

СКРИПКА МАРИЯ ОЛЕГОВНА

**НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре фармакологии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ, академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Спасов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты:

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Оковитый Сергей Владимирович

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Минобрнауки РФ,

доктор медицинских наук, профессор

Покровский Михаил Владимирович

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Минобороны РФ, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в ____ ч. на заседании Диссертационного Совета 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1, и на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы исследования. Ментальные расстройства являются одними из наиболее распространенных патологий в мире [Rehm et al. 2019; Botturi et al. 2020]. В среднем каждый третий человек в течение жизни страдает психическим расстройством [Christensen et al., 2020]. В дополнение к эпидемиологическим показателям, таким как заболеваемость и смертность, важность психических расстройств можно также оценить с помощью исследований стоимости болезни в рамках экономики здравоохранения: потери мировой экономики от прямых и косвенных издержек, обусловленных психическими заболеваниями работников, оценивается в 2,5 трлн долларов США ежегодно [Doran et al., 2019].

Тревожные расстройства являются наиболее распространенными психическими заболеваниями [Александровский Ю. А., 2014; Bandelow et al., 2022]. Тревога выполняет адаптивную функцию в стрессовых обстоятельствах, но в отсутствие мотивации она может стать травмирующим фактором, и тогда представляет собой клинический синдром [Shastry et al., 2016]. В период эпидемии COVID-19 увеличилась распространенность тревожных состояний, а также депрессии и приступов агрессии при одновременном снижении удовлетворенности жизнью [Sher, 2020]. Многие страдают от стрессового расстройства, часто переживаемого в одиночестве [Peteet, 2020].

В настоящее время селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (СИОЗСН) преимущественно рекомендуются при лечении тревожных расстройств ввиду хорошего соотношения пользы и риска. Текущие руководства не рекомендуют бензодиазепины в качестве препаратов первой линии, поскольку они вызывают ряд нежелательных эффектов [Петров и др., 2015; Тюренок и др, 2011; Thibaut et al., 2022]. К «новым анксиолитикам» относятся парциальные агонисты ГАМК (абекарнил), эндогенные модуляторы ГАМКА (эндозепины), агонисты ГАМКВ (фенибут), мембранные модуляторы ГАМКА (афобазол), глутаматергические (кетамин) и серотонинергические

анксиолитики (буспирон) [Воронина и др., 2002]. В большинстве случаев они характеризуются менее выраженными нежелательными реакциями, и, в то же время, уступают производным бензодиазепа в эффективности [Ковалев, 1990; Воронина и др., 2002; Середенин и др., 2009; Полковникова и др., 2011; Арушанян, 2012; Шабанов и др, 2016; Багметова и др, 2017;].

Значительное внимание исследователей привлекают гетероарилзамещенные производные моноаминовых нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и нейрогормонов, таких как дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин, мелатонин, гистамин и β -фенилэтиламин, а также их близкие структурные аналоги [Pruitt et al., 2003; Tintori et al., 2009; Lin et al., 2010; McKay et al., 2010; Fournier et al., 2012; Kers et al., 2012; Papa et al., 2015; Kasserra et al., 2016; Capaldi et al., 2017; Cinelli et al., 2020; Morrow et al., 2020; Vui et al., 2021]. Таким образом, эти соединения должны представлять интерес, прежде всего, как нейротропные средства.

В научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного Федерального университета совместно с Северо-Кавказским зональным научно-исследовательским ветеринарным институтом был синтезирован неизвестный ранее тип гетероариллированных аналогов моноаминовых нейротрансмиттеров, а именно *о*-хиноксалил-2-метилпроизводные β -арилэтиламинов и 2-хиноксалил-2-метил *N*-метилтриптамина [Zubenko et al., 2020]. Для настоящей работы был получен новый ряд соединений этого типа и изучено действие таких производных на центральную нервную систему лабораторных животных.

Актуальным и целесообразным представляется изучение фармакологических эффектов новых соединений. Таким образом, является перспективным изучение в ходе настоящего исследования нейропсихотропных свойств нового ряда производных хиноксалина с целью оценки перспективности разработки на их основе новых высокоэффективных нейропсихотропных средств.

Тема утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протокол № 1 от 29.01.2020) и включена в план НИР.

