

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО

На правах рукопису

ОНУФРИЕНКО ОКСАНА ВІКТОРІВНА

УДК: 615.214+615.46+547.893

**Нейротропна активність в ряду нових 3-ацилокси-1,2-
дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів**

14.03.05 - фармакологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
доктор біологічних наук, професор
Карасьова Тамара Леонідівна

Одеса - 2012

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1	Загальна характеристика похідних 1,4-бенздіазепінів.....	12
1.1.2.	Побічні ефекти бенздіазепінів.....	18
1.2.	Фармакологічні властивості 3-заміщених 1,4-бенздіазепінів...	22
1.3.	ГАМК-ергічні снодійні засоби.....	26
1.3.1.	Нейрохімічні механізми сну.....	30

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1.	Матеріали.....	34
2.2.	Методи, які застосовувались у роботі	
2.2.1.	Вивчення наявності міорелаксації за методом "стрижню, що обертається" у дослідах на мишах.....	35
2.2.2.	Вивчення орієнтовно-дослідницької поведінки за методом "відкритого поля" у дослідах на мишах і щурах.....	35
2.2.3.	Вивчення анорексигенної активності у дослідах на щурах...	36
2.2.4.	Вивчення антидепресивної активності за методом "форсованого плавання" за Порсолтом у дослідах на мишах	37
2.2.5.	Вивчення протисудомної активності за методом "антагонізму з коразолом" у дослідах на мишах.....	37
2.2.6.	Вивчення снодійних властивостей за методом "потенціювання снотворної дії барбітуратів" у дослідах на мишах.....	38

2.2.7.	Вивчення снодійних властивостей за методом "пролонгування дії барбітуратів" у дослідах на мишах.....	38
2.2.8.	Вивчення снодійної активності за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ в нормі.....	39
2.2.9.	Вивчення снодійної активності за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ на фоні введення резерпіну.....	40
2.2.10.	Метод вивчення впливу на пам'ять у щурів у водному лабіринті Морріса.....	40
2.2.11.	Вивчення антигіпоксичних властивостей за методом "гіпоксії з гіперкапнією у гермооб'ємі " у дослідах на мишах.....	41
2.2.12.	Вивчення гострої токсичності за методом Літчфілда і Уїлкоксона у дослідах на мишах.....	42
2.2.13.	Методика "Конфліктна ситуація" Вогеля (модифікація Вороніної) в дослідах на щурах при внутрішньоочеревинному введенні.....	42
2.2.14.	Вивчення толерантності в дослідах на мишах при тривалому введенні протягом 14 і 30діб.....	44
2.2.15.	Метод радіолігандного зв'язування з бездіазепіновими рецепторами.....	46
2.2.16.	Статистична обробка результатів.....	46

РОЗДІЛ 3. ВИЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ПОХІДНИХ 3-АЦИЛОКСИ-1,2-ДИГІДРО-3H-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ

3.1.	Вивчення гіпноседативних і анксиолітичних властивостей нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів у порівнянні з циназепамом та 3-гідроксифеназепамом.....	47
------	---	----

- 3.2. Вивчення протисудомної активності нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, виявлення значення (ED₅₀) та їх впливу на пам'ять та апетит щурів..... 60

РОЗДІЛ 4. ВИЧЕННЯ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ РОЗВИТКУ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ЦИНАЗЕПАМУ (ПРЕПАРАТУ ЛЕВАНА® ІС) ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ 3-ГІДРОКСИФЕНАЗЕПАМУ

- 4.1. Вивчення розвитку толерантності до циназепаму (препарату Левана® ІС) при тривалому введенні мишам протягом 14 та 30 діб..... 71
- 4.2. Вивчення розвитку толерантності до основного метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму при хронічному введенні 14 та 30 діб..... 77

РОЗДІЛ 5 ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ГІПНОСЕДАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЦИНАЗЕПАМУ (ЛЕВАНА® ІС) ТА 3-ГІДРОКСИФЕНАЗЕПАМУ, НЕЙРОФІЗІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ЇХ ВПЛИВУ НА СТРУКТУРУ СНУ

- 5.1. Порівняльне вивчення снодійної, протисудомної, міорелаксантичної, антигіпоксичної дії циназепаму та основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму..... 83
- 5.2. Вплив циназепаму (препарат Левана® ІС) та основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму на структуру сну щурів за даними ЕКоГ на резерпіновій моделі..... 89

РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ..... 97

ВИСНОВКИ..... 108

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ..... 110

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БДА – бенздіазепінові анксиолітики
БДР – бенздіазепінові рецептори
ПБДР – периферичні бенздіазепінові рецептори
ЦБДР – центральні бенздіазепінові рецептори
ГАМК – гамма аміномасляна кислота
ГАМК_A – рецептори гамааміномасляної кислоти підтипу А
ED₅₀ – доза, що викликає 50%-й ефект
ТІ – терапевтичний індекс
ЦНС – центральна нервова система
non-Rem-sleep – повільнохвильовий (ортодоксальний) сон
Rem-sleep – швидкий сон (парадоксальний)
ω₁ – підтипи БД-рецепторів
ω₂ – підтипи БД-рецепторів
ССК – холецистокінінові рецептори
5-НТ – серотонін
W – неспання
ARAS – активуюча система
АГ – антигіпоксичний ефект
log P – константа розподілу у системі "октанол-вода"
ЕКоГ – електрокортикограма
K_i - константа інгібування зв'язування з рецептором

ВСТУП

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Похідні 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів мають різноманітні нейротропні властивості (анксіолітичні, протисудомні, снодійні, анорексигенні, антидепресивні, аналгетичні). Фармакологічні ефекти цих речовин обумовлені, головним чином, їх зв'язуванням з бенздіазепіновими, брадикініновими, холецистокініновими (ССК) рецепторами двох підтипів - ССК₁ і ССК₂ [1].

Процес створення нових лікарських засобів 1,4-бенздіазепінової структури базується на великому матеріалі зі зв'язку будова – властивості – активність, метаболізму і фармакокінетики, а також уявленнях про молекулярні механізми дії цих речовин [2, 3].

У Фізико-хімічному інституті (ФХІ) ім. О.В. Богатського НАН України створений новий снодійний засіб циназепам (препарат Левана[®] ІС) (3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он) [4], який відрізняється від інших бенздіазепінів за снодійною дією (нитразепам, флунітразепам, триазолам, мідазолам) [5] тим, що не змінює структуру сну [6].

Розлади сну відносяться до найменш специфічних порушень нервово - психічної діяльності. Поряд з неврастенічними, депресивними та іншими порушеннями "невротичного рівня" вони можуть входити до структури усіх, без винятку, психічних (депресій, шизофреній, деменцій) і соматичних захворювань [7]. Однак серед великої кількості снодійних препаратів немає жодного, який би не мав побічної дії (толерантність, міорелаксація, ефект після дії) [8, 9].

Більшість снодійних засобів, які використовують для лікування розладів сну: похідні бенздіазепінів, хіназоліни (метаквалон), піперидиндіони (глютетимід), етаноламіни (донорміл), барбітурати змінюють фізіологічну природу сну за рахунок зниження тривалості швидкого сну (REM-sleep) [9],

тоді як небенздіазепінові гіпнотики (зопіклон, золпідем) мало впливають на фази сну [10].

Основним метаболітом циназепаму є 3-гідроксифеназепам (7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он), який за анксиолітичною, протисудомною та снодійною активністю подібний до циназепаму [11], але на сьогодні не вивченим залишається його вплив на структуру сну. Невирішеним залишається також питання про вплив циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму на структуру сну в умовах патології.

Проблема толерантності до психотропних препаратів (снодійних, нейролептиків, анксиолітиків та ін.) є однією з актуальних у фармакології та медичній хімії [12]. Клінічні та експериментальні спостереження свідчать про можливість розвитку толерантності до бенздіазепінових препаратів, яка залежить від дози, тривалості введення, виду тварин і встановленого прояву [13]. Однак процеси розвитку толерантності до циназепаму та його метаболіту, 3-гідроксифеназепаму, до теперішнього часу не були вивчені.

Актуальним є пошук сполук з нейротропною активністю серед нових синтезованих 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, які володіли б менш вираженою побічною дією (міорелаксацією, атаксією, порушенням пам'яті).

Зв'язок роботи з науковими програмами планами, темами.

Дисертаційна робота є частиною планової науково-дослідницької роботи ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України та виконувалася за постановою бюро Відділення хімії НАН України за темами: "Синтез, структура, властивості та молекулярне розпізнавання центральними та периферичними рецепторами біологічно активних гетероциклічних сполук та пептидоміметиків" (№ держреєстрації 0105U002634, 2005–2009 р.р.) та "Структурно-функціональне вивчення біологічно активних сполук та

каталітичних систем та матеріалів для оптоелектроніки" (№ держреєстрації 0107U001300, 2007–2011 р.р.). Дисертант є співвиконавцем цих тем.

Мета і завдання роботи. Метою роботи є встановлення зв'язку структура - нейротропна активність сполук у ряду нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепіну, порівняльна оцінка гіпнosedативних властивостей циназепаму та його основного метаболіту - 3-гідроксифеназепаму.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити спектр фармакологічної активності 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів (гіпнosedативну, протисудомну, анксиолітичну, вплив на пам'ять та апетит щурів) визначити значення ED₅₀ за основними видами дії, встановити показники гострої токсичності (LD₅₀).

2. Дослідити толерантність до циназепаму (препарату Левана[®] ІС) при тривалому введенні мишам протягом 14 та 30 діб.

3. Дослідити толерантність до метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму при хронічному введенні мишам протягом 14 та 30 діб.

4. Дослідити за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження вплив на структуру сну метаболіту циназепаму - 3-гідроксифеназепаму.

5. Дослідити вплив циназепаму та його метаболіту - 3-гідроксифеназепаму, на цикл "спанья - неспанья" на інтактних тваринах та на щурах з попереднім введенням резерпіну.

Об'єкт дослідження: пошук та фармакологічне вивчення нових нейротропних засобів

Предмет дослідження: аналіз нейротропної та гіпнosedативної активності ГАМК-ергічних сполук – похідних 1,4-бенздіазепінового ряду.

Методи дослідження – фармакологічні, нейрофізіологічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Серед нових сполук - 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів виявлено сполуки, які у низьких дозах не поступаються циназепаму (препарату Левана[®] ІС) за протисудомною (0,03-0,12 мг/кг) і седативною (0,25-0,40 мг/кг) активністю при внутрішньоочеревинному введенні. Встановлено, що гіпноседативна та протисудомна активність залежить від структури та фізико-хімічних властивостей вивчених сполук: із збільшенням довжини ланцюга ацильного фрагменту та ліпофільності гіпноседативна та протисудомна активність зменшуються.

Вивчені сполуки володіють менш вираженими побічними ефектами (міорелаксацією, порушенням пам'яті).

У порівняльному аспекті досліджено нейрофізіологічну дію циназепаму та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму та їх вплив на показники циклу "спання – неспання" у інтактних тварин та у щурів з попереднім введенням резерпіну. Показано, що 3-гідроксифеназепам не змінює структуру сну. Вперше на основі нейрофізіологічного аналізу встановлено, що у щурів з синдромом порушень циклу "спання - неспання", викликаного застосуванням резерпіну, циназепам і 3-гідроксифеназепам нормалізують тривалість фази поверхневого повільнохвильового сну, збільшують тривалість фази парадоксального сну та знижують його фрагментованість.

Проведене порівняльне дослідження толерантності до циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму при тривалому введенні 14 і 30 діб показало, що при тривалому введенні циназепаму мишам зберігається снодійна дія і розвивається толерантність за седативною дією. На відміну від циназепаму у 3-гідроксифеназепаму розвивається толерантність за снодійною дією і спостерігається відновлення седативної активності на 30-ту добу введення.

Практичне значення одержаних результатів. Проведене дослідження дозволило розширити і поглибити уявлення про фармакологічні властивості нових похідних 7-бром-5-арил-3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, обґрунтувати доцільність їх можливого застосування у медичній практиці для лікування порушень сну, для попередження або зменшення судом, що виникають при різних нападах епілепсії.

Аналіз отриманих даних дає підґрунтя вважати досліджені похідні 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они перспективними сполуками для подальшого пошуку і вивчення речовин з нейротропною активністю на основі зв'язку структура – біологічні властивості – механізм дії.

Результати роботи також можуть бути використані в навчальному процесі при викладанні курсів з фармакології, медичної хімії, фізіології у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури, виконані всі експериментальні дослідження. Проведено математичну обробку одержаних результатів, оформлено їх у вигляді таблиць і рисунків, здійснено аналіз результатів та опубліковано основні положення дисертації. Автор висловлює глибоку вдячність за допомогу при проведенні нейрофізіологічних методів дослідження зав. кафедри біофізики, інформатики та медичної апаратури Одеського національного медичного університету, д.мед.н., професору Л. С. Годлевському, при проведенні радіолігандних досліджень - к.х.н., ст.н.с. В. І. Павловському, м.н.с., к.х.н. І. А. Бойко відділу медичної хімії ФХІ ім. О. В. Богатського НАН України.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на: національній науково-технічній конференції з міжнародною участю "Актуальні проблеми синтезу і створення нових

біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів" (Львів, 2008), III всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених "Хімічні проблеми сьогодення" (Донецьк, 2009), V міжнародній науково-практичній конференції "Наукові дослідження – теорія та експеримент 2009" (Полтава, 2009), IV-th International young Scientists conference "Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution" (Odessa, 2009), V міжнародній науково-практичній конференції "Розвиток наукових досліджень 2009" (Полтава, 2009), 82-й міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених "Теоретические и практические аспекты современной медицины" (Сімферополь, 2010), науковій конференції, присвяченій 100-річчю від дня народження доцента Лариси Юхимівни Бешевлі (Одеса, 2010), VII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2011), XI-ому науково-практичному семінарі "Научные основы создания лекарственных средств" (Гурзуф, 2011), IV-ому Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 друкованих праць, з них 4 статті у фахових наукових журналах і тези 10 доповідей у збірниках наукових конференцій.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика похідних 1,4-бенздіазепінів

Серед анксиолітичних засобів похідні 1,4-бенздіазепінового ряду продовжують посідати домінантне положення та виявляються найбільш широко застосовуваними препаратами. За своєю фармакологічною дією вони відносяться до депримуючого типу нейротропних засобів [14, 15], впливають на центральну нервову систему, виявляючи ефективну дію при невротичних станах, але на відміну від нейролептиків не мають антипсихотичної дії та мало впливають на вегетативні функції [16, 17].

Спектр фармакологічної дії бенздіазепінів характеризується значною широтою і різноманітністю фармакологічних ефектів. Анксиолітики бенздіазепінового ряду проявляють анксиолітичну, снодійну, седативну, протисудомну, м'язоворозслаблюючу активність.

Крім того, багато бенздіазепінових анксиолітиків (БДА) володіють антифобічними, активуючими, антидепресивними, вегетостабілізуючими, антигіпоксичними, гіпотензивними, антиаритмічними, протибольовими і деякими іншими властивостями. [18] Співвідношення цих властивостей у спектрі дії кожного препарату визначає особливості його психотропного ефекту і побічну дію.

Завдяки своїм властивостям бенздіазепіни широко використовуються у різних галузях медицини: клініці нервово-психічних розладів, терапії, хірургії, гінекології, акушерстві, дерматології та ін.

Бенздіазепіни ефективні при безсонні, збудженні, панічних станах, фобіях, нападах страху, нічних страхах і сомнамбулізмі (у дітей), м'язових спазмах, викликаних різними причинами, у тому числі при правці та церебральному паралічу, епілепсії, анестезії, для премедикації при підготовці до хірургічного втручання [19]. Вони застосовуються також при різноманітних екстремальних ситуаціях, у здорових людей, діяльність яких

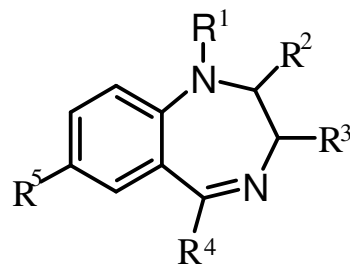
пов'язана з роботою у надзвичайних умовах: військовослужбовці, рятувальники, робітники спецслужб, спортсмени, альпіністи.

Ці сполуки мають високу фармакологічну активність та є малотоксичними [20].

За своєю хімічною будовою сполуки 1,4-бенздіазепінового ряду відносяться до азотовмісних гетероциклів з різноманітними замісниками R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 загальна формула яких може бути представлена наступним чином (деякі з численних комерційних сполук наведені в таблиці 1.1):

Таблиця 1.1

Представники препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду



(1.1)

Препарат	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
Хлордіазепоксид	H	NHCH ₃	H	C ₆ H ₅	Cl
Нордіазепам	H	O	H	C ₆ H ₅	Cl
Оксазепам	H	O	H	C ₆ H ₅	Cl
Медазепам	H	O	H	C ₆ H ₅	Cl
Діазепам	CH ₃	H	H	C ₆ H ₅	Cl
Темазепам	CH ₃	O	H	C ₆ H ₅	Cl
Сулазепам	CH ₃	O	OH	C ₆ H ₅	Cl
Лоразепам	CH ₃	S	H	C ₆ H ₄ Cl	Cl
Флюразепам	CH ₃ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	H	OH	C ₆ H ₄ F	Cl
Празепам	Циклопропілметил	O	H	C ₆ H ₅	Cl
Гідазепам*	CH ₂ CONHNH ₂	O	H	C ₆ H ₅	Br
Бромазепам	H	O	H	C ₆ H ₄ N	Br
Феназепам*	H	O	H	C ₆ H ₄ Cl	Br

Нітразепам	H	O	H	C ₆ H ₅	NO ₂
Клоназепам	H	O	H	C ₆ H ₄ Cl	NO ₂
Флунітразепам	CH ₃	O	H	C ₆ H ₄ F	NO ₂
Німетазепам	CH ₃	O	H	C ₆ H ₅	NO ₂
Левана [®] ІС* (циназепам)	H	O	OSO(CH ₂) ₂ COOH	C ₆ H ₄ Cl	Br

Примітка: *Ці сполуки були вперше синтезовані в Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

В теперішній час більш ніж 40 препаратів, похідних бенздіазепинів, використовуються, як ефективні лікарські засоби [20].

Всі препарати бенздіазепінової структури володіють виразним анксиолітичним ефектом, і за домінуючим компонентом в спектрі фармакологічної активності БДА можна розділити на 3 групи:

1. Бенздіазепіни з переважанням анксиолітичної дії (феназепам, гідазепам, циназепам, хлордіазепоксид, діазепам, оксазепам, лоразепам, бромазепам, клозепат, медазепам, алпразолам, клобазам, тофізопам та ін.).

2. Бенздіазепіни з переважанням снодійної дії (феназепам, циназепам, нітразепам, флунітразепам, флуразепам, діазепам, лоразепам, хлордіазепоксид, тазепам та ін.).

3. Бенздіазепіни з переважанням протисудомної дії (феназепам, клоназепам, діазепам, нітразепам, клобазам) [20].

БДА мають високу ліпофільність, швидко всмоктуються з шлунково-кишкового тракту і досягають максимуму концентрації в крові. За показниками абсорбції, часу полуемілінації, типу метаболізму, характеру метаболітів БДА поділяють на три групи: препарати з коротким часом життя і, відповідно, дії (тріазолам, мідазолам, лоразепам), БДА з середньою тривалістю ефекту (хлордіазепоксид, темазепам, алпразолам, лорметазепам, лопразолам, тощо) і препарати тривалої дії з довгим строком життя

(феназепам, циназепам, діазепам, нітразепам, флунітразепам та ін.). Для тривалості ефекту БДА істотне значення мають активні метаболіти, що утворюються в організмі в процесі біотрансформації препарату, що вводиться [22, 23].

Дія БДА спрямована, насамперед, на структури лімбічного мозку, гіпоталамусу і кори, тобто на найважливіші ланки системи, де здійснюється тривала активація нейронів, що викликається зовнішніми імпульсами.

Механізм дії БДА визначається їх здатністю полегшувати постсинаптичну дію γ -аміномасляної кислоти (ГАМК). В кінці 1970-х років у мозку і на периферії були виявлені місця специфічного зв'язування БДА - бенздіазепінові рецептори (БДР), які в центральній нервовій системі (ЦНС) локалізовані на синаптичній мембрані ГАМК-ергічних нейронів і знаходяться в безпосередньому зв'язку з ГАМК_A рецептором. БДР і ГАМК_A рецептор, а також барбітуратова ділянка зв'язування, стероїдний компонент утворюють супрамолекулярний комплекс хлорного каналу [24].

Розрізняють БДР-1 і БДР-2 підтипи, що включають α , β , γ та ін субодиниці [25, 26]. Підтипи БДР іноді називають ω - рецепторами, виділяють БДР-1 (ω -1) і БДР-2 (ω -2) підтипи [27]. ГАМК_A-рецептори – це пентамерні ансамблі, що складаються з п'яти субодиниць та їх ізоформ (α_1 – α_6 , β_1 – 3, γ_1 -3,), із яких α -субодиниця має особливе значення. Рецептори, що містять α_5 -субодиницю представлені в 5% усіх ГАМК_A-рецепторів мозку, вони представлені у гіпокампі – структурі, пов'язаній з процесами навчання та пам'яті, і вони складають там до 20% усіх ГАМК_A-рецепторів. Відомо, що α_1 субодиниця ГАМК_A-рецептору відповідає за седацію і міорелаксацію, α_2 і α_3 субодиниці – за анксиолітичну і протисудомну активність; α_5 – за когнітивні процеси (увагу, навчання, пам'ять) [28, 29].

У схематичному вигляді механізм дії класичних БДА, полягає в тому, що речовина зв'язується з БДР, який алостерично пов'язаний з ГАМК_A рецептором. Змінюється конформація ГАМК_A рецептора, посилюється частота і тривалість відкриття хлорних каналів, збільшується проникливість

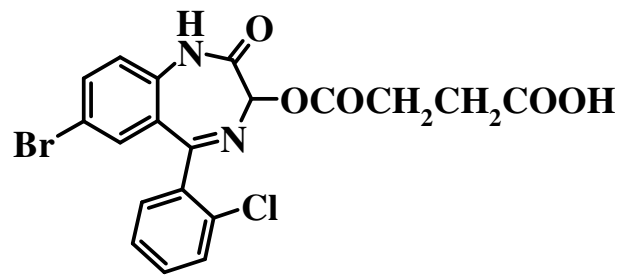
нейрональної мембрани для іонів хлору, які більш активно проходять всередину нейрона. Відбувається гіперполяризація мембрани і зниження нейрональної збудливості. Зв'язування порушується при неврозах та панічних розладах [11, 20].

Така взаємодія забезпечує загальні ефекти БДА - анксиолітичний, протисудомний, а в високих дозах - амнезуючий та міорелаксантий. Посилення гальмівного впливу ГАМК призводить до зниження активності катехоламінергічних нейронів ЦНС, що може визвати снодійну і стрес-протекторну дію, серотонінергічних нейронів головного мозку, пов'язаних з системою покарання, і холінергічних нейронів у ретикулярній формації і спинному мозку, що може вплинути на міорелаксантну та протисудомну дію БДА [20, 30].

Прикладом активного прямого агоніста БДР є створений у Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України препарат бенздіазепінової структури - феназепам [11], який вже більш ніж 20 років з успіхом застосовується у лікувальній практиці. Крім того у Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського створено ще два оригінальних препарати: селективний анксиолітик гідазепам і гіпнosedативний засіб циназепам [2, 4].

Гідазепам (1-гідразин-карбонілметил-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он) дозволений для широкого застосування у лікувальній практиці. Показаннями до застосування гідазепаму є ті ж захворювання, що і для інших БДА. Разом з тим, у зв'язку з майже повною відсутністю міорелаксантної, седативної і амнезируючої дії, гідазепам можна призначати амбулаторно в денний час, а також ослабленим хворим, особам похилого віку та дітям [11, 31].

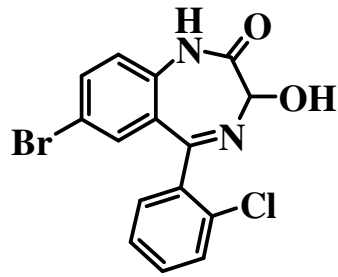
Циназепам - це нове похідне 1,4-бенздіазепіну, яке було синтезовано у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України. За хімічною структурою це 3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(орто-хлор)феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он.



(1.2)

Показано, що циназепам має переваги перед препаратами цього типу дії, поєднуючи потужні снодійні, седативні і анксиолітичні ефекти. Циназепам у дозі 1 мг/кг істотно впливає на параметри сну щурів, причому особливістю снодійної дії препарату, на відміну від інших снодійних препаратів групи бенздіазепінів (феназепам, нітразепам, флунітразепам) є його здатність збільшувати не тільки глибокий повільнохвильовий, але і парадоксальний сон при незмінній кількості його епізодів, що робить його снодійний ефект більш фізіологічним [4, 32]. Тобто, циназепам має здатність активувати системи, що беруть участь у підтримці як глибокого повільнохвильового, так і парадоксального сну. Проведені раніше дослідження з використанням стандартних методів фармакологічної оцінки гіпноседативних засобів показали, що за виразністю і глибиною снодійної дії циназепам не поступається референсному препарату зопіклону [6, 33].

Показано, що метаболіт циназепаму 3-гідроксифеназепам (7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2он) за анксиолітичною і снодійною дією подібний до циназепаму [5, 11]. Проте 3-гідроксифеназепам переверщує циназепам за протисудомною активністю і проявляє більш виразні міорелаксанти властивості. Спектр психофармакологічних властивостей циназепаму, мабуть, в суттєвій мірі визначається властивостями його активного метаболіту 3-гідроксифеназепаму [5, 11].



3-гідроксифеназепам (1.3)

Незважаючи на різноманітність та ефективність існуючих анксиолітиків, дослідження, які спрямовані на пошук нових сполук серед цієї групи при менш виражених побічних ефектів, продовжуються.

1.1.2. Побічні ефекти бенздіазепінів

До побічних ефектів бенздіазепінів відносяться толерантність, міорелаксація, атаксія (порушення координації руху), лікарська залежність, амнезія (порушення пам'яті), в тій чи іншій мірі вони можуть викликати подальшу (денну) сонливість [8, 20].

При використанні деяких БДА у високих дозах, або протягом тривалого часу, може спостерігатися порушення мнестичних функцій, що виражається, перш за все, в амнезії на поточні та минулі події, зниженні уваги, погіршенні процесів відтворення і навчання [34]. Одним з механізмів порушення пам'яті після введення БДА є порушення соматостатинергічної нейропередачі [20, 35].

Проблема толерантності до психотропних препаратів і лікарської залежності від них є однією з найбільш актуальних проблем сучасної фармакології [12, 13]. В експериментальних та клінічних дослідженнях широко вивчаються особливості та механізми розвитку толерантності до різних психотропних препаратів і лікарської залежності від них (опіоїди, барбітурати, етанол, анксиолітики та ін) [13, 36].

Відомо про можливість розвитку толерантності до бенздіазепінових препаратів в клініці, а в деяких випадках і залежності від них [37]. Звикання розвивається практично до всіх бенздіазепінів і залежить від використовуваної дози, тривалості введення, виду тварин та ін. [12].

Відомо, що при тривалому введенні (хлордіазепоксиду, діазепаму, нитразепаму, оксазепаму) спостерігається зниження активності препаратів [38].

При тривалому введенні феназепаму спостерігається чітке розшарування транквілізуючого і седативного ефекту. Це розшарування виражається, з одного боку, в послабленні пригнічуючої дії препарату, а з іншої сторони - у збереженні транквілізуючого ефекту [11]. Неоднозначна зміна седативного і транквілізуючого ефекту спостерігається і у інших бенздіазепінів, зокрема у лоразепаму, при їх тривалому застосуванні, однак відзначається більш повільним у порівнянні з феназепамом розвитком толерантності за седативною дією [39].

Експериментальні дослідження показали, що в процесі тривалого введення феназепаму [40], бромазепаму [41], гідазепаму [2] та інших бенздіазепінів спостерігається розвиток толерантності за міорелаксантаю та седативною дією. Відзначається, що толерантність і залежність розвиваються значно меншою мірою відносно селективних агоністів бенздіазепінових рецепторів 1 типу (БДР - 1) (алпідем, золпідем, квазепам) і часткових агоністів БДР (бретазеніл), ніж повних агоністів (лоразепам) [13].

З іншого боку, дані поведінкових і електрофізіологічних експериментів свідчать на користь концепції про поступовий розвиток гіпофункції ГАМК-системи мозку, що, як вважають деякі дослідники, є основою для прояву толерантності до бенздіазепінів і залежності від них при їх тривалому введенні [13, 42].

Відомо, що толерантність до бенздіазепінів розвивається в першу чергу за амнестичним, епілептичним, протисудомним, седативним, міорелаксантичним, а потім за анксиолітичним ефектом [13]. Характерними для звикання до бенздіазепінів є також порушення циркадного ритму сну-неснування з нічними пробудженнями [43].

Деякі автори відзначають, що в дослідженнях із зміни зв'язування з БДР селективних лігандів ГАМК_AR при хронічному застосуванні бенздіазепінів

отримано неоднозначні і суперечливі результати [44]. Значне число публікацій вказують на збільшення або зменшення, або відсутність, виразних відмінностей у параметрах зв'язування мічених H^3 лігандів БДР при їх хронічному введенні [13, 45]. Передбачається, що відмінності у розвитку толерантності до лігандів бенздіазепінових рецепторів можуть залежати від їх селективної дії на окремі структури мозку [13, 46].

Однак механізм толерантності до бенздіазепінів поки недостатньо ясний. Деякі автори припускають, що механізм толерантності може бути обумовлений зміною біотрансформації при тривалому введенні, з іншого боку - підвищенням адаптації клітин ЦНС до постійної присутності в організмі анксиолітиків [47]. З приводу розвитку толерантності до бенздіазепінів є й інші точки зору, зумовлені зміною їх фармакокінетики і метаболізму при тривалому введенні [43]. Толерантність до бенздіазепінів більш пов'язана з фармакодінамічними механізмами (зміна активності рецепторів), ніж з метаболічними [13, 48]. Таке припущення підтверджується результатами деяких експериментів, що показують відсутність адаптивних процесів у бенздіазепінових рецепторах і в активності хлорного іонофора у мозкових структурах, що містять перший підтип БДР (наприклад, мозочок) [45, 49]. Відповідно, хронічне введення лоразепаму знижувало число ділянок зв'язування бенздіазепінів в корі мозку мишей з часом, і це корелювало з розвитком толерантності, атаксії [50]. Зниження бенздіазепін-зв'язуючих ділянок у гіпоталамусі і гіпокампі було значно менш виразним, ці зміни були відсутні у мозочку та середньому мозку. Була висунута гіпотеза про те, що перший підтип БДР важко адаптується до хронічної стимуляції, викликаній бенздіазепінами [51, 52], і це призводить до значно більш слабого розвитку толерантності, яка виявлена у селективних агоністів першого підтипу БДР. Однак інші отримані дані не узгоджуються з таким висновком [53].

Так, повідомлялося, що алпідем та золпідем підвищують перехресну толерантність до діазепаму та мідазаламу на моделях зміни рухової активності щурів і судом, індукованих ізоніазидом [54]. Більш того, введення

флуразепама протягом чотирьох тижнів значно знижує зв'язування міченого тритієм золпідему в корі щурів, у мозочку та гіпокампі. У зв'язку з відсутністю успіхів у пошуках спільних адаптивних процесів, які спостерігаються у бенздіазепінових рецепторах у випадках хронічного введення лігандів бенздіазепінових рецепторів, зусилля багатьох дослідників були сконцентровані на адаптивних процесах, що розвиваються у субодиниці ГАМК_A рецепторного комплексу [55]. Отримані дані не є однозначними, і їх важко інтерпретувати. Наприклад, зниження рівнів м-РНК [54, 56] відповідальної за синтез альфа-1 субодиниці ГАМК_A рецептора в церебральній корі, спостерігається після введення щурам або мишам діазепаму або лоразепаму. Оскільки альфа-1 субодиниця є, ймовірно, ключовим компонентом бенздіазепінового рецептора, то зниження рівня вмісту м-РНК, відповідальної за її синтез, призведе до зменшення експресії першого типу БДР. Однак, отримані до теперішнього часу результати свідчать про те, що не виявлено кореляції між даунрегуляцією рецептора та змінами у концентрації м-РНК. Деякі автори виявили, що у корі мишей вміст м-РНК знижується через 14 діб після введення лоразепаму, в той час як зв'язування з рецептором знижується вже на 7 добу [54, 55].

