксичної, нормобаричної гіперкапнічної, гіпобаричної; моделювання гепатиту, ураження міокарду по типу оксидативного стресу, набряку задньої кінцівки щурів, набряку легень; токсикологічні: дослідження гострої та хронічної токсичності; біохімічні: визначення вмісту ТБК-реактивних дієнових кон'югатів, триєнових кон'югатів, шифових основ, відновленого глутатіону, активності супероксиддисмутази, аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, вмісту загального білка в крові та сечовині, білірубину, холестеролу, глюкози, сечовини в крові та сечі, вмісту

азоту в сечовині, гемоглобіну в крові; гістологічні (дослідження структури легень методом світлової мікроскопії); методи *in vitro*: визначення рівня радикалів – 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразину, гідроксильного, супероксиданіону та статистичні (використано програму Statistica 6.0, t-критерій Стьюдента, непараметричний U-критерієм Манна-Уїтні, кутове перетворення Фішера, коефіцієнт кореляції Пірсона).

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше теоретично обґрунтовано й експериментально доведено наявність у нових сполук – похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину антигіпоксичних, антиоксидантних та антиексудативних властивостей, та розширені уявлення щодо залежності «структура–активність–токсичність». Показано, що їхня антигіпоксична й антиоксидантна активність зумовлена базовою структурою – 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідином. Відсутність дифенільного радикала в положенні 5,5 піролопіримідинового циклу приводить до підвищення цих видів активності та зниження токсичності. Вираженість антиексудативної активності в підгрупі сполук із наявністю цих радикалів має певну закономірність: при подовженні аліфатичного ланцюга в першому положенні дезапуринової системи від трьох до п'яти атомів карбону підвищується.

На підставі узагальнення даних щодо встановлених закономірностей «структура-активність-токсичність» у ряду досліджуваних похідних обрано перспективну сполуку 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон (умовна назва «Дезапур»). Отримані нові дані щодо фармакодинаміки і безпеки сполуки «Дезапур»: встановлено, що вона є практично нетоксичною речовиною (V клас токсичності за класифікацією К. К. Сидорова, 1973) та не чинить токсичного впливу на загально-трофічні процеси, функціональний стан ЦНС, серцево-судинної системи, печінки, нирок, клітинний склад крові, стан слизової оболонки шлунка за тривалого введення.

Показано, що сполука-лідер проявляє високу антигіпоксичну активність на моделях гострої гістотоксичної, нормобаричної гіперкапнічної та гіпобаричної гіпоксії в щурів при внутрішньошлунковому введенні в ED_{50} 10 мг/кг відповідно на рівні 104%; 134% та 206%, за вираженістю якої не поступається препарату порівняння мексидолу. Підтвержено антиоксиданту активність сполуки-лідера за умов оксидативного стресу: встановлено виражений гальмівний ефект дезапуру на утворення продуктів ПОЛ, про що свідчить достовірне зниження відповідно в міокарді та в сироватці крові рівня ТБК-реактивних (ТБК-Р) на 72,3% і 70,6%; дієнових кон'югатів (ДК) – на 77,1% і 58,7%; трієнових кон'югатів (ТК) – на 84,6% і 71,7%; шифових основ (ШО) – на 38,7% і 32,9% і стимулювальний вплив на активність антиоксидантного ферменту СОД: підвищення в міокарді на 108,2%; у еритроцитах – на 83,4%.

Установлена висока ефективність дезапуру на моделі набряку легень щурів: зниження летальності тварин у 2,5 раза і у 2,4 раза подовження часу до загибелі тварин ($p < 0,05$), зниження коефіцієнта маси легень (КМЛ) у 1,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою контрольної патології; збереження альвеолярного рисунку легень, запобігання розвитку мікроциркуляторних розладів і змінам перивазальних просторів.

Доведено, що механізм антиоксидантної активності сполуки-лідера зумовлений гальмуванням утворення радикалів 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразину (ДФПГ) (на 46,0% і 64,7% відповідно через 60 хв та 120 хв); гідроксильних (на рівні 50%, що відповідає ефекту маніту і є нижчим за ефект іонолу) та супероксиданіону (в концепції

нтрації 3-6 мкг/мл середовища на рівні референс-препарату) та здатністю гальмувати утворення ТБК-реактивів при індукованому Fe^{2+} ПОЛ у суспензії жовткових ліпопротеїдів на рівні 72,6%-97,4 %, дещо поступаючись іонулу.

Практичне значення отриманих результатів. Обґрунтована перспективність пошуку нових антигіпоксичних та антиоксидантних засобів у ряду похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину, а виявлена залежність «структура-діятоксичність» цінна для подальшого цілеспрямованого синтезу перспективних антигіпоксантів і антиоксидантів. Отримані результати поглибленого вивчення фармакодинаміки й окремих механізмів антиоксидантної дії обґрунтовують перспективність дезапуру як ефективного і безпечного антигіпоксанта з антиоксидантними й антиексудативними властивостями та доцільність його подальшого доклінічного вивчення.

Запроновано використання нової хімічної сполуки 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-пірол[2,3-d] піримідин-2,4,6-тріону (Дезапур) як антиоксиданта при запальних процесах (інформаційний лист МОЗ України про нововведення у сфері охорони здоров'я № 319-2015, 2015) та потенційного антигіпоксичного лікарського засобу (патент України на корисну модель №103357, 2015 р.).

Результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр: фармакології НФаУ (протокол № 1 від 29.08.2016 р.), фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету (протокол № 6 від 27.10.2015 р.), фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол № 4 від 15.12.2015 р.), промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (протокол № 5 від 16.03.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом разом із науковим керівником визначені мета і завдання дослідження. Самостійно проведено патентний пошук, узагальнення даних літератури за темою дисертації, розроблено програму досліджень, прийнято участь у плануванні та виконанні експериментів, здійснено статистичну обробку даних і узагальнення результатів досліджень, написані всі розділи дисертації та сформульовані висновки. Дисертантом самостійно проведено підготовку наукових праць до публікації за основними положеннями дисертації. Співавторами публікацій є науковий керівник В. А. Волковой та науковці, які брали участь у окремих фрагментах дослідження: С. В. Колісник, К. М. Ситнік, Г. П. Фоміна, Л. В. Карабут, Л. В. Лук'янова, М. Є. Березнякова, Н. В. Решетняк, А. О. Сілаєв. Особисту участь наведено у списку опублікованих праць за темою дисертації. Гістологічні дослідження виконані за участі канд. біол. н., ст. н. сп. ЦНДЛ НФаУ Ю. Б. Лар'яновської.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи були викладені й обговорені на: IV міжнародній науково-практичній конференції «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (Белгород, 9-16 квітня 2014 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Нове у медицині сучасного світу» (Львів, 28-29 листопада 2014 р.); the XX international scien. and pract. conf. of young scientists and student «Actual Questions of Development of New Drugs» (Kharkiv, 22-23 April, 2014); I міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні

аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 7-8 листопада 2014 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Забезпечення здоров'я нації та здоров'я особистості як пріоритетна функція держави» (Одеса, 23-24 січня 2015 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць: 5 статей у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України, в т. ч. у 3 виданнях, які прирівнюються до закордонних, 3 статті в зарубіжному виданні, 5 тез доповідей, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я, 1 патент на винахід.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 6 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, що містить 224 найменувань (141– кирилицею і 83 – латиницею) та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 151 сторінку друкованого тексту. Робота ілюстрована 35 таблицями і 10 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. У роботі було досліджено 15 нових сполук похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину (рис.1), синтезованих на кафедрі органічної хімії НФаУ канд. фарм. н., доц. К. М. Ситніком під керівництвом академіка НАН України, професора В. П. Черних.

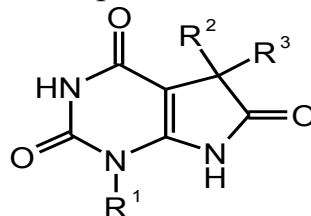


Рис. 1. Базова структура нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]-піримідину

Досліди виконано на 1266 білих статевозрілих мишах масою 20 ± 2 г і 382 білих статевозрілих щурах масою 180-220 г. Тварини були вирощені в розпліднику віварію ЦНДЛ НФаУ, що атестована МОЗ України (посвідчення № 058/15 від 08.12.2015 р., чинне до 07.12.2019 р.), відповідно до санітарно-гігієнічних норм (температура $19-24^{\circ}\text{C}$, вологість повітря 50 %, режим природного освітлення «день-ніч», стандартний харчовий раціон із вільним доступом до води та їжі), що відповідає санітарно-гігієнічним нормам і біоетичним принципам Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.). Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з вимогами, зазначеними в «Загальних етичних принципах експериментів на тваринах», та Законом України № 3477-IV від 21.02.2006 р. зі змінами «Про захист тварин від жорсткого поводження». Дотримання етичних норм підтверджено комісією з біоетики НФаУ (протокол № 10 від 18.10.2017).