Степень разработанности. На современном этапе азотсодержащие гетероциклы представляют особый интерес для разработки новых препаратов или потенциальных лекарственных молекул [Deerika et al., 2011; Ahmad et al., 2017; Kalaria et al., 2018; Heravi et al., 2020; Kerru et al., 2020]. Хиноксалиновый скаффолд, образованный слиянием двух ароматических колец, бензола и пиперазина, является одним из гетероциклов, которому уделяется значительное внимание [Montana et al. 2021]. Производные хиноксалина характеризуются широким спектром фармакологических активностей: противовирусной [Montana et al., 2020], противоопухолевой [Montana et al., 2019], противолейшманиальной [Barea et al., 2013], противогрибковой [Patidar et al., 2011; Ammar et al., 2002], анальгетической [Tadesse et al., 2012], противовоспалительной [Abu-Hashem et al., 2010; Curry et al., 2005], гипогликемической [Kulkarni et al., 2012], антидепрессивной [Mahesh et al., 2011], противосудорожной [Abul-Khair et al., 2013], анксиолитической [Bhatt et al., 2013], что обуславливает значительное внимание к нему в области синтеза и поиска новых активных фармацевтических субстанций. Механизм действия производных хиноксалина отличается широкой вариабельностью: серотонинергический [Campiani et al., 1999], глутаматергический [Potschka et al., 1998], адренергический [Wheeler et al., 2006], ГАМК-ергический [Jacobsen et al., 1999]. Доступность химического синтеза и широкий спектр биологических активностей позволяет позиционировать хиноксалиновый скаффолд как перспективный с точки зрения медицинской химии для синтеза на его основе активных фармацевтических субстанций для лечения и профилактики ряда заболеваний.

На кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ ранее создана база для проведения исследований нейропсихотропного действия новых рядов соединений различных химических классов – меркаптобензимидазолов, диазепино[1,2- α]бензимидазолов, циклопентаазуления бромидов, имидазопиперазинов, тиазолов, триазолодиазепинов, бифенилов и многих других [Спасов и др., 2020; Maltsev et al., 2021]. Настоящая работа является первичным исследованием указанной активности производных хиноксалина с целью оценки

перспективности данного направления, поиска высокоактивных соединений, а также возможного формирования практических рекомендаций по оптимизации существующих структур на основании полученных экспериментальных данных.

Цель исследования

Оценка нейрпсихотропного потенциала действия нового ряда C^2, C^3 -производных хиноксалина.

Задачи исследования

1. Провести изучение нейрпсихотропного потенциала действия ряда новых производных хиноксалина.
2. Изучить зависимость анксиолитической активности новых соединений от их химической структуры.
3. Исследовать спектр анксиолитического действия соединения, проявившего наибольшую активность.
4. Изучить антидепрессивную активность соединения-лидера.
5. Оценить противосудорожные эффекты соединения с наибольшей активностью.
6. Исследовать анальгетические свойства соединения-лидера.
7. Проанализировать взаимодействие соединения-лидера с основными лигандами нейромедиаторных систем *in vivo*.
8. Оценить влияние соединения-лидера на содержание основных метаболитов и их моноаминов в головном мозге мышей.
9. Рассчитать характеристики нового соединения с применением методик ADMET.
10. Определить острую токсичность и нейротоксикологический профиль наиболее активного соединения с применением теста «S. Irwin».

Научная новизна исследования. Впервые были изучены нейрпсихотропные свойства нового ряда C^2, C^3 -производных хиноксалина при внутрижелудочном пути введения исследуемых веществ. В ходе экспериментальной работы отмечено характерное для данных соединений анксиолитическое, антидепрессивное, анальгетическое действие. Выявлено

соединение ЗДМ-81, по уровню анксиолитической активности не уступающее препарату сравнения диазепаму. Получены данные об отсутствии влияния введения соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус животных. Было установлено, что изучаемое соединение относится к классу 3, что соответствует умеренной токсичности. Таким образом, изучаемое соединение может рассматриваться в качестве вещества, проявляющего транквилизирующие свойства.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определена взаимосвязь между анксиолитической активностью C^2, C^3 -производных хиноксалина и их химическим строением. Были получены данные, которые могут быть положены в основу направленного поиска новых соединений с нейрорепрессивными свойствами. Впервые получены данные о характере нейрорепрессивных свойств соединения ЗДМ-81. Впервые была определена полуживотная доза соединения ЗДМ-81, а также получены данные о возможных нежелательных реакциях. Изучаемое соединение ЗДМ-81 характеризуется серотонинергическим механизмом действия.

Методология и методы исследования. Методологическая основа для выполнения исследования соответствовала поставленным задачам и основывалась на технологической базе ФГБОУ ВО «Волгоградского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также ГБУ Волгоградского медицинского научного центра. Исследование осуществлялось на нелинейных половозрелых мышцах-самцах и крысах-самцах. Среди нейрорепрессивных свойств C^2, C^3 -производных хиноксалина изучались анксиолитические, антидепрессивные, психорелаксирующие, противосудорожные, анальгетические. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием теста Колмогорова-Смирнова для определения нормальности распределения данных, а в случае ненормального распределения - непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна, либо U-критерия Манна-Уитни с применением ПО GraphPad Prism 7.0.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные C^2, C^3 -хиноксалинового скаффолда являются перспективным классом соединений для поиска и изучения новых высокоэффективных анксиолитических средств.

2. Важным фактором проявления противотревожной активности новых соединений являлось наличие во втором положении хиноксалинового скаффолда заместителя, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью, за исключением пара-нитрофенилзамещённого, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин в положении 1.

