



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56831 (13) C2

(51) 7 C07D211/86, A61K31/44

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ПОХІДНІ 1,4-ДИГІДРОПІРИДИНУ ТА СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ

1

(21) 2002097694

(22) 26.09.2002

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Макітрук Василь Лукич, Шаламай Анатолій
Севастьянович, Безпалько Людмила Василівна,
Со́ва Євген Олександрович, Мохорт Микола Анто-
нович, Серединська Наталія Миколаївна, Киричок
Лора Михайлівна, Стефанов Олександр Вікторо-
вич, Григор'єва Ганна Савівна(73) ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО НАУ-
КОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР "БОРЩАГІВСЬКИЙ
ХІМІКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЗАВОД", ІНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

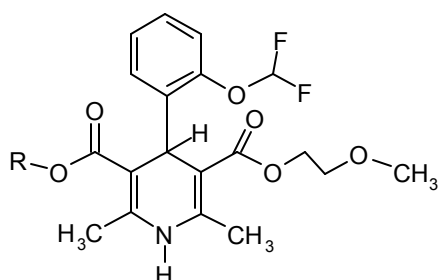
(56) US, 4957930, A, 18.09.1990

EP, 0366548, A, 02.05.1990

US, 6066655, A, 23.05.2000

(57) 1. Похідні 1,4-дигідропіридинів загальної фор-
мули:

2

де: R - β -метоксиетильний або ізопропільний за-
лишок, що проявляють інгібіторну дію по відно-
шенню до трансмембранного переносу іонів каль-
цію та гіпотензивну активність.2. Спосіб для отримання похідних 1,4-
дигідропіридинів, який відрізняється тим, що
здійснюють роздільне проведення всіх стадій одер-
жання вихідних та кінцевих продуктів реакцій, при
цьому о-дифторметокси-бензальдегід конденсу-
ють метоксиетилним естером оцетової кис-
лоти, синтезують халкон і вводять в реакцію з ним,
відповідно, ізопропільний або метоксиетильний
естери 3-амінокротонової кислоти.

Даний винахід стосується галузі органічної
хімії і відноситься до нових біологічно активних
сполук, конкретно до похідних 1,4-
дигідропіридинів, що проявляють гіпотензивну
активність і способів їх отримання, які можуть бути
використані в медичній практиці як лікарські засо-
би групи антагоністів іонів кальцію.

Препарати з властивостями блокаторів каль-
цієвих каналів за останні 30 років зайняли суттєве
місце в кардіологічній практиці. Фактично у всіх
клініках світу кардіологи та терапевти застосову-
ють Ca^{2+} блокатори для лікування ішемічної хво-
роби серця (ІХС), артеріальної гіпертензії, пору-
шень серцевого ритму, різних видів ангіоспазму,
стенокардії [1 - 5]. Саме ці патологічні стани, за
даними ВООЗ, є основними причинами смертності
та інвалідності працездатного населення проми-
слово розвинутих країн.

Сьогодні медицині відомо багато антагоністів
кальцію (Ca^{2+} блокаторів), які традиційно кла-
сифікуються за трьома групами: дигідропіридини,
бензодіазепіни, фенілалкіламіни [3, 5, 8, 11]. Ці
препарати в значній мірі відрізняються один від
одного ступенем прояву та тривалістю фармако-
логічних ефектів (антиангінального, ан-
тигіпертензивного, інотропного, антиаритмічного
(або аритмогенного), співвідношенням анти-
ангінального і гемодинамічного впливу), фарма-
кокінетичними особливостями, можливістю вико-
ристання в комплексній терапії з лікарськими
засобами інших класів при різних формах патології
серцево-судинної системи.

В останній час, протягом трьох-чотирьох років,
на сторінках наукової періодики ведеться полеміка
щодо безпечності застосування антагоністів каль-
цію при ішемічній хворобі серця, артеріальній
гіпертензії, що викликає критичну дискусію. Така

(13) C2

(11) 56831

(19) UA

ситуація обумовлена, за даними багато центрових досліджень, підвищенням смертності при застосуванні короткодійних антагоністів кальцію у хворих ІХС, підвищенням ризику розвитку інфаркту міокарда при лікуванні артеріальної гіпертензії за допомогою антагоністів кальцію, ніж при лікуванні указаної патології діуретиками чи β -блокаторами, а також підвищенням летальності у осіб похилого віку, що одержували антагоністи кальцію (монотерапія) при артеріальній гіпертензії, в порівнянні з хворими, що отримували β -блокатори. З позицій сучасного уявлення патологічної суті серцевої недостатності, феномен росту смертності та числа випадків госпіталізації хворих із даною патологією пояснюється, головним чином, ініціюванням дигідропіридинами I - II поколінь механізмів прогресування серцевої недостатності із-за додаткової перманентної стимуляції симпато-адреналової системи, яка й так гіперактивована при синдромі серцевої недостатності, ішемічній хворобі серця.