У дослідженні були використані препарати порівняння: етилметилгідроксипіридин сукцинат («Мексидол», таб. в/о 125 мг №10 виробництва ТОВ «Науково-виробнича компанія «ФАРМАСОФТ», РФ); диклофенак натрію («Вольтарен», таб. 25 мг №30 виробництва Новартіс Фарма С.п.А.); індометацин («Індометацин», таб. в/о 25 мг № 30 виробництва АТ «Софарма»).

З метою виявлення сполуки-лідера в ході фармакологічного скринінгу було вивчено гостру токсичність (LD_{50}) сполук при в/о введенні мишам (О. В. Стефанов, 2001), розрахунок LD_{50} проводили методом Б. М. Штабського (1980) (Л. Н. Сернов и соавт., 2000; А. Г. Каплаушенко та співавт., 2010). Антигіпоксичну активність сполук у дозі $1/100 LD_{50}$ вивчали на моделі гострої гемічної гіпоксії в білих мишей (Н. Є. Лісинчук, 2007; М. S. Mohamed et al., 2016); антиексудативну активність – на моделі гострого карагенінового запалення лапи в щурів (О. В. Стефанов, 2001); антиоксидантну – на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту в мишей (Н. Є. Лісинчук, 2007) за показником виживаності тварин, коефіцієнтом маси печінки (КМП), умістом ТБК-реактивів (ТБК-Р) та відновленого глутатіону (ВГ), що визначали відповідно за методиками М. А. Прохорової (1986); В. Г. Макарова и соавт. (2013).

Для подальшого поглибленого вивчення було обрано сполуку під шифром KMS-211 – 1-фенетил-5,7-дигідро-1H-піроло-[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон, що була умовно названа «Дезапур». Середньоєфективну дозу сполуки-лідера визначали за умов гострої гемічної гіпоксії на білих нелінійних щурах при в/ш введенні і розраховували методом Б. М. Штабського (1980). LD_{50} дезапуру визначали на двох видах тварин: мишах та щурах при в/о і в/ш шляхах введення, розрахунок проводили за методом Кербера (Л. Н. Сернов и соавт., 2000; О. В. Стефанов, 2001).

Для дослідження хронічної токсичності дезапур дозами ED_{50} (10 мг/кг); 2,5 ED_{50} (25 мг/кг); 10 ED_{50} (100 мг/кг) вводили щурам 1 раз за добу протягом 1 і 3 місяців. Вивчали вплив дезапуру на масу тіла тварин, функціональний стан ЦНС у тесті «відкрите поле» (Л. Н. Сернов и соавт., 2000); серцево-судинної системи (ССС) за показниками ЕКГ, яку проводили на багатоканальному електрокардіографі моделі ЕК1Т-03М2 (В. Г. Макаров и соавт., 2013); на функціональний стан печінки за вмістом загального білка (В. С. Камышников, 2002), фракційного складу білків у сироватці крові, за допомогою набору «Філісіт-Діагностика» (Дніпро, Україна), та білірубіну за пробою Фуше (М. А. Прохорова, 1986), а також холестеролу методом Ілька (Н. Є. Лісинчук, 2007). Вираженість процесу цитолізу оцінювали за активністю АсАТ, АлАТ, що визначали методом А. Karmen (J. Delattre, 2006; Н. Є. Лісинчук, 2007). Антитоксичну функцію печінки оцінювали за допомогою гексеналової проби (О. В. Стефанов, 2001). Функціональний стан нирок під впливом дезапуру оцінювали за об'ємом виділеної сечі, її густиною, за вмістом білка, визначеного методом Бранденбурга-Робертса-Стольнікова (Е. Б. Берхин, 1977), а також за концентрацією сечовини в сироватці крові (В. Г. Макаров и соавт., 2013). На тлі введення дезапуру було проведено макроскопічне дослідження слизової оболонки шлунка (В. Е. Новиков, 2010). Також вивчали вплив сполуки на гематологічні показники: гемоглобін визначали гемоглобінціанідним методом (В. В. Меньшиков, 1987; В. Н. Титов и соавт., 1995); ШОЕ – методом Панченкова (В. В. Меньшиков, 1987; В. Г. Макаров и соавт., 2013); кількість еритроцитів підраховували під мікроскопом у камері Горяєва

та визначали лейкоцитарну формулу за допомогою лічильника (В. Н. Титов и соавт., 1995); уміст азоту в сечовині – діацетил-монооксимним методом; уміст глюкози – глюкозооксидазним методом за окисненням *o*-толуїдину (М. А. Прохорова, 1986). Досліджувані показники реєстрували на початку досліду, через 30 і 90 днів.

Поглиблене вивчення антигіпоксичної активності дезапуру проводили на різних моделях гострого кисневого голодування: гіпобаричній (С. А. Строев и соавт., 2006; F. Di Marco et al., 2008), нормобаричній гіперкапнічній, гемічній (Л. Н. Сернов и соавт., 2000) та гістотоксичній гіпоксії (Д. В. Сосин и соавт., 2014). Антигіпоксичну активність розраховували за показником тривалості життя тварин на тлі введення сполук порівняно з контролем.

Поглиблене вивчення антиоксидантної активності дезапуру проводили на моделі емоційно-больового стресу, спричиненого іммобілізацією з больовим компонентом (O. Desiderato et al., 1974). У сироватці крові та гомогенаті міокарда досліджували вміст ТБК-Р (М. А. Прохорова, 1986); ДК і ТК – за оптичною щільністю гептанового екстракту на двопробеновому СФ «Specord UV VIS»; ШО і активність СОД – ксантин-ксантинооксидазним методом (А. V. Maksimenko, 2005; P. J. Hart, 2006).

Ураховуючи те, що дезапур проявив антигіпоксичну, антиоксидантну й антиексудативну дію, була оцінена його ефективність на моделі гострого набряку легень у щурів (J. Ahrens, 2006; N. R. Díaz et al., 2008; Г. Л. Литвиненко, 2014). Ефективність дезапуру і препарату порівняння індометацину оцінювали за такими показниками: виживання тварин (%), час загибелі (хв), коефіцієнт маси легень (%), антиексудативна активність (%), яку розраховували за зниженням коефіцієнта маси легень. Спостереження за розвитком набряку легень охоплювали візуальну оцінку поведінки тварин (збудження, наявність судом, задишки, корчів) і час загибелі. З метою оцінки стану легеневої тканини визначали наявність патологічних ознак: ексудату, альвеолярного набряку, венозного застою. Проводили гістологічні дослідження структури органа (Г. А. Меркулов, 1968).

Загальну антирадикальну активність дезапуру визначали спектрофотометричним методом за кінетикою його взаємодії зі стабільним радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразином (ДФПГ) (З. Марченко и соавт., 2007; Л. В. Кравченко и соавт., 2008). Здатність «перехоплювати» гідроксильні та супероксидні радикали визначали відповідно дезоксирибозним методом (В. Halliwell, J. M. C. Gutteredge, 1987) та в системі перетворення адреналіну на адренохром (Н. Р. Misra, 1972). Антиоксидантну активність дезапуру оцінювали в модельній системі ліпопротеїдів жовтка курячого яйця (ЛПЖКЯ) (Г. И. Клебанов и соавт., 1988; Л. В. Кравченко, 2008), вимірюючи Fe^{+2} -ініційовану біохемілюмінесценцію на БХЛ-06.

Для отримання статистичних висновків при порівнянні статистичних виборок відносних перемінних, після того, як однофакторний дисперсійний аналіз (або критерій Крускала-Уоліса для даних, які не підлягають нормальному закону розподілення), виявив відмінності між експериментальними групами, використовували критерій Ньюмана-Кейлса для множинних порівнянь або критерій Манна-Уїтні. Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм «Statistica 6.0». При застосуванні методу математичної статистики був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ (А. Г. Кочетов и соавт., 2012). Для аналізу за-

кономірностей зв'язку між окремими показниками використовували коефіцієнт кореляції Пірсона.