Роль фармакокінетичних процесів слід завжди брати до уваги, коли розглядаються зміни в активності лікарських засобів після їх тривалого прийому [48, 50]. Наприклад, толерантність до барбітуратів метаболічно індукується, тому що ці препарати посилюють свій власний метаболізм [13, 57]. З цієї точки зору, посилення метаболізму препарату, також як і зміни в процесах абсорбції та елімінації, можуть бути відповідальними за розвиток толерантності до лігандів бенздіазепінових рецепторів [48]. Однак більшість експериментальних даних не підтверджують це припущення. Виявилось, що концентрація діазепаму та імідазенілу, а також їх метаболітів, у мозку тварин була однаковою, як при гострому, так при хронічному введенні цих сполук протягом 14 діб [54, 57].

У ряді робіт показано, що, на відміну від повних, часткові агоністи ГАМК_A – рецепторного комплексу виявляють лише частину спектра фармакологічної активності бенздіазепінів, зберігаючи деякі клінічні та поведінкові ефекти (снодійний, анксиолітичний) при слабкому прояві міорелаксації або протисудомної дії. Так, при введенні часткових агоністів сармазенілу, алпідему, золпідему, змішаного агоніста абекарнілу спостерігали уповільнений розвиток толерантності і слабкі ознаки синдрому відміни у лабораторних тварин порівняно до ведення повних агоністів [13, 48].

При довготривалому прийомі похідних 1,4-бенздіазепіну може виникати не тільки толерантність, але і лікарська залежність (фізична і психічна), тому бажано застосовувати їх не довше чотирьох тижнів [58].

Незважаючи на низьку токсичність та добру переносимість, при безконтрольному тривалому застосуванні БДА, особливо у високих дозах, може з'явитися небезпека розвитку синдрому відміни, а також психологічної та фізичної залежності [59]. Синдром відміни може характеризуватися загостренням загальної хвороби, появою депресивних розладів, безсонням, тахікардії та інших. У зв'язку з цим БДА слід відміняти поступово.

1.2. Фармакологічні властивості 3-заміщених 1,4-бенздіазепінів

Похідні 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів володіють різноманітними нейротропними властивостями (анксиолітичними, снодійними протисудомними, анорексигенними, антидепресивними, анальгетичними) [1, 60].

Фармакологічні властивості цих речовин обумовлені головним чином зв'язуванням їх з бенздіазепіновими і з холецистокініновими рецепторами двох підтипів - ССК₁ і ССК₂ [61, 62]. Представник таких сполук девазепід вже пройшов стадію клінічних досліджень в якості лікувального засобу аліментарного ожиріння, а також при тривожних та панічних станах з різною етіологією [60, 61].

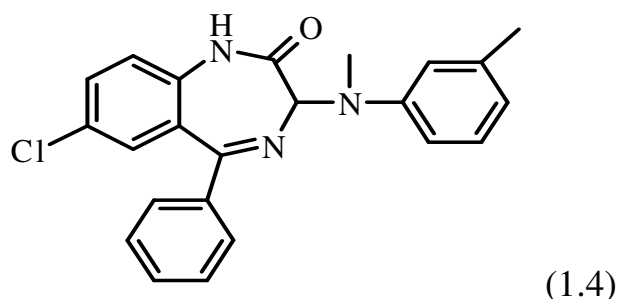
Автори [60], які вивчали протисудомні, анксиолітичні, седативні, міорелаксантні властивості похідних 3-аміно-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, показали, що практично всі сполуки володіють анксиолітичною активністю, а найбільш активні сполуки за силою дії не поступаються діазепаму.

Відкриття вченими фірми Merck того факту, що природний антибіотик асперліцин, який має у своїй будові 1,4-бенздіазепіновий фрагмент, є антагоністом ССК₁ рецепторів, дало поштовх до вивчення 3-заміщених бенздіазепінових структур як потенційних лігандів холецистокінінових ССК₁ та ССК₂ рецепторів [63].

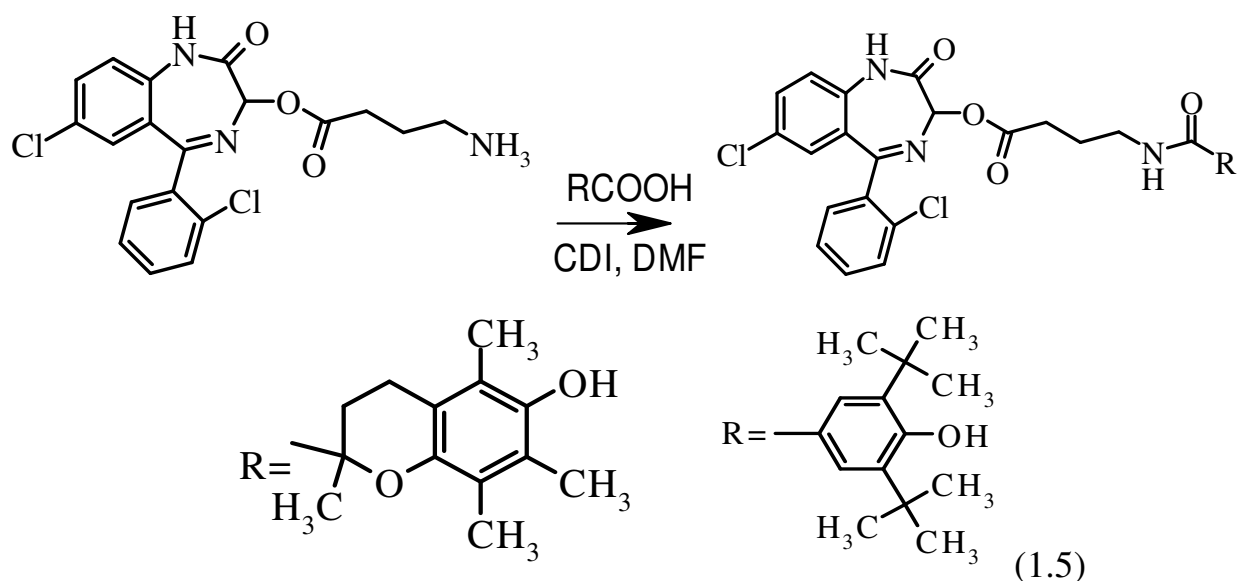
У літературі є дані, що вказують на взаємодію холецистокінінергічної системи з ГАМК_A - рецептором [61]. Відомо, що всі ССК-ергічні нейрони у гіпокампі та корі великих півкуль є також ГАМК-ергічними [64]. Було показано, що агоністи БДР (хлордіазепоксид, діазепам та інші) усувають центральні (тривогу, пригнічення харчової поведінки) та периферичні ефекти ССК-8 [65, 66]. З іншого боку, встановлено, що ССК-8 та його аналоги (церулеїн) [67, 68] виявляють у деяких поведінкових тестах дію, подібну до дії діазепаму та скасовують судомні, викликані пікротоксином, ізоніазідом, гарманом та ін., при чому антагоніст бенздіазепінових рецепторів Ro15-1788 усуває тільки протисудомну дію діазепаму, а не агоністів ССК-рецепторів [61, 67]. Відомо також, що похідні 3-заміщених 1,4-бенздіазепінів, разом з вираженою анксиолітичною і анорексигенною активністю, характеризуються майже повною відсутністю у них седативного і міорелаксантного ефекту, на відміну від феназепаму і діазепаму [60, 69].

Автори [62] повідомляють про синтез заміщених 3-аніліно-5-феніл-1,3-дигідро-2*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів та вивчення фармакологічних властивостей цих сполук. Було виявлено, що ці сполуки з різними аліфатичними та ароматичними замісниками у третьому положенні проявляють високий афінитет до ССК₁ та ССК₂ рецепторів і виявляють орексигенні (підвищують апетит) і анорексигенні (знижують апетит)

властивості. Сполуки, які є антагоністами ССК₂ виявляють також виразні антидепресивні властивості. У цьому ряду сполук одна з них (1.4) виявляє не тільки антидепресивні але й анксиолітичні властивості [62].



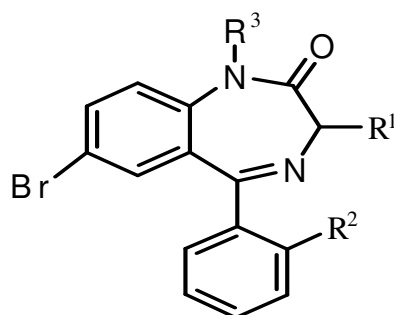
У літературі повідомляється про конструювання антистресових і антиоксидантних структур засобів проти патологічних наслідків стресу. Центральне ядро цих сполук містить залишок ГАМК, карбоксильна група якої етерифіцується бенздіазепіновим анксиолітиком лоразепамом, а аміногрупа ГАМК амідидується двома відомими потужними антиоксидантами: ліпоєвою кислотою і цистеїном (1.5) [70].



Отримані сполуки володіють антиоксидантною та антистресовою активністю. Синтезовані сполуки є перспективним для розробки менш ліпофільних і, можливо, більш активних структур проти біологічного стресу та його ускладнень (окислювальний інсульт) [71].

Раніш в експериментальних моделях на тваринах у 3-аміно-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів разом з орексігенною активністю, характерною для більшості 1,4-бенздіазепінів, була виявлена і анорексигенна [72]. Як було

показано у роботі авторів, молекулярними мішенями, відповідальними за зазначені ефекти деяких 3-заміщених 1,4-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, є центральні бенздіазепінові рецептори (ЦБДР), периферичні бенздіазепінові рецептори (ПБДР) та ССК₂ рецептори головного мозку щурів. Дослідження афінітету сполук до ССК₂ рецепторів свідчать про те, що сполуки, які мають анорексигенну дію, активно проявляють здатність зв'язуватися з холецистокініновими рецепторами.



(1.6)

В роботах авторів [73] було показано вплив сполук цис-3-ариліден(гетариліден)-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів на когнітивні функції щурів, а саме на процеси навчання і пам'ять, за методом "водного лабіринту Морріса". Серед цис-3-ариліден(гетариліден)-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів було знайдено сполуку 3-(2-тієнілметілен)-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он, яка проявляє такий же ноотропний ефект, як і пірацетам (2-оксо-1-пірролідинацетамід) - перший представник класу ноотропів.

Авторами [74, 75] була вивчена нейротропна активність та афінітет нових 3-ариліден(гетариліден) похідних 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів до ЦБДР та ПБДР. Показано, що сполуки, які мають найбільш високий афінітет до ЦБДР, мають виражену протисудомну активність, тоді як сполуки, що селективно зв'язуються із ПБДР, проявляють високу анксиолітичну активність [76].

Роботи авторів [77] свідчать про те, що 3-амінопохідні 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепінів проявляють виражену анальгетичну активність у дозі 1 мг/кг за тестом "корчів", викликаних оцтовою кислотою. Сполука, яка

містить - 3-піперазинільне похідне, володіє анальгетичною активністю на рівні диклофенаку. Показано, що анальгетична активність залежить від структури та ліпофільності сполук, які вивчаються.

Процес створення нових лікарських засобів 1,4-бенздіазепінового ряду базується на великому матеріалі зв'язку будова – властивості – активність, метаболізму і фармакокінетики, а також уявленнях про молекулярні механізми дії цих речовин. Аналіз літератури свідчить про перспективу подальшого вивчення 3-заміщених похідних 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону як потенційних анксиолітиків, протисудомних, антистресових, гіпноседативних, анальгетичних, анорексигених та ін. сполук для лікування різноманітних розладів ЦНС, апетиту, з менш вираженими побічними ефектами. Подібні дослідження вже багато років проводяться у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

1.3. ГАМК-ергічні снодійні засоби

Розлади сну відносяться до найменш специфічних порушень нервово - психічної діяльності [78, 79]. Поряд з неврастенічними, депресивними та іншими порушеннями "невротичного рівня" вони можуть входити до структури усіх, без винятку, психічних і соматичних захворювань [80, 81]. За даними ВООЗ, на сьогодні приблизно кожна друга доросла людина планети страждає від тих чи інших порушень сну. Розрізняють більше ніж 90 різновидів порушень сну, із них 33 (40%) припадає на інсомнію (порушення нічного сну) [82, 83]. Однак серед великої кількості снодійних препаратів немає жодного, який би не мав побічної дії [6, 84].

За сучасними уявленнями, сон - це активний процес, при якому функція гіпногенних або синхронізуючих (таламус, гіпоталамус і каудальні відділи ретикулярної формації) структур головного мозку підвищена, а активуючих або десинхронізуючих (ростральная частина ретикулярної формації) – знижена. Очевидно під впливом снодійних засобів змінюється взаємодія цих двох систем на користь гіпогенної [89 - 91].

Розрізняють дві фази природнього сну - повільнохвильовий (non-REM-сон) і швидкий (REM-сон), який супроводжується швидкими рухами очних яблук. Ці назви обумовлені характерними особливостями ритміки ЕКОГ під час сну - повільнохвильовою активністю у non-REM-сні і більш швидкою у REM-сні [92, 93].

Сон людини і тварин циклічно організований. У людини тривалість одного циклу сну складає у середньому 1,5-2 години (за ніч спостерігається 3-5 циклів). Кожний із циклів складається із окремих стадій non-REM-сну і REM-сну. Перша поява REM-сну настає через 1,5 години після засинання, слідом за стадіями non-REM-сну [8]. Протягом ночі цикли парадоксального сну проявляються 5-6 разів. При цьому тривалість кожного повільнохвильового відрізка сну коротшає, а швидкохвильового зростає, досягаючи перед пробудженням 20-30 хвилин і більше [94, 95].

У середньому в людини у молодому і зрілому віці фаза повільнохвильового сну складає 75-80% від тривалості всього сну. В свою чергу, non-REM-сон розділяють на чотири стадії, що відрізняються біоелектричними (електроенцефалографічними) характеристиками і порогами пробудження, що є об'єктивними показниками глибини сну. (табл.1.2)

Таблиця 1.2

Стадії повільнохвильового сну.

I стадія дрімоти (10%)	II стадія – сон середньої глибини (45-50%)	III стадія	IV стадія
		глибокий сон	найглибший сон
		δ – сон (20%)	
Відсутність на ЕЕГ α-ритму (ритм бадьорості); поява низько амплітудної повільної активності з частотою 3-7 в 1 с (θ-и δ-ритмів)	Поява ритму "сонних веретен" (коливання біопотенціалів, згруповані в пачки) з частотою 13-16 сек. Поява К- комплексів (2-3- фазні високо	Поява на ЕЕГ повільної ритміки в δ діапазоні з частотою 2 в 1 с	Домінування високо амплітудного повільного дельта-ритму

	амплітудні біопотенціали); Відмічається ріст амплітудних коливань і зменшення частоти. і іі		
--	--	--	--

REM-сон (швидкий сон, парадоксальний, задньомозговий), що складає 20-25% від тривалості всього сну, характеризується наявністю як повільнохвильових, так і високочастотних ритмів: гамма-, бета-, альфа-, і появою так званих пилкоподібних розрядів з частотою 4-6 коливань за одну секунду, що характеризують швидкий рух очей, повним спадом тону м'язів рота і шиї [90, 92].

Виразність і тривалість фаз сну істотно залежать від віку. Плод людини більшу частину свого життя проводить у парадоксальній фазі сну. У новонароджених парадоксальна фаза сну у загальній тривалості сну займає 60%, у дорослих – 20%. З віком відбувається подальше зниження тривалості даної фази сну [93].

Пробудження людей відразу після цієї фази сну свідчить про те, що під час парадоксального сну людина бачить сновидіння. В період парадоксального сну показники діяльності серцево-судинної і дихальної систем різко збільшуються. При цьому нерідко відмічається фізіологічна аритмія діяльності серця і дихання [94].

Так, наприклад, якщо людині не давати спати протягом тільки "парадоксальної" фази, і пробуджувати її щоразу, як тільки починається ця фаза сну, то це призводить до істотних порушень психічної діяльності.

REM-сон має велике функціональне значення для життєдіяльності організму, а його депривація на різні терміни може викликати порушення процесів навчання і пам'яті [96, 97].

Автори [98] вказують, що порушення поведінки або розлади у поведінці під час REM сну - перші прояви нейродегенеративних захворювань (хвороба Паркінсона, деменція, церебральний синдром).

Відомо, що при психічних захворюваннях (депресіях, шизофренії, деменціях) часто виникає порушення REM сну, причому зв'язок між психічною патологією і цими порушеннями є двостороннім [99, 100].

Данні із літератури вказують на те, що порушення сну і психічні розлади представляють собою взаємопов'язані клінічні прояви, які посилюють один одного і приводять до погіршення якості життя [101].

У роботах інших авторів вказується, що приблизно 70 % пацієнтів з діагнозом депресії скаржаться на інсомнії, котрі проявляються як труднощі при засинанні, часті нічні і ранні ранкові пробудження [102].

Сон під впливом снодійних засобів відрізняється від природного фізіологічного сну. Перш за все, це стосується швидкого сну: збільшується латентний період появи швидкого сну, зменшується загальна його тривалість [8, 94]. Тривалі порушення кожної із фаз сну несприятливо відбиваються на стані організму, виникають поведінкові, психічні розлади. Відміна снодійних засобів може супроводжуватись так званим "синдромом віддачі" (компенсаторне збільшення тривалості "швидкого" сну), при якому відмічається велика кількість сновидінь, нічні кошмари, часті пробудження [6, 103]. У зв'язку з цим, особливу увагу привертають снодійні засоби, які не завдають впливу або мінімально впливають на співвідношення фаз сну і сприяють розвитку сну, близького до природного [104, 105].

Перспективним є пошук нових снодійних засобів, що втручаються в нейрохімічні механізми регуляції і підтримки різних фаз і стадій сну, зокрема в процесі медіації серотоніну і ГАМК [106, 107]. До ГАМК-ергічних снодійних препаратів належать барбітурати, похідні 1,4-бенздіазепіну і сполуки небенздіазепінової структури. ГАМК-ергічні снодійні засоби пригнічують міжнейронну (синаптичну) передачу в різних відділах ЦНС [8].

Так, наприклад, барбітурати здійснюють пригнічуючий вплив на активуючу ретикулярну формацію стовбуру мозку, що сприяє розвитку сну [108, 109].

1.3.1. Нейрохімічні механізми сну

Базуючись на комплексних дослідженнях в експерименті на тваринах з використанням стереотаксичних, електрофізіологічних, біохімічних і гістологічних методів, була показана роль моноаміноергічних механізмів у регуляції циклу "спанья - неспанья" і, зокрема, фаз сну. Відповідно до цієї теорії стверджується, що у мозку ссавців у циклі "спанья - неспанья" відбуваються циклічні біохімічні коливання від неспанья (W), що залежить від ретикулярної активуючої системи (ARAS), до повільнохвильового сну (SWS). SWS залежить від нейронів системи шву (Raphe system), що містять серотонін (5-HT) [106, 110]. Проте біохімічний механізм, регулюючий чергування цих станів (неспанья, ортодоксальний і парадоксальний сон) практично залишається невідомим.

У 1980 рр. виявлено, що в парадоксальному сні (PS) ті нейрони активуючих систем мозку, які виділяють медіатори ацетилхолін і глутамат (розташовані в ретикулярній формації стовбуру і базальних ядрах переднього мозку), надзвичайно активні, а нейрони, які виділяють моноаміни (норадреналін, серотонін і гістамін) вимикаються і "мовчать" [111]. Цей факт визначає фізіологічну відмінність між неспаньям і парадоксальним сном. Існує припущення, що в індукції швидкого сну можуть брати участь продукти катаболізму серотоніну, зокрема, 5-оксиіндолоцтова кислота, триптофан [112]. Розвиток фаз циклу "спанья - неспанья" пов'язують з відносними концентраціями серотоніну і норадреналіну в структурах головного мозку [111, 113]. Оскільки вміст норадреналіну збільшується в мозку після пробудження, норадреналіну (НА) надається велике значення в регуляції циклу "спанья – неспанья" [114].

Було показано, що блокатори транспортера норадреналіну, які інгібують його зворотне захоплення, знижують парадоксальний сон.

Антагоністи $\alpha 1$ -адренорецепторів НА посилюють парадоксальний сон, а прямі ін'єкції агоністів $\alpha 1$ -адренорецепторів НА скорочують цю стадію сну. $\alpha 1$ -адренорецептори розташовані на нейронах у стовбурі мозку і беруть участь в процесі неспання [111, 114].

Вплив агоністів $\alpha 2$ -адренорецепторів приводить до таких самих результатів. Їх агоністи, ймовірно, діють на постсинаптичному рівні, знижуючи парадоксальний сон. Мікроін'єкція β -антагоністів також посилює парадоксальний сон [115].

Як було показано, руйнування ядер шву веде до різкого пригнічення повільнохвильового сну і відсутності сну взагалі, при встановленому зниженні концентрації серотоніну у мозку. Введення серотоніну в ядра шву супроводжується збільшенням фази повільнохвильового сну. Серотонінергічна система шву, за думкою ряду авторів, може мати подвійну функцію гіпногенного передавача і антипробуджуючого фактору [106, 113].

В останній час велика увага зосереджена на дослідженні можливої ролі ГАМК в організації сну [116, 117]. Під час сну спостерігається тенденція до підвищення вмісту ГАМК в ЦНС. Було встановлено зростання рівня ГАМК в ЦНС під дією інгібіторів трансамінази, що призводило до посилення сну [118].

Агоністи ГАМК_A-рецепторів: бенздіазепіни, барбітурати, гіпнотики третього покоління (зопіклон, золпідем) підсилюють II стадію повільнохвильового сну у людей [8].

Дослідження на рецепторному рівні показали, що агоністи ГАМК_B- і ГАМК_C-рецепторів також залучені до регуляції циклу "спанння - неспання" [119]. Відомо, що агоністи ГАМК_B-рецепторів збільшують тривалість сну у людей, а ГАМК_B-антагоністи посилюють неспання у щурів.

Антагоністи ГАМК_C-рецепторів також посилюють неспання, а агоністи - сон. Специфічні агоністи і антагоністи цього підтипу рецепторів можуть бути корисні при лікуванні безсоння, епілепсії, нарколепсії, відповідно. Ліганди ГАМК_C-рецепторів діють у більш низьких дозах і з меншими

побічними ефектами. Під час парадоксального сну відзначається зниження активності ГАМК-ергічних нейронів переднього мозку [120].

Відомо також, що антигістамінні засоби, нейропептиди, аденозин, інтерлейкіни, простагландини посилюють сон [121].

Гістамін інгібує субкортикальні сон-індукуючі структури. Внутрішньомозкове введення гістаміну та його аналогів посилює неспання і знижує тривалість REM та non-REM сну [121, 122].

Вплив гістаміну на цикл "спанья - неспання" здійснюється за допомогою H_1 і H_3 гістамінових рецепторів ЦНС. Антагоністи H_1 -рецепторів гістаміну (антигістамінні препарати) сприяють розвитку сну, мають седативну дію. Ліганди гістамінових H_3 рецепторів модулюють цикл "спанья - неспання". Гістамінові H_3 рецептори локалізовані на пресинаптичних терміналях різних нейронів, вони регулюють вивільнення гістаміну і беруть участь у підтриманні неспання [123].

Велика увага останнім часом в якості регуляторів сну приділяється регуляторним пептидам, з них, в першу чергу пептиду дельта-сну, або "Дельта-сон" індукуючому пептиду. Було виявлено, що цей пептид діє на клітини мозку не безпосередньо, а запускає довгий ланцюг поки невідомих подій. Кінцевою ланкою цього ланцюга є зміна балансу нейромедіаторів, що приводить до зменшення часу неспання і збільшення часу звичайного сну [112, 117].

Крім пептидів, надзвичайний інтерес представляє така система мозку або залоз внутрішньої секреції, як епіфіз, який виділяє гормон мелатонін. Однак штучно введений в організм мелатонін так само, як і пептиди, швидко руйнується. Очевидно, і в цьому випадку ефект має не "фармакологічний", а "фізіологічний" характер, тобто дію викликає не сама введена речовина, а механізм, котрий вона запускає [124, 125].

Проте єдиної думки про нейрофізіологічні і нейрохімічні механізми регулювання та підтримки різних проявів "спанья - неспання", зокрема його фаз і стадій, до теперішнього часу не існує.

Досягнуті успіхи у результаті експериментальних досліджень на тваринах свідчать про складну ієрархію взаємозв'язків нейрофізіологічних і нейрохімічних систем мозку в регуляції циклу "спанья - неспанья" і різноманіття його проявів.

Аналіз літератури свідчить про те, що пошук і розробка нових ефективних гіпнosedативних засобів (для лікування різноманітних розладів сну), анксиолітичних та протисудомних засобів без виражених побічних ефектів, і нетоксичних, у рядах 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепіну є достатньо перспективним.

З аналізу літератури випливають завдання наступного дослідження: пошук серед нових 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепінового ряду речовин з гіпнosedативними, протисудомними і анксиолітичними властивостями; порівняльне вивчення процесів розвитку толерантності до циназепаму (препарату Левана[®] IC) та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму, їх вплив на структуру сну за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

В ході роботи використовувалися похідні 1,4-бенздіазепіну. Ці сполуки були синтезовані у Фізико-хімічному інституті НАН України ім. О.В. Богатського НАН України у відділі медичної хімії (зав. відділом академік НАН України С.А. Андронаті, директор Фізико-хімічному інституту ім. О.В. Богатського НАН України).

Дослідження проведено на 400 білих безпородних щурах - самцях масою 180-380 г і на 750 мишах – самцях масою 18 – 32 г розведення Одеського національного медичного університету. Дослідження проводились у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України відповідно до вимог Комітету з біоетики Державного фармакологічного центру МОЗ України (Посвідчення протоколу № 20 від 20 вересня 2005 р.) та комісії з питань біоетики ФХІ інституту ім. О. В. Богатського НАН України (протокол № 7 від 01.12.2011 р.).

Досліджувані водорозчинні речовини вводилися внутрішньоочеревинно (в/о) у ізотонічному розчині натрію хлориду (0,9%), а нерозчинні у воді – в емульсії з Твін–80 за 30-40 хв до початку дослідження. Тваринам контрольних груп у відповідних об'ємах вводили фізіологічний розчин.

У ході досліджень використовувались наступні реактиви: Твін-80 – фірма «FERAK» (Німеччина); як судомний агент використовували коразол (пентилентетразол) – об'єднання «Мосхімфармпрепарати»; етамінал натрію – фірма «SIGMA» (США).

Нижче наведено докладний опис використаних методик.

2.2. Методи, які застосовувались у роботі

2.2.1. Вивчення наявності міорелаксації за методом "стрижня, що обертається" у дослідях на мишах

За методикою Janssen мишей розміщують на гладенький дерев'яний стрижень діаметром 2 см, кругові секції ділять стрижень на 10 відділів, що дозволяє проводити дослідження на 10 мишах одночасно.

Мишей розміщують на стрижень, що обертається зі швидкістю 5 об/хв. Для експерименту відбирають тварин, які залишаються на стрижні 3 і більше хвилин у двох повторних випробуваннях. Якщо тварині не вдається утриматись на стрижні більше ніж 3 хв, як мінімум 2 рази, тест розцінюють, як позитивний, тобто це вказує на пригнічення рухової активності тварини.

Якщо швидкість обертання стрижня складає 10 об/хв, то контрольні миші, як правило, повинні залишатися на стрижні більше 30 с. Реєструють кількість тварин, які впали з обертового стрижня протягом 30 с. ED визначають за кількістю тварин, які впали.

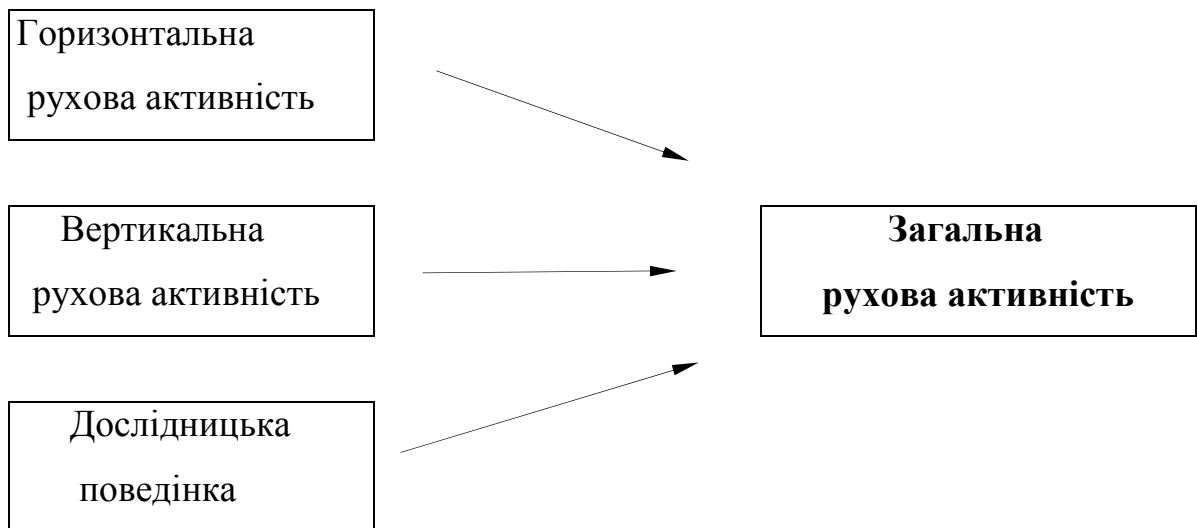
Кожній групі із 10 мишей внутрішньоочеревинно вводять досліджувану сполуку і розміщують на стрижні через 30, 60, 90, 120 і 150 хв. після введення препарату. При необхідності розраховують ED₅₀ для кожного відрізка часу після введення досліджуваної речовини [129].

2.2.2. Вивчення орієнтовно-дослідницької поведінки за методом "відкритого поля" у дослідях на мишах і щурах

Методику "відкритого поля" застосовують для оцінки орієнтовно-дослідницької поведінки щурів і мишей. Установка представляє собою камеру розміром 60×60 см для мишей і 80×80 см для щурів з прозорою кришкою. Підлога камери рівномірно розділена на 9 квадратів з 9 отворами діаметром 2 см для мишей і 3 см для щурів. Кількість тварин у групі повинна

складати від 8 до 10. Під час перебування тварин у "відкритому полі" (2 хв для мишей і 3 хв для щурів) реєстрували показники рухової активності: ВА (вертикальна рухова активність), число вставань на задні лапи; ГА (горизонтальна рухова активність), кількість переходів з квадрату у квадрат; ДП (дослідницька поведінка), число зазирань в отвори; ЗРА (загальна рухова активність) – це сума усіх видів активності: ВА+ГА+ДП (схема 2.2.1). Кількість тварин у кожній групі складала 10 [126].

Схема 2.2.1 методики "Відкритого поля".



2.2.3. Вивчення анорексигенної активності у дослідах на щурах

Щурів протягом двох тижнів утримують на рідкій дієті. Потім за день до експерименту щурам вводять внутрішньоочеревинно розчин 0,9% NaCl. Тварин допускають до рідкої їжі через кожні 30 хв протягом трьох годин. Контрольні щури повинні вживати в середньому за 30 хв 8 мл рідкого корму. На наступний день після двох годин депривації щурам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводять фізіологічний розчин (0,9% NaCl). А щурам експериментальної групи вводять розчин досліджуваної речовини. Через 30 хв. після введення сполуки щурів допускають до рідкої їжі. Кількість вжитої їжі фіксують кожні 30 хв. протягом трьох годин. Всі показники

підсумовують, знаходять середнє арифметичне і порівнюють його з контрольними показниками. Ефект виражають у мл вжитої їжі [127].

2.2.4. Вивчення антидепресивної активності за методом "форсованого плавання" за Порсолтом у дослідях на мишах

Антидепресивну активність оцінюють за методом "поведінкового відчаю" за Порсолтом, який ефективно використовується для скринінгу як типових, так і атипових антидепресантів. Вказаний метод призначений для створення стресового стану у мишей шляхом примусового плавання. Експериментальних тварин по черзі поміщають у вузький циліндр діаметром 10 см, висотою 25 см. Циліндр заповнюють на 1/3 водою з температурою 23-24 °С. Вплив препарату оцінюють за зменшенням тривалості позімобілізації тварин у порівнянні з контрольними значеннями. Поведінку тварин реєструють протягом 4 хв після двохвилинної акліматизації [128]. Кількість тварин у кожній групі складала 10.