3. Соединение ЗДМ-81, 2-(2-{[3-(4-трет-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид, проявляет высокую анксиолитическую активность на уровне препарата сравнения диазепама.

Внедрение результатов исследования. Выявленная взаимосвязь структуры и фармакологической активности изученного ряда производных хиноксалина послужит для оптимизации синтеза веществ на базе НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета с целью получения высокоэффективных соединений. Разработанная методология направленного поиска новых соединений с нейрорепрессивной активностью применяется в лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ, а также кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ; фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ; фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с нейрорепрессивной активностью, а также критериев статистической обработки

данных. Основные результаты диссертационной работы были представлены на научно-практических конференциях: 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2020); XXV Региональной конференции молодых ученых и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2021 г.); 79-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2021); 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MedChem-Russia 2021» (Волгоград, 2021 г.).

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в выполнении исследования по изучению фармакологической активности новых производных C^2, C^3 -хиноксалина на всех его этапах, а именно: определения подходов к решению поставленных задач, выполнения экспериментальной работы, обсуждения результатов и разработке практических рекомендаций. Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы, посвященных данной проблеме, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, а также оформление рукописи.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы работы, 6 глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, научно-практические рекомендации, список литературы, содержащий 170 источников, из которых 38 отечественных и 132 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 70 рисунками и содержит 14 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ отечественных и зарубежных литературных источников, посвящённых фармакологическим свойствам различных производных хиноксалина. Спектр биологических активностей указанных производных включает противопротозойные, противовирусные, противогрибковые, противовоспалительные, анальгетические, гипогликемические, психотропные.

Во второй главе представлено описание материалов и методов исследования, использованных при выполнении диссертационной работы.

В ходе исследования было изучено 15 новых производных хиноксалина, синтезированных коллаборацией ученых НИИ физико-органической химии Южного Федерального университета научными сотрудниками Диваевой Л.Н. и Морковником А.С., а также Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского ветеринарного института Зубенко А.А. и Клименко А.И. Анксиолитическое действие новых соединений было изучено с применением методики «Приподнятый крестообразный лабиринт», антидепрессивной активности – в тесте «Подвешивания за хвост», седативных свойств – в тесте «Открытое поле». Дополнительно была оценена способность нового ряда соединений вызывать миорелаксацию в тестах «Сетка», «Проволока», «Ротарод». Изучена длительность эффекта соединения с высокой противотревожной активностью ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также зависимость величины эффекта от выбранной дозы. Анксиолитические свойства наиболее активного соединения были проверены в тестах «Темная/светлая камера», «Конфликтная ситуация по Vogel», «Тревожно-фобическое состояние животных». Более широкий нейропсихотропный профиль был оценен с применением методик «Отдергивания хвоста» и «Горячей пластины», теста «Закапывания шариков», «Подвешивания за хвост» и «Принудительного плавания по Porsolt», «Максимальный электрошок» и «Коразоловые судороги», а также батареи миорелаксационных тестов. Эффекты взаимодействия с нейромедиаторными системами исследованы с применением моделей «5-

гидрокситриптофановый гиперкинез», «Галоперидоловая каталепсия», «Апоморфиновая стереотипия», «Ареколиновый тремор», «Пикротоксиновые судороги». Исследовано влияние соединения ЗДМ-81 на содержание основных моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было проведено изучение острой токсичности соединения на мышах с определением LD50, оценка фармакокинетических свойств соединения ЗДМ-81 методами ADMET, а также нейротоксикологических эффектов с использованием многопараметрового нейротоксикологического теста по S.Irwin. Статистическая обработка данных была произведена с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, США).

В третьей главе проведен поиск новых высокоактивных психотропных соединений среди синтезированных производных хиноксалина. По результатам теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» наиболее активным соединением является ЗДМ-81. Мыши под действием указанного соединения были более активны, больше времени проводили в светлых рукавах установки, не боялись исследовать новые пространства, чаще выглядывали и свешивались с краев лабиринта. Не было выявлено значимых антидепрессивных эффектов новых соединений в тесте «Подвешивания за хвост». Обнаружено, что присутствие неполярного заместителя в R₂ положении либо *пара*-нитрофенила, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин в положении R₁, являлось структурной особенностью для новых производных хиноксалина с наиболее выраженной противотревожной активностью. Этим критериям соответствуют вещества ЗДМ-4, ЗДМ-5 и ЗДМ-81 (рисунок 1). Наиболее перспективными для дальнейшего изучения выступают анксиолитические свойства соединения ЗДМ-81, профиль противотревожного действия которого наиболее близок к препарату сравнения диазепаму в дозе 1 мг/кг, без присущего диазепаму миорелаксирующего и седативного действия.

