

НЕЙРОХИМИЯ

УДК 547:855+615.213:615.214

DOI: 10.54503/0321-1339-2022.122.1-41

Член-корреспондент НАН РА Г. Г. Данагулян^{1,2},
Р. Г. Пароникян², А. П. Бояхчян², И. М. Назарян², В. К. Гарибян¹

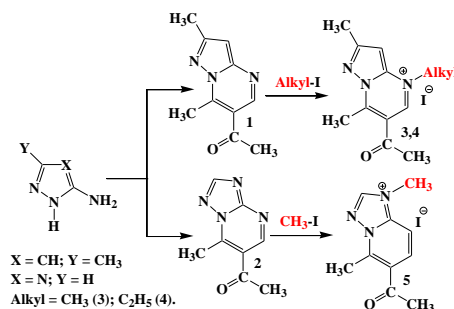
Синтез и исследование противосудорожной активности азоло[1,5-а]пиримидинов и продуктов их алкилирования

(Представлено 9/II 2022)

Ключевые слова: *пиразоло[1,5-а]пиримидины, 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидины, алкилийодиды, противосудорожное действие, коразоловые судороги.*

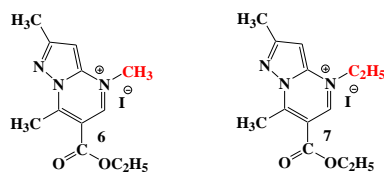
В представленном сообщении описан синтез некоторых замещенных пиразоло[1,5-а]- и 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов и продуктов их алкилирования, а также приведены результаты испытаний синтезированных веществ на противосудорожное действие. Известно, что подобные системы обладают высокой противоопухолевой и антибактериальной [1], а также нейротропной и противосудорожной активностями [2, 3].

Синтез исследованных соединений проведен по приведенной ниже схеме, включающей конденсацию α -аминоазолов с этоксиметилиденацетилацетоном, что приводит к получению 6-ацетил-2,7-диметилпиразоло[1,5-а]-(**1**) и 6-ацетил-7-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов (**2**), а также последующее алкилирование соединений **1** и **2** метил- и этилийодидом.



Спектрально (ЯМР, с использованием методики NOESY) доказано, что алкилирование идет неоднозначно и зависит от строения азоло[1,5-а]пиримидина. В реакции 6-ацетил-2,7-диметилпиразоло[1,5-а]пиримидина (1) с указанными алкилйодидами реакция протекает по атому азота N-4 пиримидинового кольца и образуются йодиды 6-ацетил-2,4,7-триметилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (3) и 6-ацетил-2, 7-диметил-4-этилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (4), тогда как соответствующий 6-ацетил-7-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин (2) алкилируется с участием атома азота N-3 триазольного кольца, что приводит к получению йодида 6-ацетил-3,7-диметил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидиния (5).

С целью выяснения влияния 6-ацетильной группы на биологическую активность азолопиримидинов была изучена активность также солей, содержащих в положении 6 сложноэфирную группу – йодидов 2,4,7-триметил-6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (6) и 2,7-диметил-4-этил-6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (7), синтезированных ранее по аналогичной схеме взаимодействием 5-амино-3-метилпиразола с этиловым эфиром этоксиметилиденацетоксусной кислоты и последующим алкилированием, соответственно, реакциями с метилйодидом и этилйодидом.



Материал и методы. Исследование противосудорожной активности 7 соединений, а именно, 6-ацетил-2,7-диметилпиразоло[1,5-а]пиримидина (1), 6-ацетил-7-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина (2), йодида 6-ацетил-2,4,7-триметилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (3), йодида 6-ацетил-2,7-диметил-4-этилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (4), йодида 6-ацетил-3,7-диметил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидиния (5), йодида 2,4,7-триметил-6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (6) и йодида 2,7-диметил-4-этил-6-этоксикарбонилпиразоло[1,5-а]пиримидиния (7) проводили на белых лабораторных мышах обоего пола массой 18-24 г. Использовали модели судорог, вызванных коразолом (пентилентетразол) и электрическим током [4-7]. О противосудорожной и возможной транквилизирующей активности соединений судили по предупреждению коразоловых клонических судорог [4], являющейся моделью малых судорожных припадков. Коразоловые клонические судороги получали при подкожном введении коразола в дозе 90 мг/кг. Противосудорожную активность соединений определяли также по предупреждению тонико-экстензорной фазы судорожного припадка максимального электрошока (МЭШ), являющейся моделью больших судорожных припадков. Параметры максимального электрошока 50 мА, длительность 0.2 с, частота колебаний 50 имп/с, крите-

рием оценки является предупреждение тонико-экстензорной фазы судорожного припадка.