Результати та їх обговорення. Результати вивчення гострої токсичності похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину, їхньої антигіпоксичної та антиексудативної активності наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Середньосмертельна доза (LD₅₀), антигіпоксична та антиексудативна активність нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину (X±S_x), n=6

Шифр сполуки	LD ₅₀ , мг/кг	Модель гемічної гіпоксії ^{\$}			Модель карагенінового набряку [@]
		середня тривалість життя, хв	анти-гіпоксична активність, %	активність відносно мексидолу, %	Анти-ексудативна активність, %
Контроль (гемічна гіпоксія)	-	35,00±0,36	-	-	-
Мексидол	-	56,00±0,37*	60	100	-
Вольтарен	-	-	-	-	49,2
KMS-161	1625	53,00±0,31*	51	95	-6,8
KMS-162	1500	66,00±0,29*/**	89	118	-8,9
KMS-163	1333	70,00±0,27*/**	100	125	-7,2
KMS-164	1759	50,00±0,62*	43	89	4,9
KMS-166	1508	47,00±0,37*/**	34	84	1,8
KMS-168	1466	49,00±0,42*	40	88	0,5
KMS-172	1750	71,00±0,63*/**	103	127	0,5
KMS-174	2000	48,00±0,24*	37	86	-1,2
KMS-176	2396	51,00±0,30*	46	91	0,8
KMS-178	1750	64,00±0,61*/**	83	114	14,0
KMS-179	2500	68,00±0,21*/**	94	121	18,6
KMS-191	2750	47,00±0,58*	34	84	47,1
KMS-211	2916	81,00±0,36**	131	145	48,8
KMS-214	2875	68,00±0,18**	94	121	40,8
KMS-217	2750	60,00±0,15*/**	71	107	36,9

Примітки:

1. * – відмінності достовірні відносно контролю (гемічна гіпоксія), p<0,05;
2. ** – відмінності достовірні відносно мексидолу, p<0,05;
3. \$ – на моделі гемічної гіпоксії сполуки досліджені в дозі 1/100 LD₅₀;
4. @ – на моделі карагенінового набряку сполуки вивчені в дозі 8 мг/кг;
5. n – кількість тварин у групі.

LD₅₀ досліджуваних сполук при в/о введенні мишам знаходяться в межах від 1333 до 2916 мг/кг, тобто сполуки належать до V класу токсичності (практично нетоксичні) згідно з класифікацією К. К. Сидорова (1973). Найменш токсичною є сполука KMS-211 (LD₅₀ = 2916 мг/кг).

Аналіз отриманих результатів свідчить про наявність антигіпоксичної активності в усіх досліджуваних сполуках при в/о введенні дозою 1/100 LD₅₀. За вираженістю антигіпоксичної активності всі сполуки можна розташувати в такий ряд: KMS-211 (131%) > KMS-172 (103%) > KMS-163 (100%) > KMS-214 (94%) = KMS-179 (94%) > KMS-162 (89%) > KMS-178 (83%) > KMS-217 (71%) > KMS-161 (51%) > KMS-176 (46%) > KMS-164 (43%) > KMS-168 (40%) > KMS-174 (37%) > KMS-166 (34%) = KMS-191 (34%). Антигіпоксична активність сполук KMS-161, KMS-164, KMS-166, KMS-168, KMS-174, KMS-176, KMS-191 була нижча (p<0,05), а сполук KMS-162, KMS-163, KMS-172, KMS-178, KMS-179, KMS-211, KMS-214, KMS-217 – вища (p<0,05) за активність мексидолу (60%) в дозі 100 мг/кг.

На моделі карагенінового набряку лапи в шурів шість сполук (KMS-178, KMS-179, KMS-217, KMS-214, KMS-191, KMS-211) проявили антиексудативний ефект відповідно на рівні 14%; 18,6%; 36,9%; 40,8%; 47,1; 48,8%, за величиною якого дві сполуки KMS-191 і KMS-211 в дозі 8 мг/кг не поступалися НПЗЗ вольтарену (8 мг/кг).

На моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту (табл. 2) найефективнішими були сполуки під шифрами KMS-162, KMS-176, KMS-191, KMS-211, KMS-214, KMS-217, які проявили виражену антиоксидантну дію і сприяли 100% виживаності тварин. Серед указаних сполук найактивнішою за всіма досліджуваними показниками була сполука KMS-211.

Аналіз залежності «структура–активність–токсичність» показав, що антигіпоксична й антиоксидантна активність досліджених сполук зумовлена базовою структурою - 5,7-дигідро-1H-піроло[2,3-d]піримідином. Відсутність дифенільного радикала в положенні 5,5 піролопіримідинового циклу приводить до підвищення цих видів активності та зниження токсичності. Вираженість антиексудативної активності не залежить від наявності чи відсутності дифенільного радикала в 5 положенні піролопіримідинової системи, а в підгрупі сполук із наявністю цих радикалів має певну закономірність: при подовженні аліфатичного ланцюга в першому положенні дезапуринової системи від трьох до п'яти атомів карбону підвищується.

Наявність антигіпоксичної, антиоксидантної й антиексудативної активності та низька токсичність нових похідних 5,7-дигідро-1H-піроло[2,3-d]піримідину обґрунтовують їхню перспективність для подальшого дослідження.

Для поглибленого вивчення була відібрана сполука KMS-211 (1-фенетил-5,7-дигідро-1H-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон), яка проявила найвиразніші антигіпоксичний, антиоксидантний і антиексудативний ефекти і була найменш токсичною. Ця сполука умовно названа «Дезапур».

Наступним завданням дослідження було встановлення ED₅₀ дезапуру на моделі гемічної гіпоксії при в/ш введенні та визначення гострої і хронічної токсичності. Як уже зазначалося, в скринінгових дослідженнях на моделі гемічної гіпоксії сполука KMS-211 (дезапур) дозою 29 мг/кг (1/100 LD₅₀) при в/о введенні проявила анти-гіпоксичну активність на рівні 131%, при в/ш введенні розрахована

ЕД₅₀ склала 10 мг/кг, а за подальшого підвищення дози антигіпоксичний ефект знижувався.

Таблиця 2

Активність похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину при тетрахлорметановому гепатиті в мишей на 3 день досліду ($X \pm S_x$), n=6

Умови досліду	n ₁ /n ₂	Виживаність, %	КМП, %	ВГ, ум.од.	ТБК-Р, мкмоль/г
Інтактний контроль	6/6	100	4,92±0,66	57,06±3,10	55,21±5,62
Контрольна патологія	6/5	83,33	6,93±0,25*	23,67±1,92*	116,48±4,10*
KMS-161	6/6	100	6,76±0,36*	42,12±4,38 ^{*/#/**}	78,72±6,18 ^{*/#}
KMS-162	6/6	100	6,74±0,37*	53,62±4,58 [#]	76,82±5,68 ^{*/#}
KMS-163	6/6	100	6,91±0,18*	62,34±3,37 ^{#/**}	98,23±7,72 ^{*/**}
KMS-164	6/5	83,33	6,92±0,11*	58,82±3,22 [#]	92,72±2,20 ^{*/#/**}
KMS-166	6/4	66,66	6,91±0,17*	64,72±2,37 ^{*/#/**}	88,62±6,02 ^{*/#}
KMS-168	6/5	83,33	6,88±0,40 ^{**}	26,63±1,89 ^{*/**}	90,85±5,94 ^{*/#/**}
KMS-172	6/4	66,66	6,91±0,20*	30,58±2,19 ^{*/#/**}	98,60±3,21 ^{*/#/**}
KMS-174	6/6	100	6,89±0,30*	28,85±2,56 ^{*/**}	79,62±6,94 ^{*/#}
KMS-176	6/6	100	6,72±0,43*	54,83±4,80 [#]	66,43±4,00 [#]
KMS-178	6/5	83,33	6,87±0,31*	33,22±3,20 ^{*/#/**}	86,52±7,85 ^{*/#}
KMS-179	6/5	83,33	6,92±0,42*	40,35±2,94 ^{*/#/**}	80,42±5,47 ^{*/#}
KMS-191	6/6	100	6,54±0,39*	53,42±4,82 [#]	66,82±4,06 [#]
KMS-211	6/6	100	6,57±0,42*	55,16±2,14 [#]	65,30±5,31 [#]
KMS-214	6/6	100	6,56±0,40*	51,23±3,80 [#]	67,62±4,69 [#]
KMS-217	6/6	100	6,62±0,42*	52,82±4,83 [#]	68,72±5,04 [#]
Мексидол	6/6	100	6,63±0,48*	53,86±1,62 [#]	72,64±6,7 ^{*/#}

Примітки:

1. * – відмінності достовірні відносно інтактного контролю, p<0,05;
2. # – відмінності достовірні відносно контрольної патології, p<0,05;
3. ** – відмінності достовірні порівняно з мексидолом, p<0,05;
4. n₁/n₂ – кількість тварин на початок / кінець дослідження.