Однак, всі ці дослідження ретроспективні і стосуються Ca^{2+} блокаторів I і II (у більшості випадків, IIb) поколінь, в основному - дигідропіридинового ряду, тобто мова йде лише про антагоністів кальцію короткої дії, вплив яких пов'язаний з хвилеподібними змінами артеріального тиску після прийому препаратів у малих дозах. Такі недоліки короткодійних Ca^{2+} блокаторів дигідропіридинового ряду було усунено за допомогою ретардних форм, що дають можливість повільного вивільнення субстанції та підтримки постійного рівня препарату в крові.

Сьогодні розвивається новий напрямок упровадження в клінічну практику дериватів дигідропіридинового ряду III покоління, які викликають щонайменшу рефлекторну тахікардію, значно менше випадків набряків кінцівок, менше ішемічних нападів у пацієнтів із стабільною стенокардією [9, 10].

Небажані фармакологічні прояви Ca^{2+} блокаторів інших хімічних груп - бензодіазепінів, фенілалкіламінів, серед яких - значне пригнічення скорочувальної функції міокарда, швидке та досить сильне зниження артеріального тиску крові обмежує їх застосування у пацієнтів із зниженою функцією лівого шлуночка серця. В той же час, фенілалкіламінові похідні (верапаміл) використовуються, як препарати вибору, при лікуванні стенокардії та інфаркту міокарда.

Аналіз літературних даних з питань фармакокінетики і фармакодинаміки антагоністів кальцію, шляхів їх взаємодії з різними типами кальцієвих каналів і місцями зв'язування в них препаратів різних хімічних груп, аналіз даних про тканинну вибірність Ca^{2+} блокаторів, а також, враховуючи широко представлені у світовій літературі дані клінічного застосування антагоністів іонів кальцію, результати власних експериментальних досліджень, показали, що сумніви щодо припустимості, доцільності та ефективності застосування препаратів групи блокаторів кальцієвих каналів навряд чи доречні. Величезна кількість не вирішених, на сьогоднішній день, питань стосується більш глибокого вивчення механізмів дії антагоністів кальцію, структурних і кінетичних ха-

рактеристик та особливостей кальцієвих каналів у різних тканинах, особливостей перебігу різних захворювань при застосуванні довгостроково діючих форм антагоністів кальцію як при самостійному використанні, так і в комплексній терапії [4, 5, 11].

Експериментатори та клініцисти всього світу, залишаючи достойне місце в застосуванні короткодійних антагоністів кальцію, в тому числі - похідних дигідропіридинового ряду, у випадках надання невідкладної допомоги, при тривалому лікуванні схильються до застосування ретардних форм Ca^{2+} блокаторів II генерації, а також до більш активних розробок по створенню та впровадженню в клінічну практику препаратів дигідропіридинового ряду III покоління. До їх переваг, перш за все, відносяться наступні:

1) відсутність або незначний прояв негативного інотропного ефекту;

2) повільна абсорбція, висока біодоступність, повільний печінковий метаболізм, незначна швидкість сполучення та дисоціації з місцями зв'язування в Ca^{2+} каналах, що могло б забезпечити повільний розвиток гемодинамічних ефектів та їх тривалість; при цьому період напіввиведення препаратів повинен бути 30 - 50 годин;

3) відсутність рефлекторної активації симпато-адреналової й ренін-ангіотензивної систем, яка, перш за все, визначалася б за динамікою концентрації норадреналіну і реніну в плазмі крові у хворих з застійною серцевою недостатністю;

4) виражений антиангінальний і антигіпертензивний ефекти;

5) відсутність негативного впливу на метаболізм інших препаратів, що застосовуються в комплексній терапії, особливо серцевих глікозидів, діуретиків, β -адреноблокаторів.

Існуючі на сьогоднішній день антагоністи іонів кальцію в повній мірі не задовольняють усіх вище перерахованих вимог та вимог щодо нормалізації діяльності серцево-судинної системи при різних патологічних станах. Вивчення фізіологічних та фармакологічних параметрів взаємодії 1,4-дигідропіридинів із молекулярними елементами кальцієвих каналів дозволили встановити основні принципи та закономірності взаємозв'язку будови і біологічної дії цих сполук. Саме врахування молекулярно-біологічних закономірностей фармакологічної активності дигідропіридинів дозволило створити високоефективні лікарські засоби направленої дії.

Так, на зміну відомому антиангінальному препарату ніфедипіну прийшов більш ефективний препарат нового покоління форидон, засіб позбавлений вад першого препарату. Відомий лікарський засіб форидон (11) (ріудипін) - 2,6-диметил-3,5-диметоксикарбоніл-4-(2-диформетоксибеніл)-1,4-дигідропіридин (3) - відноситься до антагоністів іонів кальцію групи похідних дигідропіридину. За хімічною будовою та фармакологічними властивостями він є одним із перших представників антагоністів іонів кальцію, на основі якого створено багато лікарських засобів. Форидон в орто положенні фенільного залишку молекули містить диформетоксильну групу. Препарат проявляє гіпотензивну,

спазмолітичну та коронаролітичну дію. Саме заміна у фенільному фрагменті ніфедипіну орто-нітрогрупи на диформетоксильний замісник позначилась на біодоступності та стабільності нового препарату, на розширенні спектру його фармакологічних властивостей. Як свідчать дані світової літератури, саме структурні модифікації, введення замісників різної природи в дигідропіридиновий (3,5-положення) та /або в арильний (орто-, мета-) фрагменти молекули спричиняють суттєвий вплив на перерозподіл, посилення або ослаблення тих чи інших фармакодинамічних ефектів, а також на фармакокінетичні особливості антагоністів кальцію. Звертає на себе увагу те, що в більшості випадків ліпофільність (гідрофобність) замісників та особливості їх стереохімічної будови вносять основний вклад у термодинамічні показники взаємодії конкретного похідного 1,4-дигідропіридину зі структурними елементами клітинних мембран [6, 11].