Пиримидины-основания (соединения **1** и **2**) вводили внутривентриально в дозах 50-200 мг/кг во взвеси с карбоксиметилцеллюлозой с твин-80 за 45 мин до введения судорожных агентов и нанесения электрического раздражения, тогда как йодиды азолопиримидиния (соединения **3-7**), растворимые в воде, вводили за 30 мин до судорожных агентов и МЭШ. Контрольным животным вводили эмульгатор. Каждую дозу соединений по каждому тесту изучали на 5 животных. Аналогом сравнения служили известный противоэпилептический препарат этосуксимид (заронтин), применяющийся при лечении абсансов и миоклонических судорог [8], вводимый мышам в дозах 50-300 мг/кг внутривентриально, и известный транквилизатор диазепам, вводимый в дозах 0.1-2.0 мг/кг.

Изучено побочное нейротоксическое (миорелаксантное) действие соединений и этосуксимида в дозах от 50 до 200 мг/кг при внутривентриальном введении. Миорелаксацию исследовали по тесту «вращающегося стержня» у мышей [4, 9]. С этой целью мышей помещали на металлический стержень с гофрированным резиновым покрытием, который вращался со скоростью 5 оборотов в минуту. Определяли число животных, не способных удерживаться на нем в течение 2 мин. Определяли также острую суточную токсичность соединений при внутривентриальном введении. Для определения 50%-ных эффективных доз (ED_{50}), вызывающий противосудорожный эффект у 50% животных, использовали статистический метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона [10].

Для тестируемых соединений определяли также исследовательскую активность при регистрации их спонтанного двигательного поведения на модифицированной модели «открытое поле» на крысах (в каждой группе по 6 животных). Использовалась установка, дно которой разделено на квадраты и имеет отверстия (ячейки). Опыты проводились в дневное время при естественном освещении. Исследуемые соединения вводили крысам в наиболее эффективной дозе – 50 мг/кг внутривентриально. В течение 5 мин эксперимента у опытных и контрольных групп животных определялось количество горизонтальных перемещений (пересечений квадратов), обнюхиваний ячеек и вставания на задние лапки (вертикальные перемещения) [11, 12].

Антитревожное, седативное и антидепрессивное действие изучали на мышах на модели «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [13, 14]. Это приподнятая над полом крестообразная установка, имеющая по паре расположенных друг против друга открытых и закрытых рукавов. Нормальные животные предпочитают большую часть времени проводить в закрытых (темных) рукавах лабиринта. При этом фиксируются время, проведенное в закрытом рукаве, количество попыток зайти в закрытые рукава и время нахождения в центре установки. В вышеуказанной модели исследуемые соединения и препараты сравнения вводили внутривентриально до проведения экспериментов. Контрольным животным вводили

эмульгатор. Результаты обрабатывались статистически ($P \leq 0.05$).

Экспериментальная часть: результаты и обсуждение. Общая методика получения азоло[1,5-а]пиримидинов 1 и 2. Кипячением с обратным холодильником в течение 4-6 ч эквимольных количеств этоксиметил-иденацетилацетона, соответственно, с 3-метил-5-аминопиразолом либо 5-амино-1,2,4-триазолом получают 6-ацетил-2,7-диметилпиразоло[1,5-а]пиримидин (**1**) и 6-ацетил-7-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин (**2**). Выходы, соответственно, **1** – 72.6% и **2** – 73%.

Общая методика получения метил- и этилйодидов азолопиримидинов 3-5. Пиразолопиримидин **1** и триазолопиримидин **2** (по 0.0046 моль) засыпают в ампулу, добавляют избыток – 0.031 моль (соотношение 1:6.7) соответствующего йодида – 4.4 г (2 мл) метилйодида или 4.84 г (2 мл) этилйодида. Ампулу запаивают и нагревают в кипящей водяной бане в течение 6-8 ч. По окончании ампулу охлаждают, вскрывают, осадок отфильтровывают, промывают эфиром, высушивают и перекристаллизовывают из гексана. Выход, соответственно, йодида **3** – 1.3 г (87%), йодида **4** – 0.95 г (60%), йодида **5** – 1.1 г (75%). Синтез йодидов **6** и **7** осуществлен по методике, описанной [15].