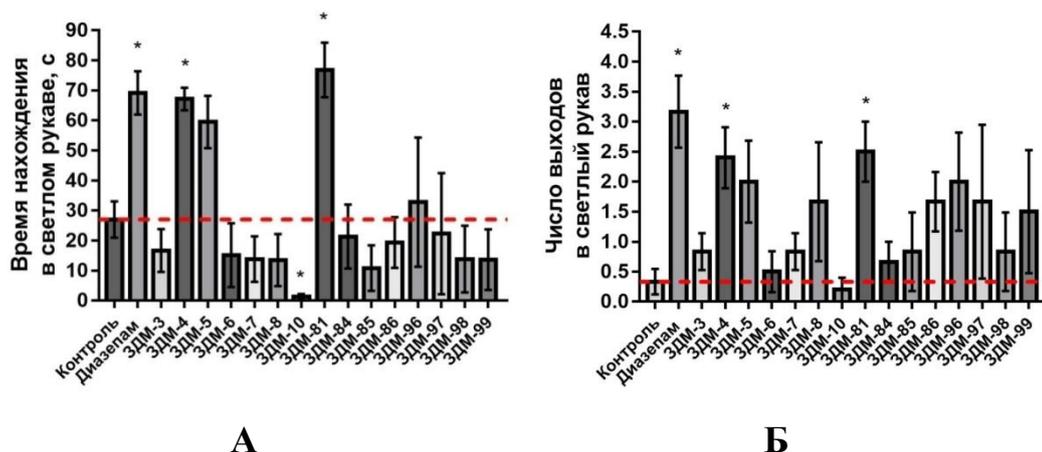
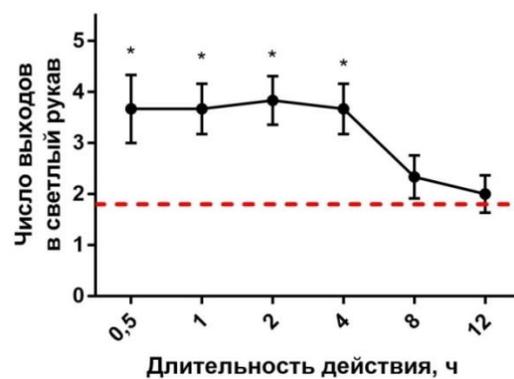
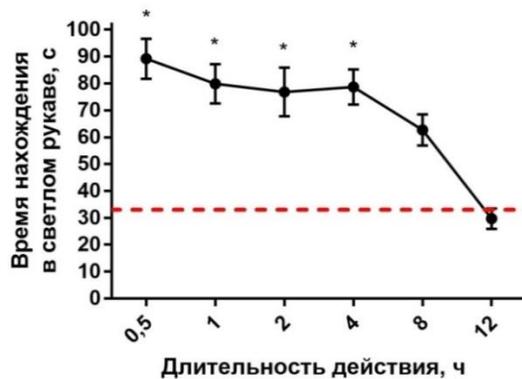
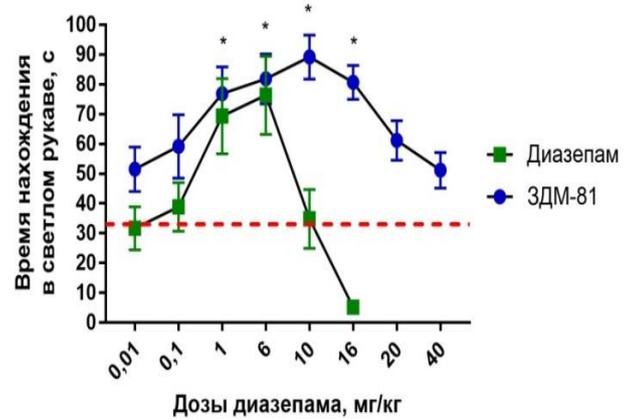


Рисунок 1 - Анксиолитическое действие производных хиноксалина в дозе, эквивалентной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение ($M \pm SEM$). *Примечание:* * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В четвертой главе с целью уточнения и детализации эффекта, выявленного в результате скрининговых исследований, соединения ЗДМ-81 было проведено углубленное изучение его анксиолитических свойств с применением различных методик. На первом этапе была составлена кривая зависимости искомого эффекта от дозы нового соединения, определена эффективная доза – 17,5 мг/кг (рисунок 2). В эффективной дозе были проведены дальнейшие исследования анксиолитической активности ЗДМ-81, в том числе изучение длительности эффекта соединения, которое составило 4-6 часов (рисунок 3). Согласно рекомендациям «Руководства по доклиническому изучению лекарственных средств» [Миронов и др., 2012], необходимо применение как минимум двух неконфликтных и одной конфликтной методик для подтверждения противотревожной активности новых соединений. Исходя из этого, был сформирован перечень тестов для проверки анксиолитических свойств ЗДМ-81: «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние животных» и «Конфликтная ситуация по Vogel». Во всех представленных тестах эффект соединения ЗДМ-81 не уступал препарату сравнения диазепаму. Таким

образом, анксиолитическое действие производного хиноксалина ЗДМ-81 было подтверждено с применением широкого ряда методов, а также определена его эффективная доза и длительность действия.