2.2.5. Вивчення протисудомної активності за методом "антагонізму з коразолом" у дослідях на мишах

Антагонізм з коразолом оцінювали у дослідях на мишах за здатністю сполук попереджувати тоніко-клонічний компонент судорожного нападу і смерть тварин. Коразол у дозі 120 мг/кг (ED₉₅ – доза, що здатна викликати клонічні судоми і смерть 95 % тварин) вводили підшкірно за 10 хв до прояву максимального ефекту досліджуваних речовин. Наявність судом і кількість загиблих тварин реєстрували протягом 40 хв після введення коразолу. Кількість тварин у кожній групі складала 10 [129].

2.2.6. Вивчення снодійних властивостей за методом "потенціювання снотворної дії барбітуратів" у дослідях на мишах

Оцінюють здатність бенздіазепінів збільшувати кількість мишей, які втратили рефлекс перевертання. Критерієм ефекту речовини є втрата рефлексу перевертання не менше ніж на 30 с при розміщенні тварини на спину. Барбаміл у дозі, яка викликає сон у 10 % мишей ED₁₀ (≈50 мг/кг), вводять внутрішньоочеревинно через 40 хвилин після внутрішньоочеревинної ін'єкції транквілізаторів (бенздіазепінів). Реєструють кількість мишей, що заснули, за критерієм втрати рефлексу перевертання більше, ніж на 30 с. Спотереження проводять протягом години після введення барбамілу. Визначають кількість тварин, які втрачають рефлекс перевертання і розраховують ефективну дозу (ED). Якщо тривалість втрати рефлексу менше 30 с – інгібування дії барбамілу. Встановлювали дозу ED₅₀ при якій у 50 % тварин пригнічувався рефлекс перевертання [11, 129]. Кількість тварин у кожній групі складала 10.

2.2.7. Вивчення снодійних властивостей за методом "продовження снодійної дії барбітуратів" у дослідях на мишах

Оцінюють здатність бенздіазепінів збільшувати тривалість сну під впливом барбітуратів у мишей. Барбаміл у дозі, яка викликає сон у 10 % мишей ED₁₀ (≈50 мг/кг), вводять внутрішньоочеревинно одразу після внутрішньоочеревинної ін'єкції транквілізаторів (бенздіазепінів). Реєструють тривалість бічного положення мишей (втрату рефлексу перевертання), а також латентний період засинання після введення барбамілу. У кожній групі використовували 10 тварин [11, 129].

2.2.8. Вивчення снопідійної активності за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ в нормі

Експерименти проводили на щурах-самцях масою 250-280 г в умовах хронічного досліду. Усіх тварин утримували при постійній кімнатній температурі 22 °С і вільному доступі до їжі та води.

Тварин оперували, за допомогою стереотаксису і топографічних атласів імплантували їм хронічні електроди із ніхромового дроту діаметром 0,5 мм в ділянку гіпокампа (з координатами AP=4,0, L=2,5, H=3,5), а також лобної і потиличної сенсомоторної кори (з координатами AP=1,0, L=2,0, H=1,0) під гексеналовим наркозом. Електроди фіксувались за допомогою зубного пластичного матеріалу. Після операції щурів розміщували в клітках по 5-10 тварин. Експерименти проводили через 1-2 тижня після хірургічної операції. Вивчення циклу "спанья-неспанья" проводилося в один і той же час доби протягом 4-годинного періоду (12-16 год). Кожна група експериментальних тварин складалася з 8 щурів. Після того, як тварину помішали в клітку з постійним рівнем штучного освітлення, проводився запис ЕКоГ, який оцінювали кожні 50 с. При обробці отриманої інформації враховували такі параметри циклу "спанья-неспанья": загальний час поведінкового неспанья; загальну тривалість сну, абсолютний час тривалості повільнохвильового сну, абсолютний час тривалості парадоксального сну; латентний період епізоду парадоксального сну і латентний період засинання. Запис ЕКоГ проводили з використанням енцефалографа системи DX-5000 PRACTIC.

Дві стадії повільнохвильового сну (поверхневий і глибокий) визначали за методом [130]. Стадія поверхневого сну характеризується появою нестабільної, низькоамплітудної активності з окремими тета- і дельта-хвилями, що не перевищують 180 мкВ. Також у цій стадії спостерігаються окремі веретена альфа-ритмів.

Глибокий повільнохвильовий сон характеризується збільшенням кількості і амплітуди тета- і дельта - хвиль до 200 мкВ.

Досліджувальні сполуки циназепам, 3-гідроксифеназепам вводились внутрішньоочеревиною, в ізотонічному розчині NaCl з Твін-80 за 30-40 хв до початку експерименту. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. Запис ЕКоГ здійснювали через 30 хв. після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних сполук. Аналіз отриманих результатів проводився за критерієм вірогідності Стьюдента при $p < 0,01$ [131].

2.2.9. Вивчення снодійної активності за допомогою нейрофізіологічного аналізу ЕКоГ на фоні введення резерпіну

Експерименти проводили на щурах-самцях масою 250-280 г в умовах хронічного дослідження. Усіх тварин утримували при постійній кімнатній температурі 22 °С і вільному доступі до їжі та води.

Тварин оперували, за допомогою стереотаксису і топографічних атласів імплантували їм хронічні електроди із ніхромового дроту діаметром (див. методику 2.2.8.). Експерименти проводили через 1-2 тижня після хірургічної операції. Щурам I - ої групи вводили фізіологічний розчин з Твін-80, II - ої групи повторно (3 – 5 діб) внутрішньоочеревиною вводили резерпін (2 мг/кг) – 0,5 мл фізіологічного розчину, III і IV - група тварин, які отримували повторні ін'єкції резерпіну, а під час експерименту циназепам і 3-гідроксифеназепам, відповідно. Запис ЕКоГ здійснювали через 30 хв після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних сполук (див. методику 2.2.8.). Аналіз отриманих результатів проводився за критерієм вірогідності Стьюдента при $p < 0,01$ [131].

2.2.10. Метод вивчення впливу на пам'ять у щурів у "водному лабіринті Морріса"

Прилад, запропонований вперше автором методу, Д. Моррісом, для оцінки просторової орієнтації і пам'яті (круглий басейн, заповнений непрозорою водою, в яку занурена невелика "безпечна платформа", невидима тварині), надалі знайшов найширше застосування в різного роду

нейробиологічних дослідженнях, пов'язаних з вивченням механізмів просторової орієнтації і пам'яті та виявленням шляхів фармакологічного впливу на них. У літературі описано багато варіантів режиму експерименту лабіринту Морріса, в цій роботі використовували модифікований варіант тесту Морріса. Експериментальна установка являє собою басейн (70×55×60), який наповнювали водою на висоту 25 см, $t = 27-28$ °С, забарвленою молоком. В одному з кутів цього басейну поміщали платформу діаметром 7 см. Експеримент проводили за протоколом без попереднього ознайомлення тварини з установкою. При навчанні щурів поміщали в дальній від платформи кут, і реєструвався час знаходження нею платформи. Якщо протягом 60 с тварина платформу не знаходила, її поміщали туди вручну і залишали на ній на 10 секунд. Для кожної тварини проводили 5 повторних пред'явлень з інтервалом 15 хвилин. Через 10 днів оцінювали вплив на довготривалу пам'ять, проводили за тією ж схемою, що і в перший день досліду.

Вплив сполук на здатність до навчання і довготривалу пам'ять у "водному лабіринті Морріса" оцінювали за зниженням латентного часу знаходження прихованої платформи в 1-й і 10-й день, відповідно.

Тваринам першої групи (пасивний контроль) вводили фізіологічний розчин внутрішньоочеревинно. Тваринам другої та третьої групи досліджували сполуки [132]. Кількість тварин у кожній групі складала 10.

2.2.11. Вивчення антигіпоксичних властивостей за методом "гіпоксії з гіперкапією у гермооб'ємі" у дослідах на мишах

Скринінг антигіпоксичної активності проведено на моделі гострої гіпоксії замкнутого простору (ГЗП) та гострої асфіксії. ГЗП моделювали шляхом розміщення щурів в ізольованому гермооб'ємі ($V = 0,001$ м³). Спостереження проводили до моменту загибелі тварин. Антигіпоксичний ефект (АГ) оцінювали за динамікою показника тривалості життя (у хв)

відповідно до контролю, прийнятого за 100 %, та виходячи з розрахунку коефіцієнту антигіпоксичного захисту (K_3).

$$K_3 = T_D / T_K,$$

де T_D – середня тривалість життя тварин в дослідній групі;

T_K - середня тривалість життя тварин в контрольній групі [129]. Кількість тварин у кожній групі складала 10.

2.2.12. Вивчення гострої токсичності за методом "Літчфілда і Уїллоксона" у дослідях на мишах

Гостру токсичність речовин вивчали на безпородних білих мишах і щурах самцях при введенні сполук внутрішньоочеревинно при постійній температурі навколишнього середовища (20 - 21°C). Мишей розміщували у клітки-комірки розміром 8×8×8 см (для щурів – 15×15×15 см) по одній тварині. Оцінку результатів проводили через 24 години після введення речовин. Розраховували відсотки померлих тварин із 10 у кожній групі [129].

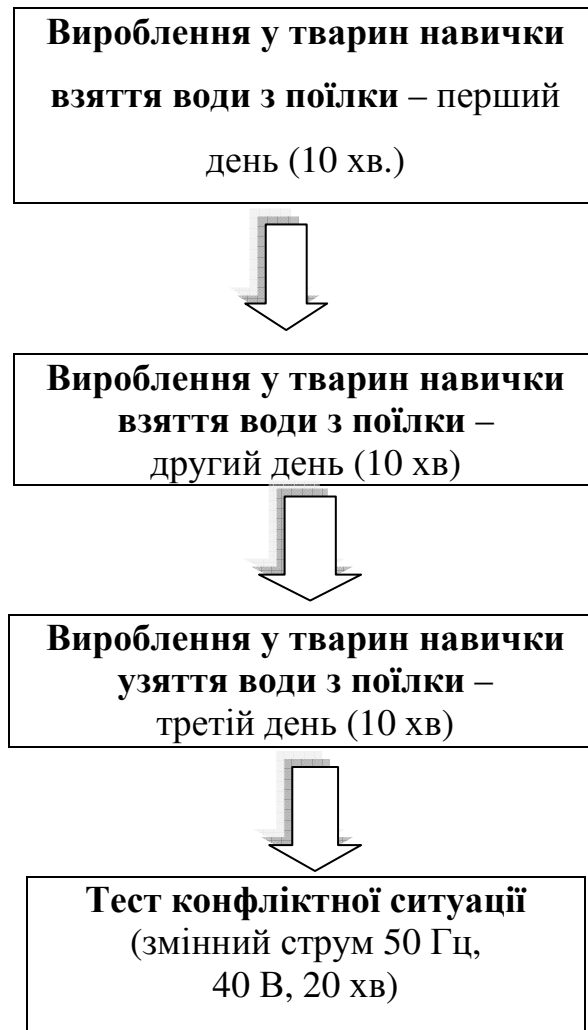
2.2.13. Методика "конфліктна ситуація" Вогеля (модифікація Вороніної) в дослідях на щурах при внутрішньоочеревинному введенні

Поведінкові моделі створення у тварин стану неспокою і страху з використанням караючого подразника, переважного прояву умовної або безумовної поведінки, є найбільш широко використовуваними методиками при оцінці транквілізаторів з моменту їх появи і обов'язково використовуються при оцінці анксиолітичних, антистресорних речовин нового покоління. Серед цих моделей методики конфліктних ситуацій є основними, базовими методами при оцінці дії анксиолітичних засобів. Принцип використовуваних методик полягає в тому, що караючий фактор (наприклад, больове подразнення), пригнічує звичайну для тварини безумовну поведінку (наприклад, питну, харчову) в результаті чого створюється ситуація неможливості здійснення необхідної мотивації і неузгодженість бажаного і дійсного, що підкріплюється страхом отримання

больового подразнення. Таким чином, конфліктна ситуація створюється за рахунок зіткнення стресорного караючого подразника і мотиваційних потреб тварини. Саме конфліктні ситуації найбільш часто призводять до стресу і невротичних станів людини. Ефект анксиолітиків в тесті "конфліктної ситуації" полягає в подоланні страху перед караючим фактором і відновленні значимої для тварин поведінки, що виражається в збільшенні числа караючих відповідей, наприклад, взяття води, незважаючи на отримання при цьому больових подразнень. Методики конфліктних ситуацій мають хорошу відтворюваність, чіткі контролі і високу ступінь кореляції з клінічними ефектами. Згідно з процедурою методики тварин попередньо позбавляють води на 48 годин, не обмежуючи їжу, і потім виробляють навик взяття води з поїлки, поміщаючи щурів в камеру, де вони знаходять поїлку з водою і починають пити. На третій день щурів, у яких вже виробився стабільний питний навик взяття води з поїлки, поміщають в камеру на 20 хв, і через 10 с після початку пиття кожне взяття води супроводжується електробольовим подразненням (0,5 мА). В результаті, щоб збільшити питну мотивацію, щури мають подолати почуття страху перед покаранням. Критерієм оцінки анксиолітичного ефекту було зростання числа актів вживання води тваринами, не дивлячись на "караючу" стимуляцію – ноцицептивне (електробольове) подразнення. Ноцицептивне подразнення здійснювалось через електроди, вмонтовані у підлогу експериментальної камери (змінний струм 50 Гц, 40 В). Кількість тварин у кожній групі складала 8 [11].

Схема 2.2.2. Методика конфліктної ситуації Вогеля (модифікація Вороніної).





2.2.14. Вивчення толерантності в дослідях на мишах при тривалому введенні протягом 14 і 30 діб

Толерантність до циназепаму і 3-гідроксифеназепаму вивчали в дослідженнях на мишах за допомогою комплексного методичного підходу, що базується на зіставленні спектрів фармакологічної активності препарату при його одноразовому та тривалому застосуванні. Порівняння спектрів фармакологічної активності препаратів при тривалому і одноразовому введенні дозволяє не тільки встановити наявність або відсутність толерантності, а й виявити ступінь її виразності за кожним з видів дії, і визначити, чи змінюється терапевтична широта. Досліди проводилися на білих безпородних мишах самцях. Препарати вводили внутрішньоочеревино

за 30-40 хв до початку експерименту в суспензії з твін-80 один раз на добу. Контрольні тварини отримували фізіологічний розчин з твін-80. Тварин утримували при вільному доступі до їжі і води. Кожна доза сполук вивчалася на 8-10 тварин. У дослідах використовувалася чиста субстанція циназепаму і 3-гідроксифеназепаму. Тварини були розділені на сім груп: I - контроль (тривале введення фізіологічного розчину суспензії з твін-80), II - одноразове введення циназепаму, III - одноразове введення 3-гідроксифеназепаму, IV і V - тривале введення циназепаму: відповідно 14 і 30 діб, VI і VII - тривале введення 3-гідроксифеназепаму протягом 14 і 30 діб. Для оцінки снодійної дії використовували методики "потенціювання і пролонгування снотворної дії барбітуратів". Потенціювання снодійної дії циназепаму і 3-гідроксифеназепаму оцінювали за здатністю досліджуваних сполук збільшувати число тварин, що заснули від барбітурату. Барбаміл у дозі, що викликає сон у 10 % мишей ($ED_{10} = 50$ мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно через 40 хв після внутрішньоочеревинної ін'єкції досліджуваних сполук з наступною реєстрацією числа заснувших мишей за критерієм втрати ними рефлексу перевертання. Встановлюють дозу ED_{50} , при якій у 50 % тварин пригнічується рефлекс перевертання. Пролонгування снотворної дії оцінювали за зміною часу засинання, пробудження і тривалості сну, викликаного барбамілом (50 мг/кг). Тривалість сну у 50 % тварин обчислювали за різницею показників часу засинання (момент втрати рефлексу перевертання) і часу пробудження (відновлення рефлексу перевертання). Барбаміл вводили внутрішньоочеревинно через 15 хв після внутрішньоочеревинної ін'єкції досліджуваних сполук. Порушення координації руху вивчали за тестом "залізання на сітку". Реєстрували кількість мишей, що піднялися на протязі 5 хв по дротяній сітці, натягнутій під кутом 60° в верхній затемнений відсік камери. У контрольній групі тварин залізання досягало 100 %. Спонтанну рухову активність визначали за методикою "відкритого поля". Протягом 2 хв знаходження мишей у "відкритому полі" реєстрували число вставань на задні лапки (вертикальна

рухова активність), переходи з квадрата на квадрат (горизонтальна рухова активність) і зазирання в отвори.

2.2.15. Метод радіолігандного зв'язування з бездіазепіновими рецепторами

Афінність до бенздіазепіних рецепторів вивчали методом радіолігандного аналізу за ступенем витіснення сполуками [^3H] флумазенілу з місць його специфічного зв'язування у синаптичній фракції мембранам головного мозку щурів [11].

2.2.16. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих даних (розрахунок середніх величин, помилок середніх величин, коефіцієнту кореляції, критерію Ст'юдента) проводили загальноприйнятими в медико-біологічних дослідженнях методами статистичного аналізу з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм [133, 134].

РОЗДІЛ 3. ВИЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ 3-АЦИЛОКСИ-1,2-ДИГІДРО-3H-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНІВ

3.1. Вивчення гіпноседативних і анксіолітичних властивостей нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів порівняно до циназепаму та 3-гідроксифеназепаму

Пошук нових високоефективних та малотоксичних біоактивних молекул з широким спектром біологічної дії являє собою важливу проблему сучасної фармакології та медичної хімії.

Інтерес до 3-заміщених-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів обумовлений високою біологічною активністю цих сполук [1, 60]. Результати наших та закордонних досліджень свідчать про перспективність пошуку та створення відповідних лікарських засобів в цьому ряді. Так, в літературі з'явилась значна кількість публікацій про різнобічну біологічну (снодійну, анксіолітичну, протисудомну, анорексигенну, антидепресивну, анальгетичну) активність похідних 1,4-бенздіазепіну [60, 73]. Із літератури відомо, що фармакологічні властивості цих речовин обумовлені головним чином зв'язуванням їх з бенздіазепіновими і з холецистокініновими рецепторами двох підтипів - ССК₁ і ССК₂ [61, 62]. Спектр фармакологічної активності 3-заміщених-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів подібний до спектру 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, незаміщених у третьому положенні. Природа замісника біля атома С₃ виявляє істотний вплив на рівень активності бенздіазепінів, причому іноді різний за окремими відами активності [11]. Автори [60], які вивчали фармакологічні властивості похідних 3-аміно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів показали, що вони володіють протисудомною, анксіолітичною, седативною та міорелаксантною дією. Серед похідних 3-аніліно-5-феніл-1,3-дигідро-2H-1,4-бенздіазепін-2-онів виявлено сполуки з орексигенними та анорексигенними властивостями [62]. В роботах авторів [73] було показано вплив сполук цис-3-

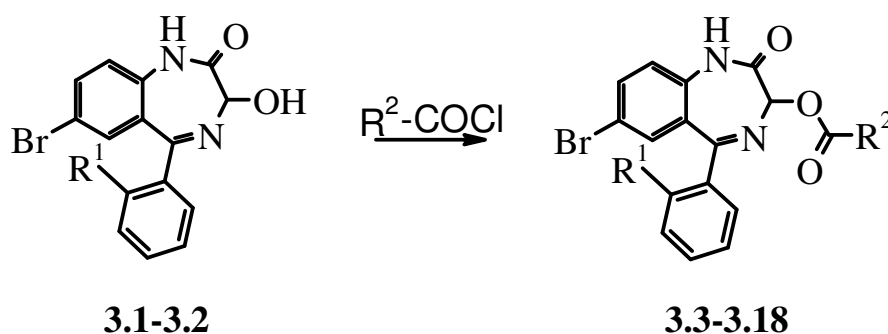
ариліден(гетариліден)-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів на когнітивні функції щурів.

Раніш у ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України було розроблено новий снодійний засіб циназепам (препарат Левана[®] ІС) (3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он) [4], який поєднує потужний снодійний, седативний і анксиолітичний ефекти. Суттєвою характеристикою циназепаму є дисоціація седативної і міорелаксантаї дії, тому що на відміну від відомих транквілізаторів міорелаксантаї ефект циназепаму розвивається при застосуванні більш високих доз, порівняно до седативних засобів [6]. За снодійною дією циназепам має суттєві переваги не тільки серед препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду, але і не поступається зопіклону (5-7,5 мг/кг) [6, 135].

З метою вивчення зв'язку структура - властивості у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України у відділі медичної хімії (зав. відділом академік НАН України С.А. Андронаті) були синтезовані нові 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они [136]. Нами були вивчені нейрофармакологічні властивості (снодійні, седативні, протисудомні, міорелаксантаї та вплив на пам'ять і апетит) сполук **3.1-3.18** наступної структури (табл. 3.1):

Таблиця 3.1

Похідні 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они.



№ П/П	R ¹	R ²
3.1	Cl	-
3.2	H	-

Продовження табл. 3.1

3.3	Cl	CH ₃
3.4	H	CH ₃
3.5	Cl	CH ₂ CH ₃
3.6	H	CH ₂ CH ₃
3.7	Cl	(CH ₂) ₂ CH ₃
3.8	H	(CH ₂) ₂ CH ₃
3.9	Cl	(CH ₂) ₃ CH ₃
3.10	H	(CH ₂) ₃ CH ₃
3.11	Cl	(CH ₂) ₄ CH ₃
3.12	H	(CH ₂) ₄ CH ₃
3.13	Cl	(CH ₂) ₅ CH ₃
3.14	H	(CH ₂) ₅ CH ₃
3.15	Cl	(CH ₂) ₆ CH ₃
3.16	H	(CH ₂) ₆ CH ₃
3.17	Cl	(CH ₂) ₁₀ CH ₃
3.18	H	(CH ₂) ₁₀ CH ₃

Вивчення фармакологічної активності 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів (**3.1-3.18**) у дослідах на мишах показало, що всі сполуки виявляють високу снодійну активність з ED₅₀ 0,22 - 1,50 мг/кг, відповідно. Снодійна активність проявляється у здатності досліджених сполук потенціювати ефекти барбітуратів. Деякі з синтезованих сполук: **3.1-3.14** за снодійною активністю не поступаються циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму, ED₅₀ для яких становить, відповідно, 0,37 і 0,25 мг/кг.

Для встановлення дози ED₅₀ досліджених сполук нами були побудовані криві залежності доза – ефект. Виходячи з аналізу кривої, встановлено значення ED₅₀ для досліджених сполук (рис. 3.1).

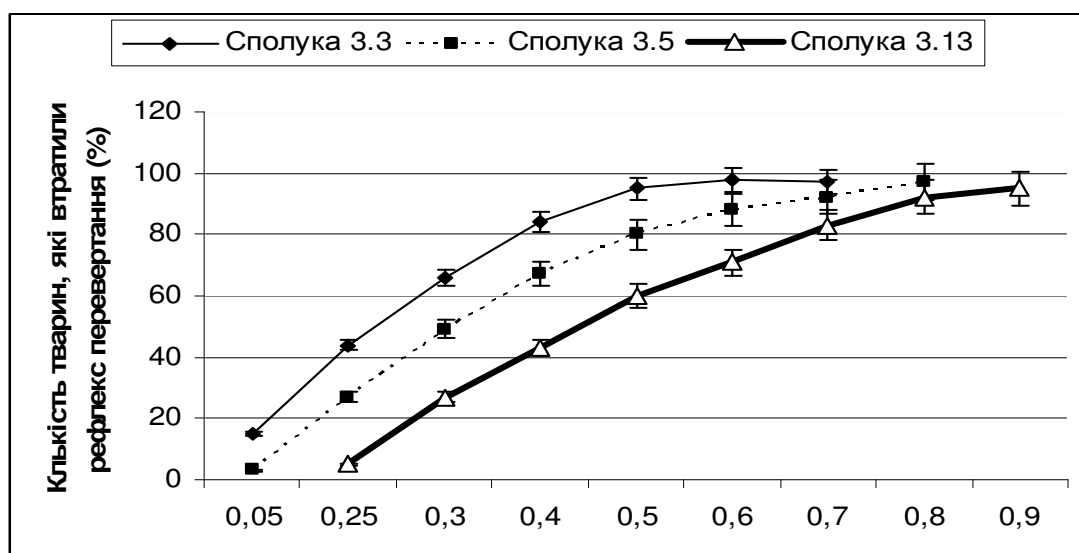


Рис. 3.1. Крива залежності доза - ефект для сполук **3.3**, **3.5**, **3.13** за тестом "потенціювання снодійної дії барбамілу", у дослідах на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно циназепаму при $p < 0,05$.

Слід зазначити, що для вивчених сполук **3.1-3.14** з невеликою довжиною ацильного фрагменту не відмічено достовірних відмінностей у величинах ED_{50} за снодійною активністю (рис. 3.2). Мабуть це пов'язано з однаковою швидкістю їх гідролізу у печінці і швидким надходженням активного метаболіту у мозок, як це зазначалося для ряду естерів оксазепаму [137, 138], однак не слід виключати активність і самих естерів.

Зі збільшенням довжини ланцюга у третьому положенні у ряді 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів (сполуки **3.15-3.18**) снодійний ефект достовірно знижується порівняно до сполук **3.1-3.14**. Так, значення величини ED_{50} для естерів каприлової (**3.15-3.16**), лауринової (**3.17-3.18**) кислот достовірно знижуються і становлять, відповідно, 0,90; 1,20; 1,00; 1,50 мг/кг (рис. 3.2). Можна припустити, що із збільшенням довжини ацильного фрагменту швидкість гідролізу у печінці може знижуватися, і такі сполуки можуть мати пролонговану активність [139].

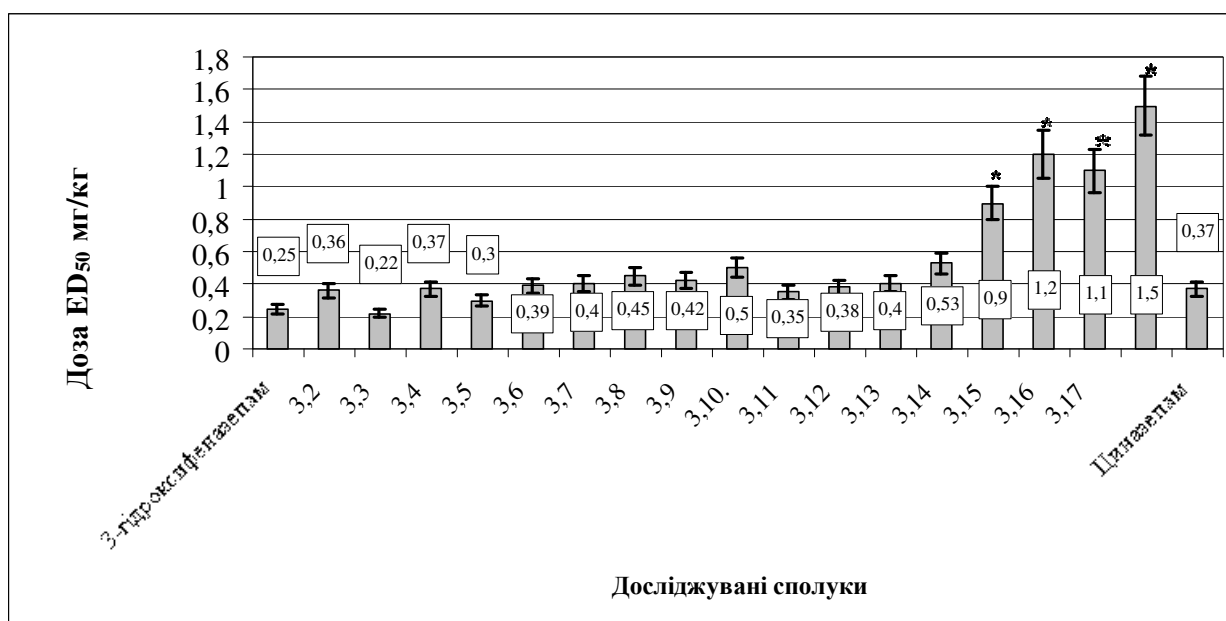


Рис. 3.2. Вплив 7-бром-5-арил-3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів на потенціювання снодійної дії барбамілу у дослідях на мишах, $n = 10$

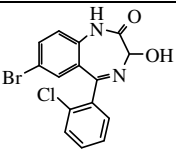
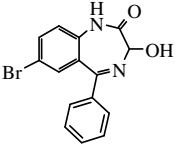
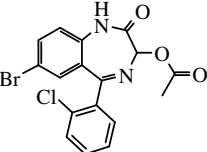
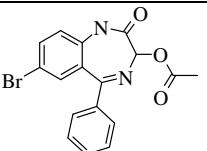
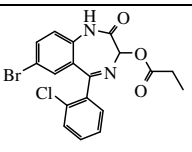
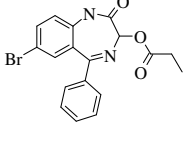
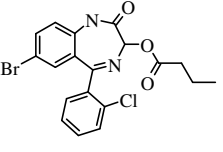
Примітки:

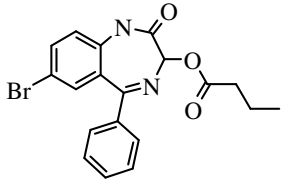
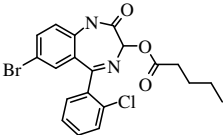
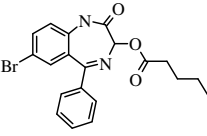
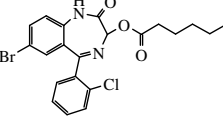
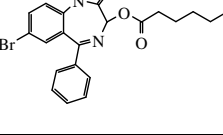
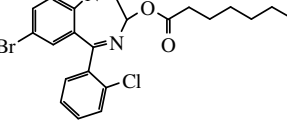
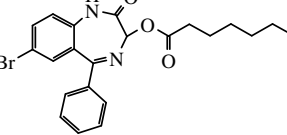
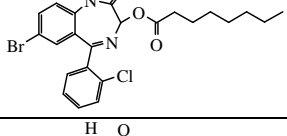
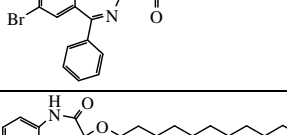
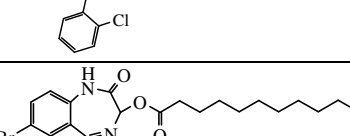
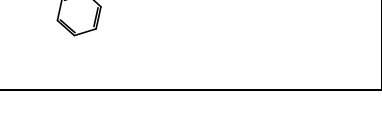
- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно циназепаму при $*p < 0,05$.

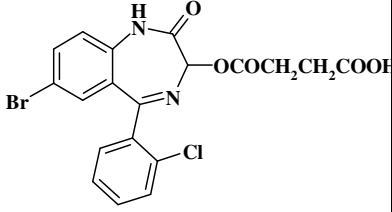
Синтезовані сполуки в інтервалі доз ED₅₀ 0,18 - 0,97 мг/кг виявляють також седативні властивості в дослідях на мишах за методом "відкритого поля" (табл. 3.2). Встановлено, що фармакологічна активність досліджених сполук залежить від структури та їх фізико-хімічних властивостей (табл. 3.2). Для досліджених сполук нами була встановлена константа розподілу у системі "октанол-вода" log P , яка характеризує здатність біологічно активних речовин проникати крізь біомембрани (табл. 3.2).

Слід зазначити, що для вивчених сполук з невеликою довжиною ацильного фрагменту (сполуки **3.1-3.6**) не відмічено достовірних відмінностей у величинах ED₅₀ за седативною активністю. Зі збільшенням довжини ацильного фрагменту, і збільшенням log P сполук (**3.7-3.10**), фармакологічна активність знижується.

Вплив 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів на седативну активність за методом "відкритого поля" в дослідах на мишах, n = 10

№ п/п	Структури досліджених сполук	Зниження загальної рухової активності за методом "відкритого поля" ED ₅₀ мг/кг.	logP
3.1	 3-гідроксифеназепам	0,20 [0.11-0.43]	3,91
3.2		0.27 [0.19-0.52]	3,35
3.3		0.18 [0.13-0.39]	4,14
3.4		0.28 [0.16-0.46]	3,58
3.5		0.19 [0.12-0.36]	4,8
3.6		0.31 [0.16-0.47]	4,24
3.7		0.28 [0.19-0.43]	5,21

3.8		0.29 [0.15-0.44]	4,65
3.9		0.33 [0.24-0.47]	5,63
3.10		0.35 [0.23-0.56]	5,07
3.11		0,24 [0.13-0.48]	6,05
3.12		0,36 [0.23-0.56]	5,49
3.13		0,38 [0.24-0.57]	6,46
3.14		0,46 [0.26-0.61]	5,91
3.15		0,82* [0.63-0.98]	6,88
3.16		0,92* [0.81-1.05]	6,32
3.17		0,85* [0.61-0.99]	8,55
3.18		0.97* [0.76-1.1]	7,99

Циназепам		0,27 [0,23 - 0,33]	
-----------	---	-----------------------	--

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно циназепаму при *p < 0,05.