Результаты биологических исследований показали, что изученные соединения и этосуксимид не проявляют антиэлектрошокового действия. В дозе 200 мг/кг у исследованных соединений и сравниваемого этосуксимида не выявлено миорелаксанта действия. Однако у соединений выявлен антагонизм с коразолом. Азоло[1,5-а]пиримидины в дозе 50 мг/кг в той или иной степени проявляют антикоразоловое действие. Данные по антикоразоловой активности наиболее активных из них – йодидов **3-5** представлены в табл. 1. Остальные соединения проявляют 40%-ную эффективность. В таблице представлено также действие этих соединений и референтных препаратов на модели «открытое поле».

Таблица 1

**Противосудорожная и исследовательская активности соединений
N 3, 4, 5 и референтных препаратов**

Соединение, доза, мг/кг	Антагонизм с коразолом (ЭД ₅₀ , мг/кг)	Количество (в абсолютных значениях за 5 мин)*		
		горизонталь- ных перемещений	вертикальных перемещений	обследованных ячеек
Контроль (эмульгатор)	-	10.8 ± 2.2	5.8 ± 1.9	1.4 ± 0.3
3 (50)	34 (22.6 ÷ 57.0)*	13.8 ± 2.8	8.6 ± 1.4	2.2 ± 0.5**
4 (50)	125 (104.2 ÷ 150)	14.4 ± 2.5	5.6 ± 1.2	2.3 ± 0.4**
5 (50)	41 (22.5 ÷ 59.2)	9.2 ± 3.7	6.6 ± 2.8	2.5 ± 0.5**
Этосуксимид (200)	155 (117.5 ÷ 204.5)	12.4 ± 3.5	6.6 ± 1.1	1.5 ± 0.4
Диазепам (2)	0.51 (0.39 ÷ 0.69)	25.6 ± 4.2**	14.0 ± 2.4**	4.5 ± 1.3**

* Доверительные интервалы при уровне вероятности $P = 0.05$.

**Различия статистически значимы по сравнению с контролем.

Как видно из таблицы, ЭД₅₀ изученных соединений по антагонизму с коразолом находится в пределах от 34 до 125 мг/кг. По антикоразоловой активности исследуемые соединения превосходят сравниваемый аналог этосуксимид, но уступают диазепаму. По нейротоксичности все вышеуказанные соединения проявляют одинаковое действие в сравнении с этосуксимидом, а диазепам намного нейротоксичнее. Фактически по защитному индексу исследуемые йодиды азоло[1,5-а]пиримидиния **3-5** безопаснее этосуксимида по проявляемому ими побочному нейротоксичному эффекту.

В поведенческой модели «открытое поле» у крыс контрольной группы количество горизонтальных перемещений составляло 10.8, вертикальных – 5.8, а обследованных ячеек – 1.4 (табл. 1). Исследуемые соединения вызывают некоторые изменения показателей поведения по сравнению с контролем. При введении соединений **Н 3, 4, 5** и этосуксимида горизонтальные, вертикальные перемещения меняются статистически незначимо, а применение диазепама статистически достоверно приводит к увеличению всех показателей (активирующее действие). Статистически достоверно увеличивается количество обследованных ячеек после введения и отобранных соединений, и диазепама, т.е. имеет место выраженное анти-тревожное действие исследованных соединений и диазепама в отличие от этосуксемида.

На модели «приподнятого перекрестного лабиринта» контрольные животные преимущественно находятся в закрытых рукавах (табл.2). В экспериментальной модели страха – ПКЛ введение соединений, а также сравнительного препарата диазепама привело к статистически значимому снижению времени нахождения животных в закрытых рукавах, при этом также уменьшается число заходов в закрытые рукава.