Відомий лікарський засіб німодипін (11) - ізопропіл-(2-метоксиетил)-4-(3-нітрофеніл)-1,4-дигідро-2,6-диметилпіридин-3,5-дикарбоксилат (4), який відноситься до блокаторів кальцевих каналів похідних дигідропіридину, впливає також на потенціалзалежні кальцеві канали. Специфічною фармакологічною особливістю німодипіна є його переважний вплив на судини мозку та слабкий вплив на периферичне судинне русло. Німодипіну притаманні виражені ліпофільні властивості в порівнянні з іншими антагоністами іонів кальцію, у зв'язку з чим він легше проникає через гематоенцефалічний бар'єр. Крім дії на гладеньком'язові клітини судин мозку, спричиняє безпосередній вплив на нейрони та клітини глії. Судиннорозширюючий та спазмолітичний ефекти обумовлені впливом на гладеньком'язові клітини судин мозку, а ноотропний і нейропротекторний ефекти - опосередковані прямим впливом на кальцеві канали нейронів.

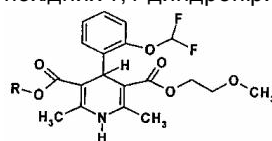
Відомі також похідні, описані в патенті США № 6 066 655, МПК, C07 D 211/86, A 61 K 31/44, 2000р., - 4-феніл-3-заміщені естери 1,4-дигідропіридинів, які в 3- та 5-позиціях дигідропіридинового кільця містять структурні залишки ізопропільного та метоксиетильного естерів. Крім цих замісників, в них використані також більш об'ємні циклопентильні та фенілалкільні групи в різних комбінаціях розміщення. Разом із тим, в цих сполуках фенільні фрагменти були представлені 2-, 3- та 2-, 5-дигалоген (хлор- і/чи фтор)феніл замісниками. В цілому схеми синтезу цих сполук базуються на класичному варіанті одержання 1,4-дигідропіридинів, тобто шляхом взаємодії заміщених бензальдегідів із кетоестерами (за Ганчем) і з енамінами при поетапному виділенні проміжних продуктів. Відомі похідні є потенційними інгібіторами кальцевих каналів, але вони є досить токсичними препаратами.

Відомий також спосіб одержання ніфедипіну (11), який полягає в синтезі сполук за схемою Ганча. Спосіб зводиться до проведення всіх стадій в одному реакторі, і саме друга стадія полягає в одержанні проміжного естеру 3-амінокротонової кислоти в присутності значної кількості водного

аміаку. Тобто, похідна 3-амінокротонової кислоти *in situ* взаємодіє з халконом. Саме наявність надлишку водного аміаку призводить до омилення як продуктів реакції, так і сприяє проходженню побічних реакцій переетерифікації, що не сприяє отриманню бажаних продуктів з високим виходом та достатнім ступенем чистоти.

В основу винаходу покладено задачу створення похідних 1,4-дигідропіридинів, які проявляють гіпотензивну активність та способу їх отримання шляхом введення нових замісників в молекулу дигідропіридину та нового порядку виконання дій у способі, забезпечило б поліпшення фармакодинамічних і фармакокінетичних властивостей, підвищення стабільності препарату при зменшенні його токсичності.

Поставлена задача досягається за допомогою похідних 1,4-дигідропіридинів, загальної формули:



де R = -CH₂-CH₂-O-CH₃ - β-метоксиетильний або -CH(CH₃)₂ - ізопропільний залишок,

що проявляють інгібіторні властивості по відношенню до трансмембранного переносу іонів кальцію та гіпотензивну активність.

Поставлена задача досягається також тим, що в способі отримання похідних 1,4-дигідропіридинів, згідно з винаходом, здійснюють роздільне проведення всіх стадій одержання вихідних та кінцевих продуктів реакцій, при цьому о-диформетоксифенальдегід конденсують метоксиетильним естером оцетової кислоти, синтезований халкон вводять в реакцію з ізопропіловим або β-метоксиетильним естером 3-амінокротонової кислоти.