При вивченні поведінкової реакції у мишей під впливом сполук **3.1-3.9** дозою 0,4 мг/кг було встановлено, що зниження загальної рухової активності за методом "відкритого поля", спостерігається за рахунок зменшення горизонтальної та вертикальної рухової активності тварин. Для досліджених сполук **3.1-3.6** не помічено достовірної різниці у впливі на горизонтальну рухову активність мишей (табл. 3.3). Деякі з вивчених сполук (**3.2-3.6**) не поступаються циназепаму за седативною дією.

Таблиця 3.3

Показники поведінкових реакцій мишей за методом "відкритого поля" при внутрішньоочеревинному введенні сполук **3.1-3.9** (M ± m), n = 10

№ Сполуки	Горизонтальна рухова активність (кількість переходів із квадрату у квадрат)	Дослідницька поведінка (число зазирань в отвори)	Вертикальна рухова активність (число вставань на задні лапи)
Контроль	52,3 ± 4,83	8,5 ± 0,72	8,2 ± 0,91
3.1	12,7* ± 1,31	3,1* ± 0,38	0,3* ± 0,03
3.2	14,8* ± 1,39	3,6* ± 0,40	1,3* ± 0,14
3.3	15,4* ± 1,42	2,8* ± 0,31	1,6* ± 0,15
3.4	14,5* ± 1,41	2,8* ± 0,27	1,6* ± 0,13
3.5	15,8* ± 1,44	1,1* ± 0,13	1,4* ± 0,15

3.6	16,0* ± 1,71	2,9* ± 0,27	1,7* ± 0,18
3.7	17,9* ± 1,64	2,3* ± 0,25	1,1* ± 0,10
3.8	18,8* ± 1,89	3,5* ± 0,38	1,9* ± 0,18
3.9	19,3* ± 1,87	3,3* ± 0,35	1,4* ± 0,12
Циназепам	16,4* ± 1,59	1,3* ± 0,14	1,1* ± 0,12

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

При вивченні впливу сполук **3.10-3.18** на спонтанну рухову активність мишей дозою 0,4 мг/кг було встановлено, що збільшення довжини ацильного фрагменту, починаючи зі сполуки **3.14** призводить до достовірного зменшення седативної активності досліджуваних сполук (табл. 3.4) за рахунок зростання горизонтальної рухової активності.

Таблиця 3.4

Показники поведінкових реакцій мишей за методом "відкритого поля" при внутрішньоочеревинному введенні сполук **3.10-3.18** (M ± m), n = 10

№ Сполуки	Горизонтальна рухова активність (кількість переходів із квадрату у квадрат)	Дослідницька поведінка (число зазирань в отвори)	Вертикальна рухова активність (число вставань на задні лапи)
Контроль	49,1 ± 5,22	9,2 ± 0,82	6,2 ± 0,71
3.10	17,9 ± 1,83	1,9 ± 0,21	1,4 ± 0,13
3.11	19,4 ± 1,81	1,8 ± 0,17	1,6 ± 0,14
3.12	18,4 ± 1,73	1,2 ± 0,13	1,9 ± 0,15
3.13	19,9 ± 1,82	1,3 ± 0,12	1,5 ± 0,13
3.14	26,4* ± 2,84	4,3* ± 0,13	2,4* ± 0,20
3.15	32,6* ± 3,11	2,9* ± 0,27	2,7* ± 0,28

3.16	33,1* ± 3,35	3,2* ± 0,29	4,9* ± 0,38
3.17	26,3* ± 2,63	3,1* ± 0,32	2,9* ± 0,29
3.18	35,1* ± 3,43	2,8* ± 0,25	4,1* ± 0,38
Циназепам	16,4 ± 1,59	1,3 ± 0,14	1,1 ± 0,12

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Слід відмити, що отримані нами результати співпадають з результатами інших авторів, які вивчали нейротропну активність естерів оксазепаму і їх залежність "структура-активність". Вони продемонстрували, що збільшення довжини ланцюга, як і у наших експериментах, приводить до зниження не тільки фармакологічної активності, а й афінитету до центральних бенздіазепінових рецепторів [139, 140].

Механізм фармакологічної дії 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів полягає в їх здатності зв'язуватися зі специфічним сайтом ГАМК_A рецепторів – центральними бенздіазепіновими рецепторами (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Афінитет 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів до центральних бенздіазепінових рецепторів

№ сполуки	IC ₅₀	K _i
	nM	
1	8	4,41
2	6,6	3,63
3	19	10,47
4	50	27,56

5	5,6	3,09
6	28	15,43
7	1,9	1,05
8	180	99,2
9	4,7	2,6
10	11	6,06
11	85	46,86
13	90	49,6
15	55	30,3

Величину константи інгібування (K_i) розраховували за формулою:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{Kd}}, \text{ де}$$

IC_{50} – концентрація тестуємого ліганду, при якій спостерігається витіснення 50% радіоліганду з місць його специфічного зв'язування з рецептором;

L – початкова концентрація радіоліганду;

Kd – константа дисоціації радіоліганду.

Нами було відмічено задовільну кореляцію між величинами ED_{50} за снодійної та седативної активністю та їх афінітетом до центральних бенздіазепінових рецепторів (величиною K_i) (табл.3.5).

У сучасному світі тривожні порушення посідають все більш значуще місце в структурі захворюваності населення, це пов'язано із значною напруженістю соціально-психологічних умов життя, інформаційним перевантаженням у психологічно значущих сферах та стресами [9, 141]. За даними літератури, близько 70 % людей знаходяться в умовах постійного стресу, який у 35 % стає причиною соматичних захворювань [20, 142]. Профілактика та лікування цих порушень – одна з пріоритетних медичних

проблем, що має велике соціальне значення. Для лікування невротичних розладів, тривоги, неврозоподібних станів в клініці широко застосовуються в даний час анксиолітики бенздіазепінового ряду, які є агоністами бенздіазепінових рецепторів, котрі тісно пов'язані з ГАМК_A рецепторами [9, 108]. При стимуляції бенздіазепінових рецепторів спостерігається алостерична активація ГАМК_A рецепторів. Тому взаємодія бенздіазепінів з БДР проявляється у вигляді ГАМК-міметичного ефекту [27, 110]. Відомо, що зв'язування бенздіазепінів з α_2 або α_3 субодиницями ГАМК_A рецептора призводить до розвитку анксиолітичного ефекту, тоді як зв'язування з α_1 – до розвитку седативного ефекту [8, 35].

Тому базова терапія, особливо на ранніх етапах, повинна ґрунтуватися на застосуванні ГАМК-ергічних лікарських засобів. ГАМК-ергічні лікарські засоби включають барбітурати, похідні 1,4-бенздіазепінів та сполуки небенздіазепінової структури (золпідем, зопіклон) [6]. Оскільки досліджувані нами сполуки відносяться до нових 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепіну, тому нами була вивчена анксиолітична дія нових естерів капронової, енантової, капрілової та лаурінової кислот (сполуки **3.11–3.17**) на моделі "конфліктна ситуація". Властиво конфліктні ситуації найбільш часто приводять до стресу і невротичних станів у людини.

Результати дослідження показали, що похідні 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они (сполуки **3.11–3.15**) проявляють анксиолітичну активність за методом "конфліктної ситуації". Деякі з досліджених сполук **3.11, 3.13, 3.15** з атомом хлору в орто-положенні фенільного кільця виявляють помірну анксиолітичну активність (від 34 до 26 ноцицептивних вживань води у щурів, порівняно до контролю (14 ноцицептивних вживань води) за методом "конфліктної ситуації") і у 1,5 – 2 рази збільшують кількість ноцицептивних вживань води, порівняно до контролю (рис. 3.3). Заміна атома хлору на атом водню приводить до зниження анксиолітичної активності до рівня контрольної групи тварин. Показано, що за анксиолітичною активністю досліджені сполуки значно

поступаються метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму (90 ноцицептивних вживань води), сполука **3.1** (рис. 3.3).

В результаті проведених нами досліджень встановлено, що у ряді нових 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, анксиолітична активність залежить від довжини ацильного фрагменту у третьому положенні і наявності атома хлору в орто-положенні фенільного кільця молекули. Збільшення довжини ацильного фрагменту зменшує анксиолітичну активність досліджених сполук (з 34 до 11 ноцицептивних вживань води).

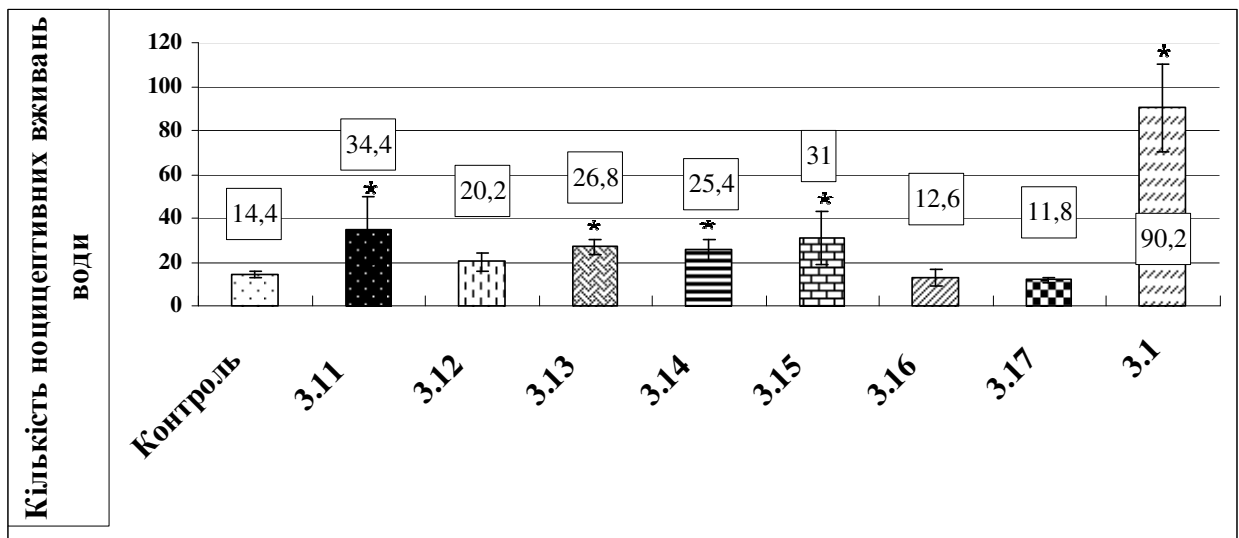


Рис. 3.3. Вплив 7-бром-5-арил-3-ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів на вираженість анксиолітичної дії у щурів, за методом "конфліктної ситуації", n = 8

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Таким чином, проведені нами дослідження показали, що нові синтезовані сполуки (7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они) володіють високою гіпноседативною активністю на рівні

циназепаму, помірною анксиолітичною активністю, що вказує на перспективність подальшого пошуку нових сполук з нейротропним ефектом у цьому ряді. Встановлено, що збільшення довжини ацильного фрагменту і ліпофільності досліджуваних сполук приводить до зниження фармакологічної активності.

3.2. Вивчення протисудомної активності нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, встановлення значення (ED_{50}), та їх вплив на пам'ять та апетит щурів

За даними ВООЗ епілепсія є одним з найпоширеніших захворювань нервової системи. Кожного року захворюваність на епілепсію збільшується на 2 млн осіб, тому сьогодні в світі нараховується понад 40 млн хворих на епілепсію, що складає 0,68 % популяції планети [143]. Питання, що стосуються етіологічних аспектів епілепсії, до цього дня залишаються дискусійними. Розповсюдженими факторами, що можуть викликати епілепсію, є судинні захворювання, травма, спадковість, пухлини, інсульт, отруєння та інші [143]. Спровокувати захворювання можуть деякі види дієти та фактори зовнішнього середовища. Відомо, що механізм протисудомної дії протиепілептичних засобів пов'язаний, головним чином, з активацією тормозних нейромедіаторних систем головного мозку, а саме ГАМК-, гліцин- і серотонін-ергічних [11, 16]. Доведено, що порушення гальмівної функції ГАМК-ергічної системи призводить до виникнення судом. Практично всі препарати бенздіазепінового ряду (діазепам, нітразепам, клоназепам, феназепам, лоразепам) виявляють протисудомну активність і є антагоністами коразолу [144]. Вони застосовуються для попередження або зменшення за інтенсивністю і частотою судом, що спостерігаються при нападах, що виникають періодично при різних формах епілепсії [143]. Підбір протиепілептичних препаратів для кожного окремого пацієнта здійснюють на основі типу судомних нападів. Парентеральне введення діазепаму використовується як один з кращих методів лікування епілептичного статусу.

Прийом всередину нітразепаму є ефективним засобом при міоклонічних нападах [144]. Препарат клоназепам є ефективним засобом при всіх формах епілепсії [145]. Оскільки існує потреба в протисудомних лікарських препаратах, а досліджені сполуки **3.1-3.17** відносяться до похідних 1,4-бенздіазепінів, тому нами було вивчено протисудомну дію досліджуваних сполук.

Як показали наші дослідження з вивчення протисудомної активності на моделі "антагонізму з коразолом" в дослідах на мишах, 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они виявляють високу протисудомну активність з ED₅₀ від 0,03 до 0,40 мг/кг. Деякі досліджувані сполуки (**3.1-3.7**) проявляють протисудомну активність на рівні циназепаму (препарату Левана[®] IC) (ED₅₀ 0,07 мг/кг). Збільшення довжини ацильного фрагменту у третьому положенні призводить до зниження протисудомної активності, але сполуки **3.14-3.17** не поступаються діазепаму (ED₅₀ 0,40 мг/кг) (табл. 3.6), який широко використовується у клінічній практиці, як протиепілептичний засіб.

Таблиця 3.6

Протисудомна активність 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів в дослідах на мишах за тестом "антагонізму з коразолом" (115 мг/кг), n = 6

№ сполуки	R ¹	R ²	Протисудомна активність ED ₅₀ , мг/кг
3.1 3-гідроксифеназепам	Cl	-	0,03 [0,024 – 0,036]
3.2	H	-	0,05 [0,040 - 0,060]
3.3	Cl	CH ₃	0,05 [0,039 – 0,590]
3.4	H	CH ₃	0,05 [0,041 – 0,061]

3.5	Cl	CH ₂ CH ₃	0,06 [0,048 – 0,072]
3.6	H	CH ₂ CH ₃	0,08 [0,063-0.097]
3.7	Cl	(CH ₂) ₂ CH ₃	0,09 [0,072 - 0,108]
3.8	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	0,11* [0,088 - 0,132]
3.9	Cl	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,10* [0,078 - 0,122]
3.10	H	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,12* [0,095 - 0,145]
3.11	Cl	(CH ₂) ₄ CH ₃	0,30* [0,230 – 0,370]
3.12	H	(CH ₂) ₄ CH ₃	0,33* [0,263 - 0,397]
3.13	Cl	(CH ₂) ₅ CH ₃	0,32* [0,265 – 0,397]
3.14	H	(CH ₂) ₅ CH ₃	0,36* [0,288 - 0,432]
3.15	Cl	(CH ₂) ₆ CH ₃	0,38* [0,303 - 0,457]
3.16	H	(CH ₂) ₆ CH ₃	0,42* [0,335 – 0,505]
3.17	Cl	(CH ₂) ₁₀ CH ₃	0,40* [0,319 - 0,481]
Циназепам	Cl	(CH ₂) ₂ COOH	0,07 [0,036 - 0,130]

Примітки:

1) n = кількість тварин у кожній групі;

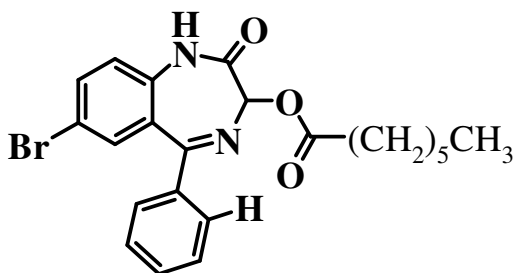
2) достовірність відносно циназепаму при *p < 0,05.

Спектр фізіологічних станів, при яких є порушення когнітивних функцій, таких як пам'ять, навчання, концентрація уваги, орієнтація у просторі – дуже широкий [73]. Він включає когнітивний дефіцит при інсультах та хронічних цереброваскулярних захворюваннях, різних нейродегенеративних пошкодженнях та травмах мозку, нейроінфекціях, інтоксикаціях (включаючи алкогольну кому), затримці розвитку дітей [146].

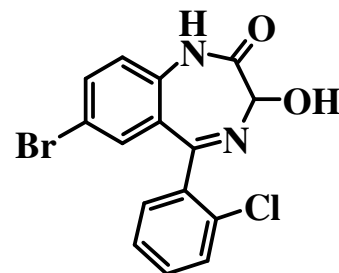
Аналогічні порушення спостерігаються і при різних захворюваннях (неврозах, неврозоподібних станах, астеноневротичних реакціях, тощо), і ступінь цих порушень збільшується при гострих і хронічних стресових впливах [147]. У зв'язку з цим особливого значення набуває пошук і створення препаратів, що знижують і запобігають дії стресорного фактора і володіють одночасно ноотропними властивостями (підвищують увагу, та поліпшують пам'ять, розумову діяльність і стійкість мозку до агресивних дій) [146].

Як відомо, вплив препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду на здатність до навчання і на процеси пам'яті неоднозначний [2]. У літературі є дані про те, що під впливом деяких бенздіазепінових анксиолітиків у низьких дозах (0,05 - 0,5 мг/кг) відбувається полегшення цих процесів, однак при збільшенні дози, ефект полегшення пам'яті зникає [9].

Для оцінки когнітивних функцій у щурів серед нових 3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів було вивчено вплив естера енантової кислоти (**3.14**), який має у третьому положенні велику довжину ацильного фрагменту порівняно з 3-гідроксифеназепамом, який у третьому положенні має лише ОН групу (**3.1**).



Естер енантової кислоти (**3.14**)



3-гідроксифеназепам (**3.1**)

Для оцінки впливу на пам'ять був використаний тест "водного лабіринту Морріса", заснований на здатності тварин до просторової орієнтації, і котрий дає можливість, використовуючи тестування (через 10 діб після навчання), оцінити також довготривалу просторову пам'ять. Відомо, що саме порушення просторової орієнтації є одним з ранніх проявів хвороби Альцгеймера [73].

Проведені нами дослідження показали, що на першу добу введення у тварин під дією естеру енантової кислоти дозою 0,4 м/кг відмічено недостовірне збільшення короткочасною пам'яті, порівняно до інтактних тварин. Під впливом 3-гідроксифеназепаму дозою 0,4 м/кг спостерігається недостовірне зниження навчання та просторової пам'яті у щурів, порівняно до контрольної групи (рис. 3.4).

При тестуванні на 10 добу у щурів під дією естеру енантової кислоти відмічено не достовірне збільшення довгострокової пам'ять, тоді як 3-гідроксифеназепам навпаки знижує довготривалу пам'ять, порівняно до контрольної групи (рис. 3.4).

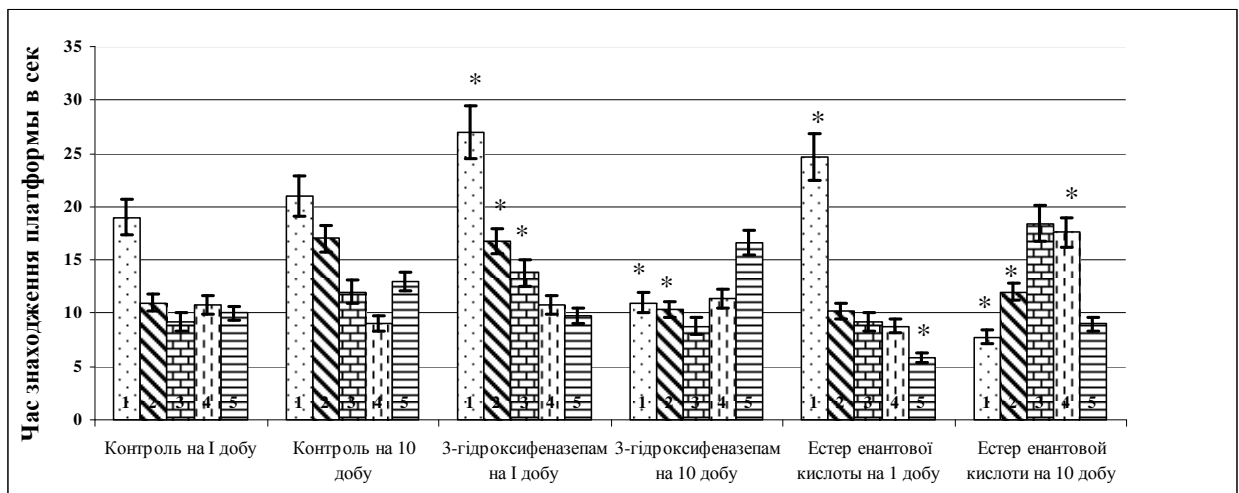


Рис. 3.4. Вплив естеру енантової кислоти та 3-гідроксифеназепаму у дозі 0,4 мг/кг на процеси пам'яті, здатність до навчання, та на довгострокову пам'ять за методом "водного лабіринту Морріса", в дослідях на щурах (1-5 кількість пред'явлень), $n = 10$

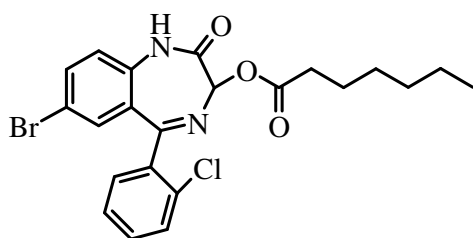
Примітки:

- 1) $n =$ кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

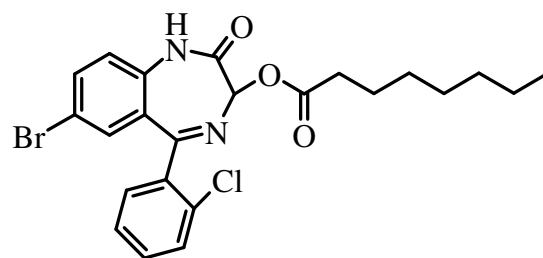
Проблема зайвої ваги у сучасному суспільстві являє собою серйозну медичну проблему, оскільки є фактором ризику розвитку діабету, серцево-судинних захворювань [60]. З іншого боку, відсутність апетиту (анорексія), різка втрата маси тіла супроводжують такі захворювання як СНІД, туберкульоз, ракові процеси, різні психічні порушення [65].

У зв'язку з цим зростає інтерес до проблеми регуляції апетиту, оскільки арсенал використовуваних терапевтичних засобів для вирішення цієї проблеми досить обмежений [72]. До них відносяться засоби, що впливають на катехоламінергічну (фенамін, фепранон), серотонінергічну систему (сібутармін), препарати, що регулюють всмоктування жирів (орлістат) та інші [61, 62]. Проте, при застосуванні цих препаратів можливі побічні ефекти з боку серцево-судинної системи, ЦНС, розвиток лікарської залежності.

З літератури відомо, що спектр фармакологічної активності 3-заміщених 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепінів відрізняється від феназепаму, діазепаму, лоразепаму [11, 74]. Так, 3-аміно-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они володіють менш вираженими анксиолітичними, протисудомними, міорелаксантами та седативними ефектами, але проявляють регулюючий вплив на апетит [60]. Фармакологічні властивості цих речовин обумовлені, головним чином, зв'язуванням їх з бенздіазепіновими та з холецистокініновими рецепторами двох підтипів - ССК₁ і ССК₂ [60, 148]. Тому нам здавалося доцільним вивчити вплив на апетит нових 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів за тестом "анорексія" у дослідах на щурах. Ми вивчали вплив естерів енантової (**3.13**) та каприлової (**3.15**) кислот на апетит дослідних тварин.



Естер енантової кислоти (**3.13**)



Естер каприлової кислоти (**3.15**)

Отримані нами результати з вивчення впливу на апетит сполук **3.13** та **3.15** показали, що досліджені сполуки дозою 1 мг/кг регулюють апетит щурів. Так, через годину після розміщення тварин у експериментальній камері спостерігається зниження апетиту в 1,5-2,5, рази у порівнянні з контролем (анорексигенний ефект). Через 2 години, та до кінця експерименту, у всіх дослідних тварин спостерігається підвищення апетиту, у порівнянні з контролем (орексигенний ефект). Це можна пояснити тим, що через 2 години після введення сполук до організму тварин утворюється активний метаболіт 3-гідроксифеназепам, який, як показали дослідження авторів [60, 72], володіє орексигенною дією. Найбільш виражений вплив на апетит проявляє сполука **3.13** (7-бром-3-гексилкарбонілокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он), естер енантової кислоти (рис. 3.5).

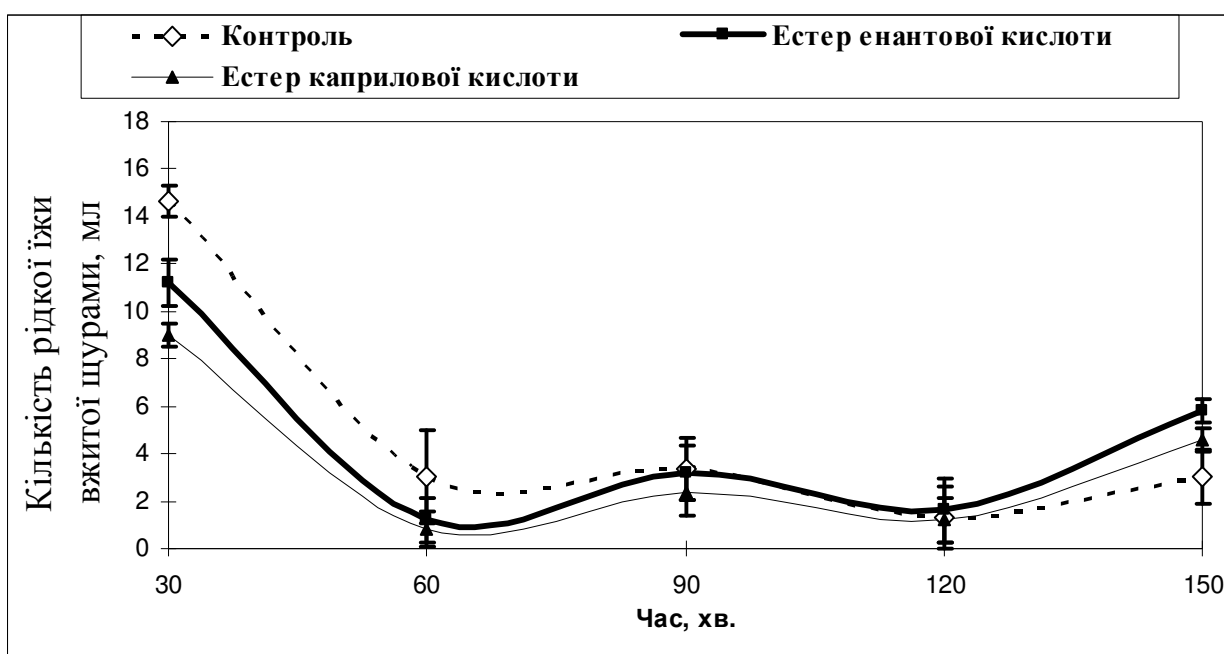


Рис. 3.5. Вплив естерів енантової (**3.13**) та каприлової (**3.15**) кислот у дозі 1 мг/кг на апетит щурів, n = 10

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $p < 0,05$.

Як відомо, препарати 1,4-бенздіазепінового ряду серед численних психотропних засобів є найбільш використовуваними у всіх галузях медицини: психіатрії, неврології, хірургії, дерматології, педіатрії, онкології, гінекології тощо [20]. Однак, бенздіазепінам притаманний і ряд небажаних ефектів (міорелаксація, толерантність, залежність тощо). Із літератури відомо, що ED_{50} для феназепаму складає 1,8 мг/кг, для нітразепаму – 1,55 мг/кг [5]. Нами була вивчена міорелаксанта дія за тестом "стрижня, що обертається". Показано, що досліджувані сполуки володіють менш вираженою міорелаксанта дією, ED_{50} за цим видом активності становить 2,5-6,5 мг/кг. Так, ED_{50} для естеру оцтової кислоти (**3.4**) становить 2,5 мг/кг, естеру енантової кислоти (**3.13**) – 5,5 мг/кг, а для естеру каприлової кислоти (**3.15**) – 6,0 мг/кг (рис. 3.6). Аналізуючи отримані нами результати, можна припустити, що збільшення довжини ацильного фрагменту призводить до зниження міорелаксанта дії.

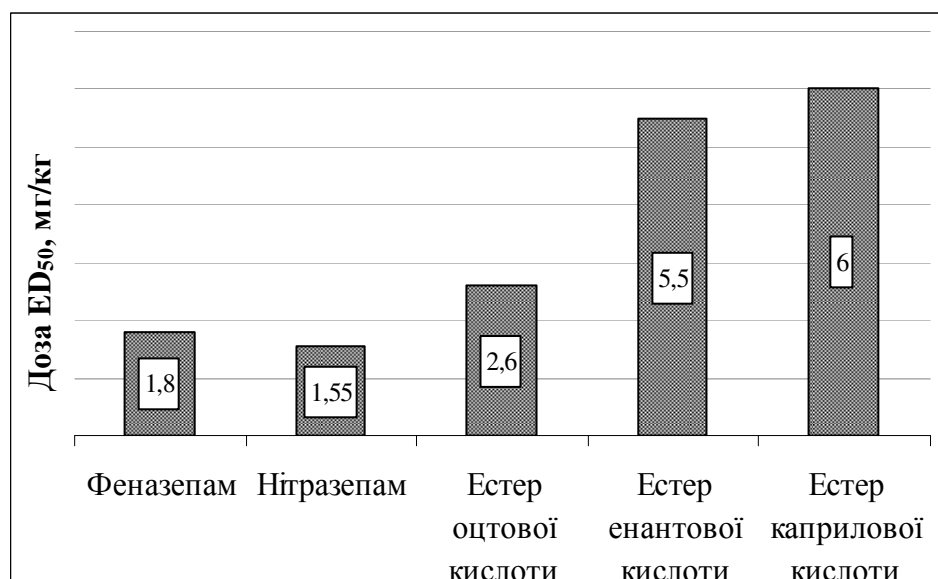


Рис. 3.6. Вплив естерів оцтової, енантової, каприлової кислот, феназепаму та нітразепаму на вираженість міорелаксанта дії у мишей за тестом "стрижню, що обертається" в дослідях на мишах, $n = 10$

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) при $p < 0,05$.

Відомо, що терапевтичний індекс (ТІ) широко використовується фармакологами в дослідженнях на тваринах для встановлення міри токсичності речовин, чим вищий індекс, тим менш токсичною вважається речовина [8]. Терапевтичний індекс розраховується за формулою $TI = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$.

Нами встановлено, що терапевтичний індекс для досліджених сполук складає 1620 - 1750.

У клінічній практиці для встановлення міри токсичності препарату використовують індекс специфічної терапевтичної дії (I_{CTD}), який розраховують за формулою $I_{CTD} = \frac{ED_{50}(\text{міорелаксація})}{ED_{50}}$. Нами встановлено, що

I_{CTD} для досліджених сполук становить 7 - 15.

Відомо, що реакція організму на чужорідні речовини залежить від їх хімічної структури. Вивчення гострої токсичності показало, що 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они відносяться до IV класу токсичності і є малотоксичним сполуками за класифікацією К.К. Сидорова, їх $LD_{50} > 650$ мг/кг. Таким чином за проведеними нами дослідженнями встановлено, що 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они володіють високою протисудомною активністю на рівні циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму при менш виражених побічних ефектах (порушення пам'яті, міорелаксація).

До 3-ацилокси-1,4-бенздіазепін-2-онів також відноситься циназепам (препарат Левана ІС). Це новий гіпноседативний препарат, який має високу гіпноседативну активність, препарат вже впроваджений у медичну практику як снодійний засіб [4]. Однак процеси розвитку толерантності до циназепаму та його метаболіту, 3-гідроксифеназепаму, а також їх вплив на показники "спання - неспання" в умовах патології у щурів з попереднім введенням резерпіну до теперішнього часу не були вивчені.