Рисунок 2 - Зависимость анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от дозы в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение ($M \pm SEM$). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений.*



А

Б

Рисунок 3 - Длительность анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в промежутке времени от 0,5 до 12 ч в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение ($M \pm SEM$). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»*

В пятой главе в рамках изучения дополнительных нейротропных эффектов соединения с анксиолитической активностью ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг были изучены антифобические, антидепрессивные, анальгетические, противосудорожные свойства, а также оценена степень его влияния на мышечный

тонус животных. Для решения поставленной задачи были выбраны методики «Закапывания шариков», «Принудительного плавания по Porsolt», «Отдергивания хвоста», «Горячей пластины», «Максимального электрошока», «Коразоловых судорог», «Сетка», «Проволока» и «Ротарод». Было отмечено противосудорожное действие соединения ЗДМ-81 в тесте «Максимальный электрошок» в сравнении с контролем, выражающееся в снижении летальности животных после получения электростимуляции (таблица 1). Не отмечено антиконвульсивного эффекта для соединения ЗДМ-81 в тесте «Коразоловые судороги» в сравнении с диазепамом в дозе 2 мг/кг. Не зафиксировано влияния соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус мышей в тестах «Сетка», «Проволока» и «Ротарод» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, что позволяет сделать вывод об отсутствии миорелаксирующего эффекта исследуемого соединения.

Таблица 1 - Противосудорожная активность соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в тесте «Максимальный электрошок» в сравнении с вальпроевой кислотой в дозе 240 мг/кг, $M \pm SEM$, мыши (n=6), внутрибрюшинное введение.

	Летальность, %
Контроль	83,3 (5/6)
Вальпроевая кислота (240 мг/кг)	16,6 (1/6)
ЗДМ-81 (17,5 мг/кг)	16,6 (1/6)

В шестой главе были изучены взаимодействия соединения ЗДМ-81 с некоторыми нейромедиаторными системами ЦНС с применением методик *in vivo*, позволяющих оценить интеракцию соединения с холинергической (тест взаимодействия с никотином и влияние на ареколиновый тремор), дофаминергической (влияние на галоперидоловую каталепсию и апоморфиновую стереотипию), адренергической (влияние на клофелиновую и резерпиновую гипотермию), ГАМК-ергической (тест взаимодействия с флумазенилом и влияние на судорожные эффекты пикротоксина), серотонинергической системами (5-гидрокситриптофановый гиперкинез), а также изучение возможной MAO-ингибирующей активности соединения (тест взаимодействия с L-ДОФА).

В тесте «Каталепсии, вызванной галоперидолом» на 45-120 минутах наблюдения зафиксировано снижение уровня каталепсии крыс под действием соединения ЗДМ-81. Во временном промежутке 60-120 минут для показателей групп, получавших галоперидол и соединение ЗДМ-81, показано значимое различие. В то же время, в тесте взаимодействия с апоморфином соединение ЗДМ-81 не проявило активности. Можно предположить некоторое влияние изучаемой субстанции на D_2 -дофаминергическую систему, что требует дальнейшего изучения и уточнения (рисунок 4).

В тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез» зарегистрировано не только потенцирование эффектов 5-ГТФ, но и пролонгирование их: после 40-й минуты наблюдения в группе 5-гидрокситриптофана число встряхиваний мышами головой убывало, в то время как в опытной группе параметр был выражен отчетливо. Основываясь на полученных данных, можно предположить наличие 5-НТ_{2A}-серотонинергического действия соединения ЗДМ-81 (рисунок 5).

В тесте взаимодействия с антагонистом ГАМК рецепторов флумазенилом показано блокирование указанным антагонистом как эффектов препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг, так и экспериментальной субстанции ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», что может свидетельствовать о реализации эффекта при участии бензодиазепинового рецептора (рисунок 6). В остальных проведенных тестах значимого эффекта обнаружено не было.

Рисунок 4 - Влияние соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж), на каталептогенный эффект галоперидола (3 мг/кг, в/б), крысы (n=6), $M \pm SEM$. *Примечание:* * - отличия статистически значимы по отношению к группе галоперидола ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни)

Рисунок 5 - Влияние соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж), на выраженность гиперкинезии, вызванной 5-гидрокситриптофаном (300 мг/кг, в/б), мыши (n=6), $M \pm SEM$. *Примечание:* * - отличия статистически значимы по отношению к группе 5-ГТФ ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни), пунктиром помечен уровень контрольных значений