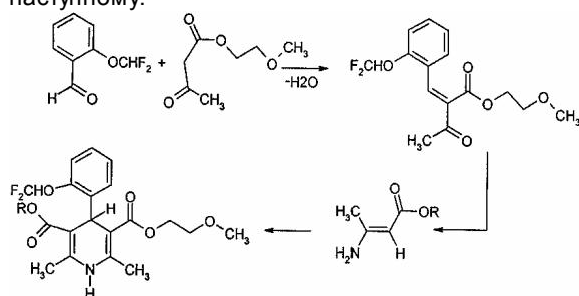
Введенням до фенільного фрагменту молекули дигідропіридину - фторвмісного залишку, а саме, орто-диформетоксильного, а в дигідропіридиновий фрагмент в 3- та 5-позиції карбізопропокси- та карбметоксиетильного залишків синтезовано нові похідні 1,4-дигідропіридинів заявленої загальної формули, що мають, зокрема, будову: 2,6-диметил-3-карбметоксиетил-4-(о-диформетоксифеніл)-5-карбізопропокси-1,4-дигідропіридин (дифодипін) та 2,6-диметил-3,5-дикарбметоксиетил-4-(о-диформетоксифеніл)-1,4-дигідропіридин (димео-дипін), проявляють гіпотензивну активність і забезпечують поліпшення фармакодинамічних та фармакокінетичних властивостей, підвищення стабільності препарату при зменшенні його токсичності.

Роздільне проведення всіх стадій одержання вихідних та кінцевих продуктів реакцій нових речовин - похідних 1,4-дигідропіридинів, що проявляють гіпотензивну активність, також забезпечує поліпшення фармакодинамічних і фармакокінетичних властивостей, підвищення стабільності препарату при зменшенні його токсичності, а також призводить до розширення асортименту речовин, які є антагоністами кальцію.

Синтезовано нові речовини, які не описані в літературі.

Дифодипін та димеодипін одержували у відповідності зі схемою синтезу за Ганчем, а саме - при конденсації о-дифторметоксибензальдегіду з β-метоксиетилловим естером ацетової кислоти отримували халкон. Окремо були одержані ізопропіловий та β-метоксиетилловий естери 3-амінокротонової кислоти, котрі, відповідно, вводились в реакцію з вище синтезованим халконом. Саме така послідовність стадій реакції дозволяє одержувати дифодипін та димеодипін з високими виходами та малим умістом домішок.

Вихідні продукти – о-дифторметоксибензальдегід та естери 3-амінокротонової кислоти одержують заздалегідь відомими способами. Схема одержання дифодипіну та димеодипіну полягає в наступному:



де: $R_1 = -CH(CH_3)_2$ - дифодипін

$R_2 = -(CH_2)_2-OCH_3$ - димеодипін

Будова синтезованих дифодипіну та димеодипіну були підтверджені даними УФ- та 1H -ЯМР-спектрів та іншими фізико-хімічними характеристиками. Чистота кінцевих продуктів підтверджена за допомогою методів ТШХ та ВЕРХ.

Винахід пояснюється такими прикладами:

ПРИКЛАД 1. До розчину 160г (1Моль) метоксиетилового естера ацетової кислоти та 172г (1Моль) о-дифторметоксибензальдегіду в 400мл ізопропілового спирту додають 3,2г (0,04Моль) піперидину та 2,4г (0,04Моль) льодяної оцтової кислоти. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 10год. Проходження реакції синтезу халкону контролюють із допомогою ТШХ (платівка Силуфол UV-254, система бензол - ацетонітрил 15 : 1).

До реакційної суміші додають 143г (1Моль) ізопропілового естеру 3-амінокротонової кислоти і кип'ятять її при перемішуванні протягом 12год. (ТШХ, система бензол - ацетонітрил 9:1), розчинник відганяють у вакуумі. Залишок розчиняють в 300мл толуолу і, при перемішуванні, додають 600мл петролейного ефіру. При повільному охолодженні розчину до 5°C починається кристалізація продукту, який відфільтровують, промивають петролейним ефіром, сушать. Одержують 280г (64%) жовтуватого продукту. З фільтрату при повільному упарюванні та висаджуванні з толуольного розчину додатково одержують ще 36г продукту. Загальний вихід складає 316г (72%). Дрібнокристалічний продукт перекристалізують з суміші толуол-петролейний ефір (1:1) і одержують продукт у кількості 292г, який, за даними ТШХ та ВЕРХ, містить 60% дифодипіну та 40% димео-

дипіну. Розділення цих продуктів виконують за допомогою препаративної колонкової хроматографії, використовуючи в якості сорбенту Kieselgel-60 (Merck).

Дифодипін - 2,6-диметил-3-карбметоксиетил-4-(о-дифторметоксибеніл)-5-карбізопропокси-1,4-дигідропіридин - білий дрібнокристалічний порошок. Т. топл. 87,2-88,6°C (етанол - вода 3:1). УФ-спектр: λ_{max} 207, 237, 363 (етанол). 1H -ЯМР-спектр (CD_3COCD_3 , d_6), TMC - внутрішній стандарт, δ : 1,09-1,24 (6H d, $(CH_3)_2CH-$), 2,32 (6H, s, -CH₃), 3,33 (3H, s, -OCH₃), 3,52 (2H, dd, -CH₂-), 4,12 (2H, dd, -CH₂-), 4,9 (1H, m, $(CH_3)_2CH-$), 5,32 (1H, s, 4H), 6,89-7,22 (4H, m, арил), 7,47 (1H, d, $J_{HF} = 2$ Гц, -CHF₂), 7,92 (1H, s, NH).