Установлено, що LD₅₀ дезапуру при в/ш введенні мишам і щурам є вищою за 5000 мг/кг, при в/о введенні щурам становить 4250 мг/кг, мишам – 2916 мг/кг. Згідно з класифікацією К. К. Сидорова (1973) дезапур належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини.

Дослідження хронічної токсичності дезапуру показали відсутність його токсичного впливу в середньоєфективній дозі 10 мг/кг та в дозах 25 мг/кг і 100 мг/кг при в/ш введенні щурам протягом одного і трьох місяців на загальнотрофічні процеси, функціональний стан ЦНС, серцево-судинної системи, печінки, нирок, клітинний склад крові,

стан слизової оболонки шлунка. Установлена здатність дезапуру в дозах, що перевищують ED_{50} у 2,5 рази і в 10 разів, посилювати детоксикуючу функцію печінки щурів, що проявилось у скороченні гексеналового сну відповідно в 1,5 рази через один і три місяці введення. Ймовірно, таку дію можна пояснити енергезуючими властивостями дезапуру, що мають місце з огляду на наявність антигіпоксичної активності в сполуки, а також можливим стимулювальним впливом на мікосомальні ферменти печінки, що задіяні в метаболізмі гексеналу (В. С. Камышников, 2002). Установлений факт необхідно враховувати при застосуванні дезапуру в комплексній фармакокорекції, оскільки посилення активності мікосомальних ферментів може призводити до прискорення метаболізму супутніх лікарських засобів (С. М. Дроговоз и соавт., 2013).

На наступному етапі було проведено поглиблене вивчення фармакодинаміки дезапуру – оцінка його антигіпоксичної активності на експериментальних моделях гострої гіпоксії різного генезу: гістотоксичній, нормобаричній гіперкапнічній, гіпобаричній.

На етапі скринінгових досліджень була встановлена антигіпоксична активність дезапуру в мишей на моделі гемічної гіпоксії, що розвивається внаслідок зниження кисневої ємності крові та пригнічення тканиного дихання через нездатність метгемоглобіну транспортувати кисень (А. О. Нікитенко, 2009). Однією з головних патогенетичних ланок гострої нормобаричної та гострої гіпобаричної гіпоксії є гіпоксемія та гіпер- чи гіпокапнія (С. А. Строев и соавт., 2006; Н. N. Siti et al., 2015). В основі гістотоксичної гіпоксії лежить інактивація дихальних ферментів, зокрема при дії ціанідів на цитохромоксидазу (Д. В. Сосин, 2014).

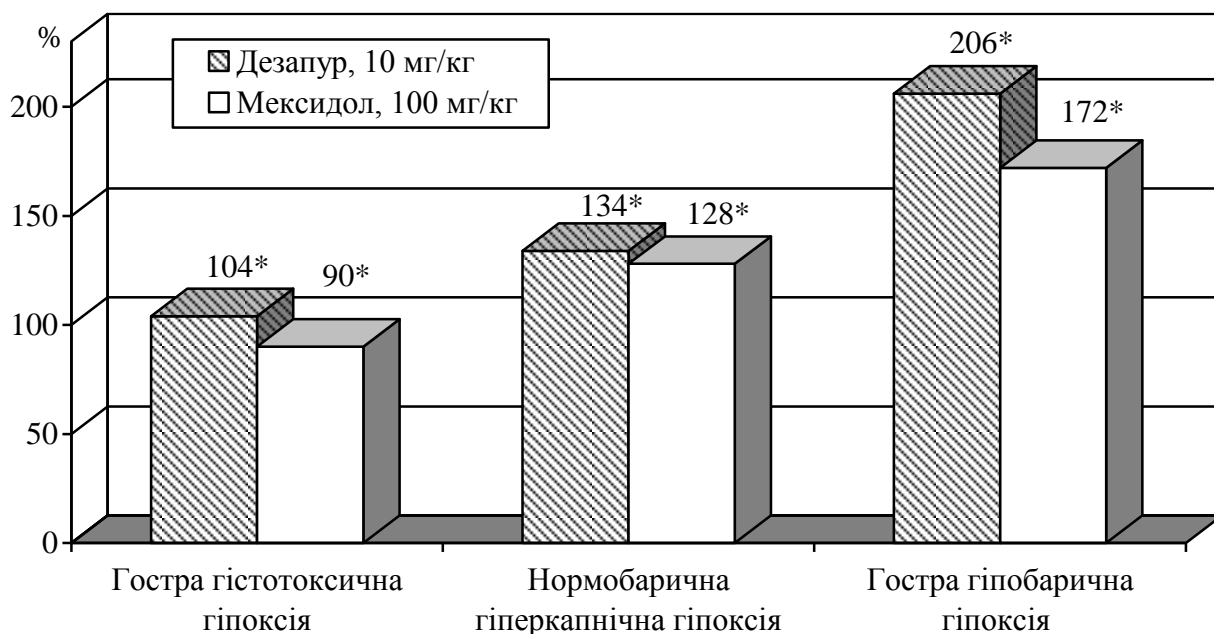


Рис. 2 Антигіпоксична активність сполуки «Дезапур» на моделях гіпоксій різного генезу

Примітка: * – відмінності достовірні відносно контролю, $p < 0,05$.

Установлено, що дезапур проявив високу антигіпоксичну активність (рис. 2) на рівні 104% на моделі гострої гістотоксичної гіпоксії, за вираженістю якої не пос-

тупався препарату порівняння мексидолу (90%). На моделях нормобаричної гіперкапнічної та гострої гіпобаричної гіпоксії дезапур і мексидол проявили виражену антигіпоксичну активність відповідно на рівні 134%, 206% та 128%, 172%. Антигіпоксичний ефект дезапуру на цих моделях вірогідно не відрізнявся від такого мексидолу. Численні дані свідчать про те, що при гіпоксичних станах активуються процеси ВРО – багатоетапний біохімічний процес перетворення кисню, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот та інших сполук. Продукти ВРО цитотоксичні, пригнічують процеси енергоутворення в клітині, порушують синтез нуклеїнових кислот і білків, що відбивається змінами в структурі різних органів та систем. Значного ушкодження ВР зазнають усі органи, зокрема кардіоміоцити при ішемічних станах, що виникають на тлі стресогенної активації симпатико-адреналової системи (G. Solaini et al., 2010; Ю. М. Колесник и соавт., 2012). Захист тканин і органів людини від агресивної дії ВР забезпечується антиоксидантною системою, але далеко не в усіх випадках ендогенні антиоксиданти можуть захистити організм людини від розвитку оксидативного стресу (В. А. Барабой и соавт., 2004; Н. К. Зенков и соавт., 2004; Е. Б. Меньщикова и соавт., 2006). У цих випадках доцільно застосовувати лікарські засоби з антиоксидантною дією.

Зважаючи на вищенаведене, було проведено поглиблене дослідження антиоксидантних властивостей дезапуру при порушеннях факторів про-/антиоксидантного балансу, спричиненого емоційно-больовим стресом у щурів.

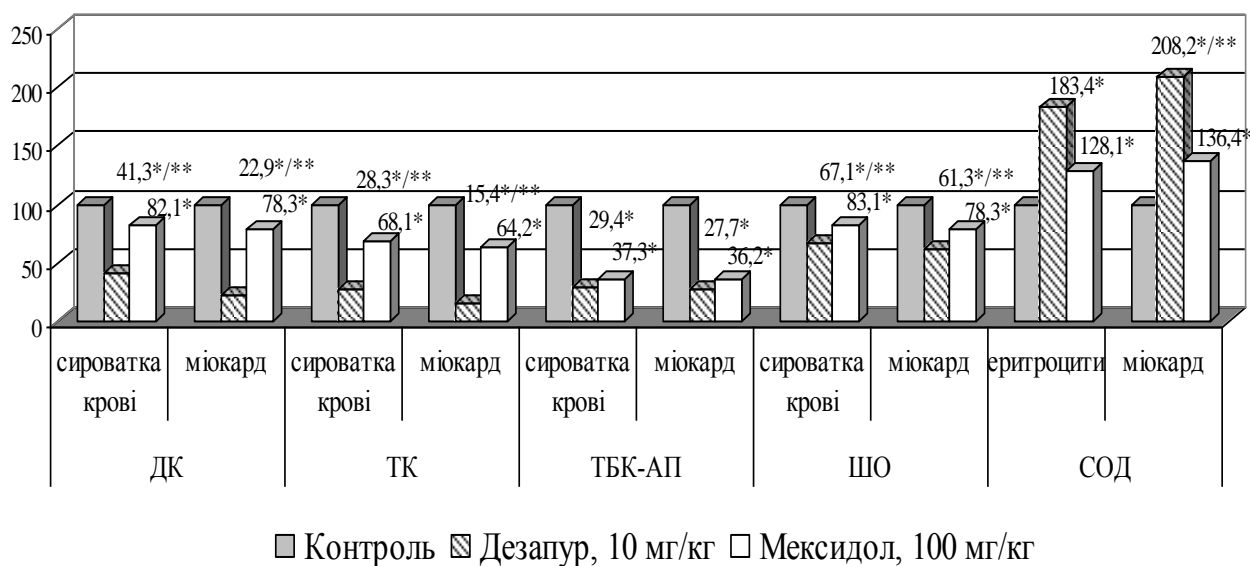


Рис. 3 Вплив дезапуру на вміст продуктів ПОЛ на моделі емоційно больового стресу (%)