Результати цього розділу було опубліковано:

1. Онуфrienко О. В. Нейрофармакологічні властивості препаратів, що регулюють сон / С. А. Андронаті, Т. Л. Карасьова, О. В. Онуфrienко, В. І. Павловский // Научные основы создания лекарственных средств : XI Научно-практический семинар материалы докладов, 21 -25 травня 2011 р., Гурзуф: матеріали конф. – Гурзуф, 2011. - С.23-28.

2. Онуфrienко О. В. Вивчення нейротропних властивостей нових алкілтіопохідних 1,3,4-бензтриазепіну в порівнянні з 1,3,4-бензтриазепін-2-онами та -2-тіонами / Т. Л. Карасьова, О. В. Онуфrienко, С. В. Власюк, В. І. Павловський, С. А. Андронаті // Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів : конф. з міжнар. участю, 15-18 квіт. 2008 р., Львів : матеріали конф. – Львів, 2008. - С. 70.

3. Онуфrienко О. В. Синтез и нейротропные свойства новых 3-замещённых 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов / О. В. Онуфrienко, Е. А. Семенишина, М. С. Бойко, Т. Л. Карасёва // Хімічні проблеми сьогодення : III Всеукр. наук. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених, 17-19 берез. 2009 р., Донецьк : матеріали конф. – Донецьк, 2009. - С. 106.

4. Onuphrienko O. V. Neuropharmacological properties of new 3-substituted 1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-ones / M. S. Boiko, O. V. Onuphrienko // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolytion : IV International young Scientists conference, 16-19 septem. 2009, Odessa : abstracts. – Odessa, 2009. - P. 130.

5. Онуфrienко О. В. Изучение влияния 3-ацилокси -1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепинов на аппетит крыс / О. В. Онуфrienко, Е. А. Семенишина, М. С. Бойко, Т. Л. Карасёва // Розвиток наукових досліджень 2009 : V міжнар. наук.-практ. конф., 23-25 листопада 2009 р., Полтава : матеріали конф. – Полтава, 2009. - С. 81-82.

6. Онуфrienко О. В. Влияние 7-бром-3-гексилкарбонилокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она на пространственную

ориентацию и память в водном лабиринте Морриса / О. В. Онуфриенко, Е. В. Отчиченко, Е. А. Семенишина // Теоретические и практические аспекты современной медицины : 82-а міжнар. наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених, 28-30 квітня 2010 р., Сімферополь : матеріали конф. – Сімферополь, 2010. - С. 198.

7. Онуфриенко О. В. Снотворная активность новых 3-замещённых 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов / Е. А. Семенишина, О. В. Онуфриенко, М. С. Бойко // Природні науки : зб. праць наук. товариства студентів, аспірантів та молодих вчених ОНУ імені І.І Мечникова. – Одеса : Південне мисливство, 2011. - С. 52-53 (Наукова конференція, присвячена 100-річчю від дня народження доцента Лариси Юхимівни Бешевлі., 25 листопада 2010 р., Одеса : тези).

8. Онуфриенко О. В. Снодійна активність нових 3-заміщених 1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів / О. В. Онуфриенко, М. С. Бойко // Молодь і поступ біології : VII міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів, 5-8 квіт. 2011 р., Львів : матеріали конф. – Львів, 2011. - С. 363-364.

9. Онуфриенко О. В. Гипно-седативные и противосудорожные свойства новых 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов / Т. Л. Карасева, К. С. Андронати, О. В. Онуфриенко, Е. А. Семенишина, В. И. Павловський, С. А. Андронати // IV Національний з'їзд фармакологів України, 10-12 жовт. 2011 р., Київ : матеріали конф. – Київ, 2011 - С. 148.

РОЗДІЛ 4. ВИЧЕННЯ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ РОЗВИТКУ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ЦИНАЗЕПАМУ (ПРЕПАРАТ ЛЕВАНА® ІС) ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ 3-ГІДРОКСИФЕНАЗЕПАМУ

4.1. Вивчення розвитку толерантності до циназепаму при тривалому введенні мишам протягом 14 та 30 діб

Серед численних психотропних засобів препарати групи 1,4-бенздіазепінового ряду вважаються найбільш "якісними", відрізняючись високою ефективністю в малих дозах, безпечністю і низькою токсичністю [21, 32]. Більше того, спектр їх психофармакологічної дії надзвичайно широкий і включає анксиолітичну, протисудомну, гіпнosedативну та інші [11, 20], що відповідає різноманітним галузям їх клінічного застосування. Однак при тривалому використанні препаратів похідних 1,4-бенздіазепінового ряду властивий і ряд небажаних ефектів (толерантність, залежність, тощо) [50].

Втрата організмом чутливості до визначеної дози фізіологічно активної речовини при тривалому її застосуванні є станом, що має назву толерантність [36]. Відомо, що толерантність та лікарська залежність розвиваються практично до всіх препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду. У таких випадках терапевтична ефективність препарату не забезпечується без збільшення дози, що в свою чергу, може привести до розвитку токсичних явищ [36, 52]. Однак механізм розвитку толерантності до теперішнього часу досліджено недостатньо. Деякі дослідники вважають [13], що в основі формування толерантності і залежності від бенздіазепінів лежить гіпофункція ГАМК системи мозку, що поступово розвивається при тривалому введенні [3]. Толерантність до бенздіазепінів більше пов'язана з фармакодинамічними механізмами (зміна активності рецепторів), ніж з метаболічними [149]. Відомо, що толерантність до бенздіазепінів розвивається в першу чергу за седативним, міорелаксантичним, а потім за анксиолітичним ефектом [11].

Характерними для звикання до бенздіазепінів є також порушення циркадного ритму "спанья-неспанья" з нічними пробудженнями [8].

Із літератури також відомо, що на відміну від повних агоністів, часткові агоністи ГАМК_A – рецепторного комплексу виявляють лише частину спектра фармакологічної активності бенздіазепінів, зберігаючи деякі клінічні та поведінкові ефекти (снодійний, анксиолітичний) при слабкому прояві міорелаксації або протисудомної дії [13]. Так, при введенні часткових агоністів сармазенілу, алпідему, золпідему, змішаного агоніста абекарнілу спостерігали уповільнений розвиток толерантності і слабкі ознаки синдрому відміни у лабораторних тварин порівняно до введення повних агоністів [13].

Циназепам при одноразовому введенні дозою 0,4 мг/кг (ED₅₀) проявляє виражений снодійний ефект за методиками "потенціювання і пролонгування снодійної дії барбітуратів" [5]. Виявлено, що циназепам значно скорочує латентний період настання сну, сприяючи більш швидкому засинанню. За снодійною дією не поступається препарату зопіклону (похідний циклопіролону) та препаратам 1,4-бенздіазепінового ряду (діазепаму, оксазепаму, нітразепаму та інших) [8].

У зв'язку із застосуванням циназепаму (препарат Левана ІС) у клінічній та амбулаторній практиці тривалими курсами важливу проблему представляє вивчення толерантності до цієї сполуки. Щодо інших препаратів 1,4-бенздіазепінової структури (хлордіазепоксид, діазепам, нітразепам, оксазепам) відомо, що при їх тривалому застосуванні спостерігається зниження активності речовин [11, 13]. Безпечність лікарських засобів при тривалому застосуванні є одним з головних критеріїв успішного впровадження їх у клінічну практику. Приймаючи до уваги той факт, що деякі препарати мають тривале застосування і використовуються без відповідного нагляду лікарів, вивчення цих показників є необхідним для забезпечення безпеки пацієнтів.

У зв'язку з вище викладеним, завданням цього дослідження було вивчення толерантності до циназепаму (препарату Левана® ІС) при

тривалому введенні протягом 14 і 30 діб, який був впроваджений у медичну практику, як новий снодійний засіб.

Проведене нами дослідження показало, що при одноразовому введенні циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) кількість тварин, які втратили рефлекс перевертання, становила 50 % (рис. 4.1), а загальна тривалість гексеналового сну при введенні циназепаму становила 45 хвилин, порівняно до контролю (23 хвилини), відповідно (рис. 4.2).

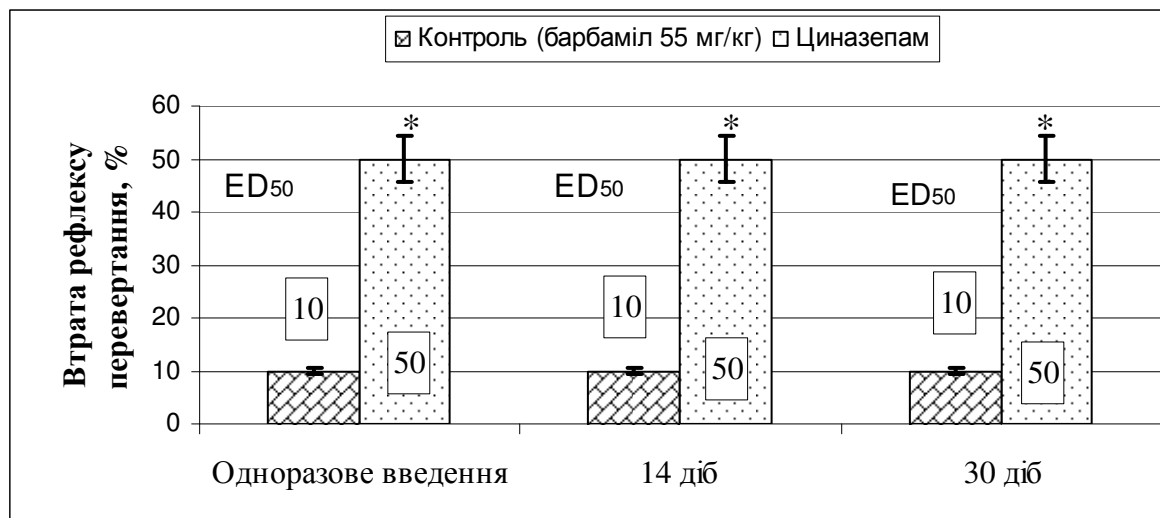


Рис. 4.1. Вплив циназепаму дозою 0,4 (ED_{50}) мг/кг на потенціювання снодійної дії барбітуратів при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 і 30 діб в досліді на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

При реєстрації снодійного ефекту в групі тварин, які одержували циназепам протягом 14 і 30 діб, дозою 0,4 мг/кг, спостерігається збереження цього ефекту, і у 50 % відзначається розвиток бічного положення (рис. 4.1), а загальна тривалість сну збільшувалася у 2 рази, порівняно до контролю (рис. 4.2).

При тривалому введенні циназепаму протягом 30 діб (ED_{50} 0,4 мг/кг) спостерігається збереження снодійної дії препарату, та не розвивається толерантність за цим ефектом.

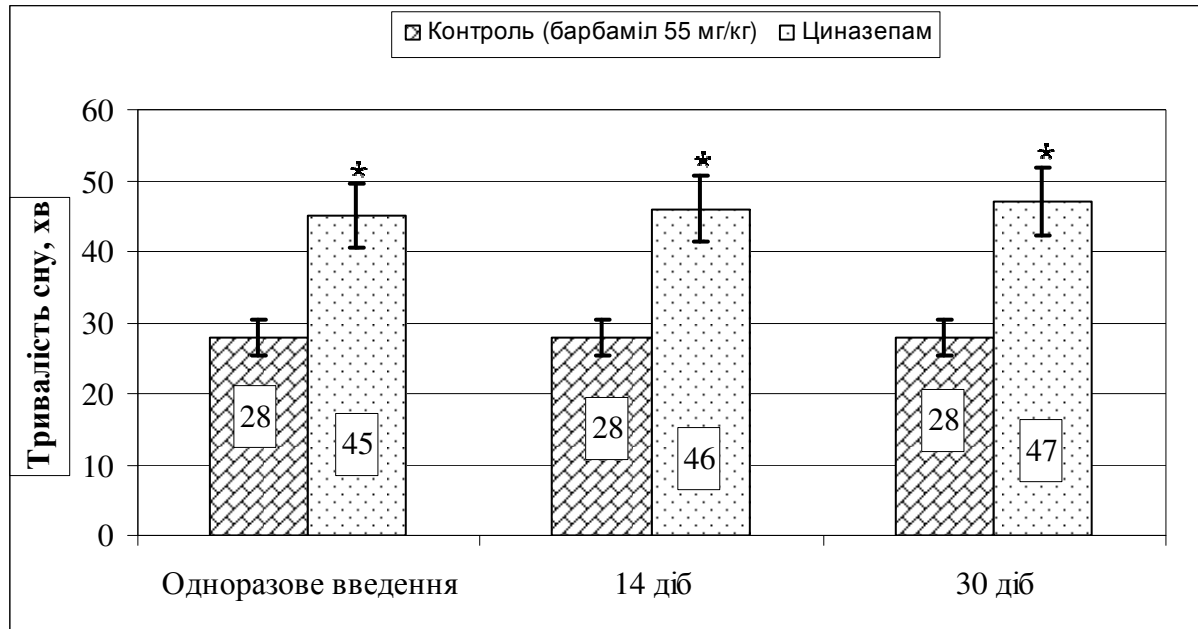


Рис. 4.2. Вплив циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) на пролонгування снодійної дії барбітуратів при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 і 30 діб в дослідях на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

Циназепам у дозі ED_{50} (0,4 мг/кг) при одноразовому застосуванні порушував координацію рухів у мишей за тестом "залізання на сітку" (рис.4.3). Вже на 14 добу введення реєструвалося повне зникнення порушення орієнтовних реакцій у цих тварин. Аналогічні ефекти спостерігалися і на 30 добу (рис.4.3).

Отримані дані свідчать про те, що при тривалому введенні циназепаму спостерігається розвиток толерантності за порушенням координації рухів у мишей.

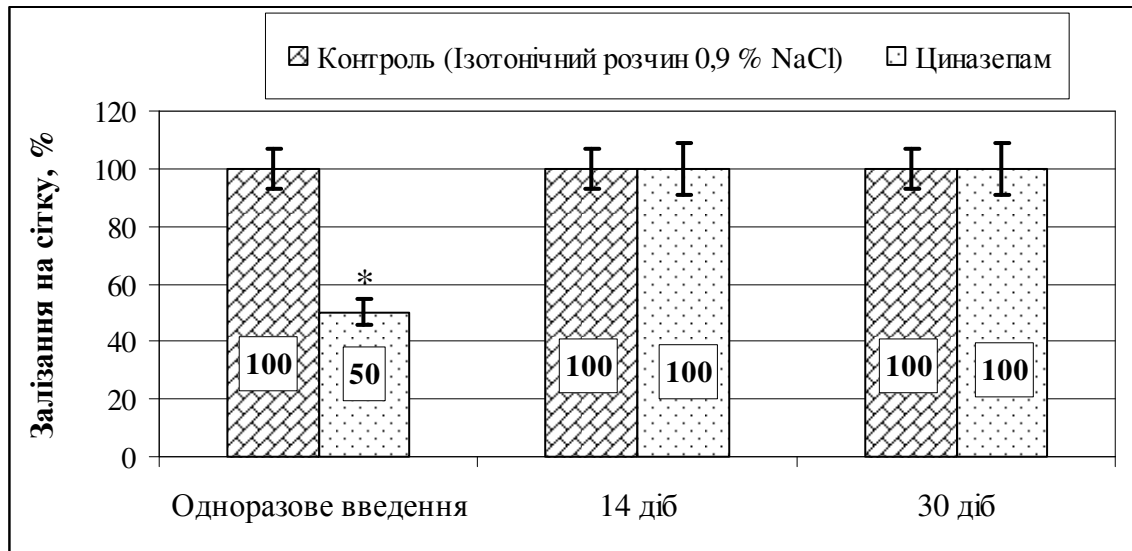


Рис. 4.3. Вплив циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) на порушення координації рухів при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 і 30 діб за методом "залізання на сітку" в дослідях на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

При вивченні поведінкової реакції у мишей за методом "відкритого поля" при одноразовому введенні циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) спостерігається седативний ефект, загальна рухова активність знижується у 4 рази, порівняно до контролю, за рахунок зниження горизонтальної та дослідницької поведінки (рис.4.4, табл. 4.1). При тривалому введенні протягом 14 та 30 діб реєструвалося відсутність седації у цих тварин, а рухова активність збільшувалася порівняно до однократного введення, тобто спостерігався розвиток толерантності за цим видом дії. Відзначалася тенденція до посилення загальної рухової активності за рахунок вертикальних стійок та дослідницької поведінки тварин у "відкритому полі" (рис.4.4, табл. 4.1).

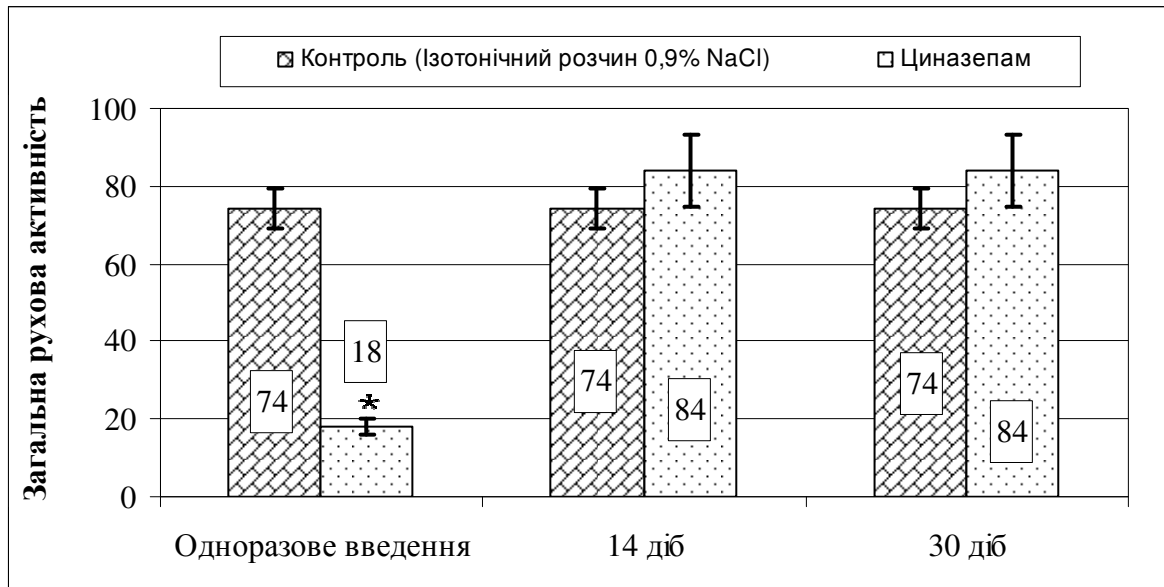


Рис. 4.4. Вплив циназепаму дозою 0,4 мг/кг на загальну рухову активність при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 і 30 діб за тестом "відкритого поля" в досліджах на мишах, n = 10

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Таблиця 4.1

Показники поведінкових реакцій мишей у методі "відкрите поле" при внутрішньоочеревинному введенні циназепаму протягом 14 і 30 діб,

(M ± m), n = 10

Показники	Контроль	Одноразове введення	Тривале введення протягом 14 діб	Тривале введення протягом 30 діб
Горизонтальна активність (кількість переходів з квадрату у квадрат)	44,1 ± 4,8	12,7 ± 1,1*	38,7 ± 4,1	36,4 ± 3,5
Дослідницька поведінка (число зазирань в отвори)	20,9 ± 1,9	4,2 ± 0,5*	23,5 ± 2,5	24,4 ± 2,5

Вертикальна рухова активність (число вставань на задні лапи)	9,0 ± 1,0	1,1 ± 0,8*	21,8 ± 1,9*	23,2 ± 2,4*
--	-----------	------------	-------------	-------------

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Отримані в цьому дослідженні результати співпадають з роботами авторів [151], які вивчали *in vitro* динаміку змін величини ГАМК - зсуву протягом 28-денного внутрішньоочеревинного введення циназепаму і показали, що максимальне зниження величини ГАМК - зсуву спостерігається через 14 діб після початку введення і залишається на цьому ж рівні до кінця введення. Через 7 діб після припинення введення циназепаму спостерігається повне відновлення функціональної спряженості ГАМК_AR.

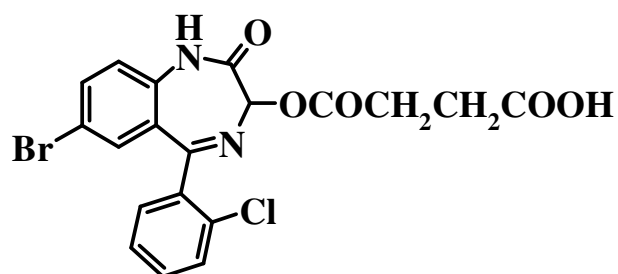
Таким чином, отримані в цьому дослідженні результати свідчать про те, що при тривалому введенні циназепаму мишам протягом 14 і 30 діб спостерігається збереження основної снодійної дії. Це можна пояснити достатньо високим рівнем концентрації у мозку циназепаму та його метаболіту, необхідних для проявлення цього ефекту. Толерантність розвивається щодо порушення координації рухів та седативної активності.

4.2. Вивчення розвитку толерантності до основного метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму при хронічному введенні протягом 14 та 30 діб

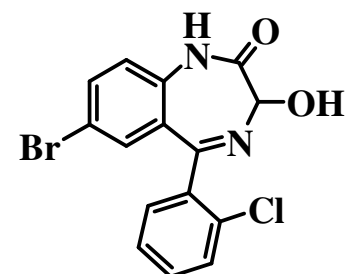
Аналіз багаторічного використання бенздіазепінів у клінічній практиці показав, що тривале їх застосування може привести до розвитку толерантності, причому не до всіх видів фармакологічної активності толерантність розвивається з однаковою швидкістю: найбільш швидко вона розвивається до седативного та протисудомного ефекта, повільніше – до

анксіолітичного [13]. Дослідження з вивчення толерантності до феназепаму показали, що при тривалому введенні феназепаму спостерігається толерантність за седативною дією, а анксіолітична зберігається [11]. Препарати бенздіазепінового ряду (діазепам, лоразепам та ін.), які є повними агоністами ГАМК_A рецептора, незважаючи на їх високу ефективність та низьку токсичність, мають вузьке терапевтичне вікно між дозами, що викликають анксіолітичний та седативний ефекти, а також дозами, пов'язаними з розвитком фізичної залежності і синдромом відміни [50, 59]. В кінці 1980-х на початку 1990 був розроблений ряд неселективних часткових агоністів бенздіазепінових рецепторів, таких як бретазеніл, абекарніл, пазіналон, які мали велике вікно між анксіолітичними і седативними дозами, а їх залежність і синдром відміни були значно меншими [13]. На жаль, ці сполуки з ряду причин не отримали широкого застосування у клінічній практиці.

Згідно з нашими експериментальними даними при тривалому застосуванні циназепаму протягом 14 і 30 діб зберігаються основні ефекти: снодійний і анксіолітичний, а толерантність розвивається за порушенням координації рухів та седативною дією [149]. Даних, стосовно розвитку толерантності до основного метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму, у літературі нами не виявлено. Тому нам доцільно було вивчити толерантність до 3-гідроксифеназепаму (7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2он), який є основним метаболітом циназепаму.



Циназепам (Левана ІС)



3-гідроксифеназепам

Отримані нами дані щодо вивчення толерантності до 3-гідроксифеназепаму за методом "продовження снодійної дії барбітуратів", показали, що через 14 діб після тривалого введення 3-гідроксифеназепаму до нього не розвивається толерантність і спостерігається збереження снодійного ефекту. Так, загальна тривалість сну дослідних тварин на 14 добу становила 48 хвилин так само, як і при одноразовому введенні (47 хвилин), тоді як в контролі 28 хвилин (рис.4.5).

При реєстрації снодійного ефекту в групі тварин, які щоденно отримували 3-гідроксифеназепам дозою 0,25 мг/кг (ED_{50}) протягом 30 діб, відзначено розвиток толерантності за основним ефектом: тривалість сну тварин зменшувалася у два рази, порівняно до однократного введення (рис. 4.5), та становила 28 хвилин.

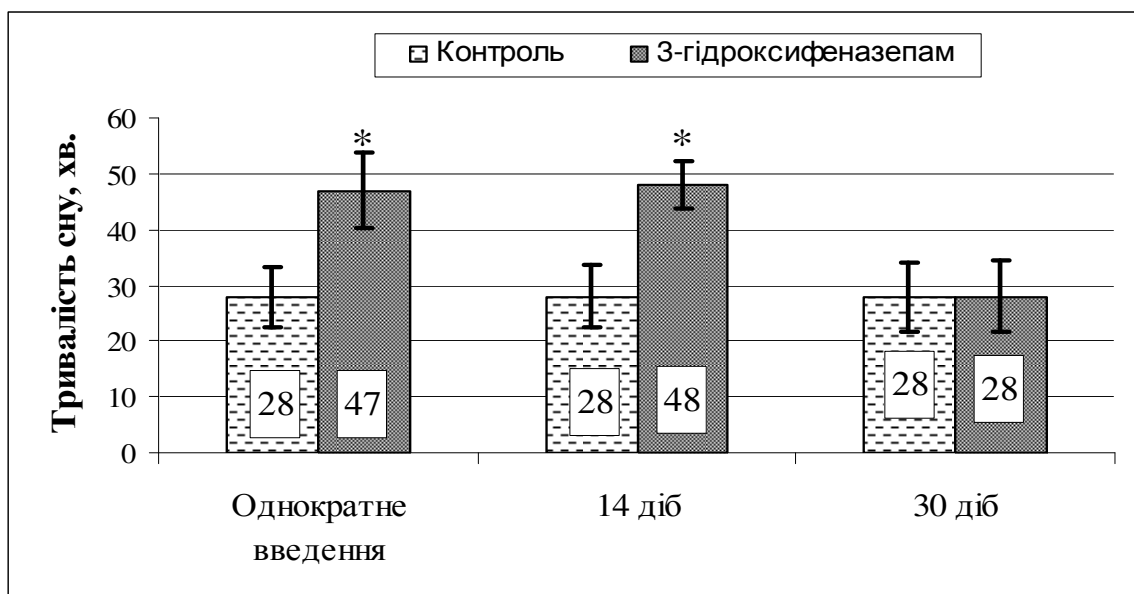


Рис. 4.5. Вплив 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг на продовження снодійної дії барбітуратів при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 і 30 діб в досліді на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

Таким чином, при тривалому введенні 3-гідроксифеназепаму (через 30 діб) у мишей спостерігається розвиток толерантності за снодійною дією, на відміну від циназепаму, до якого в ці терміни дослідження толерантність не розвивається.

Дослідження загальної рухової активності за методом "відкритого поля" під впливом 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг (ED_{50}) при одноразовому введенні спостерігається розвиток седативного ефекту, як і у циназепаму (рис. 4.6, табл. 4.2). На 14 добу введення реєструється збільшення загальної рухової активності за рахунок горизонтальної активності (рис. 4.6, табл. 4.2). Проте на 30 добу введення 3-гідроксифеназепаму спостерігається зниження загальної рухової активності мишей у "відкритому полі", порівняно до групи тварин, яка отримувала 3-гідроксифеназепам протягом 14 діб, приблизно у 2 рази, тобто розвивається седативний ефект (рис. 4.6, табл. 4.2). Ці дані узгоджуються з висновками, наведеними в роботі [150], про те, що в ці терміни відбувається повне відновлення функціональної спряженості ГАМК_A Р.

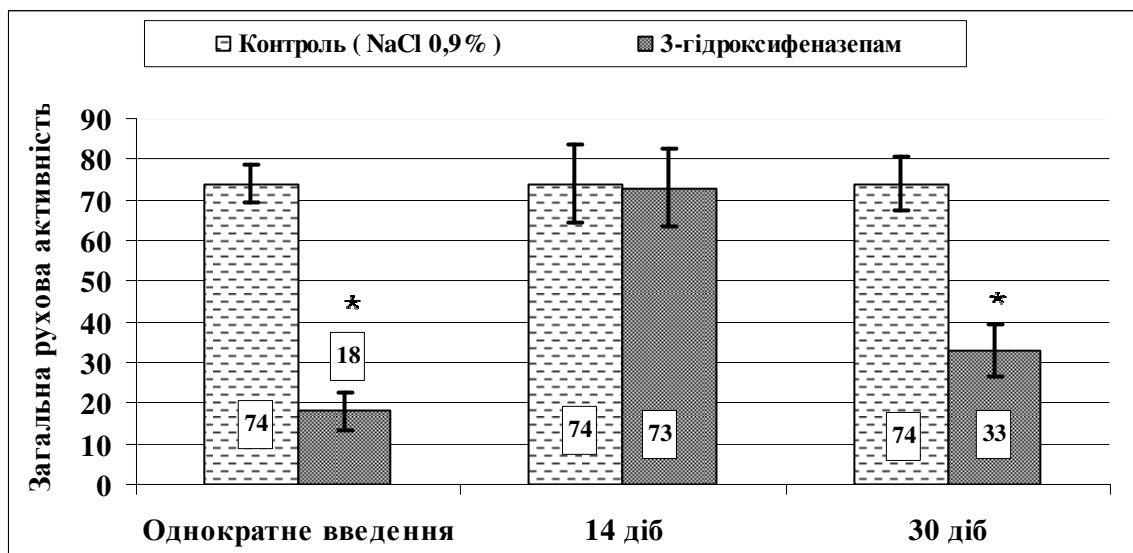


Рис. 4.6. Вплив 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг на загальну рухову активність при одноразовому та тривалому введенні протягом 14 та 30 діб за методом "відкритого поля" в дослідях на мишах, $n = 10$

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $*p < 0,05$.

Таблиця 4.2

Показники поведінкових реакцій мишей у методі "відкрите поле" при внутрішньоочеревинному введенні 3-гідроксифеназепаму протягом 14 і 30 діб, (M ± m) n = 10

Показники	Контроль	Одноразове введення	Тривале введення протягом 14 діб	Тривале введення протягом 30 діб
Горизонтальна активність (кількість переходів з квадрату у квадрат)	44,1 ± 4,8	14,6 ± 1,5*	47,4 ± 4,6	22,8 ± 2,3*
Дослідницька поведінка (число зазирань в отвори)	20,9 ± 1,9	3,1 ± 0,2*	13 ± 1,1*	4,6 ± 0,5*
Вертикальна рухова активність (число вставань на задні лапи)	9,0 ± 1,0	0,3 ± 0,02*	12,6 ± 1,3	5,6 ± 0,4*

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Однак, з даного питання у літературі немає однозначної думки [152]. Так, наприклад, у кількісних ауторадіографічних експериментах введення хлордіазапоксиду (30 мг/кг) протягом 2-х тижнів не впливало на зв'язування флуразепаму і флумазенілу з БДР, але знижувало зв'язування мусцімолу в корі, стріатумі і гіпокампі [44].

Таким чином, проведено дослідження з вивчення толерантності до циназепаму та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму свідчать про сприятливе поєднання ефектів: у циназепаму збереження основного

снодійного, а у його метаболіту 3-гідроксифеназепаму виявлено відновлення седативної активності.

Результати цього розділу було опубліковано:

1. Онуфриенко О. В. Экспериментальное изучение развития толерантности к циназепаму / Т. Л. Карасёва, Л. В. Попова, О. В. Онуфриенко, К. С. Андронати, С. А. Андронати // Доповіді Національної академії наук України. - 2008 - № 7.- С. 157-161.

2. Онуфриенко О. В. Изучение развития толерантности к препарату левана и его основному метаболиту при их длительном введении мышам / С. А. Андронати, О. В. Онуфриенко, К. С. Андронати, В. И. Павловский, Т. Л. Карасёва // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2010. - № 2(18). - С. 28-31.

3. Онуфриенко О. В. Экспериментальное изучение развития толерантности к метаболиту циназепамма - 3-гидрокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она в опытах на мышах / О. В. Онуфриенко, Т. Д. Слатвинская, А. В. Савченко, Т. Л. Карасёва // Наукові дослідження – теорія та експеримент : V міжнар. наук.-практ. конф. 18-20 трав. 2009 р., Полтава : матеріали конф. – Полтава, 2009. - С. 69–70.

Розділ 5. ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ГІПНОСЕДАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЦИНАЗЕПАМУ ТА 3-ГІДРОКСИФЕНАЗЕПАМУ. НЕЙРОФІЗІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ЇХ ВПЛИВУ НА СТРУКТУРУ СНУ

5.1. Порівняльне вивчення снодійної, протисудомної, міорелаксантичної, антигіпоксичної дії циназепаму та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму при внутрішньоочеревинному введенні

Постійне прискорення темпу життя, стресові ситуації – ці чинники є супутниками життя в розвинених країнах і пов'язані з якістю сну, тому регулювання сну, застосування снодійних препаратів - це не тільки нормалізація сну, не тільки поліпшення якості життя, перш за все - це профілактика захворювань [8, 85]. Перші синтетичні снодійні засоби, стали застосовуватися в 19 столітті, це солі бромю (броміди). Однак солі бромю при повторному застосуванні кумулюються в організмі, викликаючи захворювання бромізм – синдром, що включає алергічний нежить, кон'юнктивіти, атаксію, апатію та інші небажані побічні ефекти [8].