Димеодипін-2,6-диметил-3,5-дикарбметоксиетил-4-(о-дифторметоксибеніл)-1,4-дигідропіридин - білий кристалічний порошок.

Т. топл. 97,3-98,0°C (етанол - вода 3:1). УФ-спектр: λ_{max} 204, 235, 356 (етанол). 1H -ЯМР-спектр (CD_3COCD_3 , d_6), TMC- внутрішній стандарт δ : 2,32 (6H, s, -CH₃), 3,33 (6H, s, -OCH₃), 3,53 (4H, dd, 2 - CH₂OCH₃), 4,12 (4H, dd, 2 - COOCH₂-), 5,34 (1H, s, 4H), 6,89 - 7,22 (4H, m, арил), 7,47 (1H, d, $J_{HF} = 8,1$ Гц, CHF₂), 7,98 (1H, s, -NH).

ПРИКЛАД 2. В трьохгорлий реактор, місткістю 2,5л, оснащений мішалкою та зворотнім холодильником завантажують 518,4г (2Моля) β-метоксиетилового естеру 3-амінокротонової кислоти, 320,4г (2моля) метоксиетилового естеру ацетової кислоти і 344г (2Моля) о-дифторметоксибензальдегіду, приливають 1л етилового спирту. Реакційну суміш кип'ятять при перемішуванні протягом 6 годин (ТШХ, система бензол - ацетонітрил 9:1), обробляють активованим вугіллям, фільтрують. Фільтрат залишають на ніч в холодильнику. Осад, що випав, відфільтровують, промивають охолодженим 75% водним етанолом, сушать. Одержують 546,56г (60%) продукту блідожовтого кольору.

Маточник упарюють у вакуумі до половини початкового об'єму, залишають на ніч в холодильнику, осад фільтрують, промивають охолодженим 70% етанолом, висушують. Додатково одержують ще 90,64г продукту. Загальний вихід складає 637,2г (70%). Дрібнокристалічний продукт перекристалізують з 60% водного етилового спирту і одержують продукт в кількості 541,5г, який, за даними ТШХ та ВЕРХ, містить не менше 98,5% димеодипіну. Т. топл. 97,1-8,0°C

Сполукам, що заявляються - 2,6-диметил-3-карбметоксиетил-4-(о-дифторметоксибеніл)-5-карбізопропокси-1,4-дигідропіридин (дифодипін) формули (1) та 2,6-диметил - 3,5 - дикарбметоксиетил-4-(о-дифторметоксибеніл)-1,4-дигідропіридин (димеодипін) формули (2) притаманна здатність блокувати проникнення іонів кальцію всередину клітини через повільні кальцеві канали L-типу.

В перспективі ці сполуки можуть бути використаними в якості лікарських засобів для лікування патології серцево-судинної системи.

Фізіологічна активність нових сполук оцінювалась за здатністю обмежувати трансмембранний перенос іонів кальцію всередину клітини

на моделі гіперкалієвої деполяризації мембрани гладеньком'язових клітин ізольованих судин (аорти). Крім того, вивчався один з найбільш інтегральних показників загальнобіологічної дії нових ксенобіотиків - гостра токсичність.

При вивченні фізіологічної активності нових сполук, що заявляються, в якості найближчих аналогів вибрані та використані при дослідженні фориридону та німодипіну, структурні фрагменти молекул яких взято при створенні та синтезі дифодипіна та димеодипіна.

ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПОХІДНИХ ДИГІДРОПІРИДИНУ

Вивченню гострої токсичності підлягали нові похідні дигідропіридину - димеодипін та дифодипін, а також фориридону та німодипін, як сполуки, структурні елементи яких входять до складу молекул нових синтезованих активних в плані впливу сполук на трансмембранний перенос іонів кальцію.

Вивчення гострої токсичності похідних дигідропіридину - німодипін, фориридону, а також - нових, вперше синтезованих - димеодипін, дифодипін, проводили по одному з найбільш інформативних тестів - тесту визначення середньосмертельної дози при пероральному однократному їх введенні на трьох видах лабораторних тварин - білих щурах, білих мишах та собаках при однократному їх введенні всередину через спеціальний металевий зонд по методу В.Б. Прозоровського і співавт. (1978) [12].

Після введення сполук спостереження за тваринами відбувалось протягом 14дб. Основним критерієм токсичної дії була летальність тварин, але протягом експерименту реєструвалися і найбільш інтегральні показники стану організму, зокрема, маса та температура тіла, стан вовняного покриву, загальна активність тварин, їх реакція на зміни зовнішнього середовища, адекватність відповіді на різні подразники, колір слизових оболонок та інше, а також деякі вегетативні реакції (салівація, лакримация, діарея, міоз або мідріаз, судоми, зміни частоти дихання та серцевих скорочень та ін.).

Результати проведених досліджень представлені в табл.1.

Всі тварини (йдеться про білих щурів та мишей), які отримували димеодипін і дифодипін, були адинамічними протягом перших 7 - 10дб.