Примітки:

- * – відмінності достовірні відносно контролю, $p < 0,05$;
- ** – відмінності достовірні відносно препарату порівняння, $p < 0,05$.

Було встановлено виражений гальмівний ефект дезапуру на утворення продуктів ПОЛ (рис. 3), про що свідчить достовірне зниження відповідно в міокарді та в сироватці крові вмісту ТБК-Р на 72,3% і 70,6%; ДК – на 77,1% і 58,7%; ТК – на 84,6% і 71,7%; ШО – на 38,7% і 32,9%; стимулювальний вплив на актив-

ність антиоксидантного ферменту СОД: спостерігалось її підвищення в міокарді на 108,2%; у еритроцитах – на 83,4%. За гальмівним впливом на утворення продуктів ПОЛ: ДК, ТК і ШО в міокарді та в сироватці крові та за здатністю підвищувати активність антиоксидантного ферменту СОД у міокарді й еритроцитах дезапур перевершував референс-препарат мексидол.

Установлено прямий кореляційний зв'язок між умістом продуктів ВРО в міокарді та ступенем ушкодження кардіоміоцитів, а також зворотний зв'язок з активністю СОД. Рівні ДК з $r = 0,94$ ($p < 0,001$) і ШО з $r = 0,86$; ($p < 0,05$) лінійно зворотно залежать від активності СОД. Ця залежність однаково реалізується і в міокарді, і в сироватці крові. При цьому дезапур перевершує ефекти референс-препарату, ймовірно, за рахунок своєї комплексної дії. Установлений профіль фармакологічних властивостей дезапуру зумовив доцільність оцінки його ефективності на моделі набряку легень, унаслідок якого розвивається гостра дихальна недостатність, яка стає наслідком гіпоксії та порушення метаболізму.

Ці порушення ведуть до підвищення в плазмі крові вмісту ВР, що каталізують і прискорюють ПОЛ (К. А. Шербанов и соавт., 2016). Тому в клінічній практиці в терапію гострої дихальної недостатності включають комплекс антиоксидантних і антигіпоксичних препаратів, які поліпшують окисно-відновні процеси на клітинному рівні та відновлюють захисно-приспосувальні механізми хворого (Г. Л. Литвиненко та співавт., 2015).

Установлено, що на моделі набряку легень у щурів дезапур дозою 10 мг/кг сприяв виживанню тварин та майже вдвічі подовжував час до загибелі порівняно з тваринами з групи контрольної патології, приводив до зниження КМЛ у 1,8 рази ($p < 0,05$) і виявив антиексудативну активність на рівні 78 %, що була невірогідно вища за таку індометацину (57 %). Отримані результати обґрунтовують перспективність використання дезапуру в комплексній терапії гострої дихальної недостатності, спричиненої набряком легень.

На завершальному етапі було проведено дослідження окремих механізмів антиоксидантної дії дезапуру в модельних системах ПОЛ *in vitro* (рис. 4; 5).

У тесті взаємодії з радикальною формою ДФПГ (рис. 4а) дезапур проявив виражену антирадикальну активність: знижував концентрацію ДФПГ через 10; 60; 120 хв відповідно на 25,7%; 46,0% і 64,7%, значною мірою перевершував аналогічну активність мексидолу. У модельній системі з дезоксирибозою (рис. 4б) дезапур гальмував утворення гідроксильних радикалів на рівні 50% і більше, починаючи з концентрації 0,30 мкг/мл. Активність сполуки наближалася до такої маніту і поступалася іонолу.

У модельній системі «адреналін-адренохром» (рис. 5а) дезапур проявив здатність «перехоплювати» супероксидні аніонрадикали на рівні референс-препарату в концентрації 3-6 мкг/мл середовища та поступався йому в концентрації 12-100 мкг/мл. На моделі переокиснення ліпопротеїдів яєчного жовтка, що індуковане Fe^{2+} , дезапур у діапазоні концентрацій 0,2-100,0 мкг/мл проявив антиокисні властивості, інгібуючи утворення ТБК-Р на 72,6%-97,4 %, але дещо поступався іонолу (рис. 5 б).

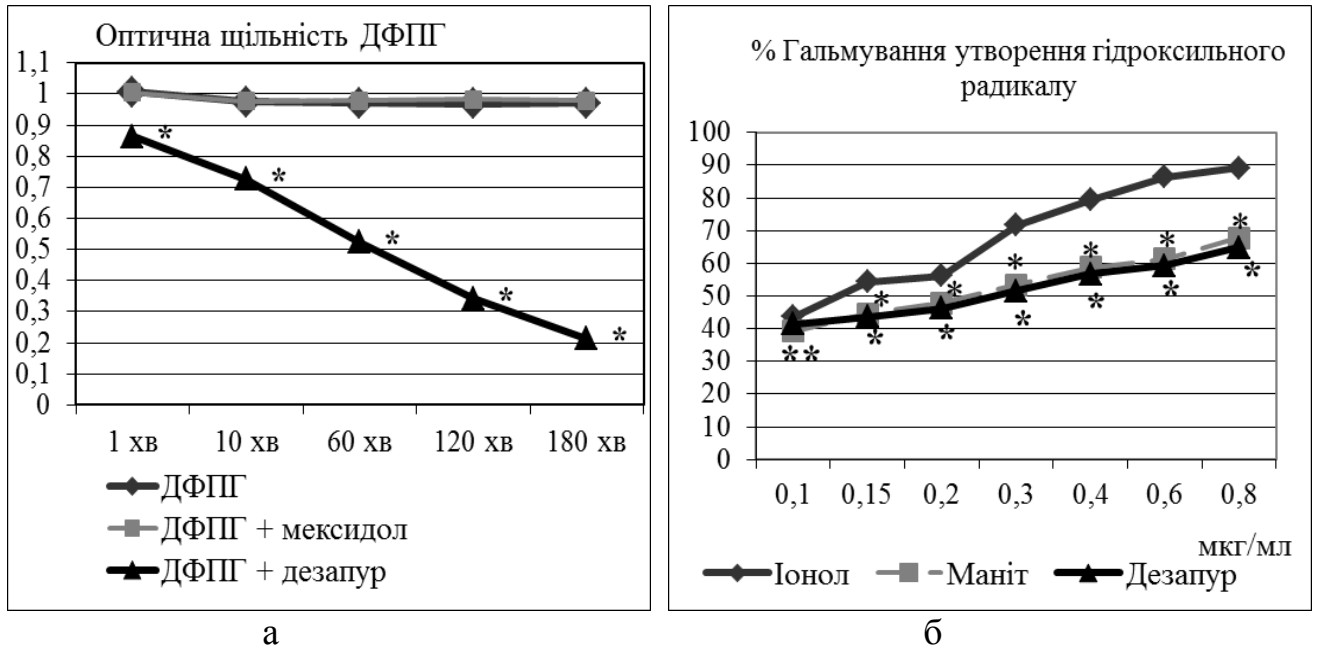


Рис. 4 Гальмівний вплив дезапуру на утворення радикалів ДФПГ (а) і гідроксильного (б)

Примітка: * – відмінності вірогідні щодо відповідного препарату порівняння, $p < 0,05$;