Раніше у ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України було розроблено новий снодійний засіб – циназепам (Левана[®] ІС) (3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он) [4]. Особливістю циназепаму є слабкий прояв ефекту міорелаксації, що вигідно відрізняє його від інших снодійних засобів [5]. Важливою перевагою циназепаму, як гіпнотика, є те, що він викликає дозозалежні зміни циклу "спанья-неспанья", які полягають у скороченні фази неспанья і пропорційному подовженні глибокого повільнохвильового і парадоксального сну, що робить снодійний ефект препарату більш фізіологічним. За характером впливу на цикл "спанья-неспанья" циназепам не поступається зопіклону [8].

Слід відмітити, що значення терапевтичного індексу циназепаму із снодійного ефекту вище, ніж для зопіклону та інших препаратів бенздіазепінового ряду (рис 5.1).

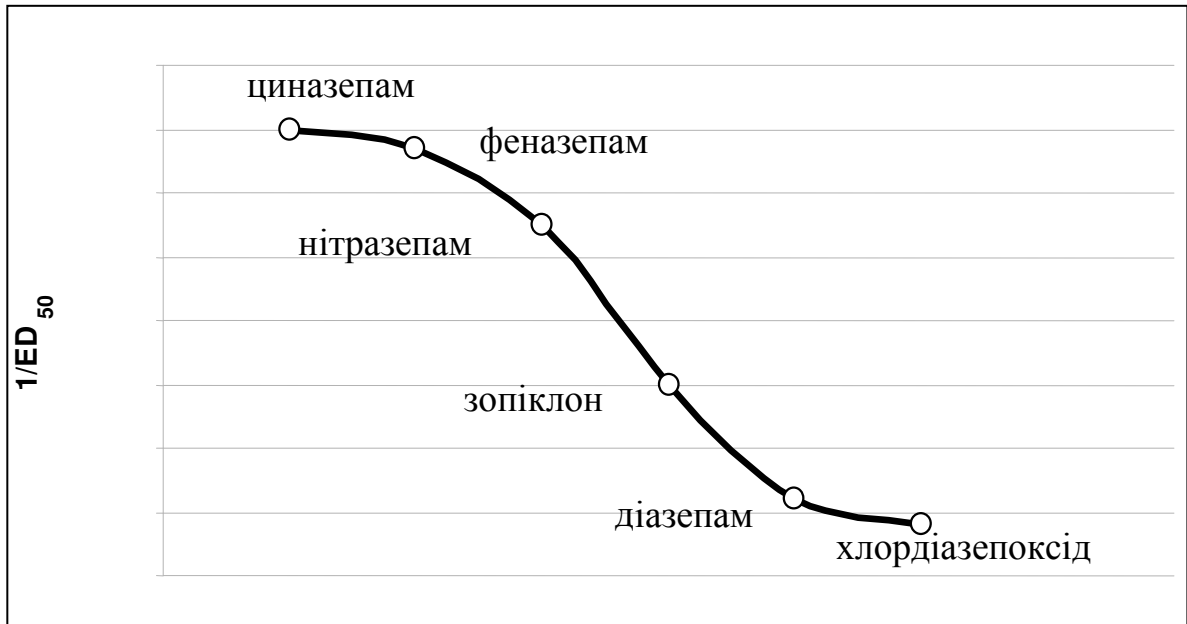


Рис 5.1. Терапевтичний індекс препаратів (ТІ), обчислюваний відношенням ED_{50} (за тестом "стрижню, що обертається") та ED_{50} ("потенціювання снодійної дії барбамілу").

Нам було доцільно вивчити у порівняльному аспекті протисудомну, міорелаксантну та антигіпоксичну дію циназепаму та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму.

У порівняльному аспекті досліджено вплив на протисудомну активність циназепаму і 3-гідроксифеназепаму (7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)-феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он), проводили у дослідах на мишах за методом "антагонізму з коразолом", основанийому на здатності досліджуваних сполук відмінити тоніко-клонічний компонент судомного нападу і загибель тварин. Проведені нами дослідження показали, що ED_{50} для циназепаму за методом "антагонізму з коразолом" складає 0,07 мг/кг, а для 3-гідроксифеназепаму ED_{50} - 0,03 мг/кг, тобто на рівні феназепаму (ED_{50} - 0,037 мг/кг) (рис. 5.2).

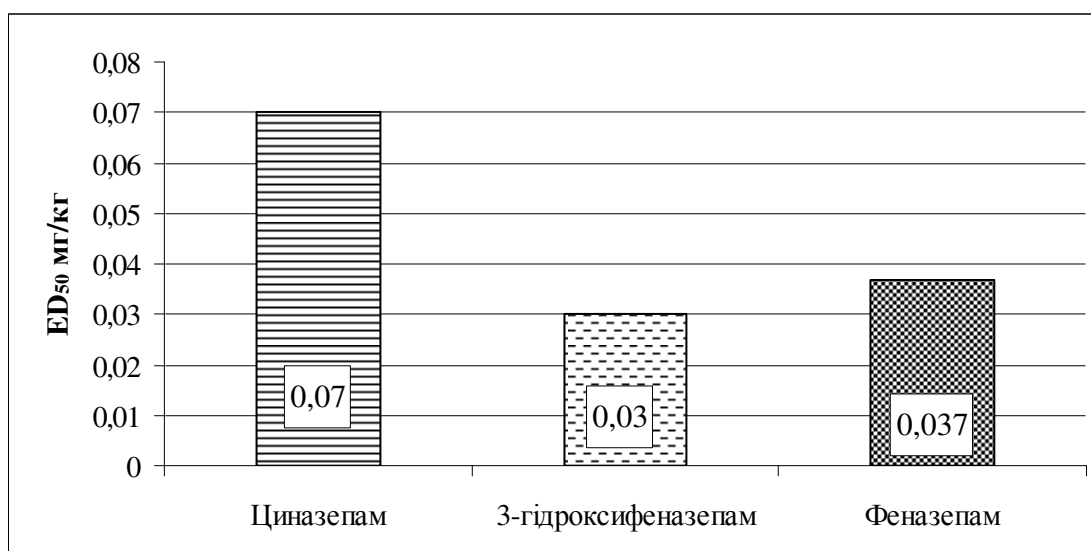


Рис.5.2. Протисудомна активність циназепаму, 3-гідроксифеназепаму та феназепаму за методом "антагонізму з коразолом" у дослідях на мишах, n = 6

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) при $p < 0,05$.

Снодійну активність сполук вивчали в дослідях на мишах за методом "потенціювання снодійної дії барбамілу" [126] в інтервалі доз (0,05-0,8 мг/кг). Гіпноседативна дія циназепаму та 3-гідроксифеназепаму чітко проявляється у здатності цих речовин пролонгувати ефекти барбамілу у мишей. На підставі отриманих експериментальних даних нами була побудована крива залежності "доза-ефект" (рис. 5.3). За кривою залежності доза-снодійний ефект, побудованої для циназепаму і його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму, встановлено величини (ED₅₀) для циназепаму (0,37 мг/кг) та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму (0,25 мг/кг). Нами показано, виходячи з аналізу кривої залежності доза - ефект, що 3-гідроксифеназепам є повним агоністом, так як проявляє максимальний ефект (99,9 %), а циназепам - частковим агоністом, і збільшення дози не приводить до прояву максимального ефекту (68 %) (рис. 5.3). Отримані нами дані співпадають з даними авторів, які вивчали афінитет циназепаму до

бенздіазепінових рецепторів за здатністю даної сполуки інгібувати специфічне зв'язування ^3H -флумазенілу з фракцією синаптичних мембран головного мозку, та встановили величину константи інгібування $K_i = 72,6 \pm 1,7$ нМ [150]. Автори [25] вважають, що механізм дії циназепаму зв'язаний з активацією ГАМК_A – рецепторного комплексу, топографічно і функціонально спряженого з дофамінергічною, серотонінергічною, холецестокінінергічною системами ЦНС.

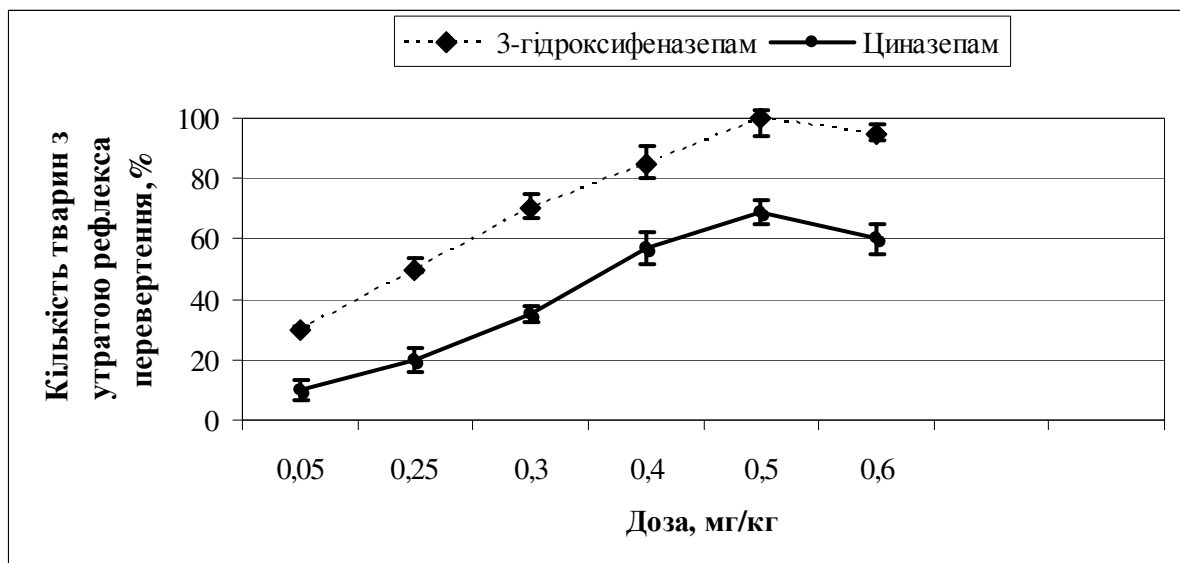


Рис.5.3. Крива залежності доза - ефект для циназепаму та 3-гідроксифеназепаму за методом "потенціювання снодійної дії барбамілу", у дослідях на мишах, $n = 10$

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) при $p < 0,05$.

Недостатність кисню є станом, який є великою загрозою для функціональної діяльності мозку. В патогенезі гіпоксії беруть участь різні фактори: метаболічні, морфологічні і функціональні [2, 6].

Дослідження останніх років відкрили новий етап у розумінні процесів ураження тканин мозку за умови гострої церебральної гіпоксії. Відомо, що первинна причина даного процесу - дефіцит кисню у клітинах, що

призводить до зниження ресинтезу енергоутворюючих фосфатів. У результаті виникають вторинні порушення, які запускають порочне коло [58]. Велика група препаратів, які здійснюють антигіпоксичну дію, складається із представників групи психофармакологічних засобів [153].

Тому пошук нових біологічно активних речовин, які мають антигіпоксичні властивості з різними механізмами дії на системному та клітинному рівні, є актуальним завданням фармакології та медичної хімії.

Відомо, що для первинної оцінки наявності антигіпоксичної активності застосовується метод "гіпоксії з гіперкапнією у гермооб'ємі" [126], як найбільш простий і зручний при проведенні експерименту.

Нами встановлено, що 3-гідроксифеназепам дозою 0,5 мг/кг за тестом "гіпоксії з гіперкапнією у гермооб'ємі" проявляє антигіпоксичні властивості і у 1,8 рази збільшує тривалість життя мишей, порівняно до контрольної групи тварин. В свою чергу, циназепам у цій самій дозі збільшує тривалість життя контрольної групи тварин в 1,5 рази (рис.5.4.).

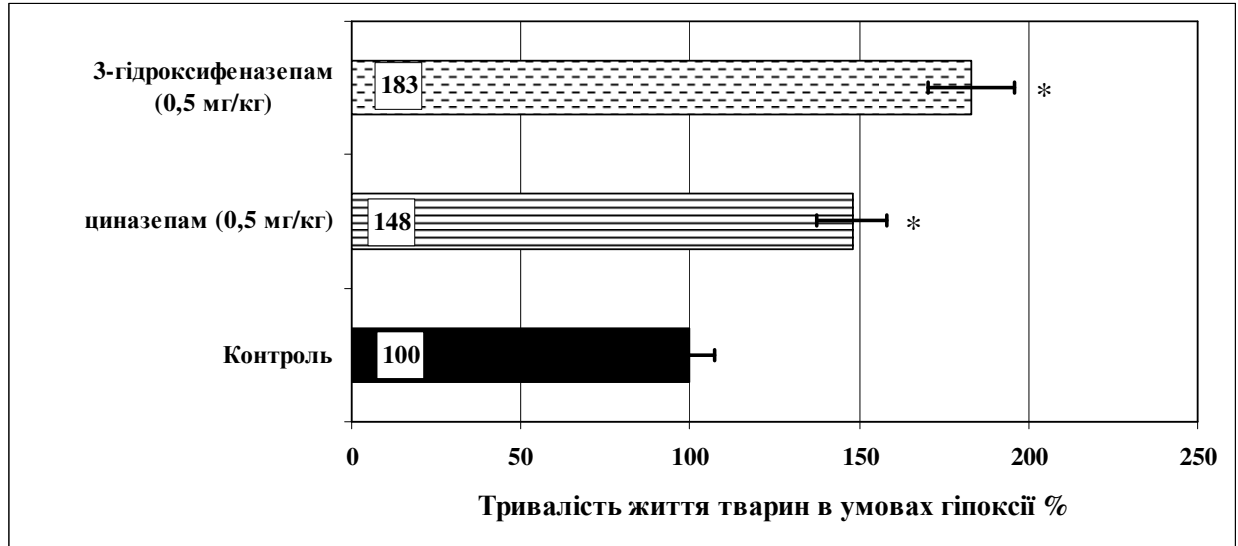


Рис.5.4. Вплив циназепаму (0,5 мг/кг) та 3-гідроксифеназепаму (0,5 мг/кг) на тривалість життя тварин в умовах гіпоксії з гіперкапнією в гермооб'ємі у дослідях на мишах, n = 10

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,05.

Порівняльні дослідження з вивчення впливу циназепаму і 3-гідроксифеназепаму на порушення координації рухів (міорелаксації) за тестом "стрижню, що обертається", показали, що ED₅₀ для циназепаму складає 2,5 мг/кг, ED₅₀ 3-гідроксифеназепаму - 1,7 мг/кг (рис. 5.5).

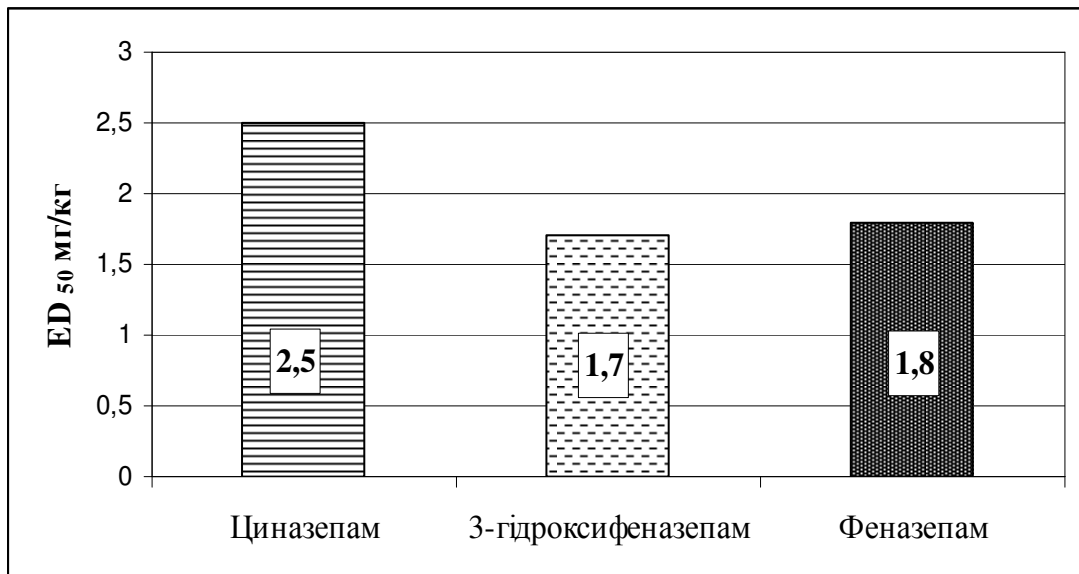


Рис. 5.5. Міорелаксантина дія циназепаму, 3-гідроксифеназепаму та феназепаму за методом "стрижню, що обертається" у дослідях на мишах, n = 10

Примітка:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) при $p < 0,05$.

Таким чином, отримані нами дані з вивчення у порівняльному аспекті фармакологічної активності циназепаму та його метаболиту, дозволяють припустити, що метаболіт циназепаму - 3-гідроксифеназепам, який володіє в експерименті високою снодійною, антигіпоксичною та протисудомною активністю, може виявляти вплив на здійснення кінцевих проявів дії цього препарату.

1. Похідні бенздіазепіну

Нітразепам Флуразепам Мідазолам
Естазолам Тріазолам

2. Препарати різної хімічної будови (небенздіазепінові сполуки)

Золпідем Зопіклон Суріклон

ГАМК-ергічні снодійні засоби пригнічують міжнейронну (синаптичну) передачу у різних утвореннях ЦНС	
Барбітурати	Анксиолітики бенздіазепінового ряду
Чинять гнітючий вплив на активуючу ретикулярну формацію ствола мозку, що сприяє розвитку сну.	Діють переважно на лімбічну систему і її зв'язки з іншими відділами головного мозку, забезпечують циклічну зміну "спанья-неспанья".

Більшість снодійних препаратів, які застосовуються для лікування розладів сну: барбітурати, похідні бенздіазепінів, етаноламін (донорміл), піперидиндіони (глютетімід), хіназоліну (метаквалон), хлоралгідрат, змінюють природу сну і не позбавлені несприятливих побічних ефектів [8, 85].

Відомо, що фармакологічний сон неадекватний за своїми механізмами до природного сну. Снодійні препарати обмежують активність різних структур мозку - ретикулярної формації, гіпоталамічної ділянки, кори головного мозку [105]. Це призводить до порушення природних механізмів формування стадій сну, порушення процесу консолідації пам'яті, переробки і засвоєння інформації [32, 105].

Перш за все це стосується швидкого сну: збільшується латентний період появи швидкого сну, зменшується загальна його тривалість. Тривалі порушення кожної із фаз сну несприятливо відбиваються на стані організму, виникають поведінкові, психічні розлади [98, 100]. Відміна снодійних засобів

може супроводжуватись так званим "синдром віддачі" (компенсаторне збільшення тривалості "швидкого" сну), при якому відмічається велика кількість сновидінь, нічні кошмари, часті пробудження [95, 104]. У зв'язку з цим особливу увагу привертають снодійні засоби, які не здійснюють вплив, або мінімально впливають, на співвідношення фаз сну, і сприяють розвитку сну, близького до природного (рис. 5.6) [8, 92].

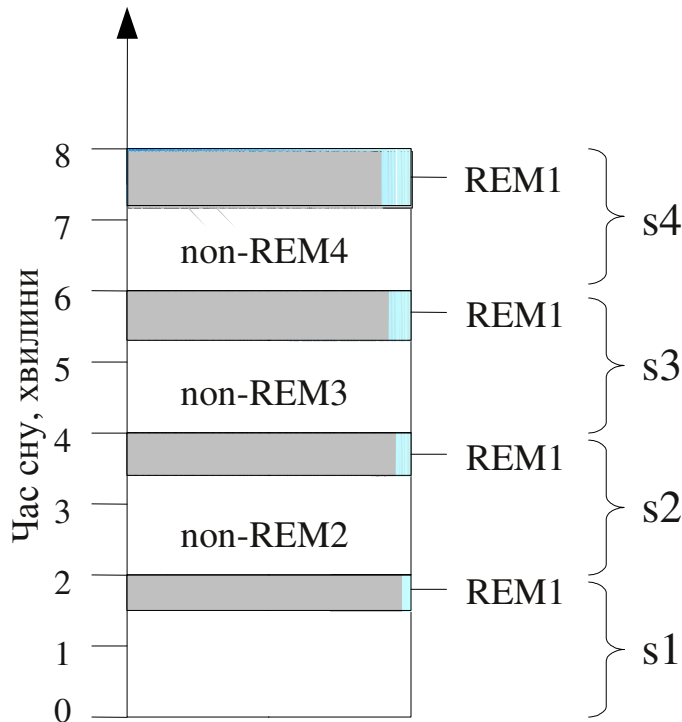


Рис.5.6. Цикли сну (S)

non-REM – повільнохвильовий сон (ортодоксальний);

REM – швидкохвильовий (парадоксальний, сон із сновидіннями) [94].

У літературі є дані стосовно впливу циназепаму на фази сну (повільнохвильовий та парадоксальний сон) [6, 8] та підфази сну (поверхневий та глибокий повільнохвильовий сон). Показано, що застосування циназепаму не впливає на співвідношення фаз сну. Тому наступною задачею нашого дослідження було вивчення впливу основного метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму на цикл "спанья - неспанья" у інтактних щурів за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження.

Дві стадії повільнохвильового сну (поверхневий і глибокий) визначались за методом, представленим у розділі 2, підрозділі 2.2.8 [131]. Досліджувані сполуки, циназепам і 3-гідроксифеназепам, вводили внутрішньоочеревинно щурам у дозі 2,5 мг/кг в ізотонічному розчині NaCl у Твін-80 за 30-40 хв до початку експерименту. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. Запис ЕКоГ проводився через 30 хв після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних сполук. Аналіз отриманих результатів проводили за критерієм достовірності Ст'юдента.

При застосуванні 3-гідроксифеназепаму дозою 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно у інтактних щурів спостерігалось скорочення фази неспання на 7 %, а також збільшувалась тривалість фази поверхневого повільнохвильового сну на 9 % у порівнянні з відповідними показниками в групі контролю (рис. 5.7). Спостерігалось скорочення латентного часу засинання на 21% та виникнення латентного часу парадоксального сну на 17%, і тривалість парадоксальної фази сну не зменшувалась (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Латентний час засинання і фрагментованості парадоксального сну під впливом циназепаму, його метаболіту (3-гідроксифеназепам) і резерпіну,

порівняно до контролю, n = 10

Досліджувані групи	Латентний час засинання (%)	Латентний час парадоксального сну (%)	Число циклів парадоксального сну
Контроль	100	100	12,3±1,2
3-гідроксифеназепам	79*	83*	11,3±0,8
Резерпін	64*	125*	22,3±2,7*
Резерпін+циназепам	63*	91*	15,3±2,1

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при $p < 0,001$.

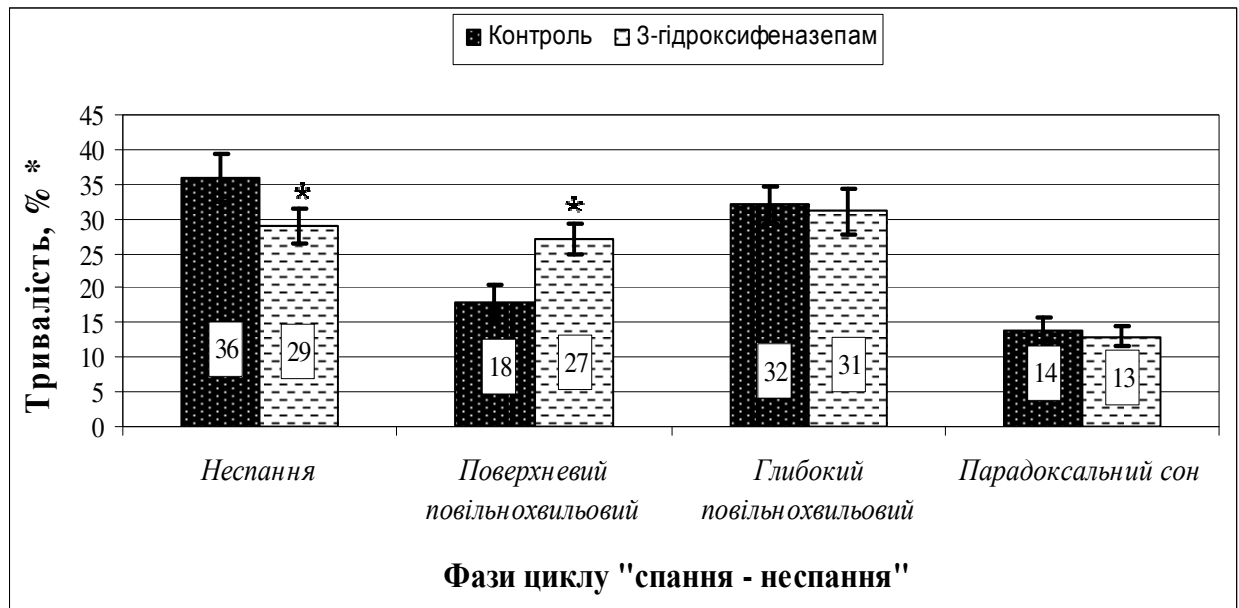


Рис. 5.7. Вплив 3-гiдроксифеназепаму дозою 2,5 мг/кг на тривалiсть фаз "спанння - неспанння" за даними ЕКОГ за чотирьохгодинний перiод дослiдження в дослiдах на щурах, $n = 10$

Примiтки:

- 1) n = кiлькiсть тварин у кожнiй групi;
- 2) достовiрнiсть вiдносно контролю при $*p < 0,001$.

Таким чином, проведенi нами дослiдження показали, що 3-гiдроксифеназепам викликає виражений сомногенний вплив, але, на вiдмiну вiд циназепаму, спричиняє лише подовження фази поверхневого повiльнохвильового сну та не зменшує тривалiсть фази парадоксального сну, порiвняно до контролю. Вiдомо, що iншi представники 1,4-бенздиазепiнового ряду (наприклад, феназепам i нiтразепам) зменшують тривалiсть парадоксальної фази сну [8, 11]. Застосування зопiклону у дозi 7,5 мг/кг, як показали дослiдження авторiв [6], знижує тривалiсть фази неспанння в 1,5 рази та збiльшує тривалiсть глибокої фази повiльнохвильового сну, а також не впливає на вираженiсть поверхневої повiльнохвильової та парадоксальної фази сну.

Вивчення впливу циназепаму і його метаболіту 3-гідроксифеназепаму на цикл "спанння - неспанння" на патологічній моделі у дослідях на щурах за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження показало, що у щурів, яким водили резерпін (2,0 мг/кг), спостерігалось скорочення, у порівнянні з контролем, тривалості фази неспанння на 13%, збільшення на 17% тривалості поверхневого повільнохвильового сну, а також зменшення майже удвічі загальної тривалості парадоксальної фази сну (рис.5.8). Крім того, характерним була значна фрагментованість парадоксального сну, число циклів якого зростало майже удвічі, порівняно до контролю (табл. 5.1).

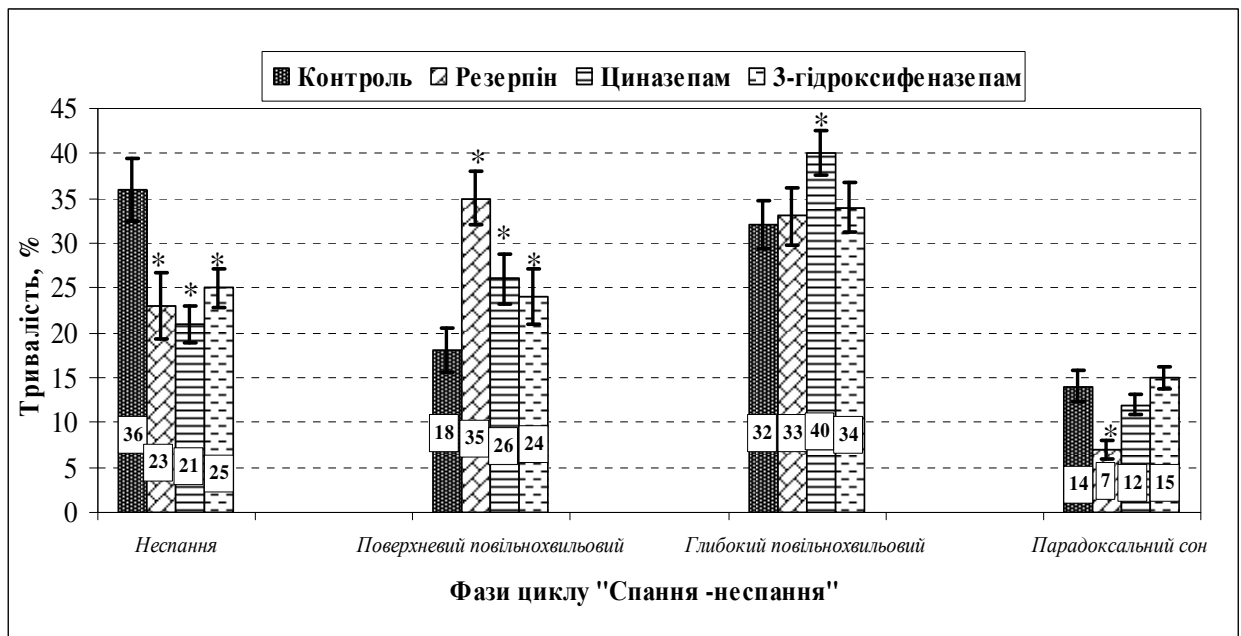


Рис. 5.8. Вплив циназепаму та 3-гідроксифеназепаму дозою 2,5 мг/кг на показники циклу "спанння - неспанння" у щурів з попереднім введенням резерпіну за даними ЕКоГ за чотирьохгодинний період дослідження в дослідях на щурах, n = 10

Примітки:

- 1) n = кількість тварин у кожній групі;
- 2) достовірність відносно контролю при *p < 0,001.

За умов застосування циназепаму (2,5 мг/кг) внутрішньоочеревинно у щурів з попереднім введенням резерпіну зберігалось скорочення фази неспання до 15 % від такої у інтактних щурів. Тривалість фази поверхневого повільнохвильового та глибокого повільнохвильового сну перевищувала показник контролю на 8 % (рис. 5.8). Спостерігалось скорочення латентного періоду засинання у порівнянні з контролем – на 37 % (табл. 5.1). Тривалість фази парадоксального сну збільшувалась, порівняно до відповідного показника, в групі резерпінізованих щурів майже у два рази (рис. 5.8).

На тлі введення 3-гідроксифеназепаму (2,5 мг/кг) внутрішньоочеревинно щурам з попереднім введенням резерпіну спостерігається зменшення тривалості фази неспання на 11 %, скорочення фази поверхневого повільнохвильового сну на 11 %, зростання тривалості фази парадоксального сну вдвічі (рис. 5.8). Спостерігалось також зменшення фрагментованості парадоксального сну (зниження числа його циклів) удвічі, порівняно до групи щурів з попереднім введенням резерпіну (табл. 5.1).

Із даних літератури відомо про залучення бенздіазепінових рецепторів до формування резерпін - викликаних орофациальних дискинезій [155]. З іншого боку, відомо, що діазепам зменшує дискинезії у щурів, у яких формували дискинезії тривалим застосуванням резерпіну [156], хоча на тлі гострих орофациальних дискинезій діазепам не впливав на їх прояви [156, 157].

Таким чином, одним із ефектів, які викликають бенздіазепіни у тварин з попереднім введенням резерпіну, є збільшення активності механізмів генерування парадоксального сну. Причому відновлення тривалості цієї фази є більш виразним за умов застосування 3-гідроксифеназепаму, ніж циназепаму. Подібні відмінності можуть пояснюватися системними порушеннями метаболічних процесів у щурів з попереднім введенням резерпіну та пригніченням процесів перетворення циназепаму тканиною печінки.

Таким чином, проведені нами дослідження показали, що у щурів з синдромом порушень циклу "спанья - неспанья", викликаним застосуванням резерпіну, циназепам (препарат Левана ІС) нормалізує тривалість фази поверхневого повільнохвильового сну, збільшує тривалість фази парадоксального сну та знижує його фрагментованість до рівня інтактних щурів. Подібні ефекти спостерігаються і за умов застосування метаболіту циназепаму - 3-гідроксифеназепаму.