В перші 2 доби також спостерігались синявість видимих слизових, почастішання, аритмічне та поверхневе дихання, настовбурченість хутра, тремор усього тіла та кінцівок. На 3 добу у тварин зникла синявість видимих слизових, клінічна картина інтоксикації помітно покращувалася, тварини вживали корм та воду, але протягом 5 - 7дб дихання у тварин залишалось поверхневим, частота його дещо прискореною, зберігалась адинамія; видимі слизові оболонки та хутрянний покрив - без видимих зовнішніх змін. В подальшому, через 10 - 14дб у тварин, що виживали, всі прояви інтоксикації згасали, практично не спостерігалось будь-яких зрушень в поведінкових і рухових реакціях. Загибель тварин спостерігалась через 2 - 3 доби після введення димеодипіну та дифодипіну.

Таблиця 1

Вивчення гострої токсичності похідних дигідропіридину

Сполука	Маса тварин, г	Доза, мг/кг	Ефект*
Білі щури			
фориридон	210	1260,0	0/2
	245	1580,0	0/2
	215	2000,0	0/2
	290	2500,0	0/2
	235	3160,0	0/2
	235	3980,0	0/2
німодипін	210	5000,0	0/2
	210	1580,0	0/2
	238	2000,0	0/2
	245	2500,0	0/2
	230	3160,0	0/2
	210	3980,0	0/2
	230	5000,0	1/2
	210	6310,0	0/2
димеодипін	220	7980,0	1/2
	210	790,0	0/2
	220	1000,0	0/2
	230	1260,0	0/2
	235	1580,0	1/2
	192	2000,0	2/2
дифодипін	215	2500,0	2/2
	220	500,0	0/2
	200	630,0	0/2
	254	790,0	2/2
	240	1000,0	1/2
	215	1260,0	2/2
	214	1580,0	2/2
	210	2000,0	2/2
Білі миші			
димеодипін	23,0	1580,0	0/2
	24,0	2000,0	0/2
	21,0	2500,0	0/2
	17,5	3160,0	0/2
	19,0	3980,0	0/2
	19,0	5000,0	0/2
	21,0	6310,0	0/2
Собаки			
димеодипін	12000,0	630,0	0/2
	12500,0	790,0	2/2
	9200,0	1000,0	1/2
	10000,0	1260,0	2/2
	10500,0	1580,0	2/2

Примітка: * - відношення кількості загинув тварин до загальної кількості тварин в групі.

Як свідчать дані таблиці 1, величина ЛД₅₀ для дослідних зразків фориридону перевищує 5000,0мг/кг маси тіла, що дозволяє віднести фориридону до IV класу безпечності.

ЛД₅₀ для німодипіну складала 6900,0 (5000,0 - 9500,0)мг/кг, що дозволяє віднести дану сполуку також до IV класу безпечності.

ЛД₅₀ для димеодипіну склала 1410 (1100,0 - 1700,0)мг/кг (досліди на білих щурах), та 4470,0 (3900,0 - 5100,0)мг/кг (досліди на білих мишах), що

дозволяє віднести нову синтезовану сполуку димеодипін до III класу безпечності.

LD₅₀ для дифодипіну - 815 (660,0 - 1000,0) мг/кг, що також свідчить про належить дифодипіну до сполук III класу безпечності.

LD₅₀ димеодипіну для собак при введенні всередину склала 950,0 (760,0 - 1190,0) мг/кг маси тіла тварини. Це є також свідченням того, що димеодипін належить до сполук III класу безпечності.

За результатами вивчення гострої токсичності нових синтезованих сполук визначено, що вони відносяться до сполук III класу токсичності при введенні всередину різним видам тварин.

ПРИКЛАД 3 ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОХІДНИХ ДИГІДРОПІРИДИНУ НА ПОВІЛЬНЕ ТРАНСМЕМ- БРАННЕ ПРОНИКНЕННЯ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ

Згідно сучасних уявлень у мембранних гладеньком'язових клітинах є два типи потенціалзалежних кальцієвих каналів [14, 15]. Перший тип - це потенціалзалежні кальцієві канали, що швидко інактивуються і приймають участь в генерації потенціалу дії (ПД) і в активації швидких фазних скорочень. До другого типу відносяться повільні потенціалзалежні кальцієві канали, що не інактивуються. Вони відкриваються будь-якою деполяризацією мембрани, через них входять іони кальцію, що активують повільно зростаюче тонічне скорочення гладеньких м'язів. Серед найбільш популярних в методичному плані речовин, які викликають деполяризацію мембрани, - адреналін, серотонін, іони калію. Найбільш простою, доступною і інформативною моделлю для вивчення природи кальцієвого току є гіперкалієва деполяризація гладеньком'язових клітин судин, яка досягається шляхом підвищення концентрації іонів калію в розчині, що омиває ізольовані смужки судин.

Скорочувальну активність ізольованих судин оцінювали за впливом похідних дигідропіридину на скорочувальну реакцію м'язових смужок аорти, викликану збільшенням концентрації іонів K⁺ в розчині Кребса до 80 ммоль/л [14, 15 та ін.].