Таблица2

Влияние соединений Н 3, 4, 5 и аналогов на модели «приподнятого крестообразного лабиринта» (5 мин исследований)

Препарат, доза, мг/кг	Время нахождения в закрытых рукавах, с*	Число заходов в закрытые рукава*	Время нахождения в центре, с*	Время нахождения в открытых рукавах, с*
Контроль	273.6 ± 22.0	4.8 ± 0.8	21.8 ± 5.0	-
3 (50)	199.0 ± 18.0**	3.4 ± 0.2**	87.4 ± 10.0**	10.6 ± 7.0 **
4 (50)	212.0 ± 32.0 **	3.6 ± 0.4**	80.1.0 ± 6.0 **	7.9 ± 3.2**
5 (50)	231.0 ± 25.0 **	4.0 ± 0.5 **	60.0 ± 7.0 **	9.0 ± 3.0**
Этосуксимид (150)	280.0 ± 42.0	3.8 ± 0.8 **	26.0 ± 6.0	3.0 ± 1.2**
Диазепам (2)	213.2 ± 31.0**	2.5 ± 0.6 **	50.8(42.3÷61)**	16.0 ± 5.0**

*P ≤ 0.05.

** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем.

После введения исследуемых соединений, как и диазепама, животные много времени находятся в центре в отличие от контрольных, что может свидетельствовать о некой защитной реакции исследуемых соединений. В дозе 50 мг/кг под воздействием всех отобранных соединений и диазепама животные статистически достоверно долгое время находятся в открытых рукавах в отличие от контроля, что указывает на то, что у соединений выявлено выраженное анксиолитическое действие.

Таким образом, проведенные исследования показали, что йодиды пиразоло[1,5-а]пиримидиния **3**, **4** и 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидиния **5** проявляют противосудорожное действие по тесту коразоловых судорог. Они менее нейротоксичны, чем функциональные аналоги этосуксимид и диазепам. Отобранные соединения **3**, **4**, **5**, как и диазепам, проявляют также анксиолитическое действие.

Исследование выполнено в Российско-Армянском (Славянском) университете в рамках совместного Российско-Армянского гранта ГРН РА и РФФИ (РФН) 20RF-138.

¹ Российско-Армянский (Славянский) университет

² Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА

e-mails: gdanag@email.com, paronikyan.ruzanna@mail.ru

**Член-корреспондент НАН РА Г. Г. Данагулян, Р. Г. Пароникян,
А. П. Бояхчян, И. М. Назарян, В. К. Гарибян**

Синтез и исследование противосудорожной активности азоло[1,5-а]пиримидинов и продуктов их алкилирования

Исследовалось противосудорожное действие семи новых соединений – азоло[1,5-а]пиримидинов и продуктов их алкилирования. Опыты проведены на двух судорожных моделях: коразоловых судорогах и максимальном электрошоке. Изучено также побочное нейротоксическое (миорелаксантное) действие этих соединений. Изучена исследовательская активность отобранных трех соединений, а также их анксиолитическое действие. Сравнение проводили с противосудорожным препаратом – этосуксимидом, а также с транквилизатором – диазепамом. Проведенные исследования показали, что йодиды 6-ацетил-2,4,7-триметил- и 6-ацетил-2,7-диметил-4-этилпиразоло[1,5-а]пиримидиния, а также 6-ацетил-3,7-диметил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидиния проявляют противосудорожное действие по тесту коразоловых судорог. Они менее нейротоксичны, чем функциональные аналоги. На модели «открытое поле» исследованные соединения, как и диазепам, статистически достоверно увеличивают количество обследованных ячеек, т.е. имеет место выраженное антитревожное действие. На модели «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) исследованные соединения и диазепам проявляют анксиолитическое действие.

**ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Գ. Հ. Դանագուլյան, Ռ. Գ. Պարոնիկյան,
Ա. Պ. Բոյախչյան, Ի. Մ. Նազարյան, Վ. Կ. Ղարիբյան**