** – відмінності вірогідні щодо відповідного препарату порівняння маніту, $p < 0,05$.

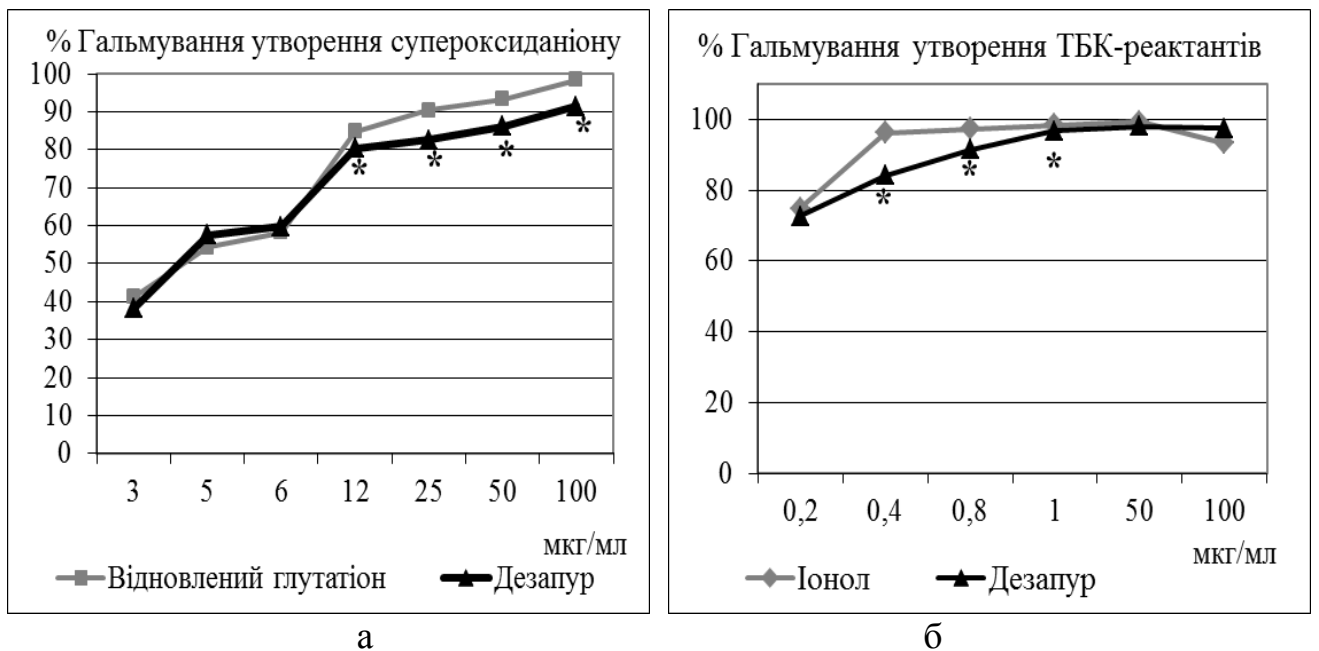


Рис. 5 Гальмівний вплив дезапуру на утворення супероксидного радикала (а) й антиокисна активність у модельній системі ЛПЖКЯ (б)

Примітка: * – відмінності вірогідні щодо відповідного препарату порівняння, $p < 0,05$

Отже, встановлені антирадикальні властивості дезапуру, його здатність перехоплювати кисневі радикали та наявність антиоксидантних властивостей є важли-

вими механізмами його фармакологічної активності – антигіпоксичної, антиексудативної, протективної дії за умов модельної патології (набряк легенів), у якій поєднуються кілька патогенетичних ланок – ексудація, гіпоксія, посилення ПОЛ.

Висока антиексудативна активність дезапуру, практично на рівні НПЗЗ вольтарену, на моделі карагенінового набряку і відсутність ушкоджувального впливу на стан слизової оболонки шлунка, що було доведено в хронічному експерименті, дає можливість стверджувати про переважно антиоксидантний механізм його дії. Відомо, що протизапальну й анальгетичну активність мексидолу також пов'язують із його антиоксидантними властивостями (Г. М. Молодавкин и соавт., 2007; Н. И. Микуляк и соавт., 2011).

Отже, отримані результати обґрунтовують перспективність подальшого пошуку нових антигіпоксичних засобів у ряду похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло-[2,3-d]піримідину, а виявлена залежність «структура-дія-токсичність» цінна для подальшого цілеспрямованого синтезу ефективних і безпечних антигіпоксантів.

Серед 15 нових похідних 5,7-ди-гідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину відібрана сполука-лідер (дезапур) – 1-фенетил-5,7-дигід-ро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон), яка проявила виражені антигіпоксичні, антиоксидантні й антиексудативні властивості. За рівнем антигіпоксичної й антиоксидантної дії вона не поступається, а в деяких випадках перевершує мексидол.

Отримані результати обґрунтовують перспективність застосування дезапуру як антигіпоксанта з антиоксидантними й антиексудативними властивостями, безпечного за тривалого вживання, та дозволяють рекомендувати його для подальшого вивчення з метою впровадження в практичну медицину.

ВИСНОВКИ

Висока частота і поширеність гіпоксичних станів та асоційованої з ними активації процесів вільнорадикального окиснення, що є важливою патогенетичною ланкою тяжких інвалідизуючих патологій – ішемічних станів різних органів, інсультів, інфарктів, актуалізує важливість їх ефективної фармакокорекції.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання фармакології, спрямованого на підвищення ефективності фармакотерапії гіпоксичних станів шляхом використання сполуки 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон) (дезапур) як антигіпоксанта з антиоксидантними й антиексудативними властивостями і сприятливим профілем безпеки.

1. Установлено, що LD_{50} 15 нових похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину при внутрішньоочеревинному введенні мишам знаходиться в межах від 1333 до 2916 мг/кг, тобто сполуки належать до V класу токсичності (практично нетоксичні) згідно з класифікацією К. К. Сидорова (1973). Установлена антигіпоксична активність у всіх 15 досліджуваних сполук на рівні 31% – 131%. Антигіпоксична активність сполук KMS-162, KMS-163, KMS-172, KMS-178, KMS-179, KMS-211, KMS-214, KMS-217 склала відповідно 89%; 100%; 103%; 83%; 94%; 131%; 94; 71% та була вірогідно вищою за таку мексидолу в дозі 100 мг/кг. Виражену антиоксидантну активність виявили шість сполук – KMS-162, KMS-176, KMS-191, KMS-211, KMS-

214, KMS-217, про що свідчать зниження вмісту ТБК-реактивів відповідно на 34%; 43%; 42%; 44%; 42%; 41% та підвищення рівня відновленого глутатіону відповідно на 126%; 131%; 125%; 133%; 116%; 123%. Шість сполук (KMS-178, KMS -179, KMS -217, KMS -214, KMS -191, KMS -211) проявили антиексудативну активність відповідно на рівні 14%; 18,6% 36,9%; 40,8%; 47,1%; 48,8%. За величиною антиексудативної активності сполуки KMS -191, KMS -211 в дозі 8 мг/кг не поступалися препаратом порівняння вольтарену в дозі 8 мг/кг.

2. Аналіз залежності «структура–активність–токсичність» показав, що антигіпоксична й антиоксидантна активність досліджених сполук зумовлена базовою структурою – 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідином. Відсутність дифенільного радикала в положенні 5,5 піролопіримідинового циклу приводить до підвищення цих видів активності та зниження токсичності. Вираженість антиексудативної активності не залежить від наявності чи відсутності дифенільного радикала в 5 положенні піролопіримідинової системи, а в підгрупі сполук із наявністю цих радикалів має певну закономірність: при подовженні аліфатичного ланцюга в першому положенні дезапуринової системи від трьох до п'яти атомів карбону підвищується.

3. За результатами скринінгових досліджень відібрана сполука під шифром KMS-211 – 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріон (умовна назва «Дезапур»), яка проявила найбільш виражену антигіпоксичну (131%), антиоксидантну, антиексудативну (48,8%) активність. На моделі гемічної гіпоксії встановлена середньо-ефективна доза дезапуру при внутрішньошлунковому введенні – 10 мг/кг.

4. За класифікацією К. К. Сидорова (1973) дезапур належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини. У хронічному експерименті встановлена відсутність токсичного впливу дезапуру при введенні середньо-ефективною дозою 10 мг/кг та дозами 25 мг/кг і 100 мг/кг протягом одного і трьох місяців на загальнотрофічні процеси, функціональний стан ЦНС, серцево-судинної системи, печінки, нирок, клітинний склад крові, стан слизової оболонки шлунка.

5. На моделі гострої гістотоксичної, нормобаричної гіперкапічної та гострої гіпобаричної гіпоксії дезапур дозою 10 мг/кг проявив виражену антигіпоксичну активність на рівні 104%; 134% та 206% відповідно, за вираженістю якої не поступався препаратом порівняння мексидолу.