Методика дослідження скорочувальної активності ізольованої судини (аорти) на моделі гіперкалієвої деполяризації

Дослідження проводили на дузі аорти кролика, якого присипляли введенням у вушну вену по-

вітря. Ширина циркулярних м'язових смужок не перевищувала 1 мм, довжина - 10 мм. Скорочувальну активність реєстрували в режимі, близькому до ізометричного, за допомогою ємкісного датчика за модифікованим методом одинарного сахарозного містка за загальноприйнятою методикою [13]. Запис скорочувальної активності проводили на діаграмному папері швидкодіючого самописного приладу Н3021-3.

Розчин Кребса мав такий склад (в ммоль/л): NaCl - 120; KCl - 5,9; NaHCO₃ - 15,5; NaH₂PO₄ - 1,2; MgCl₂ - 1,2; CaCl₂ - 2,5; глюкоза - 11,5.

Вивчалися дві нові сполуки - димеодипін і дифодипін, а також їх найближчі структурні аналоги - форидон і німодипін.

Аналізувалася реакція м'язових смужок судини, яку було викликано збільшенням концентрації іонів калію в розчині Кребса до 80 ммоль/л. Температуру проточного розчину підтримували на рівні 36°C, рН - 7,4.

Гіперкалієвий розчин викликав стійке тонічне скорочення м'язових смужок. Після досягнення стабільного скорочення м'язових смужок аорти в розчин Кребса додавали досліджувану речовину в різних концентраціях. Час дії речовин у всіх концентраціях складав 15 хв. Через цей час знову реєстрували реакцію м'язових смужок судин на гіперкалієву деполяризацію, яку порівнювали з вихідною. Дія всіх досліджуваних речовин була незворотною (при трикратному відмиванні реакції на гіперкалієву деполяризацію не спостерігалось), тому кожна речовина розглядалась на окремій смужці судини і тільки один раз, причому кожна з наступних діючих концентрацій (зростаюча кожного разу) також досліджувалася на окремій смужці судини.

Вивчення впливу похідних дигідропіридинів на повільну трансмембранну проникність іонів кальцію на моделі гіперкалієвої деполяризації.

В ході проведених експериментів за вищеописаною методикою встановлено, що досліджувані речовини мають різний ступінь пригнічення скорочення, викликаного гіперкалієвою деполяризацією, тобто те, яке опосередковується входом іонів Ca²⁺ в гладеньком'язові клітини через потенціалзалежні Ca²⁺-канали L-типу.

Дані цих досліджень представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Вивчення впливу похідних 1,4- дигідропіридину на амплітуду скорочення м'язових смужок аорти на моделі гіперкалієвої деполяризації

Показник	Дія KCl	Концентрація дигідропіридинів, М, що досліджувалися					
		5 · 10 ⁻⁸	1 · 10 ⁻⁷	5 · 10 ⁻⁷	1 · 10 ⁻⁶	5 · 10 ⁻⁶	1 · 10 ⁻⁵
дифодипін							
M±m	49,0 ± 2,5	45,6 ± 1,4	42,7 ± 3,5	40,7 ± 3,4	31,1 ± 3,1	27,2 ± 4,6	22,4 ± 3,7
n	9	9	7	7	8	6	4
% зм.		1,69	14,6	19,5	37,4	48,2	54,2

Продовження таблиці 2

димеодипін							
M±m n % змін	51,3 ± 4,8 6					29,4 ± 3,6 5 57,2	
форидон							
M±m n % змін	47,6 ± 1,7 3					39,7 ± 1,3 3 16,7	
німодипін							
M±m n % змін	45,3 ± 3,4 5					37,3 ± 2,4 4 17,7	

Дифодипін в концентраціях 10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$ М викликав дозозалежне зменшення тонічного скорочення смужок аорти. Константа дисоціації дорівнювала $5 \cdot 10^{-6}$ М. IC_{50} для інших досліджуваних речовин визначались за методом однієї точки за допомогою пробіт-аналізу за кривою доза-ефект. Вони склали для димеодипіна - $3 \cdot 10^{-6}$ М, для форидону - $5,5 \cdot 10^{-4}$ М, для німодипіна - $5,4 \cdot 10^{-4}$ М.

Дані досліджень свідчать про те, що дія форидону і німодипіну на ізольовану смужку аорти на моделі гіперкалієвої деполяризації менш виражена, ніж дія нових синтезованих сполук дифодипіну і димеодипіну. Це говорить про більш високу (можливо, із-за тканинної вибіркості) активність нових сполук - димеодипіну та дифодипіну.

Результати представлених досліджень свідчать про вираженість специфічного фармакологічного ефекту як нових синтезованих, так і ресинтезованих сполук дигідропіридинового ряду, що проявляється впливом на проникнення іонів кальцію в клітину через повільні кальцієві канали L-типу, які відкриваються калієвою деполяризацією гладеньком'язових клітин судин.

Однак виникає запитання - досліджувані речовини опосередковують свій вплив через потенціалзалежні, чи через рецепторзалежні Ca^{2+} - канали.