**Ազոլո[1,5-a]պիրիմիդինների և դրանց ալկիլման արգասիքների սինթեզը
և հակացնցումային հատկությունների ուսումնասիրությունը**

Ուսումնասիրվել է յոթ նոր միացությունների՝ ազոլո[1,5-a]պիրիմիդինների և դրանց ալկիլման արգասիքների հակացնցումային ազդեցությունը: Փորձերն իրականացվել են երկու ցնցումային մոդելների վրա՝ կորագոլային ցնցումներ և առավելագույն էլեկտրաշոկ: Ուսումնասիրվել է նաև միացությունների կողմնակի նեյրոտոքսիկ (մկանաթուլացնող) ազդեցությունը: Հետազոտվել է ընտրված երեք միացությունների հետազոտական ակտիվությունը, ինչպես նաև դրանց անքսիոլիտիկ ազդեցությունը: Համեմատություն է կատարվել հայտնի հակաէպիլեպտիկ դեղամիջոցի՝ էթոսուկսիմիդի, ինչպես նաև տրանկվիլիզատոր դիազեպամի հետ: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ պիրագոլո[1,5-a]պիրիմիդինիումի և 1,2,4-տրիագոլո[1,5-a]պիրիմիդինիումի որոշ յոդիդներ ցուցաբերում են հակացնցումային ակտիվություն կորագոլի հետ անտագոնիզմի թեստով: Դրանք ավելի քիչ նեյրոտոքսիկ են, քան ֆունկցիոնալ նմանակները: Ընտրված միացությունները «բաց դաշտի» մոդելում, ինչպես և դիազեպամը, վիճակագրորեն հավաստի մեծացնում են հետազոտված բջիջների թիվը, այսինքն՝ առկա է ընդգծված հակատագնապային ազդեցություն: «Բարձրացված խաչաձև լաբիրինթոսի» մոդելով ուսումնասիրված միացությունները դիազեպամի նման ցուցաբերում են անքսիոլիտիկ ազդեցություն:

**Corresponding member of NAS RA G. G. Danagulyan, R. G. Paronikyan,
A. P. Boyakhchyan, I. M. Nazaryan, V. K. Gharibyan**

**Synthesis and Study of the Anticonvulsant Activity of
Azolo[1,5-a]pyrimidines and Their Alkylation Products**

The anticonvulsant effect of seven new compounds: azolo[1,5-a]pyrimidines and their alkylation products was studied. The experiments were carried out on two convulsive models; corazole convulsions and maximum electroshock. The side neurotoxic (muscle relaxant) effect of these compounds has also been studied. The exploratory activity of selected three compounds, as well as their anxiolytic action, was studied. A comparison was made with the antiepileptic drug ethosuximide, as well as with the well-known tranquilizer diazepam. Studies have shown that some alkylidides of the pyrazolo[1,5-a]pyrimidines and 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidines exhibit anticonvulsant activity according to the corazole seizure test. They are less neurotoxic than the functional analogues. In the «open field» model, the selected compounds, as well as diazepam, statistically significantly increase the number of examined cells, i.e. there is a pronounced anti-anxiety effect. On «elevated cross maze» model, the studied compounds and diazepam exhibit an anxiolytic effect.

Литература

1. *Rusinov V. L., Charushin V. N., Chupakhin O. N.* – Russ. Chem. Bull., Int. Ed. 2018. V. 67. № 4. P. 573.
2. *Farag A. A., Abd-Alrahman S. N., Ahmed G. F. et al.* – Pharm. Med. Chem. 2012. V. 345. P. 703–712. DOI: 10.1002/ardp.201200014.
3. *Ciba-Geigy A. G.* – Пат. ФРГ 2304307; C.A. V. 79, 126535.
4. *Vogel H. G., Vogel W. H.* In: Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Springer/ Eds Vogel, H. E., Berlin & NY. 2008. P. 569-874.
5. *Loscher W., Schmidt D.* – Epilepsy Res. 1988. V. 2. P. 145–181.
6. *Swinyard E. A.* In: Experimental Models of Epilepsy. NY. Raven Press, 1992. P. 433–458.
7. Drugs Used in Generalized Seizures. Basic and Clinical pharmacology. 9th ed./ Ed. Katzung B. Large Medical Books/McGraw-Hill, 2003.
8. *Машиковский М. Д.* Лекарственные средства. М. Новая волна. 16-е изд. 2020. 1216 с.
9. *Dunham N. W., Miya T. S.* – J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. 1957. V. 46. № 3. P. 208-209.
10. *Беленький М. Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963. 153 с.
11. *File S. E.* – Behav. Brain. Res. 2001. V. 125. P. 151-157.
12. *Stanford S. C.* – J. Psychopharmac. 2007. V. 21. P. 134-135.
13. *Pirut C. B.* – Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 463(1-3). P. 3-33.
14. *Pelow S., File S. E.* – Pharmacol. Biochem. and Behav. 1985. V. 24. № 3. P. 525-529.
15. *Danagulyan G. G., Boyakhchyan A. P., Danagulyan A. G. et al.* – Chem. Heterocycl. Comp, 2011. V. 47. P. 321.