6. Доведено протективний вплив дезапуру на кардіоміоцити в умовах оксидативного стресу, про що свідчить достовірне зниження ($p < 0,05$) в міокарді рівня ТБК-реактивів, ДК, ТК і ШО відповідно на 72,3%; 77,1%; 84,6%; 38,7 % і підвищення антиоксидантного ферменту СОД на 108,2%.

7. Установлена висока ефективність дезапуру на моделі набряку легень у щурів: зниження летальності тварин у 2,5 раза та у 2,4 раза подовження часу до загибелі тварин ($p < 0,05$), зниження коефіцієнта маси легень у 1,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою контрольної патології та високу антиексудативну активність сполуки на рівні 78 % порівняно ($p > 0,05$) з референс-препаратом індометацином (57 %). Морфологічно встановлено, що дезапур сприяв збереженню альвеолярного рисунку і на відміну від тварин, лікованих індометацином, мікроциркуляторні розлади, зміни стану перивазальних просторів на тлі його дії були практично відсутні.

8. Встановлено, що механізм антиоксидантної активності сполуки-лідера зу-

мовлений гальмуванням утворення радикалів 2,2-дифеніл-1-пікрілгідрозину (ДФПГ) (на 46,0% та 64,7% відповідно через 60 хв. та 120 хв.); гідроксильних (на рівні 50%, що відповідає ефекту маніту і є нижчим за ефект іонолу) та супероксиданіону (в концентрації 3-6 мкг/мл середовища на рівні референс-препарату) та здатністю гальмувати утворення ТБК-реактивних при індукованому Fe^{2+} ПОЛ у суспензії жовткових ліпопротеїдів на рівні 72,6-97,4 %, децю поступаючись іонолу.

9. Отримані результати обґрунтовують доцільність подальшого пошуку нових антигіпоксичних засобів у ряду похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину та перспективність подальшого вивчення сполуки-лідера 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріону (дезапуру) як антигіпоксанта з антиоксидантними й антиексудативними властивостями, нетоксичного і безпечного за хронічного використання з метою впровадження в практичну медицину.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Визначення антиексудативної активності нових сполук у ряду похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину / О. В. Севрюков, В. А. Волковой, С. В. Колісник, К. М. Ситнік. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2015. № 6 (46). С. 84–88. (Особистий внесок – участь у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні, та підготовці статті).
2. The study of a possible general toxic action of 5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives / O. V. Sevryukov, V. A. Volkovoy, S. V. Kolisnyk, K. M. Sytnik. *Вісник фармації*. 2015. № 2 (82). С. 70–72. (Особистий внесок – участь у проведенні досліджень та підготовці статті).
3. The study of the antihypoxic action of 1-phenethyl-5,7-dihydro-1H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-2,4,6-trione (dezapur) on different models of hypoxia / O. V. Sevryukov, V. A. Volkovoy, S. V. Kolisnyk, K. M. Sytnik. *Вісник фармації*. 2015. № 3 (83). С. 76–78. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці їх результатів та підготовці статті).
4. The study of the anti-exudative activity of dezapur on the model of acute pulmonary edema in rats / O. V. Sevryukov, V. A. Volkovoy, S. V. Kolisnyk, K. M. Sytnik. *Вісник фармації*. 2015. № 4 (84). С. 70–73. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі, обробці їх результатів та підготовці статті).
5. Вивчення первинної оцінки антиоксидантної активності похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту / В. А. Волковой, О. В. Севрюков, Г. П. Фоміна, Л. В. Карабут, Л. В. Лук'янова. *Journal of Education, Health and Sport*. Radom, Poland. 2015. Vol. 5, № 7. P. 429–438. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці їх результатів та підготовці статті).
6. Investigation antiradical and antioxydative action dezapur in experiments in vitro / V. A. Volkovoy, O. V. Sevrukov, M. E. Bereznykova, N. V. Reshetniyk, G. P. Fomina, L. V. Karabut. *Journal of Education, Health and Sport*. Radom, Poland. 2016. Vol. 6, № 6. P. 291–299. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці їх результатів, підготовці статті).
7. Дослідження антиоксидантної дії дезапуру на моделі емоційно-больового стресу у

- щурів / О. В. Севрюков, В. А. Волковой, М. Є. Березнякова, Л. В. Карабут, Г. П. Фоміна, Л. В. Лук'янова. *Journal of Education, Health and Sport*. Radom, Poland. 2016. Vol. 6, № 8. P. 417–426. (Особистий внесок – участь у проведенні досліджень, аналізі та обробці їх результатів, підготовці статті).
8. The experimental study of the antihypoxic and antioxidant activity of 5,7-dihydro-1H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidine derivatives / V. A. Volkovoy, O. V. Sevrukov, S. V. Kolisnyk, N. V. Derkach, S. I. Kryzhna, M. O. Ostapets. *Вісник фармації*. 2017. № 3 (91). С. 61–64. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці їх результатів, підготовці статті).
 9. Волковой В. А., Севрюков О. В., Ситнік К. М., Колісник С. В. 1-фенетил-5,7-дигідро-1H-піроло-[2,3-d]піримідин-2,4,6-трион, який проявляє антиоксидантну та антигіпоксичну активність: пат. 103357 України: МПК C07D 487/04, A61K 31/519, A61P39/06. № u201506452; заявл. 30.06.2015; опубл. 10.12.2015, Бюл. № 23. – 3 с. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень).
 10. Pharmacology action of new connection derivatives 5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-D] pyrimidine / A. V. Sevryukov, V. A. Volkovoy, S. V. Kolesnik, K. M. Sutnik. *Actual questions of development of new drugs: abstracts of XX international scien. and pract. conf. of young scientists and student*. Kharkiv, Apr. 22-23. 2014. Kh.: NUPh, 2014. P. 186.
 11. Изучение противовоспалительной активности новых соединений в ряду производных 5,7-дигидро-1H-пиррол[2,3-d]пиримидина / В. А. Волковой, А. В. Севрюков, С. В. Колесник, К. М. Сытник, Г. П. Фомина. *Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: материалы 4-й междунар. научно-практ. конф. г. Белгород, 9-16 апреля 2014 г. Белгород, 2014. С. 128–130.*
 12. Влияние производных 5,7-дигидро-1H-пиррол[2,3-d]пиримидина на процессы перекисного окисления липидов / А. В. Севрюков, В. А. Волковой. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали I міжнар. наук-практ. інтернет-конференції, м. Харків, 7-8 листопада 2014 р. Х., 2014. С. 224–225.*
 13. Первинна оцінка антигіпоксичної активності похідних 5,7-дигідро-1H-пірол[2,3-d]піримідину / О. В. Севрюков, В. А. Волковой. *Нове у медицині сучасного світу: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Львів, 28-29 листопада 2014 р. Львів, 2014. С. 41–42.*
 14. Ефективність дезапуру на моделі гострої гіпоксичної гіпоксії / О. В. Севрюков. *Забезпечення здоров'я нації та здоров'я особистості як пріоритетна функція держави: міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 23-24 січня 2015 р. Одеса, 2015. С. 9–10.*
 15. Севрюков О. В., Волковой В. А., Сілаєв А. О. Використання нової хімічної сполуки 1-фенетил-5,7-дигідро-1H-піроло-[2,3-d] піримідин-2,4,6-трион (Дезапур) як антиоксиданта при запальних процесах: *інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 319-2015. К., 2015 р. 3 с.* (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів, підготовці інформаційного листа).

АНОТАЦІЯ

Севрюков О. В. Пошук нових антигіпоксантив серед похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину та вивчення їх фармакодинаміки. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – «Фармакологія». – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2017.

У роботі вперше досліджено 15 нових сполук – похідних 5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідину, які були синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного фармацевтичного університету канд. фарм. н., доцентом К. М. Ситник під керівництвом проф. В. П. Черних.

Установлено, що всі сполуки належать до V класу токсичності (практично нетоксичні) згідно з класифікацією К. К. Сидорова (1973), антигіпоксичну активність у 15 сполук, антиоксидантну й антиексудативну – в 6 сполук. Виявлена залежність «структура–активність–токсичність» у ряду досліджуваних похідних: їхня антигіпоксична й антиоксидантна активність зумовлена базовою структурою. Відсутність дифенільного радикала в положенні 5,5 піролопіримідинового циклу приводить до підвищення цих видів активності та зниження токсичності. Вираженість антиексудативної активності при подовженні аліфатичного ланцюга в першому положенні дезапуринової системи від трьох до п'яти атомів карбону підвищується.