Щоб отримати відповідь на це запитання, слід було застосувати аналізатор, дія якого опосередкована здебільшого входом іонів кальцію через рецепторзалежні кальцієві канали, а також вивільненням іонів кальцію з внутрішньоклітинних депо. З цією метою було обрано норадреналін, який застосовувався у концентрації 10^{-6} М/л. Норадреналін викликав невелику, короточасну деполяризацію мембрани гладеньком'язових клітин судин та стійке тонічне скорочення смужки аорти. При цьому скорочувальна реакція на дію норадреналіну після 15-ти хвилинної дії димеодипіну не змінювалася.

На відміну від описаного досліду, на моделі гіперкалієвої деполяризації після п'ятнадцятихвилинної дії димеодипіну в середньо ефективній концентрації ($5 \cdot 10^{-6}$ М/л), гіперкалієвий розчин викликав такий самий ПД, тобто величина деполяризації мембрани ГМК не змінювалась, а тонічне скорочення зменшувалось в середньому на

$51,5 \pm 2,6\%$ від вихідного значення. Така сама картина спостерігалася і при дослідженні дифодипіну за вказаною схемою з використанням норадреналіну.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що дифодипін та димеодипін пригнічують скорочення, викликане гіперкалієвою деполяризацією мембран, яке опосередковане входом іонів кальцію в ГМК через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу, але не впливають на скорочення, викликане норадреналіном, яке опосередковане як входом кальцію через рецепторзалежні кальцієві канали, так і вивільненням іонів кальцію з внутрішньоклітинних запасників.

Згідно отриманих даних встановлено, що димеодипін та дифодипін відносяться до сполук III класу токсичності, а за здатністю блокувати вхід іонів кальцію всередину клітини через повільні потенціалзалежні кальцієві канали L-типу ці нові похідні 1,4-дигідропіридину значно перевершують структурні аналоги, такі як форидон та німодипін, що нині застосовуються як антагоністи кальцію, і, таким чином, сприяють поліпшенню фармакодинамічних і фармакокінетичних властивостей, підвищенню стабільності препарату при зменшенні його токсичності.

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

1. Task Force of the European of Cardiology. Management of stable angina pectoris: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. // Eur. Heart J. - 1997. - №18. - P. 394 - 413.
2. Godfraind T. Calcium Agonists and Antagonists. - Japan.: Academic Press, 1989. - 257p.
3. Карпов Ю.А., Соболева Г.Н. Антагонисты кальция - препараты первой линии в современной кардиологии (11 часть). // Терапевтический архив, 1997. - №1. - С. 74 - 78.
4. Goldfraind T. Chental D., Salvatore S. A comparison of the Potency of Selective L-Calcium Chennel Blockers in Human Coronary and Internal Mammary Arteries Exposed to Serotonin. // J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1992. - V263. - N1. - P. 112 - 122.
5. Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. 5-Th Report. // Arch. intern. Med. - 1993. - V153. - P. 154 - 183.

6. Кастрон В.В., Витолинь Р.О., Дубур Г.Я. Синтез и фармакологическая активность 1,4-дигидропиридинов. // Хим. фарм. ж-л. - 1990. - №6. - С. 14.
7. Нетяженко В.З., Паламарчук Ю.В. Лікування стенокардії антиангінальними засобами. // Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. Актуальні питання діагностики і лікування стенокардії. - Київ: ТОВ "Джулія", 1997. - №4. - С. 162 - 170.
8. Нетяженко В.З., Колодченко Є.В. Блокатори кальцієвих каналів. // Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. Актуальні питання діагностики і лікування гіпертонії. - Київ: ТОВ "Джулія", 1997. - №2. - С. 140 - 151.
9. Нетяженко В.З. Роль амлодипіну в лікуванні стенокардії. // Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. Актуальні питання діагностики і лікування стенокардії. - Київ: ТОВ "Джулія", 1997. - №4. - С. 172 - 174.
10. Воронков Л.Г. Амлодипін як засіб вибору. // Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. Актуальні питання діагностики і лікування серцевої

- недостатності. - Київ: ТОВ "Джулія", 1997. - №3. - С. 188 - 192.
11. Одинец А.Г., Симхович Б.З., Кименс А.А., Рубур Г.Я. Фармакологические эффекты и механизмы действия препаратов 1,4-дигидропиридинового ряда на сердечно-сосудистую систему. // Хим. фарм. ж-л. - 1986. - №12. - С. 1443 - 1451.
12. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. // Фарм. и токс. - 1978. - №4. - С. 497 - 502.
13. Блаттнер Р., Классен Х., Денерт Х., Деринг Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц. - М.: Мир, 1983. - 206с.
14. Гокина Н.И. О природе электромеханической связи в гладких мышцах мозговых артерий. // Физиол. ж-л. - 1982. - Т. 28. - №2. - С. 119 - 124.
15. Гурковская А.В., Шуба М.Ф., Бурый В.А. О природе электромеханической связи в гладкомышечных клетках легочной артерии. // Физиол. ж-л. СССР. - 1983. - Т. 69. - №8. - С. 1065 - 1073.