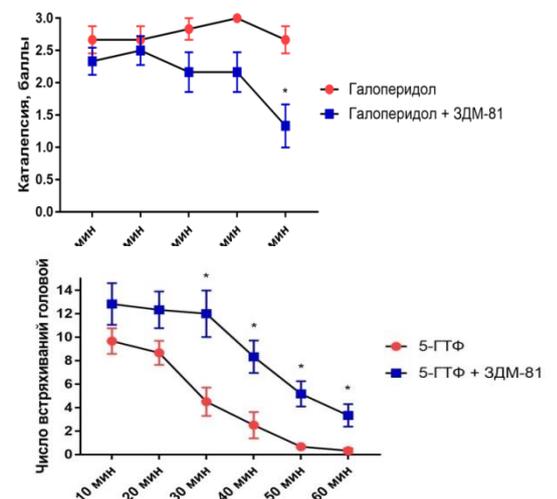
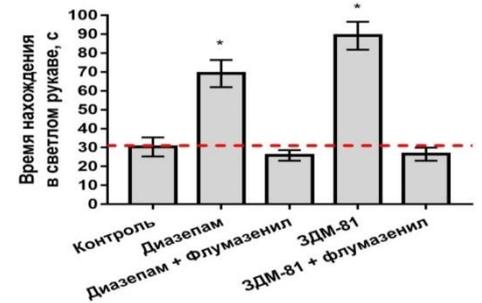
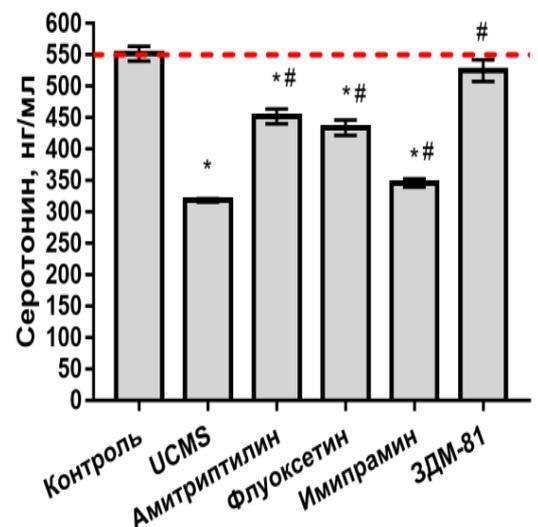


Рисунок 6 - Влияние флумазенила (1 мг/кг, в/б), на проявление анксиолитической активности диазепама (1 мг/кг, в/ж) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж), в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши (n=6), $M \pm SEM$. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений.*



В седьмой главе показано, что для экспериментального соединения ЗДМ-81 характерно серотонинергическое действие¹ (рисунок 7). Более того, соотношения метаболизма ДОФУК/дофамин и 5-ОИУК/серотонин для исследуемого соединения наиболее близки к параметрам флуоксетина, вводимого мышам в дозе 15 мг/кг. Снижение содержания серотонина и норадреналина в головном мозге мышей, подвергшихся процедуре UCMS, возможно, обусловлено хронической стрессированностью животных и истощением пресинаптических везикулярных запасов моноаминов. Уменьшение концентрации дофамина в ряде экспериментальных групп может быть связано с использованием некоторого количества эндогенного дофамина в качестве субстрата для синтеза норадреналина, депо которого истощаются при длительном стрессе или воздействии депрессирующих факторов, которым может являться процедура хронического непредсказуемого легкого стресса.

Рисунок 7 - Соотношение концентраций, нг/мл, серотонина в головном мозге мышей под влиянием amitriptyline (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши (n=6), $M \pm SEM$. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # - отличия статистически значимы по отношению к негативному контролю*



¹ Выражаем глубокую признательность сотрудникам лаборатории фармацевтических аналитических исследований НЦИЛС ВолГМУ д.б.н., проф. Смирновой Л.А., к.фарм.н., доц. Рябуха А.Ф. и н.с. Абрамову О.К. за помощь в проведении исследований

(«UCMS»), $p < 0,05$, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений.

В восьмой главе в результате изучения острой токсичности соединения ЗДМ-81 на одном виде животного – мышей-самцов, величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) при внутрижелудочном введении составляет 1539,6 мг/кг и превосходит по безопасности аналогичный показатель препарата сравнения диазепама. По уровню острой токсичности ЗДМ-81 относятся к 3 классу токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

Для ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S. Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающей таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Преходящие изменения наблюдаются в 50-кратной дозе – 875 мг/кг на 60-й минуте теста, которые возвращаются к нормальных значениям через 2 часа после введения препарата. Указанные нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных функций у животных под действием соединения ЗДМ-81 в дозе, превышающей эффективную для проявления анксиолитической активности в 80 раз, вероятнее всего обусловлены близостью указанной дозы к средней летальной, вычисленной ранее – 1539,6 мг/кг.