На моделі гемічної гіпоксії встановлена ED₅₀ сполуки-лідера 1-фенетил-5,7-дигідро-1Н-піроло[2,3-d]піримідин-2,4,6-тріону (KMS-211, дезапуру) при в/ш введенні – 10 мг/кг та відсутність її токсичного впливу в хронічному досліді. Підтверджено її антигіпоксичну активність на моделях гострої гістотоксичної, нормобаричної гіперкапнічної та гіпобаричної гіпоксії, за вираженістю якої вона не поступалася мексидолу. Доведено гальмівний ефект дезапуру на утворення продуктів ПОЛ у міокарді та ефективність на моделі набряку легень. In vitro встановлена здатність дезапуру перехоплювати кисневі радикали. Отримані результати обґрунтовують перспективність практичного застосування дезапуру як ефективного і безпечного антигіпоксанта з антиоксидантними й антиексудативними властивостями.

Ключові слова: похідні піролопіримідину; гостра і хронічна токсичність, антигіпоксична активність, антиоксидантна активність, антирадикальна активність, антиексудативна активність, дезапуру.

АННОТАЦИЯ

Севрюков А. В. Поиск новых антигипоксантов среди производных 5,7-дигидро-1Н-пироло[2,3-d]пиримидина и изучение их фармакодинамики. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – «Фармакология». – Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков, 2017.

В работе впервые были исследованы 15 новых соединений – производных 5,7-дигидро-1Н-пироло[2,3-d]пиримидина, которые были синтезированы на кафедре

органической химии Национального фармацевтического университета канд. фарм. н., доцентом К. М. Ситник под руководством проф. В. П. Черных.

Установлено, что все соединения принадлежат к V классу токсичности (практически нетоксичные) согласно классификации К. К. Сидорова (1973). Установлена антигипоксическая активность у 15 соединений, антиоксидантная и антиэкссудативная – у 6 соединений.

Выявлена зависимость «структура-активность-токсичность» в ряду исследуемых производных: их антигипоксическая и антиоксидантная активность обусловлена базовой структурой. Отсутствие дифенильного радикала в положении 5,5 пирролопиримидинового цикла приводит к повышению этих видов активности и снижению токсичности. Выраженность антиэкссудативной активности при удлинении алифатической цепи в первом положении структуры от трех до пяти атомов углерода увеличивается.

На модели гемической гипоксии у крыс установлена ED₅₀ отобранного соединения 1-фенетил-5,7-дигидро-1H-пирроло[2,3-d]пиримидин-2,4,6-трион (KMS-211; дезапур) – 10 мг/кг и отсутствие его токсического воздействия в хроническом опыте.

Установлена антигипоксическая активность дезапура в дозе 10 мг/кг при внутривенном введении крысам на моделях острой гистотоксической, нормобарической гиперкапнической и гипобарической гипоксии, по выраженности которой он не уступал мексидолу. Доказан угнетающий эффект дезапура на образование продуктов ПОЛ в миокарде и эффективность на модели отека легких.

Полученные результаты обосновывают перспективность практического использования дезапура как эффективного и безопасного антигипоксанта с антиоксидантными и антиэкссудативными свойствами.

Ключевые слова: производные пирролопиримидина; острая и хроническая токсичность, антигипоксическая активность, антиоксидантная активность, антирадикальная активность, антиэкссудативная активность, дезапур.

SUMMARY

Sevryukov O. V. Search of new antihypoxants among derivatives of 5,7-dihydro-1H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidine and study of their pharmacodynamics. – As a manuscript.

The thesis for candidate of pharmaceutical sciences degree in specialty 14.03.05 – Pharmacology. – The National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2017.

The thesis of Sevryukov O. V. has given the theoretical generalization and the new solution of the actual scientific problem of pharmacology, aimed at increasing the effectiveness of pharmacocorrection of hypoxic states by using the compound of 1-phenethyl-5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trion (dezapur) as an antihypoxant with antioxidant and antiexudative properties and a favourable safety profile.

For the first time, the paper studies 15 new compounds - derivatives of 5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine, synthesized at the Department of Organic Chemistry of the National pharmaceutical university by Associate Professor K. M. Sytnyk.

In the model of hemic hypoxia, in all 15 compounds tested, antihypoxic activity has been established. The antihypoxic activity of eight compounds KMS-162; -163; -172; -178; -179; -211; -214; -217 in a dose of 1/10 LD₅₀ amounted to 89; 100; 103; 83; 94; 131; 94; 71% correspondingly, and was significantly higher than that of a mexidol (100 mg/kg). Six compounds of KMS-162; -176; -191; -211; -214; -217 have been detected in the model of acute tetrachlormethane hepatitis, as evidenced by a decrease of the TBA-active products and increased level of reduced glutathione. In the carrageenan edema model, six compounds of KMS-178; -179; -217; -214; -191; -211 have shown antiexudative activity. The antiexudative activity of compounds KMS-191 and KMS-211 in a dose 10 mg/kg was no worse than the one of comparative drug voltaren in the dose 8 mg/kg.

The analysis of the "structure-activity" dependence has shown that the antihypoxic and antioxidant activity of the investigated compounds is due to the basic structure of 5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine. The absence of the biphenyl radical in the 5.5 position of the pyrrolo-pyrimidine cycle causes increase in these types of activity. The anti-exudative activity does not depend on the presence of the two phenolic radicals in the 5 position of the pyrrolo-pyrimidine system, and in the subgroup of compounds at these radicals has a certain pattern: it increases at extension of the aliphatic chain in the first position of the dezapurine system from three to five carbon atoms.

For further study based on the results of screening studies, compound KMS-211-1-phenethyl-5,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trion (the conventional name "Desapur") has been chosen. In the model of hemic hypoxia, a median effective dose of dezapur has been determined at an intragastric administration of 10 mg/kg. It has been established that LD₅₀ of dezapur at intragastric administration to mice and rats is over 5000 mg/kg. The LD₅₀ for intragastric administration to rats is 4250 mg/kg, to mice - 2916 mg/kg. According to the classification of K. K. Sidorov, dezapur can be attributed to the V class toxicity - almost non-toxic substances. The chronic experiment has shown no toxic effect of dezapur on trophic processes, functional state of the CNS, cardiovascular system, liver, kidney, the cellular composition of blood, the state of the mucous membrane of the stomach when administered at ED₅₀ 10 mg/kg and at doses of 25 mg/kg and 100 mg/kg during one and three months, as well as the ability of dezapur, in doses exceeding the conditional therapeutic in 2.5 and 10 times, to intensify the detoxifying liver function, what is shown in reduction of hexenal sleep in 1.5 times respectively in one and in three months of administration.

The deep study of antihypoxic activity of dezapur on models of hypoxia of different genesis has shown that dezapur in ED₅₀ 10 mg/kg at intragastric administration has shown a pronounced antihypoxic activity at the level of 104; 134 and 206% respectively, in the model of acute histotoxic, normobaric hypercapnic and acute hypobaric hypoxia, which has shown itself not less pronounced than the comparative drug mexidol. In the model of emotional and painful stress accompanied by increased Lipid peroxidation and decreased antioxidant defense activity, the expressed inhibitory effect of dezapur on lipid peroxidation products has been established, as evidenced by a significant decrease in the myocardium and in serum of TBA-reactants; diene conjugates (DC); triene conjugates and Schiff's bases (SB); and stimulating effect on the activity of antioxidant enzyme SOD in myocardium and in erythrocytes.

In vitro, antiradical properties of dezapur and its ability to intercept oxygen radicals have been established; the presence of antioxidant properties is one of the mechanisms of its pharmacological activity: antihypoxic, antiexudative, and efficacy in the pulmonary edema model, which combines several pathogenetic units: exudation, hypoxia, and enhancement of LPO. Significant antiexudative activity of dezapur, almost at the level of NSAIDs of voltaren, on the model of carragenin edema and the absence of damaging effects on the state of the stomach mucous membrane, which has been proven in the chronic experiment, makes it possible to assert a predominantly antioxidant mechanism of its action.

The obtained results substantiate the prospects of dezapur as an antihypoxant with antioxidant and antiexudative properties, safe in chronic use, and the feasibility of its further study for the purpose of introduction into practical medicine.

Key words: derivatives of pyrrolopyrimidine; acute and chronic toxicity, antihypoxic activity, antioxidant activity, antiradical activity, antiexudative activity, dezapur.