Результати цього розділу було опубліковано:

1. Онуфриенко О. В. Нейрофізіологічний аналіз ноотропної дії 7-метил-5-феніл-1,2дигидро-3H-1,3,4-бензтриазепін-2-тіону порівняно з ноотропілом у дослідах на щурах / Л. В. Попова, О. В. Онуфриенко, Д. В. Менчук, Т. Л. Карасьова // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. - 2009. - № 1(15). - С. 37-40.

2. Онуфриенко О .В. Вплив циназепаму та 3-гідрокси-БД на показники циклу спання-неспанья у інтактних і резерпінізованих щурів / С. А. Андронаті, Л. С. Годлевський, Т. Л. Карасьова, В. В. Десятський, О. В. Онуфриенко // Одеський медичний журнал. – 2010. - № 5(121). - С. 4-7.

Розділ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розлади сну відносяться до найменш специфічних порушень нервово-психічної діяльності [158, 159]. Найбільш частими причинами розладів сну є стреси, неврози, психічні, ендокринні та інші захворювання [160, 161]. Відомо, що при психічних захворюваннях (депресіях, шизофренії, розумовій загальмованості, деменції) часто виникають розлади REM сну, причому зв'язок між психічною патологією і цими порушеннями є двостороннім [162-165]. Наведені дані літератури свідчать про те, що порушення сну і психічні розлади являють собою взаємопов'язані клінічні явища, які, посилюючи один одного, призводять до погіршення якості життя [166, 167]. Регуляція сну із застосуванням снодійних препаратів спрямована на нормалізацію сну, покращення якості життя і, в першу чергу, на профілактику захворювань [168, 169]. На жаль, більшість снодійних засобів, які застосовуються для лікування різноманітних розладів сну (барбітурати, етаноламіни, бенздіазепіни та ін.), змінюють фізіологічну структуру сну [8, 170, 171]. Насамперед, це стосується швидкого сну: збільшується латентний період появи швидкого сну, зменшується загальна тривалість [172, 173]. Тривалі порушення кожної з фаз сну несприятливо позначаються на стані організму, виникають поведінкові, психічні розлади [174, 175]. Відміна снодійних засобів супроводжується так званим, "синдромом відміни" (компенсаторне збільшення тривалості "швидкого сну"), для якого характерні великі кількості сновидінь, нічні кошмари, часті пробудження [176, 177]. Вираженість синдрому залежить від тривалості застосування і дози препарату. У зв'язку з цим, особливу увагу привертають снодійні засоби, які не завдають впливу, або мінімально впливають на співвідношення фаз сну, близького до природного [6, 178, 179].

ГАМК-ергічні препарати (похідні 1,4-бенздіазепіну, циклопіролону, імідазопіридину) близькі за терапевтичної активністю і відрізняються за частотою і спектром побічних ефектів [8, 180, 181]. Чим вище селективний

зв'язок препарату з рецептором, тим менш вираженими є побічні ефекти, а його властивості наближаються до характеристик "ідеального снодійного". У зв'язку з цим, увага більшості дослідників спрямована на пошук снодійних засобів, які мінімально впливають на співвідношення фаз сну і сприяють розвитку сну, близького до природного [6, 182, 183]. У відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України був створений новий гіпноседативний засіб циназепам (препарат Левана[®] ІС) (3-гемісукцинілокси-7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он).

Відомо, що тривале застосування багатьох снодійних препаратів, нейролептиків та інших психотропних засобів може привести до негативних побічних ефектів - розвитку толерантності [149]. Тому до теперішнього часу проводиться пошук нових снодійних засобів, у яких би тривале застосування не супроводжувалося розвитком толерантності [184].

У відділі медичної хімії були синтезовані нові похідні 3-ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів. В дослідженнях на мишах та щурах вивчався спектр їх фармакологічної активності.

Із літератури відомо, що 3-заміщені аналоги 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів володіють різноманітними нейротропними властивостями (снодійними, анксиолітичними, протисудомними, анорексигенними, антидепресивними, анальгетичними та іншими) [1, 73]. Спектр їх фармакологічної активності обумовлений головним чином зв'язуванням їх з бенздіазепіновими, з холецистокініновими рецепторами двох підтипів - ССК₁ і ССК₂ та брадикініновими [1, 60].

Вивчення гіпноседативної активності в ряду нових похідних 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, показало, що всі вивчені сполуки виявляють високу снодійну активність з ED₅₀ 0,22-1,50 мг/кг і за снодійною дією не поступаються циназепаму (препарату Левана[®] ІС) та його основному метаболіту 3-гідроксифеназепаму, ED₅₀ для яких становить, відповідно, 0,37 і 0,25 мг/кг. Всі досліджені сполуки в інтервалі величин ED₅₀

0,18-0,97 мг/кг проявляють також виразні седативні властивості. Слід зазначити, що для вивчених сполук з невеликою довжиною ацильного фрагменту не відмічено достовірних відмінностей у величинах ED₅₀ за гіпноседативною активністю. Мабуть це пов'язано з однаковою швидкістю їх гідролізу у печінці та надходженням активного метаболіту у головний мозок. Нами було показано перспективність подальшого пошуку нових гіпноседативних засобів в ряді похідних 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів.

Епілепсія – хронічне захворювання головного мозку і одне з найбільш поширених нападopodobних розладів, яке характеризується виникненням повторюваних судомних, несудомних або психопатологічних проявів [36, 143]. Причини та механізм епілепсії до теперішнього часу не встановлені. Вважається, що в нормі між збудженням та гальмуванням у головному мозку існує рівновага, а порушення цієї рівноваги може призвести до виникнення судомних нападів. Протиепілептичні засоби застосовують для попередження або зменшення судом, що спостерігаються при різних формах епілепсії [185, 186]. Відсутність ефекту від лікування може призвести до інвалідації. Тому основою фармакотерапії при епілепсії є призначення протисудомних препаратів [20]. Однак слід взяти до уваги, що протисудомні препарати не виліковують хворобу, а лише зменшують частоту і тривалість нападів. Всі препарати бенздіазепінового ряду виявляють протисудомну активність, і використовуються при судамах різного походження [153]. Нами показано, що похідні 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів володіють високою протисудомною активністю з ED₅₀ 0,05-0,42 мг/кг за тестом "антагонізму з коразолом", а деякі з них не поступаються циназепаму (ED₅₀ 0,07 мг/кг). Аналіз отриманих нами даних показав, що зі збільшенням довжини ацильного фрагменту і ліпофільності протисудомна активність досліджуваних сполук знижується. Методом радіолігандного аналізу показано, що 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они проявляють афінитет до центральних бенздіазепінових рецепторів. Отже,

подальший пошук нових сполук з протисудомною активністю серед 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів є актуальним.

Актуальною проблемою є зростання кількості захворювань, що супроводжуються тривожними станами [11]. Саме похідні 1,4-бенздіазепіну серед анксиолітичних засобів продовжують займати домінуюче положення, і виявляються найбільш широко використовуваними препаратами [20]. Бенздіазепінові анксиолітики використовуються у медицині вже майже 40 років (перші препарати цієї групи – хлордіазепокід і діазепам – з'явилися у лікувальній практиці у 1960-61 рр.) [9, 20]. Тому пошук нових анксиолітичних засобів серед 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепінів до теперішнього часу є актуальним напрямком.

Нами було показано, що нові естери капронової, енантової, капрілової та лаурінової кислоти, похідних 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів проявляють помірну анксиолітичну активність порівняно до контролю, але поступаються циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму. Показано, що структура досліджуваних сполук впливає на їх активність. Так, заміна атома хлору на атом водню та збільшення довжини ланцюга у третьому положенні супроводжується зниженням анксиолітичної активності.

Відомо, що препарати 1,4-бенздіазепінового ряду неоднозначно впливають на здібність до навчання і на процеси пам'яті [9]. В літературі є дані про те, що під впливом деяких бенздіазепінових транквілізаторів відбувається полегшення цих процесів, однак при збільшенні дози ефект поліпшення пам'яті зникає [34]. Є також повідомлення про те, що діазепам залежно від умов експерименту і величини дози по-різному впливає на процеси пам'яті [55]. Феназепам у низьких дозах полегшує процеси фіксації та консолідації пам'ятного сліду, а у високих дозах погіршує їх [11].

Гідазепам, на відміну від феназепаму, в широкому діапазоні доз позитивно впливає на здібність до навчання та на процеси пам'яті і не чинить властивий для багатьох бенздіазепінів негативний вплив на пам'ять [2]. Навчальні тести, проведені у клініці на здорових добровольцях, показали, що

триазолам у малих дозах поліпшує пригадування інформації, одержаної до введення цього препарату, а лоразепам, темазепам, алпразолам, навпаки, погіршують пам'ять [187]. Це підтверджується і в експерименті на тваринах. Циназепам у дозі 0,5 мг/кг ефективно покращує пам'ять у щурів [9, 4]. Нами було вивчено вплив на пам'ять основного метаболіту циназепаму - 3-гідроксифеназепаму та естеру енантової кислоти. Отримані результати свідчать про те, що під дією естеру енантової кислоти у дозі 0,4 мг/кг у тварин не погіршуються процеси навчання та довготривала пам'ять.

Метаболіт циназепаму - 3-гідроксифеназепам, також не погіршує процеси навчання та просторову пам'ять тварин та не впливає на довготривалу пам'ять.

Зайва вага, ожиріння в сучасному суспільстві (особливо в розвинених країнах) являє собою серйозну медичну проблему, тому що є фактором ризику розвитку діабету, сприяє серцево-судинним та іншим захворюванням [60, 65]. Тому проблема регулювання апетиту у людини на сьогодні є надто актуальною. До лікарських препаратів, що регулюють апетит відносяться засоби, які впливають на катехоламінергічну систему (фепранон, фенамін), на катехоламінергічну та серотонінергічну системи (сібутармін або мерідія), засоби, що порушують всмоктування жирів у травному тракті (орліста) та інші [61, 65]. Однак, при використанні цих лікарських засобів можливі побічні ефекти з боку серцево-судинної системи (тахікардія, підвищення артеріального тиску, аритмії) і ЦНС (занепокоєння, порушення сну), розвиток звикання і фізичної лікарської залежності та ін. В зв'язку з цим, здійснюється пошук препаратів, які впливають на апетит, у рядах різноманітних речовин [60, 72].

Деякі із 3-заміщених 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів (L-365.260, L-736.380 и др.) знаходяться на різних стадіях клінічного вивчення у якості потенційних засобів для лікування аліментарного ожиріння, а також тривожних та панічних станів різної етіології [61, 72].

Вивчення впливу на апетит щурів естерів енантової та каприлової кислот, показало, що досліджувані сполуки у дозі 1 мг/кг регулюють апетит щурів. Так, через годину після розміщення тварин у експериментальну камеру спостерігається зниження апетиту в 1,5-2,5 рази порівняно до контролю (анорексигенний ефект). Через 2 години, та до кінця експерименту, у всіх дослідних тварин спостерігається підвищення апетиту, порівняно з контролем (орексигенний ефект).

Як відомо, препарати 1,4-бенздіазепінового ряду серед численних психотропних засобів є найбільш використовуваними у всіх галузях медицини: психіатрії, неврології, хірургії, дерматології, педіатрії, онкології, гінекології тощо [11, 20]. Однак бенздіазепінам притаманний і ряд небажаних ефектів (міорелаксація, толерантність, залежність тощо) [20]. Нами було показано, що ED₅₀ за міорелаксантною дією для 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, яка знаходиться в інтервалі доз 2,5-6,5 мг/кг, є меншою, чим у інших препаратів 1,4-бенздіазепінового ряду (лоразепам, феназепам, ціназепам, нітразепам) [11].

Вивчення гострої токсичності показало, що похідні 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они є малотоксичними, їх LD₅₀ > 650 мг/кг. Таким чином, проведені нами дослідження вказують на перспективність пошуку нових речовин з високою гіпноседативною та протисудомною активністю серед нових 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, які володіли б менш вираженими побічними ефектами (міорелаксацією, порушенням пам'яті).

Проблема толерантності та лікарської залежності до психотропних препаратів є актуальною у фармакології та медичної хімії [13]. Клінічні та експериментальні спостереження свідчать про можливість розвитку толерантності до бенздіазепінових препаратів, яка залежить від дози, тривалості введення, виду тварин і встановленого прояву дії [12, 38]. Із літературних джерел відомо, що при тривалому введенні хлордіазепоксиду, діазепаму, нітразепаму, оксазепаму спостерігається зниження активності

препаратів [13, 40]. Відомо, що толерантність до бенздіазепінів розвивається в першу чергу за амнестичним, епілептичним, протисудомним, седативним, міорелаксантним, а потім за анксиолітичним ефектом [149]. Характерними для звикання до бенздіазепінів є також порушення циркадного ритму "спанья-неспанья" з нічними пробудженнями [13]. Відзначається, що толерантність і залежність розвиваються значно меншою мірою до селективних агоністів бенздіазепінових рецепторів 1 типу (БД-Р 1) (алпідему, золпідему, квазепаму) і часткових агоністів БД-Р (бретазеніл), ніж до повних агоністів (лоразепам) [149].

Вивчення толерантності до нового снодійного засобу циназепаму (препарат Левана[®] ІС) та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму в теперішній час є дуже актуальною.

Отримані нами результати свідчать про те, що при одноразовому введенні циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) за тестом "продовження снодійної дії барбітуратів" середня тривалість сну мишей становила 45 хв, що у 2 рази вище, ніж у контролі (28 хв). Слід відмітити, що при хронічному введенні циназепаму мишам у дозі 0,4 мг/кг протягом 14 і 30 діб не змінюється тривалість сну мишей, тобто циназепам не викликає розвиток толерантності за основною снодійною дією. Численні дослідження вказують, що в процесі тривалого введення бенздіазепінів відбувається розвиток толерантності за седативним ефектом. Вивчення загальної рухової активності мишей під впливом циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED_{50}) за тестом "відкритого поля" показало, що при одноразовому введенні спостерігається зниження в 4 рази загальної рухової активності порівняно до контрольних значень. При хронічному введенні циназепаму протягом 14 і 30 діб спостерігається збільшення загальної рухової активності, тобто розвивається толерантність за седативним ефектом. Вивчення розвитку толерантності до основного метаболіту циназепаму - 3-гідроксифеназепаму, показало, що при одноразовому введенні 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг (ED_{50}) за тестом "продовження снодійної дії барбітуратів" тривалість сну у мишей

була у 1,5 рази більше, ніж у контролі. Тривалість сну мишей не змінювалася при введенні 3-гідроксифеназепаму протягом 14 діб, порівняно до одноразового введення. У групі тварин, які отримували 3-гідроксифеназепам дозою 0,25 мг/кг (ED_{50}) протягом 30 діб спостерігається розвиток толерантності за снодійною дією, на відміну від циназепаму, до якого не розвивається толерантність в ці терміни дослідження.

Вивчення загальної рухової активності мишей під впливом 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг (ED_{50}) за тестом "відкритого поля" показало, що при одноразовому введенні спостерігається виражений седативний ефект, і загальна рухова активність знижується у 4 рази, порівняно до контрольної групи тварин. Хронічне введення 3-гідроксифеназепаму протягом 14 діб призводить до розвитку толерантності за цим ефектом. Проте через 30 діб спостерігається відновлення седативного ефекту під впливом 3-гідроксифеназепаму. Таким чином нами було показано, що при тривалому введенні циназепаму та 3-гідроксифеназепаму протягом 14 та 30 діб спостерігається сприятливе поєднання ефектів: у циназепаму збереження снодійної активності, а у його метаболіту - відновлення седативної.

Циназепам дозою 0,5 мг/кг проявляє антигіпоксичні властивості і у 1,5 рази збільшує тривалість життя мишей, порівняно до контрольної групи тварин. Вивчення антигіпоксичних властивостей 3-гідроксифеназепаму дозою 0,5 мг/кг показало, що тривалість життя мишей збільшується в 1,8 рази, порівняно до контрольної групи тварин.

Порівняльні дослідження з вивчення впливу циназепаму і 3-гідроксифеназепаму на порушення координації рухів за тестом "стрижню, що обертається" показали, що ED_{50} для циназепаму становить 2,5 мг/кг, а ED_{50} 3-гідроксифеназепаму - 1,7 мг/кг.

Порівняльне вивчення протисудомної активності циназепаму і 3-гідроксифеназепаму оцінювали у дослідах на мишах за методом "антагонізму з коразолом", встановлене ED_{50} для циназепаму дорівнює

0,07 мг/кг, а для 3-гідроксифеназепаму ED_{50} - 0,03 мг/кг, тобто на рівні феназепаму.

При вивченні гіпноседативних властивостей циназепаму та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму та встановленні величини ED_{50} за снодійної дією за тестом "потенціювання снодійної дії барбітуратів" у дослідах на мишах нами була побудована крива залежності доза-ефект. Виходячи з аналізу кривої залежності доза-ефект, показано, що 3-гідроксифеназепам є повним агоністом (ED_{50} 0,25 мг/кг), так як проявляє максимальний ефект, а циназепам - частковим (ED_{50} 0,37 мг/кг), і збільшення дози не приводить до прояву максимального ефекту.

Вважається, що розладами сну страждає 30-45 % населення розвинутих країн. Приблизно 95 % людей протягом життя мають проблеми зі сном, при цьому у 9-15 % це становить клінічну проблему [160, 162]. Згодом це може привести до розвитку психоматичних захворювань, депресій і деяких інших форм патології. Тому відповідне лікування порушень сну на сьогодні відноситься до актуальних проблем клінічної медицини [102, 158].

Із літератури відомо, що циназепам викликає виражений сомногенний вплив, але на відміну від інших представників 1,4-бенздіазепінового ряду (наприклад, феназепаму, нітразепаму) не змінює структуру сну "спанья - неспанья" [4, 6]. Так, для вказаних препаратів відомо, що вони викликають зміни тривалості повільнохвильового і парадоксального сну, тоді як під впливом циназепаму спостерігається пропорційне подовження цих фаз сну [5, 8].

Вивчення впливу на цикл "спанья неспанья" основного метаболіту циназепаму 3-гідроксифеназепаму за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження показало, що 3-гідроксифеназепам дозою 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно викликає скорочення тривалості фази "неспанья", а також збільшення тривалість фази повільнохвильового, порівняно до контрольної групи. Спостерігалось скорочення латентного часу засинання та виникнення латентного часу парадоксального сну. Отримані результати

свідчать про те, що під впливом циназепаму збільшується тривалість фази парадоксального сну, тоді як під впливом 3-гідроксифеназепаму вона не відрізняється від контрольних значень.

Відомо, що циназепам (препарат Левана[®] ІС) є новим снодійним засобом, тому важливо вивчити його вплив на структуру сну не тільки в нормі, а й в умовах патології. Вивчення впливу циназепаму і його метаболіту 3-гідроксифеназепаму на цикл "спання - неспання" показало, що у щурів, яким вводили резерпін у дозі 2,0 мк/кг на протязі 5 діб, спостерігалася зміна структури сну "спання - неспання", яка проявлялася у скороченні, порівняно до контролю, тривалості фази неспання, збільшенні тривалості поверхневого повільнохвильового сну, а також зменшенні майже удвічі загальної тривалості парадоксальної фази сну. Крім того, характерною була значна фрагментованість парадоксального сну, число циклів якого зростало майже удвічі, порівняно до контролю.

За умов застосування циназепаму дозою 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно у щурів з попереднім введенням резерпіну зберігалось скорочення фази неспання від такої у інтактних щурів. Тривалість фази поверхневого повільнохвильового та глибокого повільнохвильового сну перевищувала показник контролю. Спостерігалось також скорочення латентного періоду засинання у порівнянні з контролем. Тривалість фази парадоксального сну збільшувалась порівняно до відповідного показника в групі щурів з попереднім введенням резерпіну майже у два рази.

На тлі введення 3-гідроксифеназепаму дозою 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно щурам з попереднім введенням резерпіну спостерігається скорочення фази поверхневого повільнохвильового сну, відновлення фази парадоксального сну до рівня інтактних щурів, а також зменшується його фрагментованість, порівняно до групи щурів з попереднім введенням резерпіну.

Таким чином, вперше вивчено у порівняльному аспекті проблему толерантності до нового снодійного засобу циназепаму (препарату Левана[®] ІС) та його основного метаболіту 3-гідроксифеназепаму. Досліджено їх вплив на цикл "спанья-неспанья" в нормі та в умовах патології. Показано перспективу пошуку речовин зі снодійною та протисудомною активністю при менш виражених побічних ефектів серед нових похідних 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів, які синтезовані у Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено нове вирішення актуальної проблеми нейрофармакології, яке полягає у теоретичному й експериментальному обґрунтування доцільності подальшого розширення галузей застосування та впровадження у медичну практику нових 3-ацилокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-онів для лікування нервово-психічних розладів і розладів сну.

1. Показано, що нові похідні 7-бром-3-ацилокси-5-арил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-они проявляють високу снодійну активність в інтервалі доз 0,22-1,50 мг/кг при внутрішньоочеревинному введенні. За снодійною активністю вони не поступаються циназепаму (препарату Левана[®] ІС) та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму. Досліджувані сполуки проявляють також виражені седативні властивості в інтервалі доз ED₅₀ 0,18-0,97 мг/кг. Зі збільшенням довжини ланцюга замісника у третьому положенні і ліпофільності досліджуваних сполук їх фармакологічна активність знижується.

2. Встановлено, що досліджувані сполуки володіють також високою протисудомною активністю на рівні циназепаму та його метаболіту 3-гідроксифеназепаму. Збільшення довжини ацильного фрагменту також зменшує протисудомну активність досліджуваних сполук (ED₅₀ 0,05-0,42 мг/кг). Досліджувані сполуки володіють менш вираженою міорелаксацією (ED₅₀ 5,5-6,1 мг/кг) і є малотоксичними. Їх LD₅₀ > 650 мг/кг в досліджах на мишах при внутрішньоочеревинному введенні.

3. Встановлено, що при хронічному введенні циназепаму дозою 0,4 мг/кг (ED₅₀) протягом (14 та 30 діб) не спостерігається розвиток толерантності за снодійним ефектом за тестом "продовження снодійної дії барбітуратів", а відмічається розвиток толерантності за седативною дією. На відміну від циназепаму при хронічному введенні 3-гідроксифеназепаму дозою 0,25 мг/кг (ED₅₀) протягом 30 діб спостерігаються виражені прояви

толерантності за снодійним ефектом та відновлення седативної активності в умовах методики "відкритого поля".

4. Показано, що за характером впливу на цикл "спанння-неспанння" 3-гідроксифеназепам (2,5 мг/кг) викликає скорочення фази "неспанння" за рахунок продовження тривалості фази поверхневого повільнохвильового сну, та не впливає на тривалість парадоксальної фази сну, порівняно з контрольною групою.

5. Встановлено, що у щурів з синдромом порушень циклу "спанння - неспанння", викликаного застосуванням резерпіну (2,0 мг/кг), циназепам (2,5 мг/кг) нормалізує тривалість фази поверхневого повільнохвильового сну, збільшує тривалість фази парадоксального сну та знижує його фрагментованість до рівня інтактних щурів. Подібні ефекти спостерігаються і за умов застосування метаболіту циназепаму - 3-гідроксифеназепаму.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Синтез и анальгетическая активность цис-3-арилиден-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов / С.А. Андронати, Т.А. Кабанова, В.И. Павловський [и др.] //Одеський медичний журнал. - 2011. - №1(123).- С.17-21.
2. Гидазепам / С.А. Андронати, Т.А. Воронина, Н.Я. Головенко [и др.]; под ред. С.А. Андронати. - К.: "Наук. думка", 1992. - 196 с.
3. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. / Н.Я. Головенко.- Одесса, 2004. — 720 с.
4. Андронати С.А. Синтез меченого оригинального снотворного препарата – ¹⁴С циназепам (Левана ІС) и его метаболита / С.А. Андронати, К. С. Андронати, В.И. Павловський // Вісн. психіатрії та психофармакотерапії. - 2010. - №2(18). - С.56-61.
5. Воронина Т.А. Спектр фармакологической активности циназепам / Т.А.Воронина // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2010. - №2(18). - С.13-24.
6. Вплив циназепаму на структуру циклу "спанья-неспанья" у щурів / Л.С. Годлевський, Т.Л. Карасева, Л.В. Попова, С.А. Андронати // Досягнення біології та медицини. - 2005. - №2.-С.22-26.
7. Gottesmann C. Brain inhibitory mechanisms involved in basic and higher integrated sleep processes / C. Gottesmann // Brain Research Reviews. - 2004. - Vol. 45, № 3. - P.230-249.
8. ГАМК-ергические снотворные средства / С.А. Андронати, Т.Л. Карасева, Л.В Попова [и др.] // Вісн. психіатрії та психофармакотерапії. - 2004. - №1(15). - С.6-17.
9. Карасева Т.Л. Вивчення впливу анксиолітиків, похідних 1,4-бенздіазепінового ряду на процеси пам'яті в експериментах на щурах /

- Т.Л. Карасева, Л.В. Попова, С.А. Андронати // Ліки. - 2003. - №3-4. - С.84-86.
10. Monti J. M. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep / J. M. Monti // Sleep Medicine Reviews. – 2010. - Vol.14. - P. 319–327.
11. Феназепам /С.А. Андронати, Г.Я. Авруцкий, А.В. Богатский [и др.]; под ред. А.В. Богатский. – К.: "Наукова думка", 1982. – 288 с.
12. Громов Л.О. Нейромедиаторні механізми розвитку толерантності до дії протисудомних засобів / Л.О. Громов, К.О. Черноштан, О.О. Євтушенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2009. -№1(8). - С.3-8.
13. Plaznik A. Pharmacology of tolerance to benzodiazepine receptor ligands / A. Plaznik // Pol.J. Pharmacol. - 1995. - Vol. 47. - P.489-499.
14. Александровский Ю. А. Пограничные психические расстройства / Ю. А. Александровский. - М., 2007. - 708с.
15. Структура, фармакологические свойства и аффинность к бензодиазепиновым рецепторам 1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-онов и их циклических гомологов / Андронати С.А., Чепелев В.М., Воронина Т.А. [и др.] // Хим. фарм. журн. - 1985. - №5. - С.535-539.
16. Зиньковский В.Г. Механизмы действия анксиолитических, противосудорожных и снотворных средств / В.Г. Зиньковский, О.В. Жук, Н.Я. Головенко К.: Наукова думка, 1988. - С.98-175.
17. Смулевич А.Б. Бензодиазепины: история и современное состояние проблемы / А.Б. Смулевич, С.В. Иванов, М.Ю Дробижев // Журн. невролог. психиатр. - 1988. - №8. - С.5-13.
18. Möhler H. A new benzodiazepine pharmacology / H. Möhler, J.M. Fritschy, U. Rudolph // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. - 2002. - Vol. - 300, №1. - P.-2-8.

19. Roscnbaum J. F. Benzodiazepines: revisiting clinical issues in treating anxiety disorders. / J. F. Rosenbaum, C. P. O'Brien // J.Clin psychiatry. - 2005. - Vol.7.-№1. - P.23-32.
20. Воронина Т. А. Перспективы поиска новых анксиолитиков / Т. А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2002, Т.65. - №5. - 4-17.
21. Богатский А.В. Транквилизаторы / А.В. Богатский, С.А. Андронати, Н.Я. Головенко. - К.:Наук.думка, - 1980. -280с.
22. Головенко М.Я. Фізіологічні моделі біодоступності лікарських засобів, що ґрунтується на механізмах їх всмоктування / М.Я. Головенко, І. Ю. Борисюк // Журн. АМН України. - 2009. - Т.15, №1. - С.32-49.
23. Сравнительная биокинетика нового пролекарственного препарата гидазепама и его метаболита / С.А. Андронати, В.Г. Зиньковский, М.Ю. Тотрова [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и медицины. - 1992. - №1. - С.45-47.
24. Teuber L. Ligands for the benzodiazepine binding site / L. Teuber, F. Watjenn, L. H. Jensen // Current Pharmaceutical Design. - 1999. - Vol.5. - P.317-343.
25. Исследование аффинитета к бенздиазепиновым сайтам ГАМК_A рецепторов ЦНС и функциональной активности потенциального гипнотика – циназепама / И.А. Бойко, С.Ю. Макан, С.П. Смульский, С.А. Андронати // Вісник ОНУ. - 2005. - Т. -10, №1. - Стр. 49-57.
26. Mitler M.M. Nonselective and selective benzodiazepine receptor agonist.- Where are we Today? / M.M. Mitler // Sleep. - 2000. - Vol.23, Suppl. 1. - P. S39-S46.
27. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A reseptor α_1 subtype / R. M. Mckernan, T.W. Rosahl, D.S. Reynolds [at.al.] // Nature neuroscience. - 2000. – Vol. 3. - P. 587-592.

28. Selective, orally active γ -aminobutyric acid_A α 5 reseptor inverse agonists as cognition enhancers / F. Sternfeld, R. W. Carling, R. A. Jelley [at.al.] // J. Med. Chem. - 2004. - Vol. 47. - P.2176-2179.
29. Bormann J. The “ABC” of GABA receptors. / J. Bormann // Trends Pharmacol. Sci. - 2000. - Vol. 21. - P.16–19.
30. Structure – Activity Relationships and Molecular Modeling Analysis of Flavonoids Binding to the Benzodiazepine Site of the Rat Brain GABA_A Receptor Complex Dekermendjian /K. Kahnberg, P. Witt, M. Sterner [at.al.] // J. Med. Chem. - 1999. - Vol.42, № 21. - P. 4343–4350.
31. Гидазепам /Андронати С.А., Битенский В.С., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. // Вісник психічного здоров'я. - 1999. - №3. - С.46-59.
32. Андронати С.А. ГАМК-ергические снотворные средства / С.А. Андронати, Т.Л. Карасева, Л.В. Попова // Фармацевтична Україна. - 2004. - №2. - С.18-22.
33. Comparison of the effects of zolpidem and zopiclone on nocturnal sleep and sleep latency in the morning: a cross-over study in healthy young volunteers / T. Nakajima, T. Sasaki, K. Nakagome [at.al.] // Life Sci. - 2000. - Vol.67, №1. - P.81-90.
34. Memory Effects of Benzodiazepines: Memory Stages and Types Versus Binding-Site / M. M. Savić, D. I. Obradović, N. D. Ugrešić, D. R. Bokonjic // Subtypes Neural Plast. - 2005. - Vol.12, №4. - P.289–298.
35. Whiting Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α 1 subtype / R. M. McKernan, T. W. Rosahl, D. S. Reynolds [at.al.] // Nature Neuroscience 2000. - Vol.3. - P.587 – 592.
36. Громов Л.О. Дослідження перехресної толерантності до протисудомної дії протиепілептичних препаратів / Л.О. Громов, К.О. Черноштан, О.О. Євтушенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2008. - №1-3. - С. 31-35.

37. Експериментальне вивчення фармакокінетичних механізмів розвитку толерантності до гідазепаму / Л. Гарібова, В.П. Жердєв, Т.А. Вороніна [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол. - 1993. - Т. 56, № 6. - С. 48-50.
38. Busto U. Pharmacologic aspects of benzodiazepine tolerance and dependence/ U. Busto, E.M. Sellers //Journal of Substance Abuse Treatment. - 1991. - Vol. 8, Is. 1-2. - P. 29-33.
39. Allan A. M. Effects of lorazepam tolerance and withdrawal on GABA_A receptor-operated chloride channels / A. M. Allan., L.D. Baie., X. Zhang //J. Pharmacol. Exp. 1992. - Vol. 261. - P.395-402.
40. Garibova T.L. Characteristics and mechanisms of tolerance to benzodiazepines / T.L. Garibova, T.A. Voronina // Neurophysiological and Neurochemical Approaches. - 1986. - P. 453-478.
41. Ropert R. Efficacy and tolerance of alprazolam and bromazepam in flexible doses. Double-blind study in 119 ambulatory anxious patients / R. Ropert, J. Bernes, J.M. Dachary // Encephale. - 1987. - Vol. 13, №2. - P.89-95.
42. Ryan G.P. Experimental induction of benzodiazepine tolerance and physical dependence / G.P.Ryan, N.R. Boisse // J. Pharmacol Exp. Ther. 1983. - Vol. 226. - P.100-107.
43. Bateson A.N. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal / A.N. Bateson //Curr.Pharmacol. Des.-2002. - Vol.8, №1. - P.5-21.
44. Development of tolerance to anxiolytic effects of chlordiazepoxide in elevated plus- maze test and decrease of GABA_A receptors / S. Ishihara, M. Hiramatsu, T. Kmeyama, T. Nabeshima // J. Neural Transm. - 1993. - № 91. - P.27-37.
45. Marley R.J. Chronic diazepam treatment produced regionally specific changes in GABA – stimulated chloride influx / R.J. Marley, D.W. Gallager // Eur. J. Pharmacol. - 1989. - №159. - P.217-223.