По результатам прогноза при проведении ADMET-анализа, для соединения характерна хорошая всасываемость в ЖКТ, низкая степень связывания с белками плазмы крови и невысокая степень прохождения через ГЭБ. Соединение малотоксично как по показателям органотоксичности, так и острой токсичности. Согласно данным прогноза, метаболизм соединения происходит с вовлечением цитохромов CYP3A4, CYP2C19 и CYP2C9, а также CYP2D6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования показано, что присутствие заместителя в положении R_2 , не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью (за исключением *para*-нитрофенилзамещенного), а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-*N*-метилэтан-1-амин в положении 1, положительно влияло на проявление противотревожной активности новых

производных хиноксалина в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг. Для проведения углубленного изучения транквилизирующей активности было выбрано соединение ЗДМ-81.

Наиболее эффективной дозой для проявления анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 является 17,5 мг/кг. Действие субстанции достаточно отчетливо выражено через 30 минут после внутрижелудочного введения мышам и сохраняется на том же уровне в течение 4-6 часов. Противотревожная активность ЗДМ-81 выявлена в тестах «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние» и конфликтной методики «Конфликтная ситуация по Vogel». Во всех указанных экспериментах анксиолитический эффект ЗДМ-81 не уступает препарату сравнения диазепаму в дозе 1 мг/кг.

Показано, что для соединения с анксиолитической активностью ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг отмечен антикомпульсивный потенциал в тесте «Закапывания шариков», противосудорожное действие в тесте «Максимальный электрошок», супраспинальные механизмы антиноцицептивного эффекта в тесте «Горячая пластина». Не зафиксировано влияния соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус мышечной в тестах «Сетка», «Проволока» и «Ротарод» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, что позволяет сделать вывод об отсутствии миорелаксирующего эффекта изучаемого соединения.

Было показано, что для экспериментальной субстанции характерно влияние на серотонинергическую, ГАМК-ергическую и дофаминергическую системы: а) В тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез» зарегистрировано пролонгирование эффектов 5-ГТФ под влиянием соединения ЗДМ-81; б) Флумазенил блокировал анксиолитические эффекты соединения ЗДМ-81 в условиях методики «Приподнятый крестообразный лабиринт»; в) Введение животным соединения ЗДМ-81 уменьшало проявление галоперидоловой каталепсии. Согласно результатам, полученным с применением методики высокоэффективной жидкостной хроматографии, соотношения метаболизма ДОФУК/дофамин и 5-ОИУК/серотонин для исследуемого соединения, наиболее близки к параметрам флуоксетина, вводимого мышам в дозе 15 мг/кг.

LD₅₀ вещества ЗДМ-81 установлена при внутрижелудочном введении мышам на уровне 1539,6 мг/кг и превосходит по безопасности аналогичный показатель препарата сравнения диазепама² - 700 мг/кг. По уровню острой токсичности ЗДМ-81 относятся к 3 классу токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976]. Для ЗДМ-81 не характерно изменение функционально- поведенческого статуса животных, изученного по методу S.Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающей таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных функций у животных под действием соединения ЗДМ-81 в дозе 1400 мг/кг, вероятнее всего, обусловлены близостью указанной дозы к средней летальной, вычисленной ранее – 1539,6 мг/кг.

В результате исследования показано, что поиск новых высокоактивных нейрорепродуктивных веществ среди нового ряда производных C²,C³-хиноксалинового скаффолда, а также проведение дальнейшего синтеза на его основе для оптимизации структуры изученных соединений, целесообразно и является перспективным направлением.

ВЫВОДЫ

1. Новый ряд химических производных C²,C³-хиноксалина является перспективной группой соединений для поиска веществ, проявляющих анксиолитическую активность.

2. Важным фактором проявления противотревожной активности новых соединений является наличие во втором положении хиноксалинового скаффолда заместителя, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью, за исключением пара-нитрофенилзамещённого, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин в положении 1.

3. Соединение под шифром ЗДМ-81, 2-(2-([3-(4-*tert*-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил)-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид, характеризуется наиболее высокой анксиолитической активностью, превосходящей препарат сравнения диазепам.

² Литературные данные (INCHEM).

4. Для соединения ЗДМ-81 не отмечено антидепрессивного действия в условиях методик «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание по Porsolt».

5. В тесте «Максимальный электрошок» процент летальности животных был снижен на 67% под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг по сравнению с контролем и соответствовал уровню вальпроевой кислоты в дозе 240 мг/кг.

6. В тесте «Горячая пластина» под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг отмечен антиноцицептивный эффект, выраженный в удлинении латентного периода полилизывания задней лапы мышей на 20% относительно контроля и уступающий уровню бутофанола в дозе 1 мг/кг в 2,5 раза.

7. Соединение ЗДМ-81 увеличивало гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном, анксиолитический эффект соединения устранялся флумазенилом, а каталептогенные эффекты галоперидола были ослаблены.

8. По результатам проведенного исследования содержания моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей показано, что концентрация серотонина в пробах была повышена на 40% по сравнению с группой контроля под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг.

9. Величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) соединения ЗДМ-81 при внутрижелудочном введении мышам составляет 1539,6 мг/кг. Соединение относится к 3 классу токсичности.