46. Differential effects of chronic lorazepam and alprazolam on benzodiazepine binding and GABA-A receptor function / W.R. Galpem, L.G. Miller, D.J. Greenblat, R.I. Shader // *Br.J. Pharmacol.* – 1990. - Vol.101. – P.839-842.
47. Keith A. W. GABA_A receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence / A. W. Keith // *Current Opinion in Pharmacology.* - 2005. - Vol. 5, Is.1. - P. 47-52.
48. File S. E. The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies / S. E. File // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 1990. - Vol.14. - P.135-146.
49. Tietz E.I. Regional GABA/benzodiazepine receptor chloride channel coupling after acute and chronic benzodiazepine treatment / E.I. Tietz , T.H. Chiu, H.C. Rosenberg // *Eur.J.Pharmacol.* – 1989. – Vol.167. - P. 57-65.
50. Chronic benzodiazepine administration I. Tolerance is associated with benzodiazepine receptor downregulation and decreased gamma-aminobutyric acid-A receptor function / L.G. Miller, D.J. Greenblatt, J.G. Bamhill, R.I. Shader // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1988. Vol. 246. - P.170-176.
51. Repeated treatment with alpidem, a new anxiolytic, does not induce tolerance or physical dependence/ G. Perrault, E. Morel, D.J Sanger, B. Zivkovic // *Neuropharmacology.* - 1993. - Vol. 32. - P.855-863.
52. Sanger D.J. Differential development of tolerance to the depressant effects of benzodiazepine and non- benzodiazepine agonists at the omega (BZ) modulatory sites of GABA-A receptors / D.J. Sanger, B. Zivkovic // *Neuropharmacology.* – 1992. - Vol.31. - P. 693-700.
53. Lack of tolerance and physical dependence upon repeated treatment with novel hypnotic zolpidem / G. Perrault, E. Morel, D.J. Sanger, B. Zivkovic // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1992. - Vol. 263. - P. 298-303.
54. Heninger C. Altered gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine interaction after chronic diazepam exposure / C. Heninger, D.W. Gallager // *Neuropharmacology.* – 1988. - Vol. 27. - P. 1073-1076.

55. Effect of continuous diazepam administration on GABA_A subunits mRNA in rat brain / C. Heninger, N. Saito, J.F. Tallman [et.all.] // J. Mol. Neurosci. - 1990. - Vol. 2. - P. 101-107.
56. Kang I. Decreased GABA_A receptor subunit mRNA concentrations following chronic lorazepam administration / I. Kang, L. G. Miller // Br. J. Pharmacol. - 1991. - Vol. 103. - P. 1285-1287.
57. Imidazenil, a partial positive allosteric modulator of GABA_A receptors, exhibits low tolerance and dependence liabilities in the rat / J. Auta, P. Giusti, A. Guidotti, E. Costa // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1994. - Vol. 270. - P. 1262-1269.
58. Громов Л. О. Фармакологічний профіль дії ГАМК-ергічних препаратів в ряду психотропних засобів / Л. О. Громов // Механізм дії ліків. - 2001. - №11. - С.2-5.
59. Gallager D.W., Primus R.J. Benzodiazepine tolerance and dependence: GABA_A receptor complex locus of change / D.W. Gallager, R.J. Primus // Biochem Soc Symp. - 1993. - Vol. 59. - P. 135-51.
60. Синтез и фармакологические свойства производных 3-амино-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она / К.С. Андронати, Е.А. Костенко, Т. Л. Карасёва, С. А. Андронати // Химко-фармацевтический журнал. - 2002. - Т.36, №7. - С.16-18.
61. Проскурякова Т.Б. Роль холецистокининовой системы в регуляции состояния тревоги / Т.Б. Проскурякова // Российский психиатрический журн. - 2000, Т.1. - С.61-65.
62. Synthesis of Substituted 3-anilino-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepine-2-ones and their Evaluation as Cholecystokinin-Ligands / M. Offel, P. Lattmann, H. Singh [et.all.] // Arch. Pharm. Chem. Life Sci. - 2006. - №339. - P. 163-173.
63. Sun H.H. Revised NMR assignments for the cholecystokinin antagonist asperlicin / H.H. Sun, S.J. Byard, R. Cooper // Journal of Antibiotics. - 1994. - Vol. 47, № 5. - P. 599-601.

64. Structure of Cholecystokinin Receptor Binding Sites and Mechanism of Activation/Inactivation by Agonists/Antagonists / D. Fourmy, C. Escrieut, E. Archer [et. all.] // *Pharmacology & Toxicology*. - 2002.-Vol. 91, Is. 6. – P. 313–320.
65. Лиганды холецистокининовых рецепторов как потенциальные терапевтические средства / С.А. Андронати, Т.Л. Карасёва, В.С. Битенский, К.С. Андронати // *Вісник психічного здоров'я*. - 2002. - №1-2. - С.39-51.
66. Altar C.A. Brain CCK-8 receptors cholecystokinin / C.A. Altar, W.C. Boyar // *Brain Res*. - 1989. - Vol.483.-P.321-326.
67. Видовые различия в поведенческих эффектах церулеина агониста рецепторов октапептида холецистокинина – у белых мишей и крыс / Э.Э. Вассар, Л.Х. Алликметс, И.В. Зыжов [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* - 1988. - Vol. 105. - P.168-170.
68. Стимуляция церулеином – аналогом октапептида холецистокинина-связывания [3H]-спироперидола после длительного введения нейролептиков / Э.Э. Вассар, А.М. Нурк, М.О. Майметс, Л.Х. Алликметс // *Биол. эксперим. биол. и мед.* - 1985. - Т.99, №2. - С.72-74.
69. Filizona M. Benzodiazepine-induced hyperphagia: development and assessment of a 3D pharmacophore by computational methods / M. Filizona, D.L. Harris, G.H. Loew // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2000. - Vol.17(5). - P.769-778.
70. Novel Nonpeptide CCK-B Antagonists: Design and Development of Quinazolinone Derivatives as Potent, Selective and Orally Active CCK-B Antagonists / J.K. Padia, M. Field, J. Hinton [et. all.] // *J. Med. Chem.* - 1998. - Vol.41(7) - P.1042-1049.
71. Novel Compounds Designed as Antistress Agents / K. C. Tsiakitzis, E. A. Reka, A. P. Kourounakis, P. N. Kourounakis // *J. Med. Chem.* - 2009. - Vol. 52. - P. 7315-7318.

72. Молекулярные мишени новых производных 1,4-бенздиазепин-2-она, влияющих на аппетит животных / С.Ю. Макан, Н.А. Ткачук, В.М. Корхов [и др.] Молекулярные мишени новых производных 1,4-бенздиазепин-2-она, влияющих на аппетит животных // Химико-фармацевтический журнал. - 2005. - Т.39, №6. - С.19-21.
73. Влияние производных цис-3-арилиден(гетералиден)-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов на когнитивные функции крыс / А.А. Казакова, Т.Л. Карасева, В.И. Павловский, С.А. Андронати // Вісн. психіатрії та психофармакотерапії. - 2010. - №1(17). - С.24-26.
74. Синтез, структура и свойства 3-арилиден(гетарилиден)-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов / С.А. Андронати, В.И. Павловский, С.Ю. Бачинский [и др.] // Научные основы создания лекарственных средств VIII Научно-практический семинар материалы докладов. Гурзуф. - 2007. - С.81-89.
75. Синтез, структура и аффинитет к бенздиазепиновым рецепторам ЦНС 3-арилиден(гетарилиден)-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов / В.И. Павловский, С.Ю. Бачинский, Н.А. Ткачук [и др.] // ХГС. - 2007. - № 8. - С.1213-1225.
76. Аффинитет к бенздиазепиновым рецепторам ЦНС и нейротропные свойства новых 3-арилиден(гетарилиден)производных 1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она / С.Ю. Макан, Н.А. Буренкова, Е.А. Костенко [и др.] // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. - 2007. - № 2 (12). - С. 118-122.
77. Лиганды брадикининовых рецепторов как потенциальные анальгетические и противовосполительные средства / С. А. Андронати, Т.А. Кабанова, В.И. Павловский [и др.] // Журн. орг. та фарм. хімії. - 2009. - Т.7, Вып.4(28). - С. 15-22.
78. Stepanski E. J. Use of sleep hygiene in the treatment of insomnia / E. J. Stepanski, J. K. Wyatt // Sleep Medicine Reviews. - 2003. - Vol. 7, Is. 3. - P. 215-225.

79. Prevalence and consequences of sleep disorders in a shift worker population
M. M. Ohayon, P. Lemoine, V. Arnaud-Briant, M. Dreyfus // *Journal of Psychosomatic Research*. – 2002. - Vol. 53, Issue 1. – P. 577-583.
80. Idiopathic rapid-eye-movement sleep disorder: Associations with antidepressants, psychiatric diagnoses, and other factors, in relation to age of onset / P. T. Teman, M. Tippmann-Peikert, M. H. Silber [et. al.] // *Sleep Medicine*. - 2009. – Vol. 10, Issue 1. - P. 60-65.
81. Costa e Silva J. A. Sleep disorders in psychiatry / J. A. Costa e Silva / *Metabolism*. - 2006. - Vol. 55, Supp. 2. – P. S40-S44.
82. Mignot E. A Circadian Sleep Disorder Reveals a Complex Clock /E. Mignot, J. S. Takahashi // *Cell*. - 2007. – Vol. 128, Is 1.- P. 22-23.
83. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases / J.-F. Gagnon, R. B. Postuma, S. Mazza [et. all.] *The Lancet Neurology*. – 2006.-Vol. 5, Iss. 5. - P. 424-432.
84. Stores G. Clinical diagnosis and misdiagnosis of sleep disorders / G. Stores // *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*. - 2007. - Vol. 78. – P.1293-1297.
85. Monti J.M. Primary and secondary insomnia: prevalence, causes and current therapeutics / J.M. Monti // *Curr. Med. Chem. Central Nerv Syst Agents*. - 2004. - Vol.4. - P.119–37.
86. Behavioral and Pharmacological Therapies for Late-Life Insomnia / C. M. Morin, C. Colecchi, J. Stone [et. all.] // *JAMA*. – 1999. - Vol 281, No. 11. - P. 991-999.
87. Lichstein K.L. Behavioral assessment and treatment of insomnia: A review with an emphasis on clinical application / K.L. Lichstein, B.W. Riedel // *Behavior Therapy*. - 1994. - Vol.25, Is.4. - P. 659-688.
88. Горьков В.В. Эволюция фармакологии снотворных средств: от алкоголя к зопиклону / В.В. Горьков, В.А Раюшкин, Ю.Ю. Чурилин // *Журн. неврол. и психиатр*. - 1999. - Т.3. - С.63-66.
89. Левин А.Я. Инсомия и принципы её лечения / А.Я. Левин // *Современная психиатрия*. - 1998. - Т.3. - С.6-10.

90. Sakai K. A neural mechanism of sleep and wakefulness / K. Sakai, S. Crochet // *Sleep Biol. Rhythm.* - 2003. - Vol 1. - P. 29-42.
91. Zammit G. K. The Prevalence, Morbidities, and Treatments of Insomnia / G. K. Zammit // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* - 2007. - №6. - P.3-16.
92. Kisley M.A. The effect of state on sensory gating: comparison of waking, REM and non-REM sleep / M.A. Kisley, A. Olincy, R. Freedman // *Clinical Neurophysiology.* - 2001. - Vol.112, Iss.7. - P. 1154-1165.
93. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease / B. F. Boeve, M. H. Silber, C. B. Saper [et. all.] // *Brain.* – 2007. - Vol. 130 (11). - P. 2770-2788.
94. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease / B.F. Boeve, M.H. Silber, C.B. Saper [et. all.] // *Oxford Journal Medicine Brain.* - 2007. - Vol.130, Is11. - P. 2770-2788.
95. Horne J. REM sleep, energy balance and optimal foraging / J. Horne // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* - 2009. - Vol.33. - P.466–474.
96. Fogel S. M. Cote Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems / S. M. Fogel, C. T. Smith, K. A. Cote // *Behavioural Brain Research.* – 2007. - Vol. 180. - P. 48–61.
97. Siegel J.M. The REM Sleep-Memory Consolidation Hypothesis / J.M. Siegel // *Science.* - 2001. - Vol 294. - P.1058-1063.
98. Iranzo A. The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior Disorder in neurodegenerative diseases/ A. Iranzo, J. Santamaria, E. Tolosa // *Sleep Medicine Reviews.* - 2009. - Vol.13. - P.385-401.
99. Husain A. M. REM Sleep Behavior Disorder: Potential Relationship to Post-traumatic Stress Disorder / A. M. Husain, P. P. Miller, S. T. Carwile // *Journal of Clinical Neurophysiology.* - 2001 – Vol. 18 , Is. 2 - P 148-157.
100. Gottesmann C. The neurobiological characteristics of rapid eye movement (REM) sleep are candidate endophenotypes of depression,

- schizophrenia, mental retardation and dementia / C. Gottesmann, I. Gottesmann // *Progress in Neurobiology*. - 2007. - Vol. 81. - P.237-250.
101. Abad V.C. Sleep and psychiatry / V.C. Abad, Ch. Guilleminault // *Zhurnal neurology and psychiatry imeni S.S. Korsacova*. - 2009. - Vol.109. - No. 9. - P.102-108.
102. Монтелеоне П. Нарушения сна как один из основных симптомов депрессии / П. Монтелеоне, М. Мей // *Журнал неврологии и психиатрии*. - 2009. - Т.109. - С.86-91.
103. Ferini-Strambi L. REM sleep behavior disorder /L. Ferini-Strambi, M. Zucconi // *Clinical Neurophysiology*. – 2000. – Vol. 111, Sup 2. – P. S136-S140.
104. Is the non REM–REM sleep cycle reset by forced awakenings from REM sleep? / M. Grözinger, Domien G.M. Beersma, J. Fell, J. Röschke // *Physiology and Behavior*. - 2002. - Vol.77. Is. 2-3 - P. 341– 347.
105. Obermeyer W.H. Effects of drugs on sleep / W.H. Obermeyer, R.M. Benca // *Neuro Clin*. – 1996. - Vol.14 (4). - P.827-40.
106. Ursin R. Serotonin and sleep / R. Ursin // *Sleep Medicine Reviews*. - 2002. - Vol. 6, Is. 1. - P. 55-67.
107. Bormann J. The “ABC”of GABA receptors / J. Bormann // *Trends Pharmacol Sci*. – 2000. - Vol. 21. - P.16–19.
108. Devor A. Synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors in the inferior olivary nucleus differ in their spatial distribution, desensitization kinetics and subunit composition / A. Devor, J. M. Fritschy, Y. Yarom // *J Neurophysiol*. - 2001. - Vol.85. - P.1686–1696.
109. Hood S.D. Agents in development for anxiety disorders / S.D. Hood, S.V. Argyropoulos, D.J. Nutt // *Current status and future potential. CNS Drugs*. - 2000. - Vol. 13. - P.421–431.
110. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. / R.J. Walters, S.H. Hadley, Kendall D.W. Morris, J. Amin // *Nature Neuroscience*. - 2000. - Vol. 3. - P.-1274–1281.

111. Gottesmann C. Noradrenaline involvement in basic and higher integrated REM sleep processes / C. Gottesmann // Progress in Neurobiology. - 2008. - Vol. 85. - P.237-272.
112. Long-lasting effects of feline amygdale kindling on monoamines, seizures and sleep / M.N. Shouse, R. J. Staba, S.F. Saquiba, P.R. Farbera // Braine Research. - 2001. - Vol.892. - P.147-165.
113. Jouvét M. Sleep and serotonin: an unfinished story/ M. Jouvét // Neurophychoparmacology. - 1999. - Vol.21, №2. - P.24S-27S.
114. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep–wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats / I. Léna, S. Parrot, O. Deschaux [et. all.] // Journal of Neuroscience Research. – 2005. - Vol. 81, Iss. 6. - P.891–899.
115. Manuna Y., Edeline J.M. Effects of noradrenaline on frequence tuning of auditory cortex neurons during wakefulness and slow wave sleep. /Y. Manuna, J.M. Edeline // Eur. J. Neurosci. - 1999. - Vol 11. - P. 2134-2150.
116. Gottesman C. GABA mechanisms and sleep / C. Gottesman // Neuroscience. - 2002. - Vol. 111, Is.2. - P.231-239.
117. Robert W. McCarley Neurobiology of REM and NREM sleep. // Sleep Medicine. - 2007. - № 8. - P.302-330.
118. Sivilotti L. GABA receptor mechanisms in the central nervous system / L. Sivilotti, A. Nistri / Progress in Neurobiology. – 1991. - Vol. 36, Iss. 1. – P. 35–92.
119. Deschaux O. Influence of a GABA_B and GABA_C receptor antagonist on sleep–waking cycle in the rat / O. Deschaux, W. Froestl, C. Gottesmann // European Journal of Pharmacology. - 2006. - Vol. 535. - P.177–181.
120. Arnaud C. Study of a GABA_C receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats / C. Arnaud, P. Gauthier, C. Gottesmann // Psychopharmacology. - 2001. - Vol. 154. - №4. - P.415 - 419.

121. The effect of REM sleep deprivation on histamine concentrations in different brain areas / T. Porkka-Heiskanen, L. Tuomisto, M. Ylinen, D. Stenberg // *Life Science*. – 1994. - Vol. 54. - Is. 22. - P. 1719-1726.
122. Effects of Lesions of the Histaminergic Tubero-mammillary Nucleus on Spontaneous Sleep in Rats / D. Gerashchenko, C.C. Thomas, C. A. Blanco-Centurion [et. all.] // *Sleep*. - 2004.- Vol 27(7). - P.1275–1281.
123. Barbier A. J. Histaminergic Control of Sleep-Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders / A. J. Barbier, M. J. Bradbury // *CNS & Neurological Disorders. Drug Targets*. – 2007. - Vol. 6. - P. 31-43.
124. Treatment of Delayed Sleep Phase Syndrome with Melatonin / K. Mundy, S. Benloucif, K. Harsanyi [et. all.] // *SLEEP*. - 2005. - Vol. 8(10). - P.1271-1278.
125. Turek F. W. Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists / F. W. Turek, M. U. Gillette // *Sleep Medicine*. - 2004. - Vol.5. - Is. 6. - P. 523-532.
126. Angelis L. Animal Techniques for Evaluating Benzodiazepine Drugs / L. Angelis // *Methods and findings exp. and clin. pharmacol.* – 1979, Vol.1 - №3. - P. 129-155.
127. Modification of receptor selectivity and functional activity in cholecystinin peptide ligands / M. Dezube, E.E. Sugg, L. S. Birkemo [et. all.] // *J. Med. Chem.* - 1995. - Vol.38. - P. 3-9.
128. Porsolt R. O., Bertin A., Jalfree M. The effects of serotonin antagonists in a behavioral Despair Procedure in Mice / R. O. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfree // *Eur. J. Pharmacol.* - 1979. – Vol. 19. – 201-210.
129. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. // В.В. Гацура - М.: Медицина, 1974. – 130 с.

130. The analysis of delta sleep-inducing neuropeptide action in cats and albino rats / I.G. Karmanova, I.P. Maximuk, I.B. Voronov [et. all.] // *J. Evolut. Biochem. Physiol.* - 1979. - Vol. 15. - P.-583-589.
131. Behavioral effects of the intranigral injection of delta sleep – inducing peptide / A.A. Shandra, L.S. Godlevsky, A.I. Brusentsov [et. all.] // *Pharmacol. Biochem. and Behavior.* – 1998. – Vol. 11. - № 1. – P.1-6.
132. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat / R. Morris // *J. Neurosci Methods.* - 1984. - 11 (1). - P.47-60.
133. Лакин Г.Ф. Биометрия. / Г.Ф. Лакин: пособ. для студентов биологических специальностей высших учебных заведений. - М., 1990. -350 с.: ил.
134. Лапач С. Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Морион, 2001. – 408 с.
135. Effect of zopiclone and temazepam on sleep EEG parameters, psychomotor and memory functions in healthy elderly volunteers / U. Hemmer, M. Muller, R. Bischof [et. all.] // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2000. - Vol.147. - №4. - P.348-396.
136. Синтез, структура, противосудорожные свойства 3-ацилокси-7-бром-5-(2'-хлорфенил)-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов / Е.А. Семенишина, В.И. Павловский, С.А. Андронати [и др.] // *Вісник Одеського національного університету.* - 2009. - Т.14, №3. - С.44-46.
137. Correlation between Hydrolysis Rates and Brain Appearance of Oxazepam / G. Maksay, Z. Tegyeu, V. Kemeny [et. all.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* - 1979. - Vol.22. - No 12. - P.1436-1443.
138. Maksay G. Oxazepam Esters. 2. Correlation of Hydrophobicity with Serum Binding, Brain Penetration, and Excretion / G. Maksay, Z. Tegyeu, L. Otvos // *Journal of Medicinal Chemistry.* - 1979. - Vol. 22. - No 12. - P.1443-1447.

139. Фармакокінетика 7-бром-5-(2'-хлор)феніл-3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону в організмі експериментальних тварин за різних способів уведення. / І.А. Кравченко, Г. І. Сівко, І.М. Радаєва І.М. [та ін.] // *Ukrainica Bioorganica Acta*. - 2008. - № 2. - С.33-37.
140. Structure-Affinity Relationships Between Several New Benzodiazepine Derivatives and 3*H*-Diazepam Receptor Sites/ T. Shibuya, R. Field, Y. Watanabe [et. all.] // *Japan. J. Pharmacol.* - 1984. - Vol. 34. - P.435-440.
141. Benzodiazepines: revisiting chemical issues in treating anxiety disorders / J. F. Chair, Rosenbaum, P. Charles, M.D. O'Brien // *J.Clin. Psychiatry*. - 2005. - Vol.7. - №1. - P.23-30.
142. Redoux L. Neurotransmitter basis of anxiety / L. Redoux / *Anxiety: basic and clinical research*. - Hammerworth Press. - 2001. - P. 36-50.
143. Громов Л.О., Ярош О.О. Фармакологічний профіль сучасних протиепілептичних препаратів / Л.О. Громов, О.О. Ярош // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. - 2008. - №4(5). - С. 22-28.
144. Shorvon S. D. The Use of Clobazam, Midazolam, and Nitrazepam in Epilepsy / S. D. Shorvon / *Epilepsia*. – 1998. - Vol. 39. – Iss. S1. - P. S15 – S23.
145. Effects of the anticonvulsant benzodiazepine clonazepam on event-related brain potentials in humans / B. Rockstroh, T. Elbert, W. Lutzenberger, E. Altenmüller // *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. - 1991. - Vol. 78. - Is. 2. - P. 142-149.
146. Influence of benzodiazepine binding site ligands on fear-conditioned contextual memory / T. M. Lorey, R. C. Lin, B. M. Brady [et. all.] // *European Journal of Pharmacology*. - 2001. - Vol. 426.- Is. 1-2.- P. 45-54.
147. Lam. P. C.H., Experimental and Computational Studies of Ring Inversion of 1,4-Benzodiazepin-2-ones: Implications for Memory of

- Chirality Transformations / P. C.H. Lam., P. R. Carlier // *J. Org. Chem.* 2005. - Vol.70 (5). - P. 1530–1538.
148. Rose C. Characterization and Inhibition of a Cholecystinin-Inactivating Serine Peptidase / C. Rose, F. Vargas, P. Facchinetti // *Nature.* - 1996. - Vol.380. - P.403-409.
149. Експериментальне вивчення розвитку толерантності до циназепаму / Т.Л. Карасьова, Л.В. Попова, О.В. Онуфрієнко [та ін.] // *Доповіді Національної академії наук України.* - 2008. - № 7. - С. 157-161.
150. Вплив одноразового і тривалого введення потенційного гіпнотіка циназепаму на функціональну спряженість ГАМК_A-бенздіазепін-рецепторного комплексу / І.А. Бойко, С.Ю. Макан, С.П. Смульська, С.А. Андронаті. // *Фармацевтичний журнал.* - 2005. - № 5. - С. 93-97.
151. Вплив довготривалого введення циназепаму і його скасування на функціональний сполучення ГАМК_A-бенздіазепін-рецепторного комплексу / С.Ю. Макан, І.А. Бойко, Т.А. Кравцова [та ін.] // *Вісн. психіатрії та психофармакотерапії.* - 2007. - № 1 (11). - С.116-118.
152. Recent developments in the behavioral pharmacology of benzodiazepine (omega) receptors: evidence for the functional significance of receptor subtypes / D. J. Sanger, J. Benavides, G. Perrault [et. all.] // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 1994. - № 18. - P. 355-372.
153. Громов Л.О. Типичные и "атипичные" транквилизаторы / Л.О. Громов, Е. Дудко // *Вісник фармакології та фармації.* - 2003. - №10. - С.7-12.
154. Kavanau J. L. Memory, sleep and evolution of mechanisms of synaptic efficacy maintenance / J. L. Kavanau // *Neuroscience.* - 1997. - Vol.79, No.1. - P.7-44.
155. Raghavendra V. Reversal of reserpine-induced vacuous chewing movements in rats by melatonin: involvement of peripheral benzodiazepine

- receptors / V. Raghavendra, P.S. Naidu, S.K. Kulkarni // *Brain Res.* - 2001. - Vol. 904 (1). - P.149-152.
156. Effects of gabaergic drugs on reserpine-induced oral dyskinesia / M. F. Peixoto, N. P. Araujo, R. H. Silva [et. all.] // *Behav Brain Res.* - 2005. - Vol.7, 160 (1). - P.51-59.
157. Soubrie P. Effects of diazepam on six drug-induced locomotor hyperactivities in mice / P. Soubrie, P. Simon, J. R. Boissier // *Psychopharmacologia.* - 1975. - Vol. 45 (2). - P. 197-201.
158. Taheri S. The genetics of sleep disorders // S. Taheri, E. Mignot // *The Lancet Neurology.* 2002. – Vol. 1, Issue 4. - P. 242-250.
159. Sleep disorders and their determinants in multiple system atrophy / I.Ghorayeb, F. Yekhlef, V. Chrysostome [et. all.] // *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* - 2002. - Vol. 72. - P.798-800.
160. Chokroverty S. Sleep and degenerative neurologic disorders. / S. Chokroverty // *Neurol Clin.* - 1996. - Vol.-14(4). - P. 807-826.
161. DeMartinis N. A. Effects of psychiatric medications on sleep and sleep disorders. *CNS neurological disorders.* / N. A. DeMartinis, A. Winokur // *Drug Targent.* - 2007. - № 6. - P. 17-29.
162. Schenck C. H. REM sleep parasomnias / C.H. Schenck, M.W. Mahowald // *Neurol Clin.* - 1996. - Vol 14(4). - P. 697-720.
163. Tsuno N. Sleep and Depression / N. Tsuno, A. Besset, K. Ritchie // *Journal of Clinical Psychiatry.* - 2005. - Vol 66(10). - P.1254-1269.
164. Paradoxical Sleep is Characterized by Uncoupled Gamma Activity Between Frontal and Perceptual Cortical Region / E. Pérez-Garci, Y. Del-Río-Portilla, M. A. Guevara [et. all.] // *Sleep.* - 2001. - Vol. 24. - No. 1. - P.118-126.
165. The histamine H₃receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders / M. B. Passani, J.-S. Lin, A. Hancock [et. all.] // *Trends in Pharmacological Sciences.* - 2004. - Vol. 25, Issue 12. - P. 618-625.

166. Depression and Sleep Disorders: Clinical Relevance, Economic Burden and Pharmacological Treatment / N. Brunello, R. Armitage, I. Feinberg [et. all.] // *J Neuropsychobiology*. - 2000. - Vol 42. - P. 107–119.
167. Partinen M. Epidemiology of sleep disorders / M. Partinen // *Handb Clin Neurol*. - 2011. - Vol. 98. - P. 275-314.
168. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders / C. Gyllenhaal, S. L. Merritt, S. D. Peterson [et. all.] // *Sleep Medicine Reviews*. - 2000. Vol. 4, Issue 3. - P. 229-251.
169. Castriotta R. J. Sleep Disorders Associated With Traumatic Brain Injury / R. J. Castriotta, J. M. Lai // *Arch Phys Med Rehabil*. – 2001. - Vol 82. - P.1403-1406.
170. Eisen J. Psychotropic and sleep / J. Eisen, J. MacFarlane, C. M. Shapir // *BMJ*. 1993. - Vol. 306. - P.1331 -1334.
171. Recommendations for a standard research assessment of insomnia / D. J. Buysse, S. Ancoli-Israel, J. D. Edinger [et. all.] // *Journal of Sleep and Sleep Disorders Research*. - 2006. - Vol 29(9). - P.1155 - 1173.
172. Javaheri S. Sleep disorders in systolic heart failure: A prospective study of 100 male patients. The final report / S. Javaheri // *International Journal of Cardiology*. - 2006. - Vol. 106. - Issue 1. - P. 21-28.
173. Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD / A. Iranzo, J. Santamaría, D. B. Rye [et. all.] // *Neurology*. – 2005. - Vol. 65 no. 2. - P. 247-252.
174. Mahowald M. W. Insights from studying human sleep disorders / M. W. Mahowald, C. H. Schenck // *Nature*. - 2005. - Vol. 437. - P.1279-1285.
175. Fulda S. Cognitive dysfunction in sleep disorders /S.Fulda, H.Schulz // *Sleep Medicine Reviews*. - 2001. - Vol.5.-Is. 6. - P. 423-445.
176. Ebert U. Basic Mechanisms of Psychotropic Drugs / U. Ebert // *Epilepsia*. - 2002. - Vol. 43, Iss. 2. - P. 2–7.

177. Ancoli-Israel S. Diagnosis and Treatment of Sleep Disorders in Older Adults / S. Ancoli-Israel, L. Ayalon // American Journal of Geriatric Psychiatry. - 2006. – Vol. 14 - Iss 2 – P. 95-103.
178. Kalimo R. Job stress and sleep disorders: findings from the Helsinki Heart Study / R. Kalimo, L. Tenkanen, M. Härmä // Stress and Health. - 2000. - Vol. 16, № 2. - P. 65-75.
179. Migno E. Sleep, sleep disorders and hypocretin (orexin) / E. Migno // Sleep Medicine 2004. - Vol. 5, Supp. 1. - P S2-S8.
180. Malow B. A. Sleep disorders, epilepsy, and autism / B. A. Malow // Developmental Disabilities Research Reviews. - 2004. - Vol. 10, Iss 2. - P.122–125.
181. Schenck C.H. Parasomnias. Managing bizarre sleep-related behavior disorders / C.H Schenck, M.W. Mahowald // Postgrad Med. – 2000. - Vol. 107(3). - P.145-56.
182. Modafinil for Excessive Sleepiness Associated with Shift-Work Sleep Disorder / C. A. Czeisler, J. K. Walsh, T. Roth [et. all.] // The new Englnd Journal of Medicine. - 2005. - Vol 353. - P. 476-486.
183. Sleep disorders and their determinants in multiple system atrophy /I. Ghorayeb, F. Yekhlef, V. Chrysostome [et. all.]. // J. Neurol Neurosurg Psychiatry. - 2002. - Vol. 72. - P. 798-800.
184. Ramsay D. S. Biological consequences of drug administration: Implications for acute and chronic tolerance / D. S. Ramsay, S. C. Woods // Psychological Review. - 1997. - Vol 104(1). - P 170-193.
185. Нейрохімічні мішені фармакологічної дії нових протиепілептичних лікарських засобів / Л.О. Громов, М.А. Філоненко, О.О. Євтушенко [та ін.] // Медична хімія. - 2005. - Т.7. - №3. - С.114-120.
186. The treatment of epilepsy: future possibilities / I. Szelenyi, K. Horvath, J.F. Howes, A.M. Mazarati // Drugs of the Future. - 2003. – Vol. 28 (9). – P.925-936.

187. Massin-Krauss M. Effects of the Benzodiazepine Lorazepam on Monitoring and Control Processes in Semantic Memory / M. Massin-Krauss, E. Bacon, J.-M. Danion // *Consciousness and Cognition*. – 2002. - Vol. 11, Iss. 1. – P.123-137.
188. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance / J.M. Khanna, H. Kalant, G. Shah, J. Weiner // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 1991. - Vol. 38, Is. 2. – P. 427 - 432.