10. По результатам ADMET-анализа, для соединения характерна хорошая всасываемость в ЖКТ, низкая токсичность, низкая степень связывания с белками плазмы крови и низкая степень прохождения через ГЭБ.

11. Для соединения ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S.Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающие таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных функций у животных под действием соединения ЗДМ-81 наблюдаются в дозе 1400 мг/кг.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразным является проведение дальнейшего синтеза соединений на основе C^2, C^3 -хиноксалинового скелета для оптимизации изученных структур и разработки на их основе новых высокоэффективных анксиолитических средств.

2. Соединение ЗДМ-81, 2-(2-([3-(4-*трет*-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил)-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид, проявляет анксиолитическую активность и является перспективной субстанцией для дальнейшего расширенного доклинического изучения ее нейрпсихотропных эффектов.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан
- ГАМК - γ -Аминомасляная кислота
- ОП – установка «Открытое поле»
- ПКЛ – установка «Приподнятый крестообразный лабиринт»
- UCMS – unpredictable chronic mild stress – хронический непредсказуемый легкий стресс
- в/ж – внутрижелудочный путь введения
- в/б – внутрибрюшинный путь введения

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных

Минобрнауки РФ

1. Мальцев Д. В., Спасов А. А., Скрипка М. О., Мирошников М. В., Диваева Л. Н., Морковник А. С., Зубенко А. А., Клименко А. И. Оценка анксиолитического потенциала новых производных C^2, C^3 -хиноксалина / Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. - Т. 19. – № 2. – С. 135-143.
2. Скрипка М. О., Мальцев Д. В., Мирошников М. В., Смирнова Л. А., Абрамов О. К., Рябуха А. Ф., Спасов А. А. Влияние производного C^2, C^3 -хиноксалина соединения А81 и диазепама на содержание основных

катехоламинов и их метаболитов в головном мозге крыс / Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2022. - Т. 19. – № 2(82). – С. 48-52.

3. **Скрипка М. О.**, Мальцев Д. В., Спасов А. А., Перфильев М. А. Фармакологический анализ механизмов действия производного хиноксалина с анксиолитической активностью / Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. - Т. 19. – № 3(83). – С. 110-115.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Maltsev D.V., Spasov A.A., Miroshnikov M.V., **Skripka M.O.** Current approaches to the search of anxiolytic drugs / Russian journal of bioorganic chemistry. 2021. – Vol. 47. – No 3. – P. 622-652.

2. Maltsev D.V., Spasov A.A., Yakovlev D.S., Vassiliev P.M., **Skripka M.O.**, Miroshnikov M.V., Sultanova K.T., Kochetkov A.N., Divaeva L.N., Kuzmenko T.A., Morkovnik A.S. Searching for new anxiolytic agents among derivatives of 11-dialkylaminoethyl-2,3,4,5-tetrahydrodiazepino[1,2-a]benzimidazole / European journal of pharmaceutical sciences. – 2021. – Vol. 161. – P. 105792.

3. Maltsev D.V., Spasov A.A., Vassiliev P.M., **Skripka M.O.**, Miroshnikov M.V., Eliseeva N.V., Lifanova Y.V., Kochetkov A.N., Kuzmenko T.A., Divaeva L.N., Morkovnik A.S. Synthesis and pharmacological evaluation of novel 2,3,4,5-tetrahydro[1,3]diazepino[1,2-A]benzimidazole derivatives as promising anxiolytic and analgesic agents / Molecules. – 2021. – Vol. 26. – No 19. – P. 6049.

4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621744 Российская Федерация. Соединения с анксиолитической активностью: № 2022621682: заявл. 13.07.2022: опубл. 15.07.2022 / Васильев П. М., Мальцев Д. В., Перфильев М. А., Спасов А. А., **Скрипка М. О.**, Кочетков А. Н.; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

5. **Скрипка М.О.** Психотропные свойства производного хиноксалина 2А / Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: сборник 79-

й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. - Волгоградский государственный медицинский университет. – 2021. - С. 353.

6. **Скрипка М.О.,** Черникова Е.М. Антидепрессивная активность нового производного хиноксалина 1В / XXV Региональная конференция молодых учёных и исследователей волгоградской области. Материалы конференции. Под редакцией М.Е. Стаценко. – Волгоград. – 2021. – С. 160-162.

7. **Скрипка М.О.,** Мусаев Р.И., Мирошников М.В. Хиноксалин как перспективный скаффолд для разработки препаратов с психотропной активностью / Medchem-Russia 2021: материалы конференции 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. Волгоград. – 2021. – С. 513.

8. **Скрипка М.О.,** Мирошников М.В., Дементенко Ю.Ю. Анксиолитическая активность производного хиноксалина соединения 1В / Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – 2020. – С. 243.

СКРИПКА МАРИЯ ОЛЕГОВНА

**НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук