

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
Волгоградский Государственный Медицинский Университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное учреждение
Волгоградский Медицинский Научный Центр

На правах рукописи

АГАЦАРСКАЯ ЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 9-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛ-2-(4-
МЕТОКСИФЕНИЛ)-
ИМИДАЗО[1,2-А] БЕНЗИМИДАЗОЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
академик РАН, З.д.н. РФ,
профессор, доктор медицинских
наук,
Спасов Александр Алексеевич
Научный консультант:
доктор медицинских наук,
Яковлев Дмитрий Сергеевич

ВОЛГОГРАД – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МИГРЕНЬ: ОСНОВНЫЕ ТЕОРИИ ПАТОГЕНЕЗА, ПУТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ. 5-НТ _{2A} РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1 Мигрень: распространенность и социальная значимость	12
1.2 Патогенез мигрени	12
1.3 Пути фармакологической коррекции мигрени.....	18
1.4 5-НТ _{2A} -рецепторы.....	27
1.5 Клинический потенциал 5-НТ _{2A} – антагонистов.....	30
1.6 Имидазо[1,2- α]бензимидазолы, как 5-НТ _{2A} – антагонисты	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований	35
2.2 Перечень используемых реактивов и веществ.....	35
2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения.....	37
2.4 Экспериментальные животные	38
2.5. Методы исследования.....	38
ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СОЛИ 9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛ-2-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-ИМИДАЗО [1,2- α]БЕНЗИМИДАЗОЛА	58
3.1. Сравнение 5-НТ _{2A} -антагонистических свойств производных 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо [1,2- α]бензимидазола	58
3.2. Заключение.....	62
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА СОСУДИСТОЕ ЗВЕНО ПАТОГЕНЕЗА МИГРЕНИ.....	64

4.1. Исследование влияния 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо [1,2 α]бензимидазола на изменение скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина.....	64
4.2. Влияние соединения РУ-31 на изменение скорости кровотока в системе внутренней сонной артерии	66
4.3. Заключение.....	67
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ТРОМБОЦИТАРНЫЕ ЗВЕНЬЯ ПАТОГЕНЕЗА МИГРЕНИ.....	69
5.1. Влияние изучаемых соединений на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов.....	70
5.2. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.....	71
5.3. Исследование активности соединения РУ-31, ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой на модели адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов.....	72
5.4. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов.	73
5.5. Влияние исследованных соединений на агрегацию тромбоцитов, вызванную ионофором кальция - А23187.....	74
5.6. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели ристоцетин- индуцированной агрегации тромбоцитов.....	75
5.7. Влияние соединения РУ-31 на показатели тромбообразования, при поверхностной сосудистой аппликации хлорида железа III.....	76
5.8. Влияние соединения РУ-31 на показатели тромбоза, индуцированного анодным током.....	77
5.9. Заключение.....	78

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МИГРЕНИ.....	80
6.1. Исследование нейротропного рецепторного профиля соединения РУ-31 in vitro.....	80
6.2. Центральные нейротропные эффекты соединения РУ-31 in vivo.....	91
6.3. Заключение.....	102
ГЛАВА 7. АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-31.....	105
7.1. Изучение анальгетических свойств соединения РУ-31 в тесте «Горячая пластина».....	106
7.2. Исследование анальгетических свойств соединения РУ-31 в тесте «Отдергивание хвоста».....	107
7.3. Исследование обезболивающих и противовоспалительных свойств соединения РУ-31 на модели «Формалиновая гипералгезия».....	108
7.4. Заключение.....	109
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	122
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день показатели распространенности мигрени в мире, по данным ВОЗ, превышают 10%, что составляет более 750 млн человек. При этом, проблема адекватной терапии мигрени является одной из наиболее приоритетных в лечении первичных головных болей (Гусев Е.В., 2018; Амелин А.В., 2014; Осипова В.В., 2018). Несмотря на прогресс в исследовании путей формирования мигренозных приступов, лечение мигрени, все еще остается малоэффективным и недостаточным (Амелин А.В., 2014; Осипова В.В., 2018). В связи с этим одним из актуальных направлений является создание и разработка новых лекарственных средств (Мирзоян Р.С., 2006; Петров В.И., 2012; Соколов А.Ю., 2019).

На сегодняшний день создание новых лекарственных средств для лечения мигрени представлено несколькими направлениями: разработка более эффективных и менее токсичных агонистов 5-НТ₁ рецепторов (триптанов), разработка антагонистов CGRP-рецепторов (рецепторов кальцитонин-ген родственного пептида) и создание новых лекарственных средств – антагонистов 2A-подтипа серотониновых рецепторов. При этом, терапия триптанами остается недостаточно эффективной, рецидив мигренозной боли может возникнуть у 15–40% пациентов, а повторное введение триптанов возможно не ранее чем через 6 часов (Antonaci F., 2016). Длительное применение антагонистов CGRP-рецепторов ограничено, т. к. препараты данной группы повышает уровень печеночных трансаминаз (Edvinsson, 2005). Помимо этого, как триптаны, так и антагонисты CGRP-рецепторов оказывают влияние лишь на некоторые компоненты патогенеза мигрени, не затрагивая тромбоцитарное звено. В связи с этим, одним из наиболее приоритетных направлений остается разработка 5-НТ_{2A}-антагонистов.

Степень разработанности

Исследованием серотонинового компонента мигрени посвящен ряд работ как зарубежных авторов (Okumar H., 2013; Murphy, 1992; Attanasio A, 2000), так и отечественных исследователей (Мирзоян Р.С., 2010; Амелин А.В., 2014). Было показано, что несколько подтипов серотониновых рецепторов вовлечены в патогенез мигрени, а именно 1 (Ferrari, 2001), 2 (Mirzoyan R., 200) и 7 (Wang X., 2010). Тем не менее, ряд авторов выделяет именно 2A-подтип серотониновых рецепторов, как один из ключевых звеньев патогенеза мигрени (Kalkman, 1997; Waller D. G., 2018) вовлеченных во все существующие теории патогенеза мигрени.

В исследованиях, проводимых на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, при совместном участии сотрудников Научно-исследовательского института Физической и органической химии Южного Федерального университета, была показана перспективность класса конденсированных азолов, в качестве источника структур, демонстрирующих высокий уровень биологической активности (Анисимова В.А., 2010). Учитывая тот факт, что молекулы серотонина и бензимидазола являются биоизостерами, были проведены исследования по изучению возможности влияния производных бензимидазола на серотониновые рецепторы (Черников М.В., Анисимова В.А., 2010) и проявления ими ряда фармакологических свойств (Кучерявенко А.Ф., 2014; Анисимова В.А., 2013; Гречко О.Ю., 2015). В дальнейшем наибольший интерес уделялся группе производных имидазобензимидазолов, для которых были показаны антисеротониновые и противомигренозные свойства (Яковлев Д.С., 2016)

В ряде работ посвященных исследованию свойств имидазо[1,2-а]бензимидазолов была показана активность в отношении 5-HT_{2A}-рецепторов (Яковлев Д.С., 2013). Были синтезированы различные соли: 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2-α]бензимидазола (Анисимова В.А., 2012). Для данных соединений был показан высокий уровень 5-HT_{2A} активности на модели изучения активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния (Мальцев Д.В., 2014; Яковлев Д.С., 2016) и проведены исследования токсических

свойств. На полученные соединения был получен патент (Патент РФ № 2465901). На этапе направленного поиска было найдено соединение, РУ-476, с высокой 5-НТ_{2А}-антагонистической активностью. При дальнейшей разработке возникла необходимость в модификации структуры, для уменьшения явления деградации при длительном хранении.

На основании изложенного выше актуальным и целесообразным является оптимизация 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]-бензимидазола путем выбора наиболее подходящего солеобразующего компонента и изучение его фармакологических свойств и рецепторного профиля.

Целью настоящего исследования является выбор неорганической соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]-бензимидазола, наиболее активной в отношении 5-НТ_{2А}-рецепторов, и исследование ее влияния на сосудистый, тромбоцитарный и нейрогенный компоненты мигрени.

Для решения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить 5-НТ_{2А}-блокирующего действия неорганических солей 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола.
2. Исследовать влияния выбранного соединения на показатели мозгового кровотока в условиях серотониновой нагрузки, в бассейне средней мозговой артерии и внутренней сонной артерии, сравнение ее с показателями препарата сравнения – ципрогептадина.
3. Изучить антитромбоцитарные, антитромбогенные свойства выбранной соли.
4. Исследовать влияние данного соединения на адренергическую, холинергическую, серотонинергическую, дофаминергическую, гистаминергическую и ГАМКергическую нейромедиаторные системы

5. Выявить влияние выбранного соединения на ноцицептивную систему на моделях центральной и периферической боли.

Научная новизна

Впервые была проведена детализация активности неорганических солей 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]-бензимидазола в отношении 5-HT_{2A} рецепторов *in vitro*, и показана селективность его антисеротонинового действия.

Впервые была показана способность соединения РУ-31 (дигидрохлорида 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]-бензимидазола) улучшать мозговой кровоток в условиях серотониновой нагрузки в широком диапазоне доз и установлена величина полуэффективной дозы.

Впервые был исследован антиагрегантный профиль соединения РУ-31 в условиях моделирования агрегации *in vitro*. Установлено, что для данного соединения характерна способность устранять агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами. В зависимости от типа использованного индуктора, величина антиагрегантного действия уменьшается в следующем порядке: серотонин > A23187 > АДФ > адреналин > коллаген > ристоцетин.

Впервые изучено взаимодействие соединения РУ-31 с различными нейромедиаторными системами головного мозга *in vivo* и *in vitro*, а также впервые изучена возможность изменять опосредованное серотонином увеличение частоты и амплитуды ГАМК-индуцированных токов в зонах СА1 и СА3 гиппокампа.

Впервые был изучен анальгетический профиль данной субстанции и показано влияние как на центральные, так и на периферические уровни проведения болевой чувствительности.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенного исследования было показано, что дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (соединение РУ-31) способен устранять транзиторные церебральные нарушения. Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, могут свидетельствовать о целесообразности проведения расширенных доклинических исследований. Результаты изучения нейрососудистых, анальгетических и антитромбогенных свойств, согласно существующих теорий патогенеза мигрени, являются основой исследования специфической фармакологической активности нового противомигренозного средства в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», государственный контракт № 14.N08.11.0159 от «02» июня 2017 г.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Исходя из совокупности показателей острой токсичности, рецепторной активности и физико-химических свойств, дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (соединение РУ-31) – является наиболее перспективным для дальнейших расширенных доклинических исследований в качестве нового противомигренозного средства с 5-НТ2А - антагонистическим профилем и не влияет на 5-НТ3 и 5-НТ4 рецепторы.
2. Соединение РУ-31 устраняет серотонин-опосредованное изменение мозговой гемодинамики, оказывает антитромбогенные, и анальгетические эффекты.
3. Для соединения РУ-31 характерно серотонин-опосредованное ГАМК-миметическое действие в СА1 и СА3-зонах гиппокампа, умеренное М-холиноблокирующее действие.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 71 - 77-й открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2013-2018 гг.; XIX и XX Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2014-2016 гг.; IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2015 г.; научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета, г.Волгоград, 2015; I научно-практической конференции с международным участием «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции», Пятигорск, 2015 г.; Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина "Достижения современной фармакологической науки" г. Рязань, 2018.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 6 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, девяти глав, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 33 таблицами. Библиографический указатель включает 119 источников, из них 43 отечественных, 76 иностранных.

ГЛАВА 1. МИГРЕНЬ: ОСНОВНЫЕ ТЕОРИИ ПАТОГЕНЕЗА, ПУТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ. 5-НТ_{2A} РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Мигрень: распространенность и социальная значимость

Мигрень относят к одному из наиболее распространенных хронических невроваскулярных заболеваний (В.Н. Mason, 2018; Е.И. Гусев., 2018) и находится на шестом месте в мире по значимости, среди состояний, ведущих к потере трудоспособности. Вместе с возможными осложнениями отнесена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к самым инвалидизирующим среди всех неврологических расстройств (Goadsby P. J, 2017). В 2000 году была включена в список заболеваний, представляющих глобальное значение для человечества (Global Burden of Disease 2000), что обусловлено как ее широкой распространенностью, так и значимым влиянием на качество жизни пациента (Woldeamanuel and Cowan, 2017), по данным ВОЗ, мигрень входит в число 20 причин, ведущих к дезадаптации.

1.2 Патогенез мигрени

Первые мигренозные приступы обычно начинаются в начале пубертатного периода с увеличением возраста растет их частота и выраженность (Е.Г. Филатова, 2018). Данное заболевание превалирует у женщин, и встречается в 3 раза чаще, чем у мужчин (М. Artero-Morales, 2018).

Формирование мигренозных приступов затрагивает несколько уровней ЦНС: сегментарный и надсегментарный. Сегментарный уровень представлен тонкими миелинизированными А-волоками и немиелинизированными С-волоками, которые происходят из тройничного ганглия, широко распространяются среди сосудов твердой мозговой оболочки с одной стороны, и до уровня сегментов С3–С4 с другой. При этом формируется обширная зона

перекрытия с ипсилатеральным задним рогом верхних шейных сегментов спинного мозга (Амиелин А.В., 2014; Гайворонский И.В., 2001; Sessle B.J., 2000; Schrks M., Diener H.C., 2008). Морфологическая и функциональная общность этих структур делает их единым нейроанатомическим образованием, получившим название «тригемино цервикальный комплекс» (Амелин А.В., 2014; Bartsch T., 2005; Goadsby P.J., 2005; Schrks M., Diener H.C., 2008). Надсегментарный уровень представлен таламусом, гипоталамусом. При этом по данным ряда источников, ключевая роль в развитии мигрени отводится гиппокампу (Liu H.Y., 2018).

Не смотря на длительную историю изучения данного вопроса, на сегодняшний день существует несколько теорий патогенеза мигрени (Соколов А.Ю., 2017; Амелин А.В., 2018). Все известные теории мигрени можно разделить на 3 типа: сосудистые (сосудистая теория Вольфа, теория шунта), тромбоцитарную и неврологические и нейрососудистые (теория распространяющейся корковой депрессии, тригеминально-вазкулярная теория) (Амелин А.В., 2014).

Предположение о сосудистом генезе мигренозных приступов впервые было сформулировано Галеном во втором веке, а затем вновь предложено Томасом Уиллисом в конце 17-го века (Isler, 1992). В 1938г. Гарольд Вольф и его коллеги первыми подвергли явление вазодилатации строгим научным исследованиям. Они провели серию опытов, в которых показали, что под действием эрготамина у больных мигренью уменьшается пульсация височной артерии и, часто, вслед за этим уменьшается головная боль (Graham et Wolff, 1938, Wolff et al., 1953; Tunis and Wolff., 1954). Это послужило основой для создания сосудистой теории Вольфа, которая длительное время считалась наиболее обоснованной. Согласно данной концепции мигренозный приступ формируется из 2 элементов: первый - внутричерепной спазм вызывает распространяющееся кортикальное снижение активности нейронов (РКД), и второй - что экстракраниальная вазодилатация провоцирует боль при мигрени. Первая часть сосудистой теории Вольфа была оспорена Олсеном и его коллегами из Копенгагена, которые обнаружили, что характер распространения РКД не соответствует анатомическим границам

основных сосудов головного мозга (Olsen et al., 1981), и, таким образом, вазоспазм не может объяснить РКД. Это исследование Олесена, однако, не противоречило второй части теории Вольфа - что боль при мигрени может быть вызвана экстракраниальной вазодилатацией.

Однако только в начале 1940-х годов Гарольд Вольф впервые показал, что интенсивность мигрени была тесно связана с пульсацией в ветвях наружных сонных артерий, а уменьшение амплитуды пульсации уменьшало интенсивность головной боли (Tfelt-Hansen and Koehler, 2008). В том же исследовании было показано, что использование препаратов спорыньи – эрготаминов вызвало вазоконстрикцию височных и средних менингеальных артерий. Сужение этих сосудов уменьшало пульсацию, одновременно приводя к уменьшению интенсивности головной боли. Эти наблюдения легли в основу теории, которая позже будет известна как сосудистая теория мигрени.

Тем не менее, Ахн сообщил об исследовании, которое противоречило наблюдениям Вольфа (Ahn, 2010). В группе из 20 пациентов с мигренью он не обнаружил временной зависимости между болью при мигрени и артериальной пульсацией. В дальнейшем сосудистая теория патогенеза мигрени не раз подвергалась сомнению и оспаривалась.

В ряде исследований, с использованием магнитно-резонансной ангиографии, для наблюдения за изменением окружности экстракраниальных артерий во время приступов, исследователи пришли к заключению, что расширение экстракраниальных артерий не было связано с болью при мигрени, хотя наблюдалась небольшая внутричерепная дилатация сосудов (Amin et al., 2013), однако исследования последних лет все же указывают на значимый вклад сосудистого компонента в развитие приступов (Mason et al., 2018) и подтверждаются высокой клинической эффективностью основной группы противомигренозных средств – триптанов, ставших золотым стандартом в терапии мигрени (Ferrari et al., 2001).

Далее, в 60-х годах прошлого века Г.Хейком была предложена альтернативная теория - теория шунта (Амелин А.В., 2014). Развитие мигрени

объяснялось шунтированием крови во время приступа из артерии в вену через артериовенозный шунт, минуя внутричерепные капилляры. По мнению Хейка и его сторонников, это провоцирует развитие ишемии мозга, которая и является основной причиной головной боли при мигрени (Т.А. Литовченко, 2015).

Затем была разработана тромбоцитарная теория патогенеза. Одним из основных депо серотонина в организме человека являются тромбоциты. Важным для понимания патогенеза приступов мигрени является положение: тромбоциты крови по многим своим характеристикам подобны серотонинергическим нейронам (Langer S. Et al., 1988). В межприступном периоде у больных мигренью в тромбоцитах крови определяется высокое содержание гранул серотонина. Их количество в группе больных в целом достоверно не отличается от этого показателя у здоровых лиц. На высоте приступа мигрени содержание серотонинсодержащих гранул в тромбоцитах почти в 10 раз снижается (К.Ф. Иззати-Заде и др., 2007). При этом, процессы, происходящие при мигрени в тромбоцитах, не ограничиваются ферментативными реакциями, осуществляющими трансформацию гранулярного серотонина в растворенный и его экскрецию в плазму крови. В ряде исследований было установлено, что самопроизвольное высвобождение гранул серотонина из тромбоцитов приводит к активации ими 5-НТ_{2А} рецепторов, расположенных на мембране тромбоцитов (Sarchielli, P 2001). Это ведет к активации тромбоцитов и высвобождению из них целого ряда индукторов агрегации, которые в дальнейшем усиливают процессы активации-агрегации, вызывают увеличение вязкости крови и усиление ишемизации мозга.

Одной из последних начали выделять так называемую нейрогенную теорию мигрени. Она включает в себя сосудистые, тригеминальные и нейротропные механизмы (Russo, 2017; Jansen-Olesen, 2018). Известно, что центральные и периферические эффекты тригеминоваскулярной системы во многом реализуются и модулируются через серотониновые рецепторы. Первый компонент нейрогенной теории сфокусирован на отношениях между тройничным нервом и внутричерепными сосудами. Moskowitz и его коллеги в своих работах показали,

что немиелинизированные С-волокна, которые происходят из тройничного ганглия, широко распространяются среди сосудов твердой мозговой оболочки с одной стороны, и до уровня сегментов С3–С4 с другой (Moskowitz M.A., 2008). При этом формируется обширная зона перекрытия с ипсилатеральным задним рогом верхних шейных сегментов спинного мозга (Гайворонский И.В., 2001; Sessle V.J., 2000; Schrks M., Diener H.C., 2008). Морфологическая и функциональная общность этих структур делает их единым нейроанатомическим образованием, получившим название «тригемино цервикальный комплекс» (Амелин А.В., 2014; Bartsch T., 2005; Goadsby P.J., 2005; Schrks M., Diener H.C., 2008). Было выявлено, что если стимулировать тройничный нерв электрическим или химическим путем, то можно спровоцировать нейрогенное воспаление в сосудах твердой мозговой оболочки. В ответ на раздражение тройничного нерва в зоне «очага» происходит выброс целого ряда провоспалительных агентов: гистамина, серотонина, кининов и т.д. (Соколов А.Ю., 2018). Следовательно, было заключено, что нейрогенное воспаление, которое происходит в тригеминоваскулярной системе, может служить моделью мигрени (Moskowitz M.A., 1984).

Вторым компонентом нейрогенной теории является РКД. Впервые описанная в 1944 году в мозге кролика, феномен РКД только недавно начал активно исследоваться. В исследовании 2005 года Kraig и его коллеги обнаружили, что РКД может быть вызвана, когда нормальный поток электрических токов внутри и вокруг клеток мозга каким-то образом риверсирован. Если достаточно большая группа клеток поражается одномоментно, данный риверсивный ток может распространиться посредством коры головного мозга, с шквалом аномальной активности мозговых клеток на первой волне и временным истощением электрически деполяризованных клеток после, так называемой «депрессией» клеток мозга.

РКД часто начинается в зрительной или соматосенсорной коре, что объясняет, почему аура обычно ощущается визуально или как тактильное

покалывание. Moskowitz с коллегами изучал проявления РКД у людей и их взаимосвязь с аурой. Учитывая тот факт, что лишь 20-30% пациентов страдают мигренью с аурой, было выдвинуто предположение, что явление распространяющейся корковой депрессии может не всегда вызывать симптомы ауры у пациента. В 1994 году в ходе эксперимента у пациентки, страдающей мигренью без ауры с помощью МРТ было зафиксировано явление, которое напоминало РКД незадолго до начавшегося приступа мигрени.

Третий компонент нейрональной теории связан с воспалительными агентами экстракраниального происхождения, инициирующими приступы мигрени и вазоконстрикцию, вазодилатацию. Исследования опубликованные итальянскими учеными Mason B.N. и Russo A.F. в 2018 году в журнале *Frontiers in Cellular Neurobiology*, показывают корреляцию между сосудистыми компонентами патогенеза мигрени и высвобождением ряда провоспалительных агентов, таких как гистамин, серотонин и простагландины из твердой мозговой оболочки. Помимо этого, было показано, что в ответ на высвобождение провоспалительных агентов эндотелием сосудов выделяется ряд вазоактивных пептидов (Tomiyama and Yamashina, 2010; Jacobs and Dussor, 2016), это приводит к началу мигренозной атаки.

Таким образом, патогенез мигрени является сложным и включает множество звеньев, формирующих периферический, сегментарный и надсегментарный уровни (Амелин А.В., 2014). Каждая из предложенных гипотез не раз подвергалась сомнениям. Однако в каждой из представленных теорий одним из значимых и важных является серотониновый компонент. Вовлеченность серотонинового звена не раз показывалась разными исследователями и подтверждалась данными клинических исследований (Jansen et al., 1992; Nozaki et al., 1992; Williamson et al., 1997; Knight et al., 2001; Wackenfors et al., 2005, Russo et al., 2018), за счет эффективности применяемых антисеротониновых агентов.

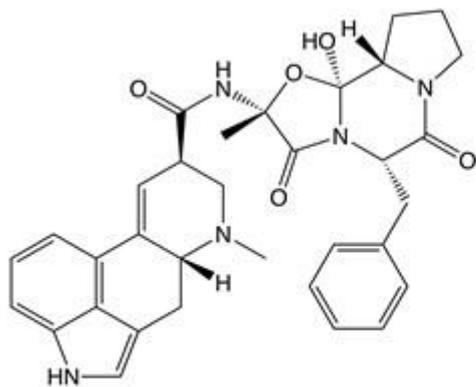
1.3 Пути фармакологической коррекции мигрени

Современный этап исследования мигрени характеризуется изучением генетических, нейрофизиологических, нейрохимических и иммунологических аспектов ее патогенеза, поиском эффективных abortивных и профилактических средств ее лечения. Следует заметить, что в течение последних 15 лет в области патофизиологии, эпидемиологии и фармакологии мигрени были достигнуты значительные успехи (Т.А. Литовченко, 2015).

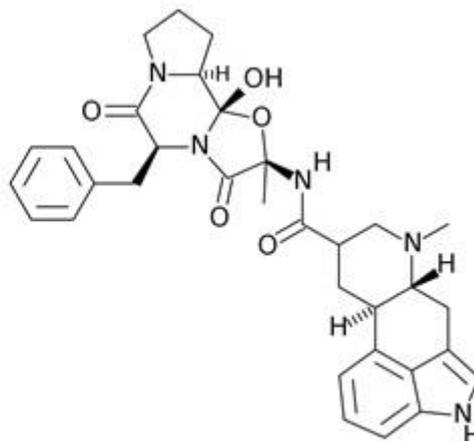
Терапию мигрени принято проводить поэтапно. На первом этапе, согласно современным стандартам лечения, как на территории РФ (Клинические рекомендации по лечению мигрени у взрослых, 2016; Osipova V.V., 2018), так и по европейским и американским рекомендациям (E. Loder, 2012), терапию острых мигренозных приступов слабой или умеренной интенсивности, продолжительностью не более 1 дня рекомендуется начинать с назначения группы нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) (Осипова, 2010). К наиболее часто назначаемым относятся ацетилсалициловая кислота, индометацин, диклофенак, парацетамол (Уровень рекомендаций А) (Осипова В.В., 2017). Обезболивающий механизм НПВП при мигрени связан с противовоспалительной активностью препаратов. Так как по одной из концепций тригеминально-васкулярной теории боль при мигрени является результатом асептического воспаления и избыточного расширения сосудов твердой мозговой оболочки, возникающих вследствие выделения из периваскулярных нервных волокон тройничного нерва альгогенных и вазоактивных нейропептидов (субстанция Р, нейрокинин А, нейропептид Y, брадикинин) (Амелин, 2007), то антиэкссудативные свойства анальгетиков и НПВП обуславливают уменьшение воспалительного отека, оказывающего механическое давление на болевые рецепторы тканей. Ингибирующее влияние этих препаратов на выработку и активность медиаторов воспаления уменьшает воздействие на нервные окончания таких биологически активных веществ, как простагландины, брадикинин, гистамин, серотонин.

Наибольшей противовоспалительной активностью в данной группе обладают диклофенак и индометацин, однако их длительное применение ограничено риском развития тромбоцитопении, агранулоцитоза и поражения почек. Одним из наиболее часто назначаемых препаратов является аспирин (ацетилсалициловая кислота). Он применяется для лечения приступов легкой и умеренной выраженности. В ряде клинических исследований приводятся доказательства эффективности аспирина (Lipton, и др., 2005). Аспирин особенно эффективен для лечения умеренных приступов в комбинации с метоклопрамидом (Ingledue & Mounsey, 2014). Однако длительное применение данного препарата ограничено проявлением ряда побочных эффектов, в частности гастродуоденопатиями и его влиянием на реологические свойства крови. Помимо этого, в ряде исследований, дозы аспирина, необходимые для эффективного купирования приступов мигрени варьируют от 500 мг до 1000 мг, и длительное применение таких доз препарата невозможно в связи с вышеописанными побочными эффектами (Ваена, et al., 2017). Парацетамол, по данным ряда клинических исследований, является менее эффективным в терапии мигренозных приступов. Исследователи отмечают, что вероятнее всего это связано с более слабыми противовоспалительными свойствами последнего, в то время, как асептическое воспаление имеет ключевое значение в формировании болевого синдрома при мигрени (Амелин, 2007). Таким образом, применение НПВП ограничено их эффективностью только при слабых и умеренных приступах, а также побочными эффектами при длительном применении.

В случаях, когда применение НПВП малоэффективно, либо невозможно, учитывая тот факт, что вазодилатация интракраниальных и экстракраниальных сосудов была выделена как триггер возникновения боли у пациентов, была создана первая специфическая группа – производные спорыньи (эрготамины) (Рисунок 2.1).



Эрготамин



Дигидроэрготамин

Рисунок 1.1 Структурные формулы препаратов спорыньи

Эрготамины оказывают антимигренозный эффект благодаря их влиянию на серотониновые (5-НТ) рецепторы. Эрготамин, введенный в 1926 году, был первым препаратом, применяемым для купирования острого приступа мигрени (F. Antonaci, 2016). Он остается одним из наиболее часто назначаемых препаратов от мигрени благодаря тому, что используется для лечения длительных приступов с тенденцией к рецидиву головной боли (возвращение боли после первоначального облегчения). Может применяться как в чистом виде, так и в комбинации с кофеином.

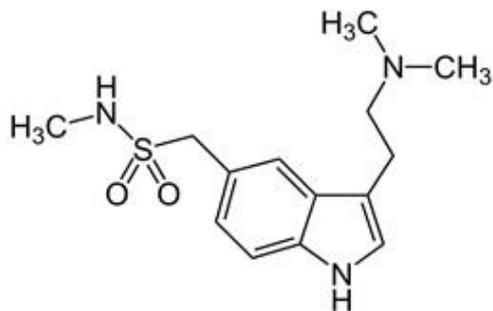
Из-за сложного механизма действия (влияет на 5-НТ_{1A}, 5-НТ₅, 5-НТ₂, 5-НТ₇, α -адренорецепторы и дофаминовые D₂-рецепторы), а также продолжительности действия, производные спорыньи часто провоцируют различные побочные эффекты (чаще всего тошнота и рвота, но также могут наблюдаться судороги, сонливость и проходящие боли в мышцах нижних конечностей). Эрготамин не следует принимать в течение 6 часов после приема триптанов, и аналогичным образом триптаны не следует вводить в течение 24 часов после приема эрготамин. Помимо этого, сосудосуживающий эффект эрготамин является противопоказанием к его применению при гипертонии, ишемической болезни

сердца, заболеваниях периферических сосудов, инсульте, нарушении функции печени или почек и беременности (F. Antonaci, 2016).

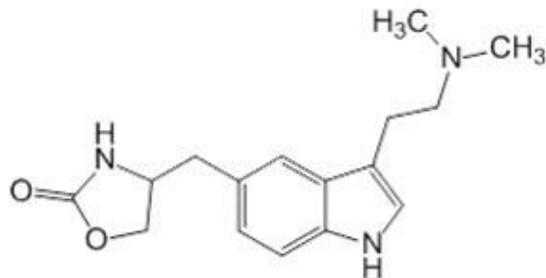
Дигидроэрготамин (ДГЭ) обычно лучше переносится, чем эрготамин, но менее эффективен из-за его плохой биодоступности при пероральном пути введения. ДГЭ при интраназальном применении обладает лучшей биодоступностью (около 40%), но относительно медленным началом действия. В двух исследованиях было четко показано, что он уступает суматриптану при интраназальном и подкожном путях введения (Boureau et al. 2000; Touchon et al. 1996). ДГЭ при внутривенном или подкожном введении, более эффективен при тяжелых приступах мигрени, но вызывает больше побочных эффектов (Colman et al. 2005).

Основная проблема эрготаминов - абзусная головная боль, связанная с частым использованием препаратов данной группы. Эта проблема ограничивает возможность применения препарата с профилактической целью.

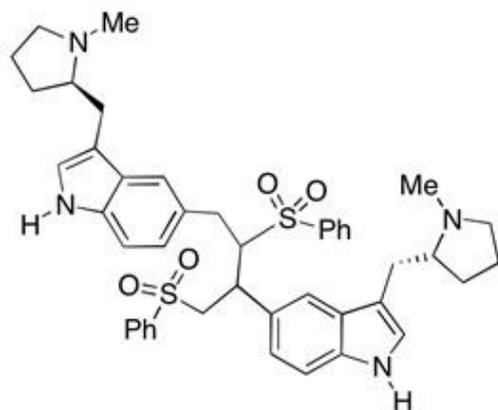
Следующими представителями специфических противомигренозных средств являются триптаны, впервые введенные в широкую клиническую практику в 80-х годах прошлого столетия (Humphrey et al., 1989). В дальнейшем триптаны не раз доказали свою эффективность и стали золотым стандартом в лечении мигрени (Ferrari et al., 2001; Соколов А.Ю., 2018). На сегодняшний день эта группа представлена суматриптаном, золмитриптаном, элетриптаном, наратриптаном и фроватриптаном (Рисунок 2.2).



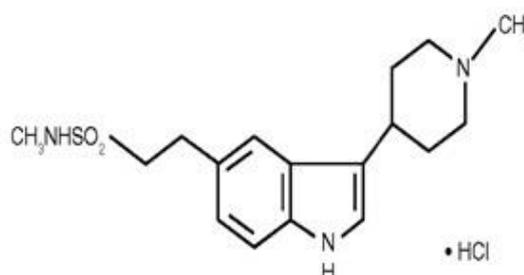
Суматриптан



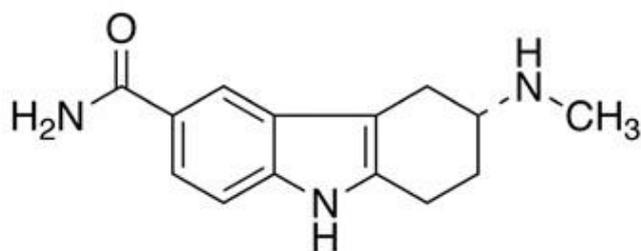
Золмитриптан



Элетриптан



Наратриптан



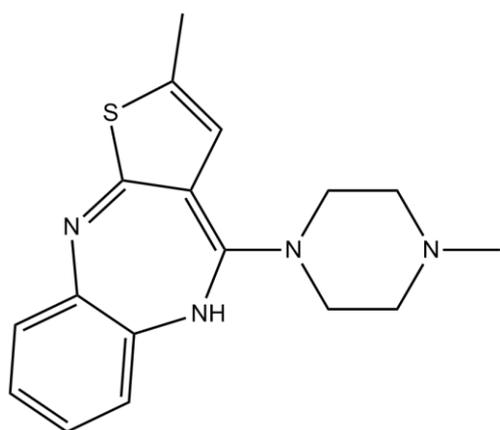
Фроватриптан

Рисунок 1.2 Структурные формулы триптанов

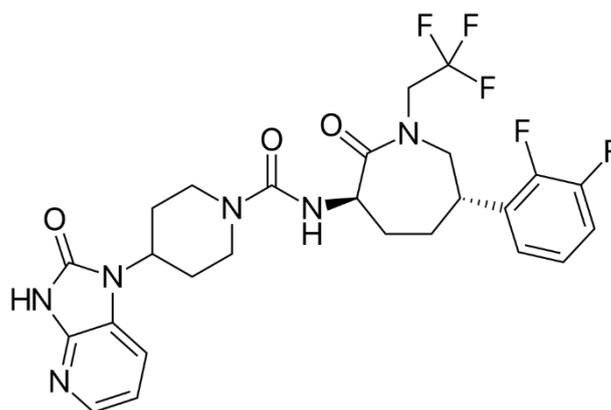
Несмотря на широкое использование и переносимость триптанов, механизм их действия никогда не был полностью определен. Известно, что триптаны являются агонистами серотониновых рецепторов типа 1B / D / F, которые могут ингибировать высвобождение нейропептидов, вовлеченных в мигрень, и действовать как вазоконстрикторы (Jansen et al., 1992; Nozaki et al., 1992;

Williamson et al., 1997; Knight et al., 2001; Wackenfors et al., 2005). Более того, при лечении суматриптаном наблюдалось снижение уровней кальцитонин-ген-связанного пептида в плазме у людей (Goadsby and Edvinsson, 1993; Juhasz et al., 2003) и в экспериментальных исследованиях у животных (Buzzi and Moskowitz, 1990; Buzzi et al., 1991; Nozaki et al., 1992). Изучение сосудистого влияния триптанов на людях позволили понять механизм его действия и роль, которую может играть изменение тонуса сосудов при мигрени. В результате исследования с использованием однофотонной эмиссионной компьютерной томографии в сочетании с доплерографией было показано, что при введении суматриптана людям только аномально расширенные сосуды возвращаются к нормальному состоянию (Asghar et al., 2010, 2011). Исследователи предполагают, что триптаны вызывают значительную вазоконстрикцию только на расширенных сосудах во время мигрени. Кроме того, интересно отметить, что триптаны наиболее эффективны, если их использовать в течение первых 2 ч после мигренозной атаки (Linde et al., 2006). Кроме того, суматриптан, по-видимому, не эффективен для снятия боли при других расстройствах (Ahn and Basbaum, 2005), не связанных с мигренью, что может быть объяснено их сосудистыми эффектами. Однако необходимо отметить, что ряд факторов ограничивает применение триптанов. Рецидив мигренозной боли может возникнуть у 15–40% пациентов, принимающих триптаны (F. Antonaci, 2016). При этом, согласно рекомендациям, в случае неэффективности первой дозы, повторное назначение триптанов возможно не ранее, чем через 6 часов. Наиболее распространенные побочные эффекты известны как «триптановые ощущения», и они включают парестезии, покраснение, покалывание, боль в шее и легкое преходящее давление в груди. Осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы встречаются редко, однако назначение триптанов лицам, имеющим в анамнезе артериальную гипертензию, ишемическую болезнь сердца либо перенесших инсульт не рекомендуется.

Одним из наиболее современных направлений терапии мигрени являются препараты, воздействующие на ген-кальцитониновый пептид (CGRP). Рецепторы к CGRP были обнаружены в стенке менингеальных артерий и окончаниях тройничного нерва, в околородопроводном сером веществе, а также во всей черепной сосудистой сети. На сегодняшний день зарегистрировано 2 препарата – гепанты: олсегепант и телкагепант (Азимова, 2015) (Рисунок 1.3).



Олсегепант



Телкагепант

Рисунок 1.3 Структурные формулы гепантов

Олсегепант является непептидным антагонистом CGRP рецепторов, который обладает высокой специфичностью к человеческим рецепторам CGRP и, согласно ряду клинических исследований II фазы, показал эффективность при мигрени (Edvinsson, 2008, 2015). Олсегепант блокирует расширение средних менингеальных и экстракраниальных височных артерий. Аналогично было показано, что телкагепант ингибирует вазодилатацию культивируемых человеческих церебральных и менингеальных артерий (Edvinsson et al., 2010). Эти наблюдения связывают эффективность антагониста рецептора CGRP с возможностью влияния на сосудистый компонент. К сожалению, препараты данной группы не могут использоваться длительно для лечения мигрени, т. к. повышает уровень печеночных трансаминаз (Edvinsson, 2005).

Весьма перспективным направлением является создание моноклональных антител к CGRP. В настоящее время активно изучаются 4 препарата на их основе. Эти препараты используются как для профилактики эпизодической, так и для лечения хронической мигрени. LY2951742, ALD403, AMG 334, LBR-101 прошли II и III фазы клинических исследований, показав высокую эффективность, а также приемлемый профиль безопасности, и, по-видимому, войдут в клиническую практику в ближайшее время (Азимова, 2015).

Не смотря на то, что все перечисленные группы препаратов находят применение в клинической практике для терапии мигрени, большинство из них не подходят для профилактики мигренозных приступов. В современных рекомендациях, профилактика считается оправданной при частых мигренозных приступах (более 2 раз в месяц) либо при тяжелых приступах или наличии других показаний (Г.Р.Табеева, 2010). Основными показаниями для проведения профилактической терапии являются: частые (2 и более в месяц) приступы на протяжении последних 6 мес, резкое ухудшение самочувствия, ограничение трудоспособности; низкая эффективность или наличие противопоказаний к применению препаратов, купирующих приступ; применение лекарств, используемых для купирования приступа мигрени, более 2 раз в неделю; особые ситуации (приступы мигрени со стойким неврологическим дефектом, мигренозный инсульт в анамнезе, мигрень-триггер эпилептического приступа) (Silberstein, 2015).

Для профилактики мигрени рекомендовано использовать следующие лекарственные средства: β -блокаторы (атенолол, метопролол, пропранолол), антиконвульсанты (топирамат, вальпроевая кислота), антидепрессанты (амитриптилин), блокаторы кальциевых каналов (флунаризин) (Vécsei L., 2018; Grazzi L., 2018).

Среди трициклических антидепрессантов наиболее часто назначают amitriptyline. У ряда пациентов наблюдается значительное улучшение состояния и облегчение мигренозных приступов (D'Amico & Terper, 2008).

Однако применение препаратов данной группы с целью профилактики мигренозных атак приводит к развитию таких побочных эффектов, как сухость во рту, запор, тахикардия, ухудшение зрения и задержка мочи. Помимо этого, трициклические антидепрессанты могут снижать порог судорог и вызывать аритмии и ортостатическую гипотензию.

В ряду блокаторов кальциевых каналов наиболее назначаемым препаратом является верапамил. Однако он не имеет достаточной доказательной базы эффективности при мигрени, и в ряде клинических испытаний не было выявлено статистически значимых различий между частотой и силой мигренозных атак у пациентов, принимавших верапамил, и у пациентов, принимавших плацебо (D'Amico & Terper, 2008). Помимо этого, при приеме препаратов данной группы необходим мониторинг интервалов QTc на кардиограммах, в связи с риском развития атриовентрикулярных блокад, брадикардии и аритмии (Silberstein and Goadsby 2002).

Антидофаминергические агенты также используются в терапии мигрени. Ряд исследований показывает эффективность внутривенного введения хлорпромазина (аминазина) пациентам с мигренозным статусом. Согласно этим исследованиям инъекции аминазина оказывают гипнотический эффект, и после пробуждения большинство пациентов отмечают прекращение мигренозной атаки как у взрослых (Utku U., 2014), так и у детей (Patniyot I.R., 2016). Все вышеперечисленные группы препаратов являются случайными находками и эффективны только у небольшого числа пациентов в связи с тем, что не оказывают влияния на ключевые звенья патогенеза мигрени.

Достаточно хорошие результаты в терапии мигрени были показаны для транквилизаторов бензодиазепинового ряда. В частности, для основных представителей бензодиазепинов – сибазона и клоназепамы была показана эффективность в купировании тяжелых мигренозных приступов как в монотерапии (Maizel M., 2018), так и в комбинации с метилпреднизолоном (Martin J., 2017). Эти препараты доказали свою эффективность в ряде крупных

клинических исследований и рекомендованы к использованию ведущими экспертами по проблеме головных болей.

Анализ данных из опубликованной литературы показывает, что от 38% до 50% пациентов с мигренью нуждаются в регулярном профилактическом лечении (D'Amico и Lanteri-Minet 2006; Lipton et al 2007), но только 6 – 13% из них получают препараты для профилактики (Lucas et al 2005; Lipton et al 2007). Таким образом, значительная часть пациентов, страдающих мигренью, которые нуждаются в профилактике, не получают ее, а многие из них отказываются от лечения из-за описанных выше побочных эффектов.

Таким образом, на сегодняшний день существует большая потребность в разработке и создании новых лекарственных препаратов как для лечения мигренозных приступов, так и для профилактики. Предпочтение отдается антисеротониновым препаратам, способным влиять на ключевые звенья патогенеза мигрени: тонус сосудов, периваскулярное воспаление и распространяющуюся корковую депрессию.

1.4 5-HT_{2A} -рецепторы

Интерес исследователей к 2 типу серотониновых рецепторов, как перспективных мишеней для противомигренозной терапии возник с конца 80-х годов прошлого века, после ряда экспериментов с неселективным агонистом 2 подтипа серотониновых рецепторов – мета-хлорфенилпиперазином (mCPP) (Рисунок 1.4). Было показано, что после введения соединения mCPP как здоровым людям, так и пациентам с мигренью, возникает приступ мигрени (Kalkman, 1997) (Silberstein, Fozard, & Murphy, 1992) (Leone & A Attanasio, 2000). Предполагается, что эффекты, вызываемые активацией 5-HT₂ рецепторов, которые могут иметь отношение к мигрени, включают в себя: сужение краниальных сосудов, повышенную проницаемость капилляров и агрегацию тромбоцитов, а также некоторые эффекты центральной нервной системы и нейроэндокринные функции.

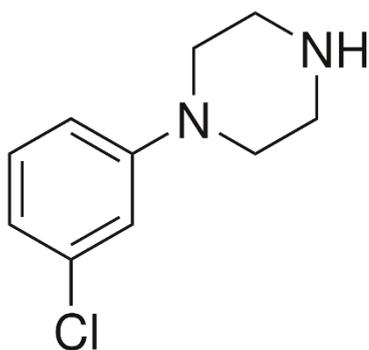


Рисунок 1.4 Структурная формула mCPP

Полученные данные были подтверждены рядом исследований с являющихся алкалоидами спорыньи - антагонистами 5-HT₂ –рецепторов – эрготаминами (Ostfeld, 1961; Ryan, 1970; Waters, 1970; Hakkarainen et al., 1979; Kinnunen et al., 1988; Sargent et al., 1988; Friedman et al., 1989; Cortelli et al., 1996; McNeely and Goa, 1999; Reches and Eletriptan Steering Committee, 1999).

Учитывая неселективность действия эрготаминов, в дальнейшем было предложено использовать более селективные антагонисты, чтобы выявить подтип серотониновых рецепторов, играющий ключевую роль в купировании мигренозного приступа. Так в ряде клинических исследований с антагонистами 5-HT_{2A} -рецепторов ципрогептадином и пизотифеном (Рисунок 1.5) была показана их эффективность в терапии пациентов, не отвечающих на стандартные группы препаратов (Н. Okumar, 2013) (D. G. Waller, 2018)

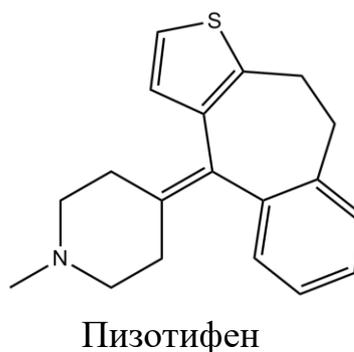
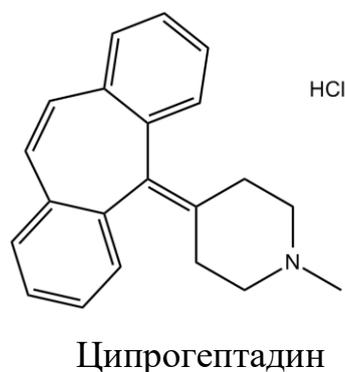


Рисунок 1.5 Структурная формула ципрогептадина и пизотифена

Помимо этого, ципрогептадин и пизотифен показали клиническую эффективность в лечении мигрени у детей и подростков (K. W. Al-Quliti, 2016). Это позволило выдвинуть предположение о вовлеченности именно 2A подтипа серотониновых рецепторов в развитие мигренозной атаки. Однако данные препараты являются неселективными 5-HT_{2A} -антагонистами и взаимодействуют с другими рецепторами (H₁-гистаминовыми, M-ацетилхолиновыми, α-адреналиновыми), что вызывает ряд побочных эффектов. В связи с этим стали разрабатываться более селективные лекарственные препараты, воздействующие на данную мишень. В 1980 фирмой Janssen Pharmaceutica был разработан высокоселективный антагонист 5-HT_{2A} -рецепторов - кетансерин (Healy, 2009) (A. Y. Sokolov, 2011) (R. Shukla, 2001) (Рисунок 1.6). Однако в дальнейшем выяснилось, что кетансерин обладает высоким сродством к α-адренорецепторам, в связи с чем вызывает выраженную гипотензию, и, на сегодняшний день, используется как гипотензивное средство (European Society of Cardiology, 2018).

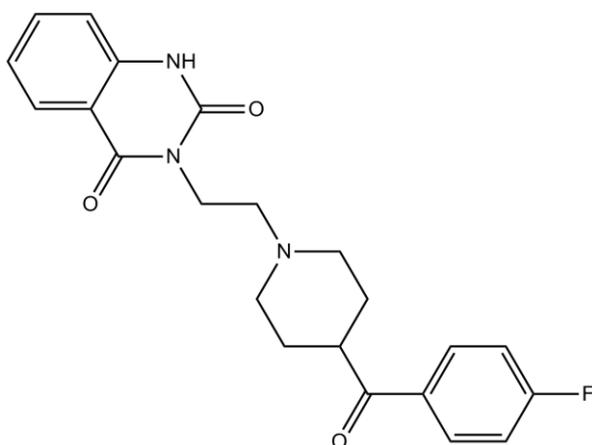


Рисунок 1.6 Структурная формула кетансерина

Таким образом, создание новых, высокоселективных лекарственных средств, проявляющих активность в отношении 2A-подтипа серотониновых рецепторов является актуальным направлением современной фармакологии.

1.5 Клинический потенциал 5-HT_{2A} – антагонистов.

Помимо описанных вазоконстрикторных эффектов, существует ряд данных, указывающих на то, что, 5-HT₂-рецепторы являются посредниками в развитии ноцицептивного эффекта серотонина (L. Vardin 2011). Предположительно, частая активация 5-HT_{2A} -рецепторов приводит к выбросу провоспалительных субстанций из первичных афферентных окончаний тройничного нерва, а увеличение количества рецепторов является фактором хронизации головной боли (А.В. Амелин, 2014). Периферические 5-HT_{2A} -рецепторы также принимают непосредственное участие в возбуждении афферентных ноцицептивных волокон. При этом блокада рецепторов 5-HT_{2A} -антагонистами способствует значимому уменьшению болевой чувствительности, в частности в условиях экспериментальной термической (К. Okamoto, 2002) и провоспалительной гипералгезии (В. Q. Huang, 2015). Подобные выводы об уменьшении провоспалительной болевой импульсации в патогенезе мигренозного приступа были получены и при использовании лекарственных препаратов с 5-HT_{2/2A}-антагонистическим действием – ципрогептадина и пизотифена (А.В. Амелин, 2011).

К другим значимым физиологическим эффектам, опосредуемым действием 5-HT_{2A} -рецепторов, относятся регуляция функций тромбоцитов, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. В тромбоцитах активация 5-HT_{2A} -рецепторов приводит к увеличению свободного внутриклеточного кальция и проагрегантному действию. Аналогичный вторичный сигнальный механизм способствует повышению сократительной активности гладкомышечного слоя коронарных сосудов и сосудов головного мозга. Отмечено, что активация 5-HT_{2A} -рецепторов приводит к увеличению частоты сердечных сокращений у крыс (S. W. Watts, 2012). Считается, что в большинстве артерий развитие сокращения, опосредуемого влиянием серотонина на 5-HT_{2A} -рецепторы гладкомышечного сосудистого слоя, происходит не только при активации протеинкиназы C, но и при активации Rho-киназного пути, который принимает участие в фосфорилировании фосфатазы легких цепей миозина (P. M. Nelson, 2012). Этим

объясняют эффективность применения при мигрени таких препаратов, как триптаны и эрготамины (B.N. Mason, 2018).

Также стоит отметить, что в центральной нервной системе 5-HT_{2A} - рецепторы вовлечены в формирование поведенческих реакций, когнитивных процессов, в том числе памяти (A. R. Preston, 2013; A. Meneses, 2013; G. Zhang, 2015). Помимо этого, считается, что кортикальные 5-HT_{2A} -рецепторы непосредственно принимают участие в ангиогенезе (N. V. Weisstaub, 2006; A. Benyamina, 2012). Учитывая наличие нарушений в функционировании ЦНС при мигрени, связанных с рядом тревожных состояний и эффективностью у ряда пациентов бензодиазепиновых транквилизаторов и трициклических антидепрессантов, 5-HT_{2A} -антагонисты все чаще позиционируются в качестве потенциальных агентов для терапии психических расстройств, в том числе для лечения генерализованного тревожного расстройства и тревожных расстройств при мигрени (T. A. Mestre, 2013). В последние годы появляется большое количество работ, посвященных изучению атипичного антипсихотического (Y. Oyamada, 2015; G. Chłóń-Rzepa, 2016), а также гипнотического эффектов отдельных 5-HT_{2A} -блокаторов.

Такой интерес к 5-HT_{2A} -антагонистам, как к потенциальным антипсихотическим средствам связан с тем, что активация 5-HT_{2A} -рецепторов может способствовать развитию психостимулирующего эффекта и зрительных галлюцинаций за счет повышения возбудимости корковых нейронов (M. Kometer, 2013). Частично это подтверждает исторически наиболее ранние исследования D-рецепторов (ранее используемое название 5-HT_{2A} -рецепторов), связанные с выявлением галлюциногенного действия диэтиламида лизергиновой кислоты (LSD), 2,5-диметокси-4-бromoамфетамина (DOB), 2,5-диметокси-4-йодоамфетамина (DOI), являющихся неселективными 5-HT₂-агонистами. С другой стороны, в настоящее время выдвинута гипотеза, что такое психотическое действие LSD, DOB, DOI может быть результатом повышения чувствительности отвечающего за распознавание лигандов участка дофаминовых D₂-рецепторов, а

также образования активных гетерорецепторных D₂/5-HT_{2A} -комплексов (D. O. Borroto-Escuela, 2014; D. O. Borroto-Escuela, 2017).

Помимо этого, для 5-HT_{2A} -рецепторов характерно участие в системной терморегуляции у мышей. Интересно, что ни агонисты (DOI), ни антагонисты (кетансерин) 5-HT_{2A} -рецепторов при введении интактным животным не способны изменять температуру тела. При этом в условиях воспалительной реакции, предположительно за счет опосредованного уменьшения активности NO-синтазы, кетансерин вызывает гипотермический эффект (I. P Voronova, 2016).

Таким образом, препараты с 5-HT_{2A} -антагонистическим механизмом действия способны оказывать влияние на все ключевые звенья патогенеза мигрени, оказывая комплексный эффект при лечении острых приступов. Согласно литературным данным, на примере рекомендаций по применению для ципрогептадина и пизотифена, 5-HT_{2A} -антагонисты будут являться перспективными также для профилактики мигренозных атак, что делает лекарственный препарат с таким механизмом действия наиболее оптимальным в терапии мигрени.

1.6 Имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, как 5-HT_{2A} – антагонисты

На базе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ ЮФУ (Ростов-на-Дону), ведется разработка нового класса биологически активных соединений, в основе которых использована структура конденсированных азолов. Были созданы базы данных новых соединений и составлен прогноз их биологической активности (Васильев П.М., 2012). Затем в работах Черникова М.В. и Горягина И.Н. на основании экспериментального скрининга соединений была показана перспективность использования данного класса, для создания на его основе новых лекарственных средств с пуринергической, серотонинергической и гистаминергической активностью (М.В. Черников 2015; М.В. Черников 2013, В.И. Петров, 2008).

В дальнейшем производился скрининг ряда азольных соединений, с целью выявления лидеров и изучение выявленных соединений на наличие различных видов активности. Был выделен класс бензимидазолов, как обобщенная и наиболее перспективная структура, с высоким уровнем биологической активности. При разработке данного класса учитывали тот факт, что молекулы серотонина и бензимидазола являются биоизостерами (Рисунок 1.7), и, предположительно, производные бензимидазола потенциально способны влиять на серотониновые рецепторы (Черников М.В., Спасов А.А., Анисимова В.А., 2010).

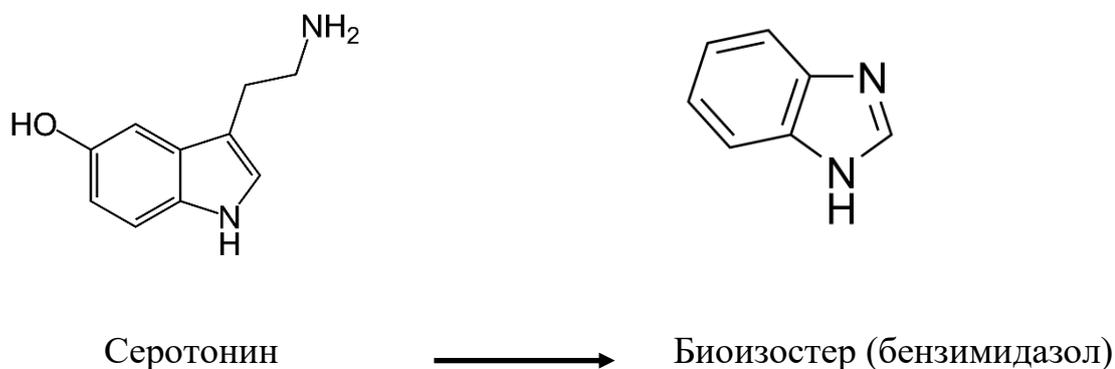


Рисунок 1.7 Структурная модификация молекулы серотонина при создании биоизостера – бензимидазола

В ходе дальнейших исследований был выделен ряд соединений с потенциально высокой антисеротониновой активностью (Черников М.В., Спасов А.А., 2010) Учитывая наличие в литературных источниках данных, о возможности проявления производными бензимидазола антимигренозной активности (Н.С. Diener, 2009; Н. Akiyama, 2013), стало целесообразно исследовать новые соединения на наличие данной активности. В работах Яковлева Д.С. был выявлен ряд соединений с высокой 5-НТ_{2А}-блокирующей и 5-НТ₃-блокирующей активностью (Д.С. Яковлев, 2016; К.Т. Султанова, 2018; Д.В. Мальцев, 2018). При изучении 5-НТ_{2А}-антагонистических свойств выбранных субстанций в работах Мальцева Д.В. было выявлено соединение-лидер, РУ-476,

обладающее высоким уровнем серотонин-блокирующей активности (А.А. Спасов, 2016; Д.С. Яковлев, 2018, Д.В. Мальцев (а), 2014). Для данной субстанции был проведен ряд исследований сосудистых свойств на мигренозных моделях (Д.В. Мальцев, 2015), тромбоцитарных свойств (Д.В. Мальцев (б), 2014), нейрнопсихотропных эффектов (D.V. Maltsev, 2013). Полученные данные позволили сделать вывод о перспективности базовой структуры выявленного соединения, в качестве кандидата для создания нового противомигренозного препарата. В дальнейших исследованиях было выявлено, что дигидронитратная соль склонна к фотодеградации и, учитывая планирование создания на основе данной субстанции пероральной формы, фактор стойкости при хранении играет немаловажную роль. В связи с этим стало необходимо синтезировать другие соли, проявляющие высокую стабильность к окислению и не оказывающие при этом собственного фармакологического влияния на организм человека и животных.

С этой целью были синтезированы неорганические дигидрохлоридная и дигидробромидная солевые формы исходной субстанции, под лабораторными шифрами РУ-31 и РУ-477 соответственно, и дальнейшие исследования посвящены выбору наиболее перспективного солевого компонента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015) и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А. Н., 2012). Все эксперименты были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2018-2015 от 16 марта 2015 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

2.2 Перечень используемых реактивов и веществ

Для исследований использованы реактивы: кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), натрий хлористый, калий хлористый, магний хлористый 6-водный, калий фосфорнокислый однозамещённый, калий фосфорнокислый двузамещённый, натрий фосфорнокислый двузамещённый, магний сернокислый 7-водный, гидрокарбонат натрия, 2-водный трехзамещенный цитрат натрия, стандарт-титр соляной кислоты 0,1 Н (ООО АО РЕАХИМ, Россия), трис

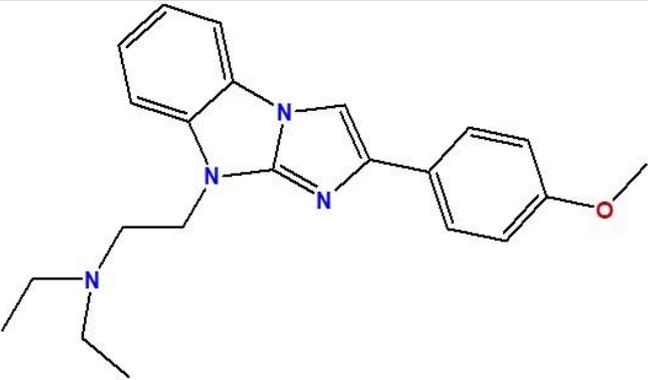
гидрохлорид, трис(гидроксиметил)аминометан (Serva Feinbiochemica, Германия), этанол 96% (Россия), натрия хлорид 0,9% (Эском, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США), Tween 20 (Fisher Scientific, США), Tween 80 (Fisher Scientific, США).

В качестве фармакологических реактивов, препаратов и веществ сравнения использованы: динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ), серотонина гидрохлорид, ципрогептадина сесквигидрат, эпинефрина гидрохлорид, коллаген, кальциевый ионофор (A23187), ристоцетин (Ristomycin monosulfate), кислота ацетилсалициловая, ML-10302, атропина сульфат, 5-гидрокситриптофан (5-ГТФ), ареколина гидробромид, никотин, пикртоксин, апоморфина гидрохлорид, леводопа (L-ДОФА), фенамин, резерпин, клофелин, коразол, fura-2 (Sigma, США), ондансетрон (ООО Верофарм, Россия), ацетилхолина хлорид (ОАО Биосинтез, Россия), хлорид железа (III) («Мосреактив», Россия), формальдегида раствор разведенный 1:9 (ООО «НПФ БликМедиклПро-дакшн», Россия), диклофенак (Nemofarm, Сербия), трамадол (Polpharma SA, Польша), галоперидол (WIEMER PHARMA, Германия).

Исследуемые вещества под лабораторными шифрами РУ-476, РУ-31, РУ-477 синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В. А. Анисимовой и научным сотрудником, к.х.н. О. Н. Жуковской¹, и представляют собой 3 различных соли: дигидронитрат, дигидрохлорид и дигидробромид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (Таблица 2.1)

¹ Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В. А. Анисимовой и научному сотруднику, к.х.н. О. Н. Жуковской за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

Таблица 2.1 - Шифры и химическая структура изученных веществ

Шифр	Базовая структура	Солеобразующий компонент
РУ-476		2HNO ₃
РУ-31		2HCl
РУ-477		2HBr

2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения

Для исследований использовано следующее оборудование: однокамерная установка для изолированных органов 4000 (Ugo Basile, S.R.L., Италия), изотонический датчик 7006 (Ugo Basile, S.R.L., Италия), 4-канальный цифровой рекордер (Ugo Basile, S.R.L., Италия), pH-метр pH213 (HANNA Instrumento, Германия), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария), весы Scout Pro SPU601 (OHAUS, США), центрифуга MultiCentrifuge CM-6M (Elmi, Латвия), концентратор кислорода (Армед, Россия), двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов Биола 230 LA (НПФ Биола, Россия), ультразвуковая ванна 4,0 л (Сапфир, Россия), центрифуга SIGMA 2-16KL универсальная с охлаждением, до 15300 об/мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия), установка Hot/Cold Plate NG 35150 (Ugo Basile, Италия), установка Tail-flick Unit 37360, автоматическая (Ugo Basile, Италия), установка для локальной фиксации потенциалов (Axon CNS, США) с цифровым преобразователем Digidata A1440 series (Axon CNS, США), и 2 автоматическими микроманипуляторами (Axon CNS, США).

Для исследований использовано следующее программное обеспечение: программный пакет ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft, США), Gephi версия 0.9 (The Gephi Consortium, Франция), ПО LabScribe3.0™ (iWorx Systems, Inc., США), ПО

PowerGraph 3.3 (ООО ДИСофт, Россия), ПО pCLAMP v.11 (Molecular Devices, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2012 (Microsoft Office, США).

2.4 Экспериментальные животные

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 175 нелинейных крысах-самцах массой 250-320 г (ООО «НИЦ БМТ», 90 нелинейных крысах-самках массой 220-240 г (ООО «НИЦ БМТ», 70 нелинейных мышах обоего пола массой 20-30 г (ООО «НИЦ БМТ», 12 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (ИП Бабичева Т.М.)

Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92, 1992).

2.5. Методы исследования

Метод изучения 5-HT_{2A}-антагонистических свойств соединений

Влияние соединений на 5-HT_{2A}-зависимую спазмогенную активность серотонина изучали на препарате изолированного рога матки крыс по методике Блаттнера с соавт (Блаттнер Р., 1993).

Изучение проводилось на 12 крысах-самках массой 220-240 г. В качестве раствора для поддержания жизнеспособности органа использовался буфер Де-Жалона (NaCl–150 ммоль/л, KCl - 5ммоль/л, CaCl₂–0,6ммоль/л, NaHCO₃ - бммоль/л, глюкоза - 3ммоль/л, pH 7,4). Исследование производили на установке для изолированных органов Ugo Basile с изотонически датчиком (см. пункт 2.3. Главы 2), предварительно выставленной на термостатирование при 24°C с

постоянной оксигенацией смесью 95% O₂ и 5% воздуха. Величина нагрузки составляла 1,0 г.

Животных наркотизировали раствором хлоралгидрата (доза 400 мг/кг.) интраперитонеально. Очищенный от жировой и соединительной ткани рог прошивали и фиксировали в ванночку для изолированных органов, и оставляли изолированный препарат для адаптации в течение 45-60 мин до начала эксперимента. В течение периода адаптации и последующего эксперимента проводили отмывку изолированного препарата в ванночке каждые 10-15 мин. Исследуемые вещества: соединения РУ-476, РУ-477, РУ-31 и ципрогептадин вводились в концентрации 1 мкМ. Сократительную активность матки индуцировали путем введения в кювету серотонина в нарастающих концентрациях 0,1 нМ, 0,3 нМ, 1 нМ, 3 нМ, 10 нМ, 30 нМ, 0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ, 30 мкМ, 100 мкМ, для построения контрольной куммулятивной кривой. Блокирующую активность оценивали по изменению сократительного ответа матки в ответ на введение серотонина в присутствии тестируемых соединений в $\Delta\%$, с расчётом показателя отрицательного десятичного логарифма полуэффективной концентрации серотонина (pEC₅₀) в программе GraphPad Prism v 5.0.

Методы изучения противомигренозных свойств на моделях сосудистой патологии

Исследование влияния веществ на изменение скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина

Эксперимент проводился на половозрелых крысах самцах 250-300 г., разделенных на 13 групп (1 контрольную, 12 опытных по 6 в каждой). Регистрацию кровотока проводили в теменной области головного мозга крыс с помощью ультразвукового доплерографа «ММ-Д-К» («Минимакс» Санкт-Петербург, Россия) (Мирзоян Р.С. и соавт. 2011). Соединение РУ-31 вводились в дозах: 30, 20, 15, 10, 5 и 0,5 мг/кг внутрижелудочно, за 60 мин до эксперимента. Препарат сравнения – ципрогептадин вводился в эквимоллярных дозах также

внутрижелудочно, за 60 мин до эксперимента. Серотонин вводился в дозе 20 мкг/кг внутривенно непосредственно во время эксперимента.

После фиксации головы животного в стереотаксисе, в теменной кости, бором производилась трепанация черепа диаметром 0,3 см до поверхности твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. После чего датчик УЗДП-010-01 с рабочей частотой 25 МГц, диаметром 0,3 см устанавливался на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания среднемозговой артерии по направлению ее центральной ветви.

После установки ультразвукового датчика фиксировали линейную скорость мозгового кровотока до введения серотонина (исходные значения), после чего через бедренную вену в общий кровоток вводили серотонин. С момента введения индуктора, фиксировался уровень линейной скорости мозгового кровотока через каждые 15 сек первую минуту и каждую минуту, со 2 по 5 мин. Всего наблюдение за одним животным велось в течение 5 мин.

По итогам эксперимента определялась способность исследуемых веществ снижать выраженность констрикторных эффектов серотонина.

Изучение влияния веществ на серотонин-индуцированное изменение скорости кровотока в системе внутренней сонной артерии

Изучение действия соединений на кровоток в каротидной системе проводили на 18 наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 граммов, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 2 опытных) (Р.С.Мирзоян с соавт, 2012).

Серотонин-индуцированный спазм моделировали введением 20 мкг/кг серотонина гидрохлорида в 0,2 мл изотонического раствора в катетеризированную бедренную вену. Изучаемые соединения вводились внутрижелудочно за 60 мин до моделирования серотонинового спазма в среднеэффективной дозе, рассчитанной в экспериментах *in vivo* на модели серотонин-индуцированного изменения скорости мозгового кровотока:

ципрогептадин 14 мг/кг и соединение РУ-31 - 10 мг/кг. Группе контроля вводили растворитель - дистиллированную воду в эквивалентном объеме.

Динамику кровотока изучали во внутренней сонной артерии, для чего производили измерение линейной скорости кровотока на общей сонной артерии с предварительной перевязкой наружной сонной артерии. Регистрацию скорости кровотока осуществляли с помощью доплерографа ультразвукового компьютеризованного для исследования кровотока ММ-Д-К («Минимакс–доплер-К», г. Санкт-Петербург, ООО «СП Минимакс»), предназначенного для исследования кровотока в крупных и мелких артериальных и венозных кровеносных сосудах в тканях живого организма.

По итогам эксперимента определялась способность исследуемых веществ снижать выраженность констрикторных эффектов серотонина.

Методы исследования антитромбоцитарных свойств соединений

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов *in vitro* изучалось по методу В.А. Габбасова [Габбасов В.А., 1989]. В исследовании использовались образцы крови 12 кроликов (массой 3-3.5 кг), стабилизированные 3,2%-ным раствором цитрата натрия, в соотношении 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму (300 мкл) помещали в кювету с магнитной мешалкой, добавляя исследуемое вещество в объеме 30 мкл - опытная группа, или дистиллированную воду – контрольная группа, с последующей инкубацией в течение 5 минут и введением индуктора (30 мкл). Регистрация агрегации тромбоцитов производилась путем измерения оптической плотности в кювете с помощью агрегометра «Viola». Исследуемое соединение РУ-31, ацетилсалициловая кислота и ципрогептадин изучались в концентрации 10 мкмоль/л. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали серотонин в концентрации 10 мкмоль/л, АДФ в концентрации 5 мкмоль/л, коллаген в концентрации 20 мкг/мл, адреналин в концентрации 1 мкмоль/л, А23187, в концентрации 3 мкмоль/л и ристоцетин в концентрации 1,25 мг/мл. Для оценки активности соединений определяли процент ингибирования

индуцированной агрегации тромбоцитов относительно показателей группы контроля.

Методы изучения антитромбогенных свойств соединений

Моделирование тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа III

Исследование антитромботической активности соединений проводили на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) («Мосреактив» Россия) [KurzK.D., 1990]. Данная модель основана на развитии в очаге поражения (месте нанесения раствора хлорида железа (III)) реакции Габера-Вейса, с образованием белого (артериального) тромба, основу которого составляют тромбоциты.

Исследование проводилось на 20 крысах самцах массой 270-310 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 контрольную и 3 опытных. Соединение РУ-31 изучалось в среднеэффективной дозе 10 мг/кг. Препаратом сравнения с наиболее близким механизмом действия был выбран ципрогептадин в среднеэффективной дозе 14 мг/кг, в качестве препарата по эффекту была выбрана кислота ацетилсалициловая в дозе 20 мг/кг. Исследуемые вещества вводились внутривентрикулярно, период инкубации составлял 60 минут для соединения РУ-31 и ципрогептадина. Кислоту ацетилсалициловую за 2 часа до начала эксперимента, согласно фармакокинетике препарата.

Крысы наркотизировались хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутривентрикулярно. Выделяли сонную артерию длиной до 4 см, под который подкладывался ватный диск, на него наносился 50% раствор хлорида железа (0,025 мл), пленка Parafilm позволяла предотвращать повреждение окружающих тканей. Проксимальнее участка нанесения раствора хлорида железа устанавливался ультразвуковой датчик (частота 25 МГц). Скорость кровотока регистрировалась с использованием ультразвукового доплерографа («Минимакс–доплер-К», г. Санкт-Петербург, ООО «СП Минимакс»).

Перед аппликацией хлорида железа фиксировался исходный уровень средней линейной (V_{am} , см/сек) скорости кровотока, после чего фиксировалось время и скорость образования тромба.

Фиксировалось время полной окклюзии, а также рассчитывалось время снижения скорости кровотока на 50%, 90% и 95%.

Моделирование тромбоза, индуцированного анодным током.

Изучение антитромботической активности на модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током, основывалось на модели Guglielmi G. [Guglielmi Getal, 1991].

Исследование проводилось на 20 крысах самцах массой 270-310 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 контрольную и 3 опытных. Исследуемые вещества вводились в тех же дозах и по такой же схеме, как и в предыдущем методе.

Крысы наркотизировались хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутрибрюшинно. Выделяли сонную артерию длиной до 4 см, очищая от сопутствующих тканей. Электроды закреплялись вплотную к сосуду, но так, чтобы не передавливать и не нарушать кровообращение в артерии, на места контакта наносился акустический гель. На 1-2 см дистальнее устанавливался ультразвуковой датчик. Индукция тромбоза наружной сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока соответствовала 10 мА. Стимуляцию прекращали только после полной окклюзии сосуда. Скорость кровотока регистрировалась по той же схеме, что и в тромбозе, индуцированном 50% раствором хлорида железа. Регистрировалось время полной окклюзии, а также рассчитывалось время снижения скорости кровотока на 50%, 90% и 95%.

Методы детализации нейрорецепторных механизмов действия *in vitro*

Метод исследования H_1 гистаминергической активности веществ

Влияние соединения РУ-31 на H_1 -зависимую спазмогенную активность гистамина изучали на препарате изолированной подвздошной кишки морских свинок по методологии Блаттнера с соавт (Блаттнер Р., 1993). и более подробно описанна в методе изучения 5-НТ₂А-антагонистических свойств соединений. Различия заключались в буферном растворе и режиме термостатирования: для препаратов изолированной подвздошной кишки использовали раствор Кребса-Хенселейста, термостатируемый при 36°C.

Для изучения H_1 - гистаминергической активности соединений использовали гладкомышечных препаратах 20 морских свинок, массой 250-280 г. Соединение РУ-31 вводилось в концентрации 1 мкМ. Блокирующую активность оценивали по изменению сократительного ответа подвздошной кишки в ответ на введение гистамина (10 мкМ) в $\Delta\%$. В качестве препарата сравнения использовался H_1 -гистаминоблокатор – хлоропирамина гидрохлорид в концентрации 1 мкМ. Изменение регистрируемых показателей в опытных группах оценивали в сравнении с контрольными показателями.

Метод исследования 5-НТ₃ серотонинергической активности веществ

Влияние соединения РУ-31 на спазмогенную активность серотонина (5-НТ₃-рецепторы) изучали на препарате изолированной подвздошной кишки морских свинок по методике описанной выше. Соединение РУ-31 вводилось в концентрации 1 мкМ. Блокирующую активность оценивали по изменению сократительного ответа подвздошной кишки в ответ на введение серотонина (10 мкМ) в $\Delta\%$. В качестве препарата сравнения использовался 5-НТ₃-блокатор – ондансетрон в концентрации 1 мкМ.

Метод исследования 5-НТ₄ серотонинергической активности веществ

5-НТ₄-агонистическую активность соединения РУ-31 изучали на препарате изолированного пищевода крыс используя методологию, описанную для H_1 -гистаминовой активности. Сокращение пищевода индуцировали введением

карбохолина в концентрации 10 мкМ. Далее устраняла карбохолин-индуцированный спазм введением серотонина (1 мкМ) либо изучаемых соединений. Соединение РУ-31 вводилось в концентрации 1 мкМ. В качестве препарата сравнения использовался 5-НТ₄-блокатор – ML-10302 в концентрации 10 мкМ.

Метод исследования М холинергической активности веществ in vitro

Влияние соединения РУ-31 на спазмогенную активность ацетилхолина (М-холинорецепторы) изучали на препарате изолированной подвздошной кишки морских свинок по методике описанной выше.

Исследование проводилось на 20 морских свинках, массой 250-280 г. Соединение РУ-31 вводилось в концентрациях 0,01 - 10 мкМ. Блокирующую активность оценивали по изменению сократительного ответа подвздошной кишки в ответ на введение ацетилхолина (0,1 мкМ) в Δ%. В качестве препарата сравнения при исследовании спазмогенной активности ацетилхолина использовался М-холиноблокатор - атропина сульфат в концентрации 10 мкМ. Изменение регистрируемых показателей в опытных группах оценивали в сравнении с контрольными показателями.

Метод исследования влияния соединения РУ-31 на Ca²⁺-зависимую флуоресценцию различных зон гиппокампа методами Ca²⁺ - имеджинга

Для исследования использовались 5 белых беспородных крысят возраста 5 – 18 дней после рождения. Животных наркотизировали изофлурановым наркозом. После этого изолировали головной мозг и производили нарезку слайсов на вибротоме Leica 3, в охлажденном до +2 °С буферном растворе искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) состава NaCl 125,0 мМ, KCl 2,5 мМ, CaCl₂ 2,0 мМ, MgCl₂ 1,0 мМ, NaHCO₃ 25,0 мМ, NaH₂PO₄ 1.25 мМ, глюкоза 25,0 мМ (pH 7.4) толщиной 500 мкм при нулевом значении вибрации и постоянной оксигенации 100% O₂. Далее полученные срезы обрабатывали реактивом fura-2 в течение 30 минут и затем с помощью лазера (Axon CNS, США) с частотой 20 kHz

снимали показатели флуоресценции срезов. Интенсивность процессов входа ионов Ca^{2+} в клетку и, как следствие, активации нейронов, оценивали по «погашению» флуоресценции нейронов.

Метод исследования влияния веществ на серотонин-опосредованное изменение сетевой активности в СА3 зоне гиппокампа крыс.

Для исследования использовались 25 белых беспородных крысят возраста 5 – 8 дней после рождения. Подготовка срезов головного мозга осуществлялась как в предыдущем методе до добавления флуоресцирующего реактива. Полученные срезы оставляли на адаптацию в течении 1 часа, после чего помещали в ванночку установки для локальной фиксации потенциалов (Axon CNS, США) (Рисунок 2.1) и производили регистрацию показателей сетевой активности с помощью полевого электрода, диаметром 50 мкм, установленного в пирамидном слое СА3 зоны гиппокампа по схеме приведенной на Рисунке 2.2. Исследуемые вещества: серотонин, в концентрации 5 мкМ, соединение РУ-31 в концентрации 1 мкМ и ципрогептадин в концентрации 1 мкМ подавались в ванночку перфузионно, со скоростью 3 мл/мин. О наличии у соединений влияния на сетевую активность ГАМК-системы судили по изменению количества генерируемых потенциалов действия в выбранной зоне, в ответ на введение вещества, в сравнении с контрольными показателями.

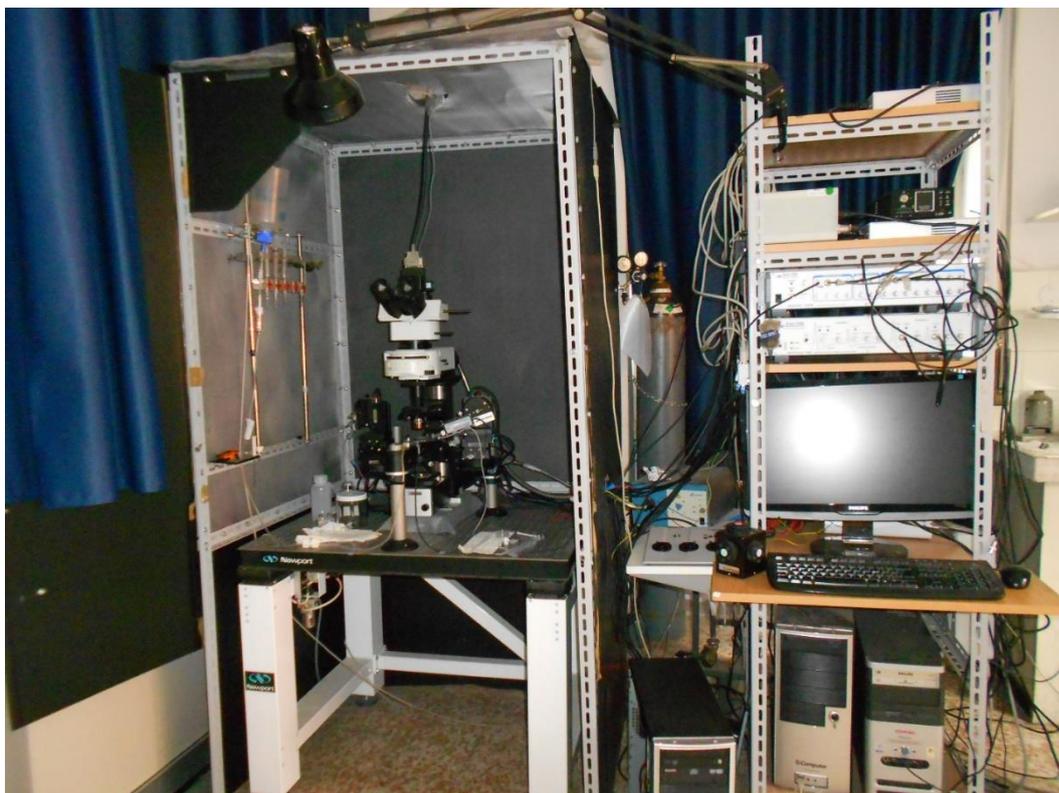


Рисунок 2.1. Установка для локальной фиксации потенциалов

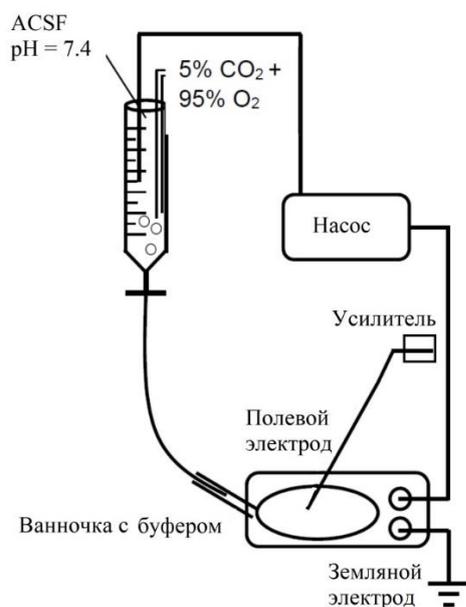


Рисунок 2.2. Схема регистрации полевых потенциалов в установке patch-clamp

Метод исследования влияния веществ на серотонин-опосредованное изменение частоты и амплитуды ГАМК-токов в СА1 зоне гиппокампа крыс

Для исследования использовались 15 белых беспородных крысят возраста 5 – 8 дней после рождения. Животных наркотизировали изофлурановым наркозом.

Методология получения срезов описана выше. Регистрацию показателей сетевой активности производили с помощью хлорсеребряного электрода, помещенного в стеклянный капилляр, изготавливаемый непосредственно перед экспериментом, заполненный пипеточным раствором CsGlu с концентрацией хлора 10 мМ, и установленный в пирамидном слое зоны CA1 гиппокампа крыс. Исследуемые вещества: серотонин, в концентрации 5 мкМ, соединение РУ-31 в концентрации 0,1 - 5 мкМ и ципрогептадин в концентрации 0,1 - 5 мкМ подавались в ванночку перфузионно, со скоростью 3 мл/мин.

В качестве показателей активности регистрировали частоту появления ГАМК-зависимых ионных токов при фиксированном потенциале клетки +10 мВ. Изменение регистрируемых показателей в опытных группах оценивали в сравнении с контрольными показателями. Отмывку производили раствором чистым раствором ACSF.²

О наличии у соединений влияния на активность ГАМК-системы в клетках пирамидного слоя CA1 зоны судили по изменению количества ГАМК-зависимых ионных токов, в ответ на введение вещества, в сравнении с контрольными показателями.

Методы изучения нейрорецепторных механизмов действия *in vivo*

Изучение влияния веществ на каталептогенный эффект галоперидола

В данном тесте исследовалась способность вещества оказывать влияние на дофаминовые рецепторы 2 типа, локализованные в центральной нервной системе, блокируя их. Это выражалось в угнетении двигательной активности и ориентировочных реакций, а также в возможном возникновении каталепсии. Проявление такой симптоматики является характерной чертой для типичных нейролептиков [Карпов В.Н., 1976; Маймете М.О. и соавт, 1985; Андреева Н.И., 2005].

² ² Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику OpenLab Нейробиологии Поволжского федерального Университета г. Казань, и руководителю подразделения лаборатории изучения особенностей развивающегося мозга UMR1249 Inserm INMED г. Марсель д.м.н. Хазипову Рустему Нариманович

Тестирование проводилось на 16 крысах, разделенных на 2 группы (1 контрольную, 1 опытную) по 8 животных в каждой. Соединение РУ-31 вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг, контрольной группе вводилась дистиллированная вода. Через 1 час производилась инъекция галоперидола (3 мг/кг, внутривенно) и велось наблюдение за животными. Развившуюся каталепсию оценивали по способности сохранять заданную непривычную позу в течение 15 секунд через 15, 30, 45, 60 и 120 минут после введения галоперидола по балльной шкале С. Моруго (1962): 1 балл – передняя лапа слегка отводится и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см.

О наличии дофаминергического влияния судили по изменению выраженности каталептогенной реакции в опытных группах по отношению к контролю.

Метод изучения взаимодействия соединения РУ-31 с апоморфином

Апоморфин в малых (0,01-0,15 мг/кг) дозах вызывает стереотипные движения у крыс. Такой эффект, как предполагается, связан с пресинаптическими дофаминовыми рецепторами и непосредственной их активацией [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005]. Это дает возможность использовать данный эффект при анализе пресинаптического влияния веществ на дофаминовые рецепторы.

Эксперименты были выполнены на 12 крысах, разделенных на 2 группы по 6 животных в каждой (1 контрольную, 1 опытную). Соединение РУ-31 вводилось животным внутривенно в дозе 10 мг/кг, контрольная группа получала дистиллированную воду. Спустя 30 минут животным вводился апоморфин (0,1 мг/кг, подкожно). Через 30, 60, 90 и 120 минут у животных оценивалась выраженность стереотипных движений. Для оценки использовалась балльная шкала: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе единичные случаи зевательных движений, непостоянное приноживание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия,

в том числе зевание, лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. О выраженности влияния изучаемого соединения на данный феномен судили в сравнении с показателями контрольной группы.

Метод изучения влияния веществ на гипотермический эффект резерпина.

Тест с резерпином позволяет оценивать влияние новых веществ на эффекты непрямых адреноблокаторов, поскольку резерпин является симпатолитиком и оказывает угнетающее влияние на ЦНС животных, вызывая уменьшение двигательной активности, гипотермию и угнетение процессов выработки условных рефлексов [Андреева Н.И., 2005].

Опыты проведены на 18 крысах самцах, разделенных на 2 контрольные и 1 опытную группы. Каждая группа состояла из 6 животных. Контрольная группа №1 не подвергалась действию резерпина и использовалась как интактный контроль, животным остальных групп внутрибрюшинно вводился резерпин в дозе 2,5 мг/кг. Развитие гипотермических эффектов резерпина длилось в течение 3 часов, после чего животным контрольных групп внутривенно вводилась дистиллированная вода, животным опытных групп – соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг. Через 60 и 90 минут после введения веществ (4 часа и 4 часа 30 минут после введения резерпина) оценивали развитие у крыс гипотермии. Измерение ректальной температуры проводили электронным термометром («OMRON», Германия). О действии изучаемых веществ судили по изменению наблюдаемых реакций в опытной группе по сравнению с контрольными показателями.

Метод изучения взаимодействия соединений с клофелином

Тест с клофелином, как и тест с резерпином позволяет оценивать влияние новых веществ на адренергическую систему, поскольку клофелин также является симпатолитиком и оказывает угнетающее влияние на ЦНС животных, вызывая уменьшение двигательной активности, гипотермию и угнетение процессов выработки условных рефлексов [Андреева Н.И., 2005].

Опыты проведены на 18 крысах самцах, разделенных на 2 контрольные и 1 опытную группы. Каждая группа состояла из 6 животных. Контрольная группа №1 не подвергалась действию клофелина и использовалась как интактный контроль, животным остальных групп внутрибрюшинно вводился клофелин в дозе 0,1 мг/кг. Животным контрольных групп внутривенно вводился растворитель - дистиллированная вода, животным опытных групп – соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг. Через 60 минут после введения веществ вводился клофелин и оценивалось развитие у крыс гипотермии через 30, 60, 90 и 120 мин. Измерение ректальной температуры проводили электронным термометром («OMRON», Германия). О действии изучаемых веществ судили по изменению наблюдаемых реакций в опытной группе по сравнению с контрольными показателями.

Метод изучения влияния веществ на ареколиновый тремор

Известно, что в опытах на животных центральные холиномиметики (ареколин, оксотреморин) вызывают развитие гиперкинеза, судорог, гипотермии и других эффектов, что позволяет использовать данный тест для выявления центрального М-холинергического действия веществ [Андреева Н.И., 2005].

Тестирование проводилось на 20 крысах, разделенных на 2 группы (1 контрольную, 1 опытную) по 10 животных в каждой. Соединение РУ-31 вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 60 минут до введения центрального М-холиномиметика ареколина (15 мг/кг, внутрибрюшинно). Контрольная группа животных получала растворитель - дистиллированную воду. При проведении теста регистрировали латентный период тремора и его длительность. О наличии у изучаемого соединения центрального М-холиноблокирующего или М-холиномиметического действия судили по изменению измеряемых показателей в опытной группе по сравнению с контрольной.

Метод изучения взаимодействия соединений с пикротоксином.

В используемом методе изучается способность пикротоксина вызывать тремор и повторяющиеся клонические судороги. Такой эффект связан с его антагонистическим влиянием в отношении ГАМК - рецепторов [Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2005].

Исследование проводилось на 20 мышах самцах, разделенных на 1 контрольную и 1 опытную группы по 10 животных в каждой. Соединение РУ-31 изучалось в дозе 10 мг/кг, контрольной группе вводился растворитель - вода дистиллированная. Все растворы вводились внутривентрикулярно за 60 минут до введения пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг (инъекция производилась интраперитонеально). После этого в течение 1 часа вели наблюдение за животными, отмечая латентный период появления тремора, латентный период развития судорог и количество судорожных приступов. Изменение регистрируемых показателей в опытных группах оценивали в сравнении с контрольными показателями.

Метод изучения влияния веществ на гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном у мышей

Методика основана на том, что метаболический предшественник серотонина 5-гидрокситриптофан (5-ГТФ) в дозах 200-300 мг/кг вызывает у мышей характерный гиперкинез в виде встряхивания головой. Механизм данного феномена связан с усилением серотонинергической нейротрансмиссии в мозге путём стимуляции 5-HT₂-серотониновых рецепторов [Peroutka S. et al., 1981; Pranzetelli M.R. et al., 1989].

Тестирование проводилось на 12 беспородных мышах, разделенных на 2 группы (1 контрольную, 1 опытную) по 6 животных в каждой. Животным опытных групп внутривентрикулярно вводилось соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, контрольным мышам вводили растворитель - дистиллированную воду. Через 1 час внутривентрикулярно вводился 5-ГТФ в дозе 300 мг/кг. После этого на

протяжении 1 часа осуществлялся подсчет количества встряхиваний головой у мышей в течение 1 минуты с интервалом 10 минут. Влияние изучаемого соединения на регистрируемый показатель оценивалось в сравнении с контрольными показателями.

Метод изучения взаимодействия соединения РУ-31 с L-ДОФА

Данный тест применяется для выявления у изучаемого соединения MAO-ингибирующего действия. Тест основан на возможности L-ДОФА в высоких дозах (500 мг/кг) вызывать у животных стереотипные движения, при этом если одновременно использовать вещества, способные ингибировать моноаминоксидазу, эффекты, связанные с проявлением стереотипных движений, возможно наблюдать и при введении низких доз L-ДОФА (100мг/кг) [Андреева Н.И., 2005].

Эксперимент был выполнен на 24 мышах, разделенных на 4 группы (2 контрольных, 2 опытных) по 6 особей в каждой. Животным опытных групп внутрижелудочно вводилось соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, животным контрольных групп растворитель - дистиллированная вода. На 60 минуте после введения вещества и воды мышам контрольной и опытной группам №1 внутрибрюшинно вводился L-ДОФА в дозе 500 мг/кг, контрольной группе №2 и опытной группе №2 – в дозе 100 мг/кг. В ходе эксперимента оценивали наличие и выраженность у животных стереотипии. Измерения проводили с интервалом в 30 минут в течение полутора часов после введения L-ДОФА. Каждое животное наблюдалось в течение 1 минуты, во время которой оценивался уровень проявляемой стереотипии, используя большую шкалу оценок: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия.

О наличии MAO-ингибирующего действия у изучаемого вещества судили по изменению показателей в опытных группах в сравнении с контрольными.

Метод изучения влияния веществ на никотиновый тремор

Никотиновый тест позволяет изучить способность N-холиноперосредованные эффекты соединений. Так, никотин в больших дозах (более 4 мг/кг) способен усиливать нервно-мышечную передачу. Такая способность никотина выражается в возникновении тремора и судорог у испытываемых животных. В связи с этим доза 4 мг/кг используется для изучения возможности проявления изучаемым соединением ингибирующих свойств. При низких дозах вводимого никотина (до 2 мг/кг) возникновения судорог не наблюдается, что можно использовать для определения возможности проявления миметических свойств изучаемых веществ [Андреева Н.И., 2005].

Эксперименты были выполнены на 60 мышах, разделенных на 4 группы (2 контрольных, 2 опытных) по 15 животных в каждой. Контрольные группы животных получали растворитель - дистиллированную воду, опытные группы - соединение РУ-31 внутрижелудочно в дозе 10 мг/кг. Спустя 60 минут животным внутрибрюшинно вводился N-холиномиметик - никотин по следующей схеме: контрольной и опытной группе №1 в дозе 2 мг/кг, контрольной и опытной группе №2 - 4 мг/кг. В ходе наблюдения за животными регистрировали латентный период развития тремора, отмечали наличие судорожных приступов и их латентность. О влиянии на N-холинорецепторы судили по изменению показателей в опытных группах в сравнении с контрольными.

Метод изучения взаимодействия соединения РУ-31 с фенамином

Метод основан на способности фенамина влиять на дофаминергическую трансмиссию, так, за счет усиления активности, указанной нейромедиаторной системы возникает стереотипное поведение [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005].

Эксперименты были выполнены на 12 крысах, разделенных на 2 группы по 6 животных в каждой (1 контрольную, 1 опытную). Соединение РУ-31 вводилось животным внутрижелудочно в дозе 10 мг/кг, контрольная группа получала

растворитель - дистиллированную воду. Спустя 60 минут животным вводился фенамин в дозе 5,0 мг/кг внутрибрюшинно. За животными велось наблюдение в течение всего периода наблюдаемого стереотипного поведения, вплоть до его полного исчезновения стереотипии. О выраженности влияния изучаемого соединения на данный феномен судили в сравнении с показателями контрольной группы.

Методы изучения анальгетической активности соединений

Исследование анальгетических свойств соединений в тесте Горячая пластина

Эксперименты были проведены согласно методическим рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под общ. ред А.Н. Миронова и в соответствии с методикой Вальдмана А.В (Вальдман А.В. 1976). В исследовании использовались 30 крыс-самок массой 220-240 г. Животные были разделены на 5 групп: 1 контрольную и 4 опытных. Вещества исследовались в среднеэффективных дозах, выявленных в экспериментах *in vivo* на моделях сосудистой патологии. Соединение РУ-31 было изучено в дозе 10 мг/кг. Препарат сравнения - ципрогептадин изучался в дозе 14 мг/кг, в качестве препарата с анальгетической активностью использовался трамадол в дозе 80 мг/кг (M. Gholami, 2015). Исследуемые вещества вводились внутривенно, период инкубации составлял 60 минут.

За 4 часа до начала эксперимента животных помещали в экспериментальную комнату для адаптации к ней. Непосредственно перед началом эксперимента пластину прибора прогревали до 55 °С (термический, альгезирующий фактор). После этого животных по одному помещали на металлическую пластину прибора и регистрировали время до проявления признаков двигательного беспокойства, отражающих болевую чувствительность: полилизывание задней лапки и подпрыгивание. Как только показатели были зафиксированы, животное немедленно снималось с пластины. О выраженности

анальгетического действия судили по изменению показателей полизывания лапы и подпрыгивания, относительно показателей контроля.

Метод исследования анальгетических свойств соединений в тесте «Отдергивания хвоста»

Эксперименты были проведены согласно методическим рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под общ. ред А.Н. Миронова и в соответствии с методикой Вальдмана А.В. [Вальдман А.В. 1976]. В исследовании использовались 30 крыс-самок массой 220-240 г. Животные были разделены на 5 групп: 1 контрольную и 4 опытных. Вещества исследовались в среднеэффективных дозах, выявленных в экспериментах *in vivo* на моделях сосудистой патологии. Соединение РУ-31 было изучено в дозе 10 мг/кг. Препарат сравнения -ципрогептадин изучался в дозе 14 мг/кг, в качестве препарата с анальгетической активностью использовался трамадол в дозе 80 мг/кг (М. Gholami, 2015). Исследуемые вещества вводились внутривенно, период инкубации составлял 60 минут.

За 4 часа до начала эксперимента животных помещали в экспериментальную комнату для адаптации к ней. Непосредственно перед началом эксперимента лазер прибора устанавливали на прогрев до 55 °С (термический, альгезирующий фактор). После этого животных по одному помещали на площадку и фиксировали хвост над разогретым лазером, после чего регистрировали время до проявления признаков двигательного беспокойства, отражающих болевую чувствительность: отдергивания хвоста. Как только животное отдергивало хвост, его убирали с площадки прибора. О выраженности анальгетического действия судили по изменению показателей отдергивания хвоста, относительно показателей контроля.

Метод исследования анальгетических свойств соединений в тесте формалиновой гипералгезии.

Данный тест позволяет определить возможность влияния веществ на острую боль, связанную с непосредственной активацией чувствительных волокон C/Ad (1 фаза), и последующую тоническую или воспалительную боль (2 фаза) [Dubuisson D., 1977].

Тестирование проводилось на 40 крысах, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных) по 10 особей в каждой.

В день исследования опытным группам внутривенно вводилось соединение РУ-31 - в дозе 10 мг/кг, ципрогептадин – 14 мг/кг, либо диклофенак натрия в дозе 2 мг/кг. Контрольная группа крыс получала растворитель - дистиллированную воду. Через 30 минут в вентролатеральную поверхность правой задней лапки подкожно инъецировалось 0,05 мл 0,5% раствора формалина и регистрировалась ответная реакция в виде вздрагивания лапки с 5-минутными интервалами в течение 60 минут. Число вздрагиваний в первые 10 минут отражает первую, острую фазу, а в период с 10 по 60 минуту – вторую, воспалительную фазу. Обезболивающий эффект соединений рассчитывали для каждой фазы отдельно по изменению количества ноцицептивных реакций в опытных группах в сравнении с группой контроля.

Методы статистической обработки данных

При парном сравнении независимых данных использовали t-тест Стьюдента. Величину pIC50 рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа. Для многопараметровых исследований статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных. Результаты динамических наблюдений обсчитывались с помощью двухфакторного ANOVA метода. Обсчет реализован в программе GraphPad Prism 5.0 и «Microsoft Excel 2012».

ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СОЛИ 9- ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛ-2-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-ИМИДАЗО [1,2- А]БЕНЗИМИДАЗОЛА

3.1. Сравнение 5-НТ_{2А}-антагонистических свойств производных 9- диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо [1,2-α]бензимидазола

В предыдущих исследованиях на скрининговых моделях был выделен ряд веществ – производных 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-α]бензимидазола (Яковлев Д.С., 2016), (Мальцев Д.В., 2014) продемонстрировавших высокий уровень активности на модели 5-НТ_{2А} - опосредованной активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния. Для дальнейших исследований были выбраны 3 наиболее активных соединения: дигидронитрат (соединение РУ-476), дигидрохлорид (соединение РУ-31) и дигидробромид (соединение РУ-477) 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2-α]бензимидазола.

Показатель IC₅₀ для данных веществ составлял $3,8 \cdot 10^{-8}$ М, $4,4 \cdot 10^{-8}$ М и $8,6 \cdot 10^{-8}$ М соответственно и статистически значимо не уступал препарату сравнения – ципрогептадину (IC₅₀ = $4,8 \cdot 10^{-8}$ М) (Мальцев Д.В., 2014).

Для более детального изучения 5-НТ_{2А}-блокирующей активности выбранных соединений была проведена серия экспериментов на препарате изолированного рога матки крыс. В результате проведенных исследований для каждого из веществ была построена кумулятивная кривая зависимости концентрация – эффект и рассчитана величина pEC₅₀ серотонина в присутствии антагониста (Таблица 3.1.), а также определен тип связывания с рецептором по форме полученного графика.

Таблица 3.1 –Полуэффективные концентрации серотонина в присутствии соединений РУ-31, РУ-476 и РУ-477, на модели серотонин-индуцированного сокращения изолированного рога матки крысы ($M \pm m$)

Вещество	Концентрация ингибитора	pEC_{50} серотонина/ серотонина в присутствии антагониста
контроль	-	$6,8 \pm 0,02$
Соединение РУ-476	1 мкМ	$5,9 \pm 0,04$
Соединение РУ-31		$5,4 \pm 0,12$
Соединение РУ-477		$5,6 \pm 0,07$
Ципрогептадин		$6,0 \pm 0,04$

Примечание: pEC_{50} – отрицательный десятичный логарифм полуэффективной концентрации серотонина/ серотонина в присутствии ингибитора. Статистическая обработка проводилась с использованием методов нелинейного регрессионного анализа.

При введении серотонина в диапазоне концентраций от 1 нМ до 100 мкМ в кювету с изолированным органом наблюдалось усиление спазмогенной активности. На основании полученных данных была построена кумулятивная кривая зависимости концентрация – эффект и рассчитана величина отрицательного десятичного логарифма величины полуэффективной концентрации серотонина, которая составила 6,8. Предварительная инкубация соединения РУ-476 в течение 3 минут вызывала сдвиг кумулятивной кривой серотонина в область более высоких концентраций, и величина pEC_{50} в присутствии соединения РУ-476 составила 5,9 (Рисунок 3.1).

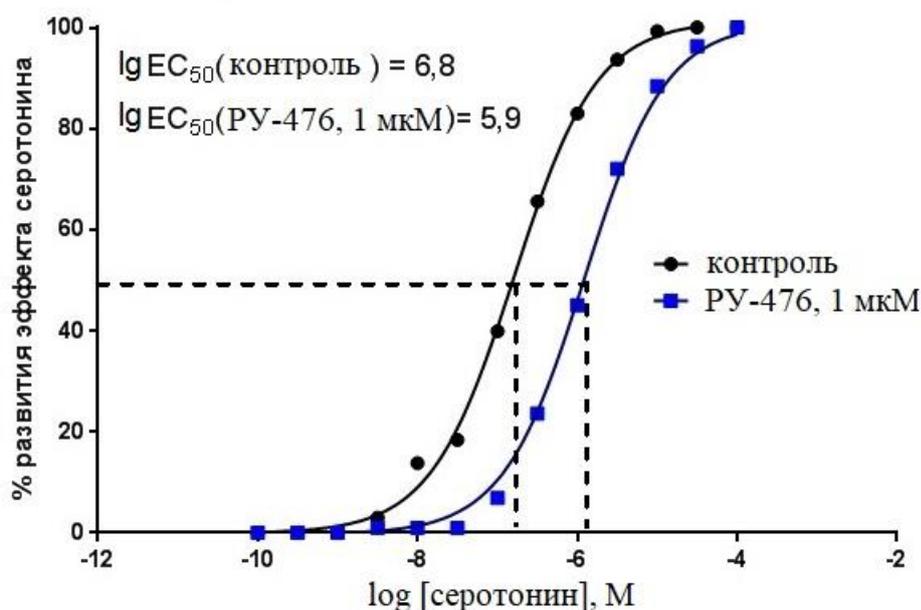


Рисунок 3.1 - Влияние соединения РУ-476 на выраженность серотонин-индуцированного спазма изолированного рога матки крыс

Предварительная инкубация в кювете соединения РУ-31 и соединения РУ-477 также вызывала сдвиг кумулятивной кривой вправо (Рисунок 3.2, Рисунок 3.3). При этом, для всех изучаемых производных 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола в рабочей концентрации 1 мкМ форма кумулятивной кривой соответствует обратимому типу связывания антагониста с рецепторами. Для препарата сравнения – ципрогептадина в эквимольной концентрации форма кривой соответствует необратимому типу связывания (Рисунок 3.4), что находит подтверждение в ряде исследований (Rashid M., 2001).

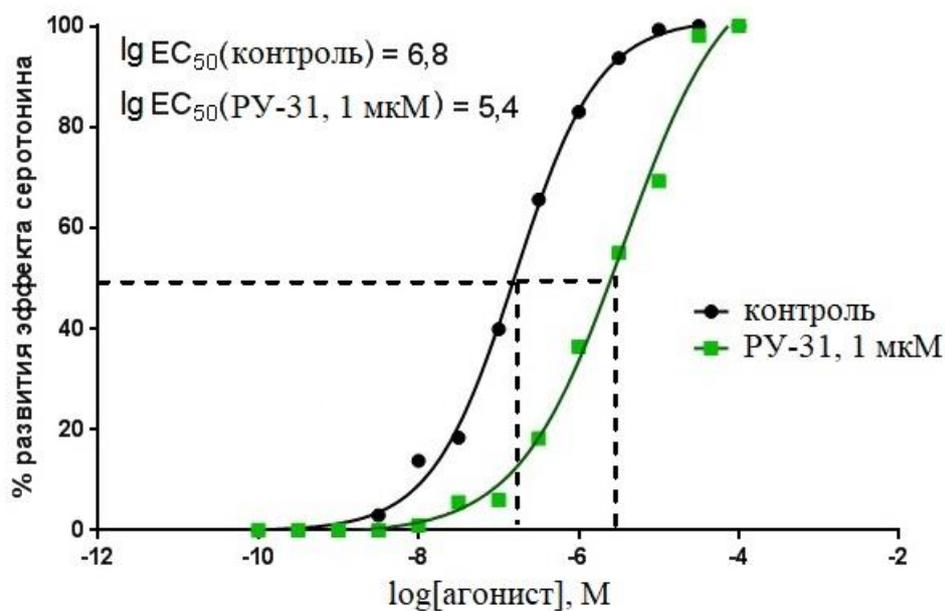


Рисунок 3.2 - Влияние соединения РУ-31 на выраженность серотонин-индуцированного спазма изолированного рога матки крыс

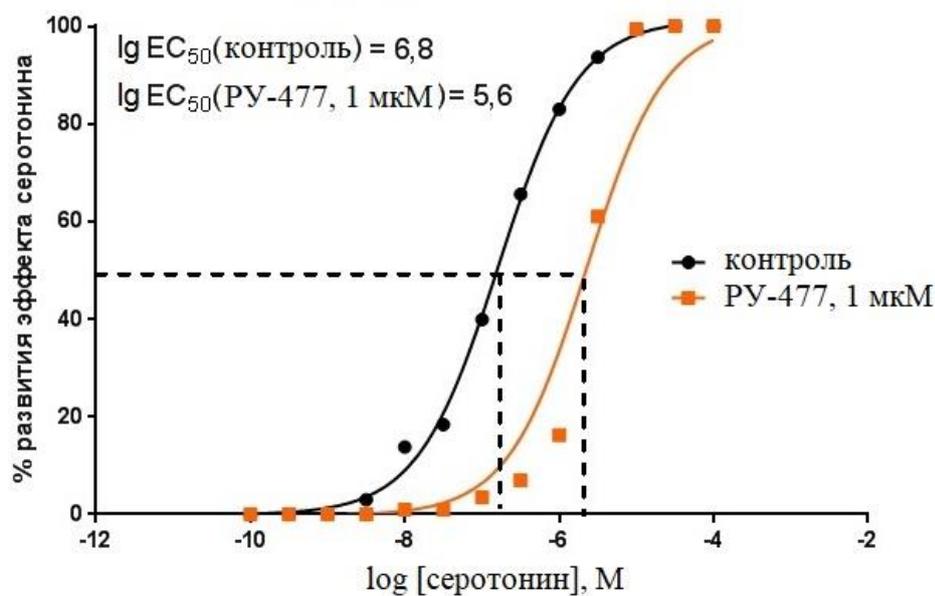


Рисунок 3.3 - Влияние соединения РУ-477 на выраженность серотонин-индуцированного спазма изолированного рога матки крыс

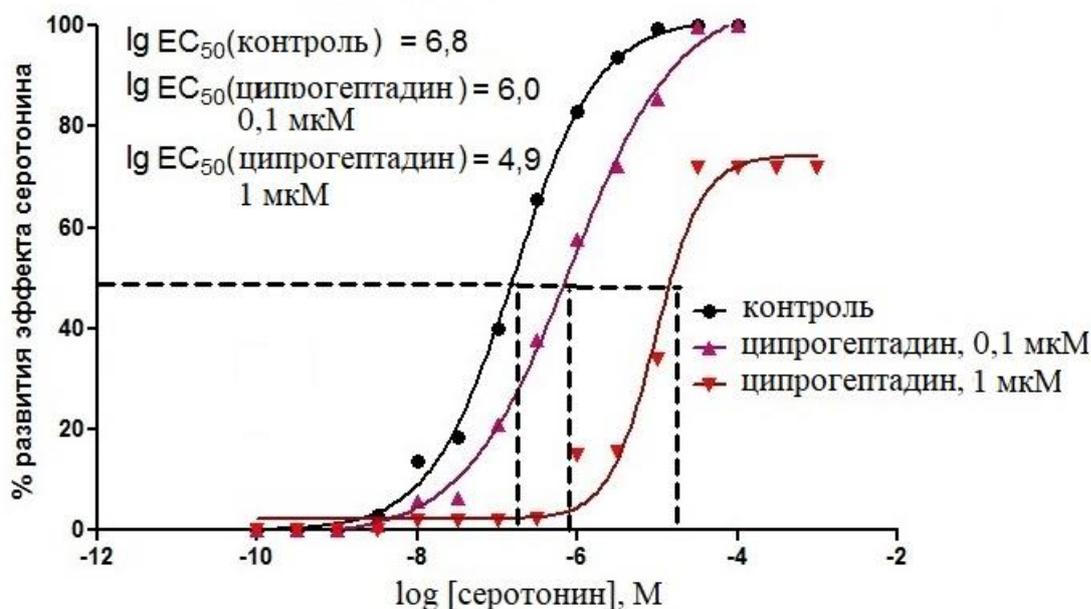


Рисунок 3.4 - Влияние ципрогептадина на выраженность серотонин-индуцированного спазма изолированного рога матки крыс

3.2. Заключение

В ходе проведенных исследований было выявлено, что все три соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола обладают высоким уровнем фармакологической активности. При сравнении 5-HT_{2A}-блокирующих свойств на модели серотонин-индуцированного сокращения рога матки крыс, наибольший уровень активности был зарегистрирован для соединения РУ-31 (дигидрохлорид). Помимо основных аспектов фармакологической активности, при дизайне молекулярной структуры нового соединения, в том, что касалось выбора противоиона, т.е. кислоты, для получения солевой формы из основной формы, принимались во внимание высокая стабильность аниона хлора к окислению, отсутствие у него существенного собственного фармакологического влияния, присущего, например бромиду иона, и в целом более высокая стабильность гидрохлоридов, в частности, по сравнению с нитратами, склонными, например, к фотодеградациии (Liu Y, 2007).

На основании имеющихся данных об уровне фармакологической активности и проведенных ранее токсикологических исследованиях на мышах (Мальцев Д.В., 2014) а также предполагаемых способах применения данного вещества и необходимости создания наиболее стойкой при длительном хранении субстанции, для дальнейших исследований было выбрано соединение РУ-31: дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА СОСУДИСТОЕ ЗВЕНО ПАТОГЕНЕЗА МИГРЕНИ

Среди основных теорий патогенеза мигрени одно из наиболее важных мест отводится сосудистой теории. В связи с этим, при разработке новых противомигренозных лекарственных средств большое внимание уделяется возможности регуляции тонуса экстракраниальных и интракраниальных сосудов (Р.С. Мирзоян и др., 2012).

4.1. Исследование влияния 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо [1,2 α]бензимидазола на изменение скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина

Для оценки влияния исследуемых соединений на тонус интракраниальных сосудов использовали модель серотонин-индуцированного спазма мозговых артерий (подробнее в Главе 2). В группе контроля при моделировании серотониновой нагрузки путем введения 20 мкг/кг серотонина внутривенно наблюдалось резкое снижение скорости кровотока в среднем на 40-50% относительно исходных показателей. Предварительная часовая инкубация соединения РУ-31 и ципрогептадина снижала вазоконстрикторную реакцию на серотонин. Данный эффект проявлялся дозозависимо (Таблица 4.1). При этом в высоких дозах (30, 20 и 15 мг/кг) статистически значимых различий между показателями группы соединения РУ-31 и группы ципрогептадина выявлено не было. В диапазоне доз 0,5 – 10 мг/кг для соединения РУ-31 характерна статистически более выраженная серотонин-блокирующая активность, значимо различающаяся с показателями активности ципрогептадина в эквимоллярных дозах.

Таблица 4.1 - Серотонин-блокирующая активность соединения РУ-31 и ципрогептадина в бассейне церебрального микроциркуляторного русла (M±m)

Исследуемое вещество	Доза/ эквимолярная доза для ципрогептадина	Подавление серотонин- опосредованного снижения скорости мозгового кровотока, Δ%
Соединение РУ-31	30 мг/кг	81,4±2,6
	20 мг/кг	76,4±3,6
	15 мг/кг	67,9±2,0
	10 мг/кг	60,4±2,4*
	5 мг/кг	38,9±1,0*
	0,5 мг/кг	12,9±3,3*
Ципрогептадин	30 мг/кг	77,7±1,6
	20 мг/кг	72,8±1,7
	15 мг/кг	68,3±2,6
	10 мг/кг	50,3±3,2
	5 мг/кг	22,4±2,2
	0,5 мг/кг	4,2±0,7

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимолярной дозе ($p < 0,05$).

По полученным данным для соединения РУ-31 и ципрогептадина были рассчитаны величины полуэффективных доз (ЕД₅₀) (Рисунок 4.1), которые в использованы во всех дальнейших тестах и моделях in vivo (Таблица 4.2).

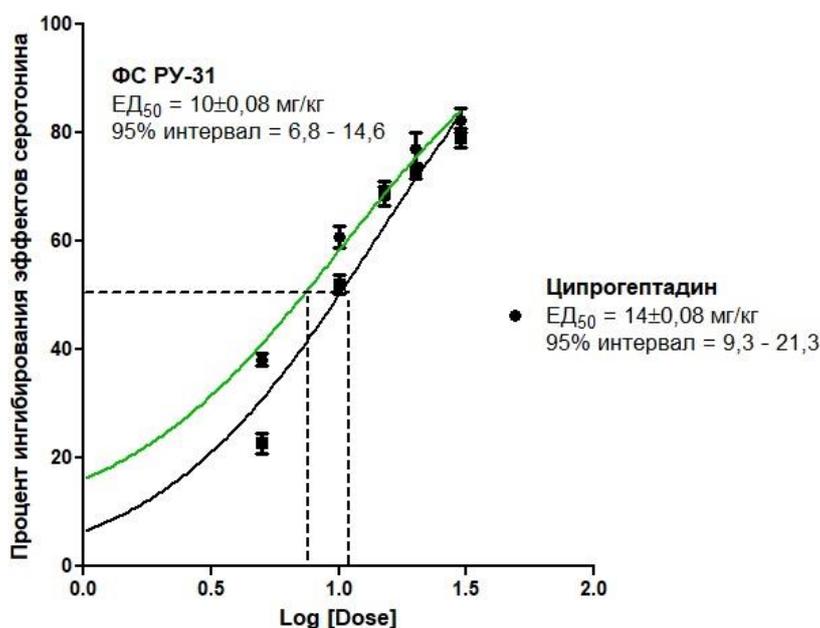


Рисунок 4.1 – кривая зависимости доза-эффект для соединения РУ-31 и ципрогептадина на модели снижения серотонин-опосредованного изменения скорости мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии

Таблица 4.2 - Эффективность противомигренозного действия соединения РУ-31 и препарата сравнения - ципрогептадина в условиях серотонин-опосредованного изменения скорости кровотока в бассейне средней мозговой артерии

Вещество	ЕД ₅₀
Соединение РУ-31	10 мг/кг
Ципрогептадин	14 мг/кг

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием методов нелинейного регрессионного анализа

4.2. Влияние соединения РУ-31 на изменение скорости кровотока в системе внутренней сонной артерии

При оценке влияния исследуемых соединений на состояние тонуса экстракраниальных сосудов использовался метод серотонин-опосредованного изменения скорости кровотока в системе внутренней сонной артерии (Р.С. Мирзоян и др., 2012) (подробнее в Главе 2).

В группе контроля при моделировании серотониновой нагрузки в системе внутренней сонной артерии путем введения 20 мкг/кг серотонина внутривенно

наблюдалось резкое снижение скорости кровотока. При этом реакция сосудистого русла внутренней сонной артерии была аналогичной реакции церебральных сосудов по времени развития реакции на серотонин (10-15 сек с момента введения), но меньше по выраженности спазма (25-30% от показателей исходного кровотока). Предварительная часовая инкубация исследуемых соединений снижала вазоконстрикторную реакцию на серотонин (Таблица 4.3). При этом статистически значимых различий между показателями соединения РУ-31 и ципрогептадина при обработке полученных данных выявлено не было.

Таблица 4.3 - Серотонин-блокирующая активность соединения РУ-31 и ципрогептадина в системе внутренней сонной артерии ($M \pm m$)

Вещество	Доза вещества	Ингибирующая активность, $\Delta\%$
Соединение РУ-31	10 мг/кг	49,01 \pm 6,2*
Ципрогептадин	14 мг/кг	48,30 \pm 6,5*

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*-изменение достоверно относительно показателей контроля ($p < 0,05$).

4.3. Заключение

Таким образом, для соединения РУ-31 была выявлена способность устранять нарушения гемодинамики, характерные для приступа мигрени, как в бассейне средней мозговой артерии, так и в системе внутренней сонной артерии, в условиях серотониновой нагрузки. При этом в бассейне церебрального микроциркуляторного русла для соединения РУ-31 характерно развитие стойкого антисеротонинового эффекта в области более низких доз, статистически значимо превосходящего показатели ципрогептадина. В диапазоне доз 15 – 30 мг/кг показатели серотонин-блокирующей активности соединения РУ-31 не уступают показателям препарата сравнения – ципрогептадина. В бассейне внутренней сонной артерии для соединения РУ-31 также был зафиксирован выраженный антисеротониновый эффект, не уступающий показателям ципрогептадина.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ТРОМБОЦИТАРНЫЕ ЗВЕНЬЯ ПАТОГЕНЕЗА МИГРЕНИ

В соответствии с тромбоцитарной теорией, мигрень вызывается первичной патологией тромбоцитов, при агрегации которых высвобождается значительное количество серотонина. Эта теория основывается на том факте, что тромбоциты больных мигренью имеют более выраженную способность к агрегации, чем у здоровых людей, и более чувствительны к факторам, провоцирующим высвобождение серотонина (Hanington E, 1981). Помимо этого, имеются доказательства повышенной спонтанной активности тромбоцитов как в период мигренозных атак, так и между приступами (Sarchielli, P 2001) за счет активации их серотонином и выброса в кровь целого ряда индукторов агрегации, таких как адреналин, АДФ и др.

В связи с этим ряд авторов предлагает использовать препараты, которые снижают агрегацию тромбоцитов, в частности нестероидные противовоспалительные средства, 5HT₂ антагонисты и бета-блокаторы, для профилактики мигрени.

При разработке новых кандидатов в противомигренозные препараты большое внимание уделяется исследованию их антитромбогенного и антитромбоцитарного профиля (Мирзоян и др., 2012).

Антитромбоцитарные свойства соединения РУ-31

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов *in vitro* изучалось по методу В.А. Габбасова (Габбасов В.А., 1989). В исследовании использовались образцы крови 12 кроликов, соединение РУ-31, ацетилсалициловая кислота и ципрогептадин изучались в концентрациях 0,1 - 100 мкмоль/л. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали специфический индуктор - серотонин, в концентрации 10 мкмоль/л, неспецифические индукторы агрегации: АДФ в концентрации 5 мкмоль/л, коллаген в концентрации 20 мкг/мл и адреналин

в концентрации 1 мкмоль/л, а также кальциевый ионофор A23187, в концентрации 3 мкмоль/л и ристоцетин в концентрации 1,25 мг/мл, отражающий взаимодействие фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib (подробнее в Главе 2).

5.1. Влияние изучаемых соединений на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов

При введении в кювету с плазмой серотонина изменялись показатели светопропускания, демонстрирующие интенсивность процессов агрегации тромбоцитов в кювете. После инкубации обогащенной тромбоцитами плазмы с соединением РУ-31 в концентрациях 0,1 мкМ-100 мкМ наблюдалось снижение выраженности агрегации. Для препарата сравнения – ципрогептадина была зарегистрирована значимая антиагрегантная активность во всем диапазоне исследуемых концентраций. При этом уровень антиагрегантного действия последнего был более низким, чем у соединения РУ-31 в эквимоллярных концентрациях ($p < 0,05$). В условиях серотонин-индуцированной агрегации для ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 0,1 – 1 мкМ не было выявлено действия, достоверно отличающегося от показателей контрольных измерений. В более высоких концентрациях 100 мкМ отмечалось наличие антиагрегантной активности, по уровню уступающей как соединению РУ-31, так и ципрогептадину в 2,2 и 1,3 раза соответственно. При этом во всем диапазоне исследуемых концентраций в данном тесте показатели активности ацетилсалициловой кислоты были статистически значимо более низкими, чем показатели соединения РУ-31 и ципрогептадина (Таблица 5.1). На основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 5,8.

Таблица 5.1 - Влияние исследуемых соединений на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (M±m)

Вещество/концентрация	Ингибирующая активность, Δ%			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	11,2±1,5	39,5±1,6°	65,8±3,4°	86,9±2,4°
Ципрогептадин	7,9±1,0	20,0±2,6*°	37,6±2,0*°	50,7±2,9*°
Ацетилсалициловая кислота	1,0±0,5*	3,3±0,9*#	9,8±1,4*#	37,8±2,5*#°

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

°-изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей РУ-31 в эквимолярной концентрации ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимолярной концентрации ($p < 0,05$).

5.2. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели АДФ- индуцированной агрегации тромбоцитов

Агрегация, индуцированная АДФ, является одним из наиболее распространенных методов оценки антитромбоцитарных эффектов веществ. При предварительной инкубации обогащенной тромбоцитами плазмы с соединением РУ-31 в диапазоне концентраций 10 мкМ- 100 мкМ наблюдалось снижение выраженности агрегации. В области более низких концентраций: 0,1 – 1 мкМ различий с показателями группы контроля выявлено не было ($p > 0,05$). Препарат сравнения – ципрогептадин проявил значимую антиагрегантную активность только в концентрации 100 мкМ. В более низких концентрациях, отличия от показателей контрольных проб выявлено не было. В условиях АДФ-индуцированной агрегации для ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 0,1 – 1 мкМ достоверных отличий от показателей контрольных измерений не наблюдалось. Наличие антиагрегантной активности для кислоты ацетилсалициловой было зафиксировано в более высоких концентрациях 10 мкМ - 100 мкМ, при этом, в концентрации 100 мкМ по уровню превосходящей РУ-31 в 1,2 раза и не уступающей показателям ципрогептадина. (Таблица 5.2). На

основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 5,7.

Таблица 5.2 - Влияние исследуемых соединений на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Вещество	Ингибирующая активность, $\Delta\%$			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	1,4 \pm 0,5	3,4 \pm 1,9	30,3 \pm 4,4# [°]	49,4 \pm 3,1*# [°]
Ципрогептадин	2,3 \pm 0,8	8,2 \pm 1,1	14,8 \pm 0,9*	68,8 \pm 4,2 [°]
Ацетилсалициловая кислота	1,0 \pm 0,3	12,9 \pm 2,2	25,6 \pm 2,3# [°]	60,3 \pm 3,2 [°]

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

[°]-изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей ацетилсалициловой кислоты в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

5.3. Исследование активности соединения РУ-31, ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой на модели адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов

Соединение РУ-31 в диапазоне концентраций 10 мкМ - 100 мкМ продемонстрировало способность статистически значимо снижать выраженность агрегации, индуцированной адреналином. В области более низких концентраций: 0,1 – 1 мкМ достоверных различий с показателями группы контроля выявлено не было. Препарат сравнения – ципрогептадин также проявил антиагрегантную активность в концентрациях 10 - 100 мкМ ($p < 0,05$). В более низких концентрациях, отличий от показателей контрольных проб выявлено не было. В условиях адреналин-индуцированной агрегации для ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 0,1 – 1 мкМ не было выявлено действия, значимо отличающегося от показателей контрольных измерений. В более высоких концентрациях 10 мкМ - 100 мкМ для кислоты ацетилсалициловой отмечалось

наличие антиагрегантной активности, при этом, в концентрации 10 мкМ достоверных различий с показателями РУ-31 не наблюдалось, а с показателями ципрогептадина были ($p < 0,05$). В концентрации 100 мкМ по уровню ингибирующей активности показатели ацетилсалициловой кислоты в 1,5 раза уступали показателям ципрогептадина, но не отличались от показателей РУ-31. (Таблица 5.3). На основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 4,8.

Таблица 5.3 - Влияние исследуемых соединений на адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Вещество	Ингибирующая активность, $\Delta\%$			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	1,6 \pm 0,4	10,9 \pm 1,0	27,0 \pm 2,8#°	66,0 \pm 3,3#°
Ципрогептадин	2,6 \pm 0,8	11,7 \pm 0,7	18,3 \pm 1,3°	88,6 \pm 2,9°
Ацетилсалициловая кислота	1,8 \pm 0,5	7,6 \pm 1,5	28,0 \pm 2,6#°	61,0 \pm 3,0#°

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

°-изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимолярной концентрации ($p < 0,05$).

5.4. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели коллаген- индуцированной агрегации тромбоцитов.

Коллаген является известным индуктором, введение которого в кювету сопровождается активацией процессов агрегации. В пробах с коллагеном в присутствии соединения РУ-31 в диапазоне концентраций 1 мкМ- 100 мкМ, наблюдалось статистически значимое снижение выраженности агрегации. В области более низких концентраций: 0,1 мкМ достоверных различий с показателями группы контроля выявлено не было. Препарат сравнения – ципрогептадин проявил антиагрегантную активность только в концентрации 100 мкМ ($p < 0,05$). В более низких концентрациях, значимого отличия от показателей контрольных проб зафиксировано не было. В условиях коллаген-индуцированной

агрегации для ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 1 – 100 мкМ были выявлены достоверные отличия от показателей контрольных измерений. При этом в данном диапазоне показатели ацетилсалициловой кислоты отличались от показателей РУ-31 и ципрогептадина ($p < 0,05$) (Таблица 5.4). На основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 4,7.

Таблица 5.4 - Влияние исследуемых соединений на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Вещество	Ингибирующая активность, $\Delta\%$			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	1,6 \pm 0,4	14,7 \pm 2,2* [°]	26,5 \pm 3,7* [#] [°]	76,1 \pm 6,4* [#] [°]
Ципрогептадин	0,9 \pm 0,2	4,7 \pm 2,1*	7,7 \pm 1,1*	56,3 \pm 6,0* [°]
Ацетилсалициловая кислота	6,6 \pm 1,3	26,2 \pm 2,3 [°]	63,1 \pm 3,5 [°]	93,5 \pm 1,0 [°]

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

[°]-изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей ацетилсалициловой кислоты в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

5.5. Влияние исследованных соединений на агрегацию тромбоцитов, вызванную ионофором кальция - A23187

После инкубации обогащенной тромбоцитами плазмы с соединением РУ-31 в диапазоне концентраций 1 мкМ- 100 мкМ наблюдалось снижение выраженности агрегации, индуцированной ионофором A23187 ($p < 0,05$). В области более низких концентраций: 0,1 мкМ достоверных различий с показателями группы контроля выявлено не было. Препарат сравнения – ципрогептадин также проявил значимую антиагрегантную активность в концентрациях 1 - 100 мкМ. В более низких концентрациях, отличия от показателей контрольных проб зафиксировано не было. В условиях A23187-индуцированной агрегации для ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 10 – 100 мкМ были выявлены различия с показателями

контрольных измерений ($p < 0,05$). При этом в исследуемом диапазоне концентраций, показатели ацетилсалициловой кислоты достоверно отличались от показателей РУ-31 и ципрогептадина только в концентрации 1 мкМ (Таблица 5.5). На основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 5,1.

Таблица 5.5 - Влияние исследуемых соединений на А23187-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Вещество	Ингибирующая активность, $\Delta\%$			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	3,2 \pm 0,6	17,2 \pm 1,7* $^\circ$	34,0 \pm 2,5 $^\circ$	65,6 \pm 2,6# $^\circ$
Ципрогептадин	9,5 \pm 1,2	19,1 \pm 3,6* $^\circ$	37,2 \pm 1,6 $^\circ$	54,6 \pm 2,6* $^\circ$
Ацетилсалициловая кислота	3,5 \pm 0,9	7,2 \pm 1,0	36,4 \pm 4,6 $^\circ$	73,4 \pm 2,7 $^\circ$

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

$^\circ$ -изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей ацетилсалициловой кислоты в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

5.6. Антитромбоцитарные свойства изучаемых соединений на модели ристоцетин- индуцированной агрегации тромбоцитов

Введение в кювету с плазмой ристоцетина сопровождалось изменением показателей светопропускания, демонстрирующих интенсивность процессов агрегации в кювете. При предварительной инкубации обогащенной тромбоцитами плазмы с РУ-31 в диапазоне концентраций 10 мкМ- 100 мкМ наблюдалось статистически значимое снижение выраженности агрегации. В области более низких концентраций: 0,1 мкМ достоверных различий с показателями группы контроля выявлено не было. Препарат сравнения – ципрогептадин также проявил антиагрегантную активность в концентрациях 10 - 100 мкМ ($p < 0,05$). В более низких концентрациях, достоверных отличий от показателей контрольных проб зафиксировано не было. В условиях ристоцетин-индуцированной агрегации для

ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 10 – 100 мкМ были выявлены значимые отличия от показателей контрольных измерений. При этом в исследуемом диапазоне концентраций, показатели ацетилсалициловой кислоты достоверно отличались от показателей РУ-31 и ципрогептадина только в концентрации 100 мкМ (Таблица 5.6). На основании полученных данных был рассчитан показатель отрицательного десятичного логарифма полуингибирующей концентрации для соединения РУ-31, который составил 4,5.

Таблица 5.6 - Влияние исследуемых соединений на ристоцетин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (M±m)

Вещество	Ингибирующая активность, Δ%			
	0,1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
Соединение РУ-31	1,5±0,3	4,3±0,5	16,4±2,2°	47,3±1,4*#°
Ципрогептадин	2,6±0,8	8,2±2,2	17,9±3,0°	91,8±2,9*°
Ацетилсалициловая кислота	1,6±0,4	2,4±0,5	13,8±2,2°	66,2±4,7°

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

°-изменение достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей ацетилсалициловой кислоты в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

#-изменение достоверно относительно показателей ципрогептадина в эквимольной концентрации ($p < 0,05$).

Антитромбогенные свойства соединения РУ-31

5.7. Влияние соединения РУ-31 на показатели тромбообразования, при поверхностной сосудистой аппликации хлорида железа III

При моделировании тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа, в группе контроля динамично снижались показатели линейной скорости кровотока, начиная со 2 минуты. Полная окклюзия сосуда наступала на 19,2±1,5 минуте. У животных, получавших РУ-31 этот показатель был на 31,2% выше. Для препарата сравнения – ципрогептадина - статистически значимых различий в показателе 100% окклюзии с группой контроля выявлено не было. При введении препарата сравнения – ацетилсалициловой кислоты отмечалось

значимое антитромбогенное действие: длительность развития полной окклюзии сосуда на 39,6% превосходила аналогичный показатель группы контроля (Таблица 5.7). При этом, во временной точке, соответствующей 50% окклюзии, только для группы ацетилсалициловой кислоты были выявлены статистически значимые различия с показателями группы контроля. Во временных точках развития 90 и 95% окклюзии сосуда, значимые различия с показателями группы контроля были выявлены для соединения РУ-31 и ацетилсалициловой кислоты.

Таблица 5.7 - Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина на тромбообразование, индуцированное поверхностной аппликацией хлорида железа III ($M \pm m$)

Снижение скорости кровотока, %	Группа			
	Контроль, мин.	Соединение РУ-31, мин.	Ципрогептадин, мин.	Ацетилсалициловая кислота, мин.
50%	8,2±0,2	9,3±1,4	9,1±1,0	16,5±1,9*°#
90%	12,5±1,0	18,4±0,5*#	15,0±0,9	20,0±1,2*#
95%	14,0±1,3	21,5±1,0*#	17,0±1,1	21,0±1,0*#
100%	19,2±1,5	25,2±0,8*#	20,4±1,2	26,8±1,0*#

Примечание: Статистическая обработка GraphPadPrismv.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*- изменение достоверно относительно показателей группы контроля ($p < 0,05$).

#- изменение достоверно относительно показателей группы ципрогептадина ($p < 0,05$).

°- изменение достоверно относительно показателей группы соединения РУ-31 ($p < 0,05$).

5.8. Влияние соединения РУ-31 на показатели тромбоза, индуцированного анодным током

При моделировании тромбоза, индуцированного анодным током, в группе контроля динамично снижались показатели линейной скорости кровотока, начиная со 2 минуты. Полная окклюзия сосуда наступала на 13,0 минуте. Для соединения РУ-31 и ципрогептадина этот показатель был на 36,9% и 24,6% выше, чем в группе контроля соответственно. Препарат сравнения – ацетилсалициловая кислота проявил значимую антитромбогенную активность, на 123% превосходя показатель полной обтурации сосуда в группе контроля (Таблица 6.8). При этом и

соединение РУ-31, и ципрогептадин статистически значимо уступали показателям ацетилсалициловой кислоты во всех контрольных точках развития окклюзии, статистически значимых различий между этими двумя группами выявлено не было.

Таблица 5.8 - Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина на показатели тромбообразования, индуцированного анодным током ($M \pm m$)

Снижение скорости кровотока, %	Группа			
	Контроль, мин.	Соединение РУ-31, мин.	Ципрогептадин, мин.	Ацетилсалициловая кислота, мин.
50%	6,5±0,5	9,8±1,3*	9,3±0,6*	21,8±0,7*°#
90%	9,0±0,4	14,0±1,4*	12,3±0,6*	25,8±0,8*°#
95%	9,8±0,4	15,5±1,4*	13,4±0,6*	27,2±1,0*°#
100%	13,0±0,7	17,8±1,1*	16,2±1,0*	29,0±0,8*°#

Примечание: Статистическая обработка GraphPadPrism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*- изменение достоверно относительно показателей группы контроля ($p < 0,05$).

#- изменение достоверно относительно показателей группы ципрогептадина ($p < 0,05$).

°- изменение достоверно относительно показателей группы РУ-31 ($p < 0,05$).

5.9. Заключение

В ходе проведенной серии экспериментов, для соединения РУ-31 выявлено наличие значимой антиагрегантной активности в условиях моделирования серотонин-индуцированной агрегации *in vitro*, превосходящей показатели препаратов сравнения: ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой. С неспецифическими индукторами: при моделировании АДФ-индуцированной агрегации и адреналин-индуцированной агрегации *in vitro* для соединения РУ-31 была установлена антиагрегантная активность в концентрациях 10-100 мкМ, при этом уступающая показателям препаратов сравнения. При моделировании коллаген-индуцированной агрегации и А23187-индуцированной агрегации, для соединения РУ-31 была зафиксирована значимая ингибирующая активность в более широком диапазоне: 1-100 мкМ, при этом в условиях коллаген-индуцированной агрегации, в концентрации 100 мкМ достоверно превышающая

показатели ципрогептадина и не отличающаяся от показателей кислоты ацетилсалициловой. При исследовании влияния соединения РУ-31 на кальциевый ток в условиях агрегации индуцированной кальциевым ионофором - А23187 показатели опытной группы не уступали показателям препаратов сравнения во всем изучаемом диапазоне, но выраженное антиагрегантное действие для всех трех групп проявляется только в высоких концентрациях, что вероятнее всего, как и в случае с неспецифическими индукторами может свидетельствовать не о прямом, а об опосредованном влиянии на процессы агрегации. На модели ристоцетин-индуцированной агрегации соединение РУ-31 не проявило значимую антиагрегантную активность что дает возможность предположить, что данное вещество не оказывает влияния на связывание фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib.

Помимо этого, в результате проведенных исследований при формировании тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), действие РУ-31 превосходит показатели препарата сравнения – ципрогептадина в точке 90, 95 и 100% окклюзии, и не уступает действию ципрогептадина при моделировании тромбоза, индуцированного анодным током. При этом оба тестируемых образца статистически значимо уступают показателям препарата сравнения ацетилсалициловой кислоте в точке 50% окклюзии, на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), и во всех контрольных точках на модели тромбоза, индуцированного анодным током.

Таким образом, на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), РУ-31 проявляет значимый эффект в период наиболее выраженного формирования окклюзии, демонстрируя различия с показателями группы контроля в точках 90, 95 и 100% окклюзии.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МИГРЕНИ

В развитии мигренозного приступа немаловажное значение отводится ряду нейромедиаторных систем, в частности серотониновой системе (см. Главу 1). При исследовании новых соединений с противомигренозным профилем необходимым становится оценка возможного влияния данных соединений на различные медиаторные системы мозга *in vitro* и *in vivo* (Р.С. Мирзоян, 2012). Для соединения РУ-31 в ранее проведенных исследованиях (см. Главу 3) была показана блокирующая активность в отношении 2А подтипа серотониновых рецепторов. На следующем этапе возникла необходимость изучить возможность взаимодействия данного вещества с другими нейромедиаторными системами. Учитывая наличие у ряда известных и показавших эффективность в клинической практике противомигренозных препаратов гистаминергической (ципрогептадин), ГАМК-ергической (диазепам) или холинергической активности (атропин), при разработке новых соединений необходимо изучить возможность влияния на данные виды рецепторных систем в условиях *in vitro* и *in vivo*.

6.1. Исследование нейротропного рецепторного профиля соединения РУ-31 *in vitro*

Гистаминергическая активность соединения РУ-31

Влияние на гистаминовые рецепторы характерно для ряда лекарственных средств, применяемых в терапии мигренозных приступов, таких как ципрогептадин и пизотифен, и может стать причиной развития ряда побочных эффектов, таких как седация, ulcerогенный и кардиотоксический эффекты (Liu H.Y, 2018). В связи с этим, оценка возможности влияния нового соединения на гистаминовые рецепторы является необходимым этапом, при разработке новых противомигренозных агентов.

На 1 этапе проводилось изучение H_1 -гистаминблокирующей активности соединения РУ-31 на изолированной подвздошной кишке крыс (см. Главу 2). В ходе исследования было установлено, что в группе контроля, при введении гистамина в кювету с подвздошной кишкой крыс наблюдался выраженный спазмогенный эффект. При исследовании активности соединения РУ-31, в концентрации 1 мкМ, достоверного изменения спазмогенной активности вызванной гистамином не наблюдалось ($p < 0,05$). При предварительной инкубации в кювете хлоропирамина гидрохлорида в концентрации 1 мкМ наблюдалось снижение выраженности гистамин-индуцированного спазма кишки, при этом различия с показателями контрольных проб были статистически значимы и превосходили показатели ингибирующей активности соединения РУ-31 в 16,8 раз (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 - H_1 -гистаминергическая активность соединения РУ-31 и хлоропирамина гидрохлорида, в условиях тест-системы изолированной подвздошной кишки морских свинок ($M \pm m$)

Вещество	Концентрация	Ингибирующая активность, $\Delta\%$
Соединение РУ-31	1 мкМ	$1,8 \pm 0,5^*$
Хлоропирамина гидрохлорид		$30,4 \pm 2,7^\circ$

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса

$^\circ$ -изменение достоверно относительно показателей контрольных проб ($p < 0,05$)

*-изменение достоверно относительно показателей хлоропирамина гидрохлорида 1 мкМ ($p < 0,05$).

Таким образом, в концентрации, в которой соединение РУ-31 проявляет значимую 5-HT_{2A}-серотонин блокирующую активность (см. Главу 4), H_1 -гистаминергической активности зарегистрировано не было.

Серотонинергическая активность соединения РУ-31

Принимая во внимание наличие 7 подтипов серотониновых рецепторов, контролирующих различные функции в ЦНС, и широко представленных в

различных отделах мозга, при детализации нейротропного механизма действия нового соединения необходимо изучать селективность антисеротонинового действия.

В связи с этим, на 2 этапе оценивалась 5-НТ₃-блокирующая активность соединения РУ-31. В ходе проведенного исследования было показано, что соединение РУ-31 в концентрации 1 мкМ, являющейся среднеэффективной для его 5-НТ_{2А}-блокирующей активности, не оказывает выраженного влияния на 3 подтип серотониновых рецепторов, значимо уступая показателям препарат сравнения – ондансетрона (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 - 5-НТ₃-серотонинергическая активность соединения РУ-31 и ондансетрона, в условиях тест-системы изолированной подвздошной кишки морских свинок (M±m)

Вещество	Концентрация	Ингибирующая активность, Δ%
Соединение РУ-31	1 мкМ	10,0±1,8*°
Хлоропирамина гидрохлорид		80,7±1,6°

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием t-теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса. °-изменение достоверно относительно показателей контрольных проб (p<0,05). *-изменение достоверно относительно показателей ондансетрона 1 мкМ (p<0,05).

На 3 этапе оценивалась 5-НТ₄-агонистическая активность соединения РУ-31. В ходе проведенного исследования было показано, что соединение РУ-31 в концентрации 1 мкМ, являющейся среднеэффективной для его 5-НТ_{2А}-блокирующей активности, не оказывает выраженного влияния на 4 подтип серотониновых рецепторов, значимо уступая показателям препарат сравнения – ML-10302 (Таблица 6.3).

Таблица 6.3 - 5-HT₄-серотонинергическая активность соединения РУ-31 и ML-10302, в условиях тест-системы изолированного пищевода крыс (M±m)

Вещество	Концентрация	Ингибирующая активность, Δ%
Соединение РУ-31	1 мкМ	2,3±0,3 *
Хлоропирамина гидрохлорид		45,6±6,9°

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием t-теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса. °-изменение достоверно относительно показателей контрольных проб ($p < 0,05$). *-изменение достоверно относительно показателей ML-10302 1 мкМ ($p < 0,05$).

Холинергическая активность соединения РУ-31

Учитывая имеющиеся данные о вовлеченности холинергической системы в регуляцию развития мигренозных приступов посредством М-холинорецепторов (Амелин А.В., 2014), при исследовании рецепторного профиля новых соединений с противомигренозным профилем необходимо оценивать возможность их влияния на М-холинорецепторы *in vitro*.

М-холиноблокирующая активность соединения РУ-31 изучалась на изолированной подвздошной кишке морских свинок (см. Главу 2). В ходе исследования было установлено, что в группе контроля, при введении ацетилхолина в ванночку с подвздошной кишкой крыс наблюдался выраженный спазмогенный эффект. После предварительной, 3-х минутной инкубации соединения РУ-31, в концентрации 1 мкМ, наблюдалось достоверное изменение спазмогенного ответа изолированной подвздошной кишки на введение ацетилхолина в сравнении с показателями активности группы контроля. В более низких концентрациях – 10 нМ – 0,1 мкМ М-холиноблокирующих свойств для соединения РУ-31 выявлено не было. При увеличении концентрации до 10 мкМ наблюдалось усиление ингибирующей активности соединения РУ-31, но уступающей показателям препарата сравнения – атропина (Таблица 6.4).

На основании полученных данных была построена кумулятивная кривая зависимости «концентрация – эффект» и рассчитана величина отрицательного

десятичного логарифма величины полуингибирующей (pIC_{50}) для соединения РУ-31, которая составила $5,12 \pm 0,9$ (Рисунок 6.1).

Таблица 6.4 - М-холинергическая активность соединения РУ-31 и атропина, в условиях тест-системы изолированной подвздошной кишки крыс ($M \pm m$)

Вещество	Концентрация	Ингибирующая активность, $\Delta\%$
Соединение РУ-31	10 нМ	$0,4 \pm 0,1^*$
	0,1 мкМ	$2,0 \pm 0,4^*$
	1 мкМ	$15,4 \pm 1,4^{*\circ}$
	10 мкМ	$70,0 \pm 1,9^{*\circ}$
атропин	1 мкМ	$55,0 \pm 1,9^\circ$
	10 мкМ	$86,0 \pm 2,2^{*\circ}$

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

$^\circ$ -изменение достоверно относительно показателей контрольных проб ($p < 0,05$).

*-изменение достоверно относительно показателей атропина 1 мкМ ($p < 0,05$)

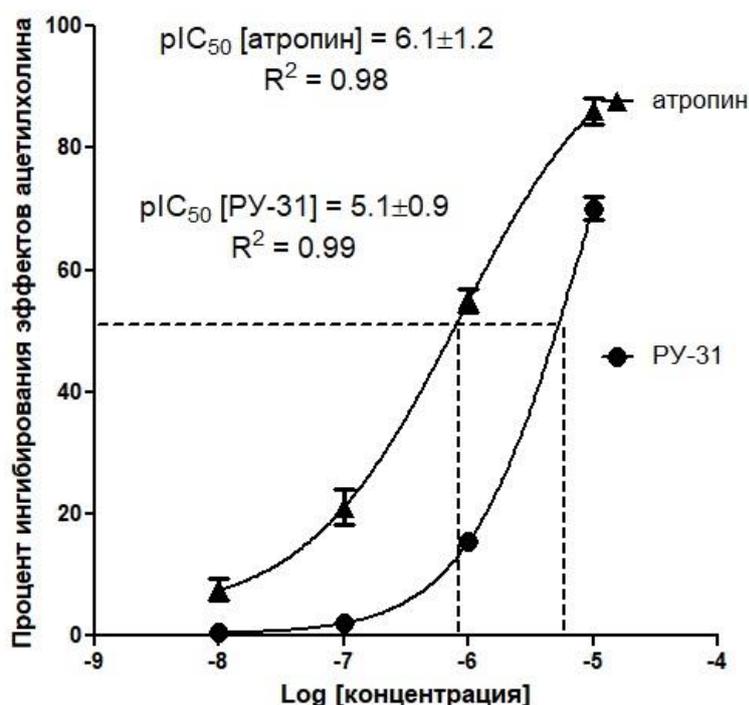


Рисунок 6.1. Влияние соединения РУ-31 и атропина на ацетилхолин-индуцированный спазм изолированной подвздошной кишки крыс

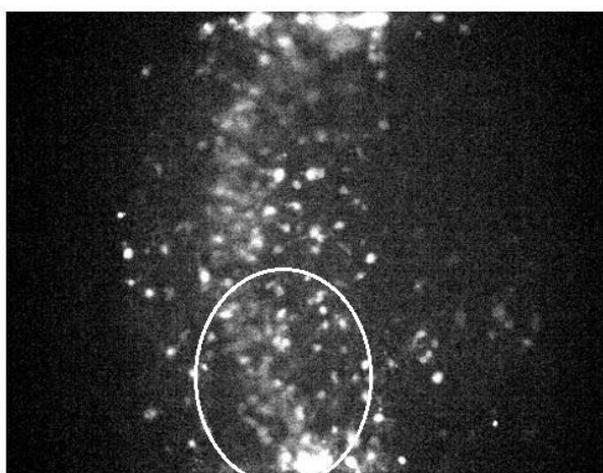
Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что для соединения РУ-31 характерно наличие М-холиноблокирующих свойств, но уступающих препарату сравнения – атропину. При этом величина pIC_{50} для изучаемого соединения в 10 раз выше, чем для атропина.

ГАМК-ергическая активность соединения РУ-31

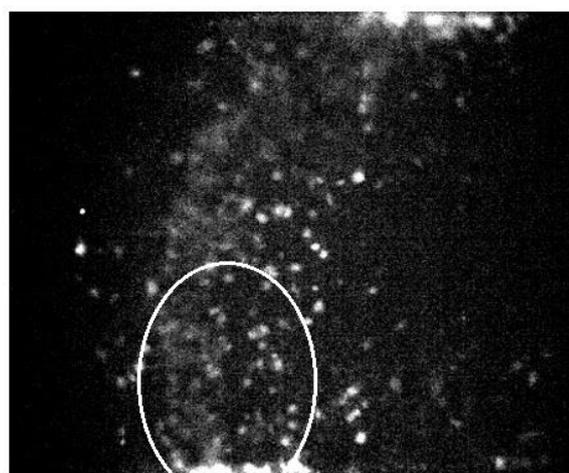
5-гидрокситриптамин при введении способен усиливать ГАМКергическую синаптическую активность, регистрируемую в пирамидных нейронах области СА1 гиппокампа (R-Y. Shen, 1998). Предыдущие исследования связывали этот эффект с активацией 5-НТ-3 рецепторов, расположенных на интернейронах. Однако во время ряда экспериментов было выявлено, что серотонин увеличивает ГАМКергическую синаптическую активность после полной блокады 5-НТ3 рецепторов. В ходе дальнейших исследований было выявлено, что схожий с серотином эффект в СА1 зоне гиппокампа может провоцировать селективный агонист 2 типа рецепторов - DOI (R-Y. Shen, 1998). В связи с этим, СА1 зона гиппокампа является ключевой зоной для исследования 5-НТ2 активности новых соединений. Помимо этого, учитывая наличие Шафферовских коллатералей между СА3 и СА1 зонами гиппокампа, для детализации зон, зависимых от активности 5-НТ_{2A} - рецепторов была проведена Ca^{2+} -визуализация.

Исследование влияния соединения РУ-31 на Ca^{2+} -зависимую флуоресценцию различных зон гиппокампа методами Ca^{2+} - визуализации

В ходе проведенного исследования было показано, что при добавлении в ванночку с живыми срезами гиппокампа крыс, возраста P8 наблюдалось снижение флуоресценции пирамидных клеток СА1 и СА3 и интернейронов границы молекулярного и радиального слоев (Рисунок 6.2).



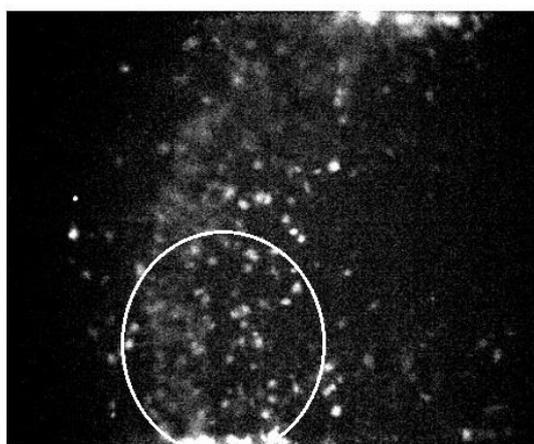
флуоресценция до введения серотонина



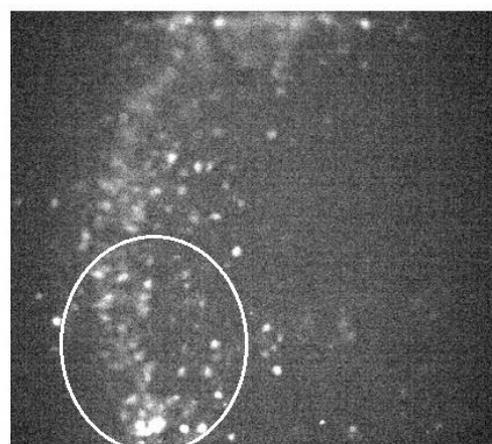
флуоресценция после введения серотонина (5 мкМ)

Рисунок 6.2. Влияние серотонина на Ca^{2+} -зависимую флуоресценцию различных зон гиппокампа. (Белым цветом выделена СА1 область, в которой регистрировалось наибольшее изменение функциональной активности нейроцитов)

При этом, добавление соединения РУ-31 в эквимольной серотонину концентрации (5 мкМ) вызывало усиление Ca^{2+} -зависимой флуоресценции данных участков, даже в присутствии серотонина (Рисунок 6.3), особенно в СА1 и СА3 зонах, что может свидетельствовать, что именно данные зоны в наибольшей степени регулируют свою активность посредством $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -рецепторов.



флуоресценция после введения серотонина (5 мкМ)



флуоресценция после введения серотонина (5 мкМ) в присутствии соединения РУ-31 (5 мкМ)

Рисунок 6.3. Влияние соединения РУ-31 на серотонин-опосредованное изменение Ca^{2+} -зависимой флуоресценции различных зон гиппокампа. (Белым

цветом выделена CA1 область, в которой регистрировалось наибольшее изменение функциональной активности нейроцитов).

Таким образом в зонах CA1 и CA3 гиппокампа были выбраны в качестве тест-систем для дальнейшего исследования гиппокампальных эффектов изучаемого вещества.

Серотонин является одним из ключевых нейротрансмиттеров в ЦНС и опосредует свои функции через 7 типов рецепторов. Почти все подтипы рецепторов серотонина экспрессируются в гиппокампе, локализуясь как аутоинаптически, пресинаптически и постинаптически, так и колокализуясь в одной и той же клетке, и формируя сложную модулирующую систему (L. C. Vegnen, 2012). Учитывая вовлеченность гиппокампальной формации в патогенез мигренозного процесса (Liu H.Y, 2018) а также вовлеченность ГАМК системы в регуляцию сосудистого тонуса мозга и формирование приступов головных болей (P.C. Мирзоян, 2018) необходимо детализовать ГАМК-миметический механизм действия соединения РУ-31 и возможность его опосредования серотониновой системой.

Исследование влияния соединения РУ-31 функциональную активность нейроцитов в CA1 и CA3 зонах гиппокампа

На первом этапе оценивалась возможность собственного влияния соединения РУ-31 на функциональную активность мозга при внутриклеточной регистрации токов в CA1 и CA3 зонах гиппокампа. В ходе проведенных экспериментов статистически значимого различия между показателями интенсивности появления ГАМК-индуцированных токов в контрольных измерениях и в присутствии соединения РУ-31 выявлено не было (Таблица 6.5)

Таблица 6.5 – Влияние соединения РУ-31 на частоту появления ГАМК-токов в СА1 и СА3 зонах гиппокампа ($M \pm m$)

Соединение	Концентрация	СА1	СА3
Соединение РУ-31	1 мкМ	5,2±3,1	4,7±0,9
	5 мкМ	8,1±4,4	11,2±4,7

Таким образом, в ходе данного исследования не было выявлено влияния соединения РУ-31 на активность генерации потенциалов действия в СА1 и СА3 зонах гиппокампа, что может свидетельствовать об отсутствии его значимого влияния на активность ГАМК-ергической системы в исследованных концентрациях.

Исследование влияния соединения РУ-31 и ципрогептадина на СА1 зону гиппокампа в условиях серотониновой нагрузки

При перфузионной подаче высокой концентрации серотонина (5 мкМ) в ванночку со срезами мозга крыс возрастом 5 - 15 дней, наблюдалось увеличение частоты появления ГАМК-индуцированных токов, в 1,5 – 8,7 раз. После предварительной инкубации соединения РУ-31 или ципрогептадина, регистрировалось снижение выраженности ответа на серотонин пирамидных клеток СА1 зоны гиппокампа крыс в диапазоне концентраций 0,5 – 5 мкМ. При этом значимых различий в изучаемых концентрациях между соединением РУ-31 и ципрогептадином получено не было (Таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Влияние соединения РУ-31 на частоту появления ГАМК-токов в зонах СА1 и СА3 гиппокампа ($M \pm m$).

Концентрация изучаемых веществ	Изменение частоты в присутствии ципрогептадина, Δ %	Изменение частоты в присутствии соединения РУ-31, Δ %
5 мкМ	31,65 ± 4,51*	29,59 ± 7,17*
1 мкМ	43,66 ± 10,36*	64,59 ± 9,7*
0.5 мкМ	45,58 ± 9,35*	47,4 ± 5,8*

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*-изменение достоверно относительно показателей контрольных проб с серотонином ($p < 0,05$).

Таким образом, 5-НТ_{2А} – антагонисты, соединения РУ-31 и ципрогептадин при введении, приводили к значимому снижению ответа пирамидных клеток СА1 зоны гиппокампа на действие серотонина. Различий между разными концентрациями получено не было, так как различные пирамидные клетки получают разное количество синаптических входов от интернейронов, расположенных на границе молекулярного и радиального слоев (Wyskiel D.R., 2016), на которых в большей степени экспрессированы 5-НТ_{2А}-рецепторы и в связи с этим, вклад 5-НТ_{2А}-звена в модуляцию серотонин-опосредованного ответа на различных клетках был неоднороден.

Амплитудные эффекты серотонина в большей степени ингибировались соединением РУ-31, так как сохранялись в концентрации 1 мкМ и 0,1 мкМ. Для препарата сравнения – ципрогептадина, выраженный эффект на амплитуду токов индуцированных серотонином присутствовал только в концентрации 5 мкМ (Рисунок 6.4, Рисунок 6.5).

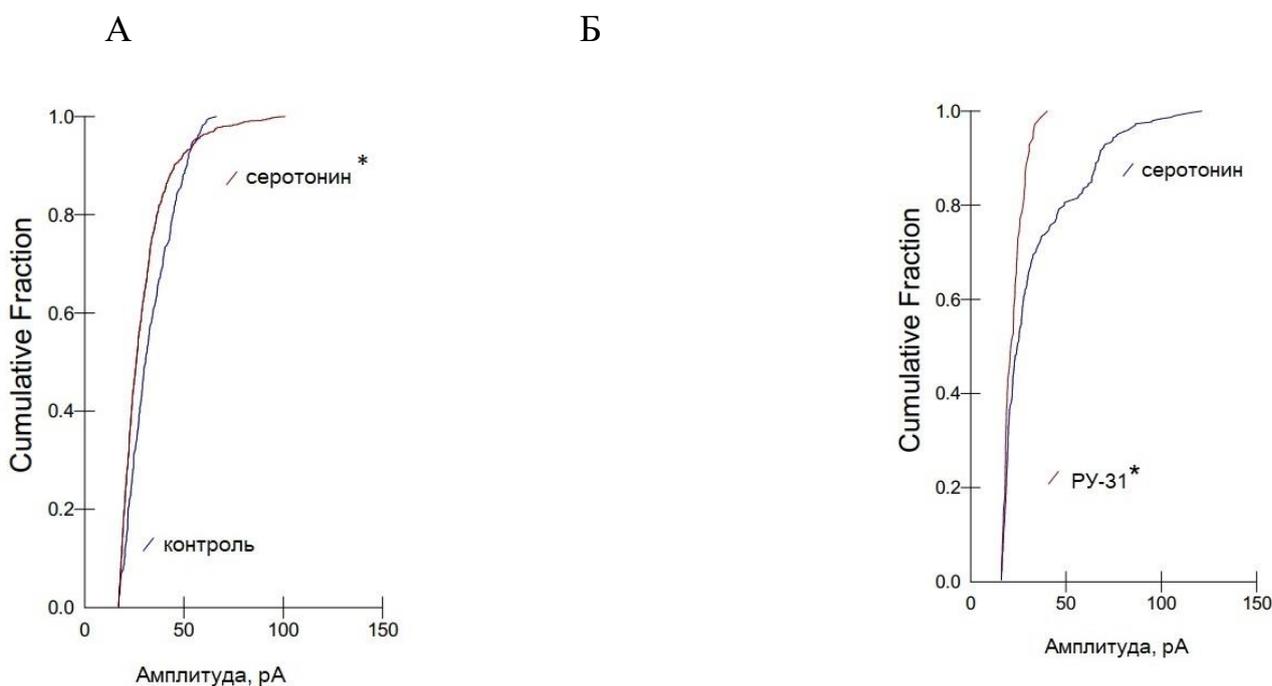


Рисунок 6.4. Влияние соединения РУ-31 (1 мкМ) на амплитуду вызванных серотонином ГАМК-токов.

* - различие статистически значимо относительно показателей контроля (А) или серотонина (Б) ($p < 0,05$), тест Колмогорова-Смирнова.

При этом для препарата сравнения – ципрогептадина, значимое ингибирование амплитудных эффектов серотонина наблюдалось в концентрации 5 мкМ.

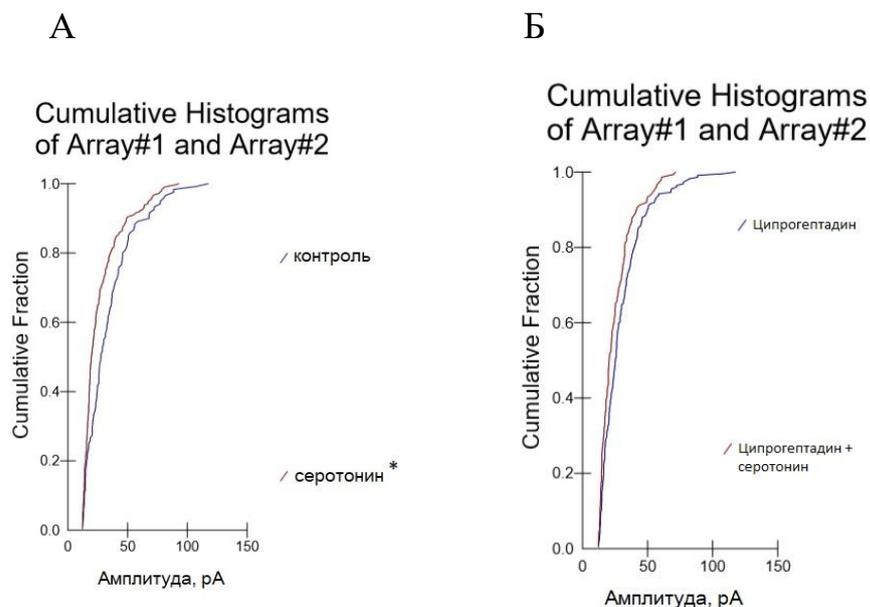


Рисунок 6.5. Влияние ципрогептадина на амплитуду вызванных серотонином ГАМК-токов.

* - различие статистически значимо относительно показателей контроля (А) или ципрогептадина (Б) ($p < 0,05$), тест Колмогорова-Смирнова.

Исследование влияния соединения РУ-31 и ципрогептадина на полевую активность в СА3 зоне гиппокампа в условиях серотониновой нагрузки.

На развивающемся мозге крыс, в среднем до возраста P10-P13 ГАМК способна оказывать деполяризующий эффект на нейроны. При достижении возраста P15 и далее, мозг крыс сформирован уже приблизительно ко взрослому функционированию и с возраста P20, функционирует как у взрослых особей, где ГАМК играет роль только в процессах реполяризации (Khazipov R.N., 2014).

В ходе проведенных исследований было показано, что серотонин при введении способен усиливать ГАМК-опосредованную синаптическую активность, на развивающемся мозге (возраст до P13) и наоборот, показывает ингибирующее действие на зрелом мозге (возраст от P24 и старше). При этом, под действием соединения РУ-31, серотонин-индуцированное увеличение нейрональной

активности у развивающегося мозга снижается, а у зрелого мозга повышается, значительно выше, чем в показателях контрольных групп (Рисунок 6.6).

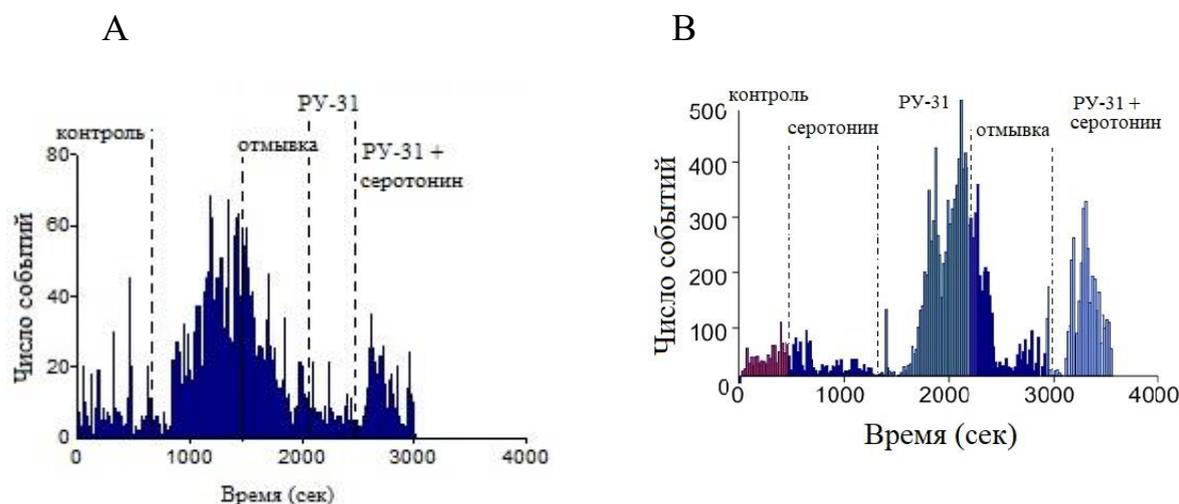


Рисунок 6.6. Влияние соединения РУ-31 на серотонин-опосредованное изменение активности нейронов в СА3 зоне гиппокампа молодого мозга (А) и взрослого мозга (В). Данные представлены в виде усредненных значений на 20-и секундном интервале.

Таким образом, было показано, что активность ГАМК системы гиппокампальной формации находится в тесной взаимосвязи с активностью серотониновой системы. На основании данных, полученных при полевой регистрации потенциалов на различных этапах формирования мозга можно предположить о различных эффектах серотонина на разных возрастах, что, вероятнее всего, связано с различием в функционировании ГАМК-системы в этих временных промежутках. На развивающемся мозге введение серотонина сопровождается усилением ГАМК-активности и десинхронизирующему действию на пирамидных клетках СА1 зоны, в то время, как на сформированном мозге введение серотонина вызывает транзиторное возбуждение с последующим снижением нейрональной активности гиппокампальной формации. Соединение РУ-31 способно устранять десинхронизирующее действие серотонина на нейроны мозга крыс на всех этапах развития головного мозга.

6.2. Центральные нейротропные эффекты соединения РУ-31 in vivo

Серотонинергическая активность соединения РУ-31 на модели гиперкинеза, вызванного 5-гидрокситриптофаном

5-гидрокситриптофан при внутрибрюшинном введении провоцирует возникновение гиперкинезии у экспериментальных животных, которая проявлялась в периодических встряхиваниях (твитчингах) головой. В контрольной группе животных максимальное количество встряхиваний головой отмечалось на 20 минуте после введения 5-ГТФ и превышало результаты в других группах минимум в 1,2 раза (Таблица 6.7). В дальнейшем уровень гиперкинеза снижался.

В тесте «5-ГТФ гиперкинез» у крыс, получавших соединение РУ-31, достоверно снижалось количество встряхиваний головой, отражающее уровень гиперкинеза животных. Так, в опытной группе (соединение РУ-31, 10 мг/кг), начиная с 10 минуты после введения 5-ГТФ, достоверно снижались эффекты 5-гидрокситриптофана более чем в 2,5 раза. Полученные данные согласуются с ранее полученными данными о 5-НТ_{2A}-рецепторной активности соединения РУ-31, так как возбуждение 5-НТ_{2A}-подтипов рецептора, в основном, и приводит, к развитию данного феномена.

Таблица 6.7 – Влияние соединения РУ-31 на гиперкинез, вызванный 5-ГТФ в дозе 300 мг/кг (M±m)

		Количество встряхиваний головой в течение минуты					
№ п/п	Группа	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин
1	Контроль 5-ГТФ (300 мг/кг)	2,5±0,2	7,0±0,4	8,16±0,5	2,6±0,3	1,8±0,5	0,8±0,3
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + 5-ГТФ (300 мг/кг)	1,0±0,4*	2,7±0,8*	3,2±0,7*	1,0±0,3*	0,3±0,2*	0,0±0,0

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.
* – различия достоверны относительно показателей группы контроля (p<0,05).

Таким образом, на модели «5-ГТФ гиперкинез» было выявлено центральное серотонин-блокирующее действие соединения РУ-31.

Влияние соединения РУ-31 на выраженность судорог, вызванных пикротоксином у мышей

В ходе настоящего экспериментального исследования было показано, что пикротоксин в дозе 2,5 мг/кг опосредует возникновение судорог и тремора. Время возникновения тремора составляло ~ 3 минуты. Первый приступ клонических судорог (время возникновения судорог) у мышей в контрольной группе в среднем возникал через 10 минут после введения пикротоксина. За период наблюдения в контрольной группе количество судорожных приступов составило около $4,9 \pm 0,6$ раза (Таблица 6.8).

В группе, которой предварительно вводили соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, отмечалось достоверное увеличение времени развития как тремора, так и приступа судорог. Так, время возникновения тремора превосходило более, чем в 2 раза аналогичный показатель контрольной группы, а время наступления судорог – более чем в 3 раза. У животных опытной группы также отмечалось снижение количества судорожных припадков в 5,4 раза.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что соединение РУ-31 в изученной дозе обладает способностью снижать судорожный эффект пикротоксина.

Таблица 6.8 – Влияние соединения РУ-31 на судороги, вызванные пикротоксином в дозе 2,5 мг/кг ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Время развития тремора, мин	Время развития судорог, мин	Количество судорожных приступов
1	Контроль пикротоксин (2,5 мг/кг)	3,0±0,3	10,1±0,4	4,9±0,60
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + пикротоксин (2,5 мг/кг)	6,2±0,4**	30,8±6,6*	0,9±0,23**

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием непарного *t*-теста Стьюдента

* – различия достоверны относительно показателей группы контроля ($p < 0,005$)

** – различия достоверны относительно показателей группы контроля ($p < 0,0001$).

Таким образом, на основании данных, полученных в тесте пикротоксиновых судорог можно предположить ГАМК-миметическое действие соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг.

Холинергическая активность соединения РУ-31 на модели ареколинового тремора

На данном этапе было изучено взаимодействие исследуемого соединения РУ-31 с ареколином. В контрольной группе животных посредством известного стимулятора М-холинорецепторов – ареколина у мышей вызывались гиперсаливация и тремор. Латентный период возникновения тремора в контрольной группе составил ~ 1 минуту. Длительность тремора составила более 20 минут.

После введения животным опытной группы соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг не было выявлено статистически значимых изменений латентного периода возникновения тремора. При этом установлено, что предварительная инкубация соединения РУ-31 влияет на длительность ареколинового тремора у мышей (Таблица 6.9). Это может свидетельствовать о наличии влияния соединения РУ-31 на холинергическую передачу.

Таблица 6.9 – Влияние соединения РУ-31 на длительность вызванного ареколином (15 мг/кг) тремора у мышей ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Время развития эффекта (сек)	Длительность эффекта (сек)
1	Контроль ареколин (15 мг/кг)	57,5±4,35	1235,0±55,38
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + ареколин (15 мг/кг)	57,9±2,42	956,4±29,50*

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием непарного t-теста Стьюдента

* – различие достоверно относительно показателей группы контроля ($p < 0,05$).

На основании полученных данных можно предположить, что соединение РУ-31 может оказывать ингибирующее влияние на центральную М-холинергическую нейротрансмиссию, что подтверждает данные, полученные в исследованиях *in vitro*.

Влияние соединения РУ-31 на показатели теста «никотиновый тремор»

В ходе данного теста никотина после введения в дозе 4 мг/кг (минимальная доза никотина, приводил к возникновению судорожных припадков у 100% животных), наблюдали возникновение судорог (Таблица 6.10). У мышей из группы контроля, которым вводился никотин в дозе 2 мг/кг (низкая доза никотина, приводившая к развитию тремора, но еще не способная вызывать судороги) наблюдалось развитие тремора, что было связано с усилением нервно-мышечной передачи (Таблица 6.11).

Таблица 6.10 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность тремора и судорог, вызванных никотином (4 мг/кг) ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Время развития тремора, сек*	Количество животных, у которых возникли судороги (%)#
1	Контроль никотин (4 мг/кг)	70,47±1,81	93,3
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + никотин (4 мг/кг)	67,93±2,08	86,7

Примечание: *-статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

– статистическая обработка проводилась точным критерием Фишера.

Для соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг не наблюдалось изменение эффектов никотина в дозе 2 мг/кг. Также для соединения РУ-31 в исследуемой дозе не было отмечено снижения или усиления эффектов никотина в дозе 4 мг/кг, характеризующихся временем наступления тремора и процентом возникших судорожных припадков, так как введение соединения РУ-31 не приводило к достоверному изменению времени развития тремора и проценту развития судорог у мышей под воздействием Н-холинергического влияния никотина.

Таблица 6.11 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность тремора и судорог, вызванных никотином (2 мг/кг) ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Время развития тремора, сек [*]	Количество животных, у которых возникли судороги (%) [#]
1	Контроль никотин (2 мг/кг)	112,9±3,69	6,7
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + никотин (2 мг/кг)	109,7±3,32	6,7

Примечание: * – статистическая обработка проводилась однофакторным дисперсионным анализом с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса
[#] – статистическая обработка проводилась точным критерием Фишера.

Таким образом, в тесте никотиновых судорог не было выявлено влияния соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг на Н-холинорецепторы как в дозе никотина в 2 мг, так и 4 мг.

Исследование D₂-дофаминергической активности соединения РУ-31 в тесте «галоперидоловая каталепсия»

На данном этапе исследования было изучено взаимодействие исследуемой соединения РУ-31 с галоперидолом. Галоперидол при внутривенном введении в дозе 3 мг/кг в контрольной группе приводил к возникновению каталепсии (Таблица 6.12).

Таблица 6.12 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность вызванной галоперидолом (3 мг/кг) каталепсии у крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Выраженность каталепсии (в баллах)				
		15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	120 мин
1	Контроль галоперидол (3 мг/кг)	1,38±0,42	2,75±0,16	2,88±0,13	2,75±0,16	2,63±0,18
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + галоперидол (3 мг/кг)	1,62±0,42	2,0±0,37	2,37±0,32	2,75±0,16	2,5±0,19

Примечание: статистическая обработка проводилась однофакторным дисперсионным анализом с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$).

На основании полученных данных можно предположить об отсутствии влияния соединения РУ-31 на каталептогенный эффект галоперидола в изучаемой дозе (Таблица 6.12), так как достоверных различий между показателями группы контроля и опытной группы выявлено не было. Таким образом, влияния соединения РУ-31 на дофаминергические структуры мозга в данном тесте не выявлено.

D₂-дофаминергическая активность соединения РУ-31 в тесте «апоморфиновая стереотипия»

По результатам исследования было показано, что апоморфин при введении в дозе 0,1 мг/кг подкожно, у животных контрольной группы вызывал стереотипное поведение. Так, максимальный балл выраженности стереотипии был достигнут на 60 мин после введения дофаминового агониста, дальнейшее наблюдение показывало постепенное снижение эффектов апоморфина (Таблица 6.13).

Соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг после часовой инкубации не вызывало значимых изменений в выраженности апоморфинового ответа у экспериментальных животных (Таблица 6.13). Достоверных различий между показателями группы контроля и опытной группы не было выявлено.

Таблица 6.13 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность вызванной апоморфином (0,1 мг/кг) стереотипии у крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Выраженность стереотипии (в баллах)			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
1	Контроль апоморфин (0,1 мг/кг)	0,83±0,17	1,66±0,21	1,66±0,33	0,66±0,33
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + апоморфин (0,1 мг/кг)	0,66±0,21	1,66±0,21	1,66±0,21	0,83±0,16

Примечание: статистическая обработка проводилась однофакторным дисперсионным анализом с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$).

Таким образом, в тесте апоморфиновой стереотипии влияния РУ-31 на центральные звенья дофаминергической системы не было обнаружено, что косвенно подтверждается данными теста галоперидоловая катаlepsия.

Влияние соединения РУ-31 на активность моноаминоксидазы

По результатам проведенного исследования установлено, что L-DOPA после введения в дозе 500 мг/кг (контроль 1) приводила к повышению двигательной активности мышцей с элементами стереотипного поведения. Максимальная выраженность эффекта была отмечена на 60 мин после введения L-DOPA, когда интенсивность стереотипии достигала 2,3 балла по 3-х балльной шкале (Таблица 6.14). После введения L-DOPA в дозе 100 мг/кг (контроль 2) эффектов, характерных для высоких доз, отмечено не было. Соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг не потенцировало эффекты малых доз и не ингибировало эффекты высоких доз L-DOPA.

Таблица 6.14 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность вызванной L-DOPA (100 и 500 мг/кг) стереотипии у мышей (M±m)

№ п/п	Группа	Выраженность стереотипии (в баллах)			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
1	Контроль 1 L-DOPA (500 мг/кг)	0,83±0,17	2,33±0,21	1,83±0,31	1,0±0,26
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + L-DOPA (500 мг/кг)	0,7±0,21	2,0±0,36	2,3±0,21	1,0±0,26
2	Контроль 2 L-DOPA (100 мг/кг)	0,0±0,00*#	0,4±0,24*#	0,5±0,22*#	0,0±0,00*#
3	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + L-DOPA (100 мг/кг)	0,0±0,00*#	0,33±0,21*#	0,0±0,00*#	0,0±0,00*#

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса
* – различие достоверно относительно показателей группы контроля L-DOPA 500 мг/кг;
– различие достоверно относительно показателей группы РУ-31 (10 мг/кг) + L-DOPA 500 мг/кг. Статистическая обработка проводилась однофакторным дисперсионным анализом с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$).

Таким образом, MAO-ингибирующих эффектов соединения РУ-31, основанных на потенцировании эффектов L-DOPA, в данном тесте не было выявлено.

Ингибирующая активность соединения РУ-31 на модели фенаминовой стереотипии

Фенамин, при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг в контрольной группе крыс приводил к возникновению беспокойства и стереотипного поведения. При изучении влияния соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг на продолжительность стереотипного поведения у животных отмечалось существенное увеличение длительности стереотипии в 3,2 раза по сравнению с группой контроля (Таблица 6.15).

Таблица 6.15 – Влияние соединения РУ-31 на выраженность вызванной фенамином (0,1 мг/кг) стереотипии у крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Длительность стереотипии (в часах)
1	Контроль фенамин (0,1 мг/кг)	3,7±0,2
2	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + фенамин (0,1 мг/кг)	11,7±0,3*

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием непарного *t*-теста Стьюдента

* – различие достоверно относительно показателей группы контроля, непарный *t*-тест Стьюдента ($p < 0,05$).

Таким образом, по результатам теста фенаминовой стереотипии установлено, что при введении соединения РУ-31 животным, у них отмечалось увеличение действие фенамина, что, учитывая отсутствие активности соединения РУ-31 в тестах галоперидоловой каталепсии, апоморфиновой и L-DOPA стереотипии, может свидетельствовать о выраженном неспецифическом влиянии соединения РУ-31 на обратный захват дофамина, норадреналина и серотонина.

Влияние соединения РУ-31 на высвобождение норадреналина в тесте «резерпиновая гипотермия»

В ходе данного теста установлено, что в группе интактных животных показатель ректальной температуры не изменялся на протяжении всего времени эксперимента (4,5 часа). У крыс контрольной группы, которым вводили симпатолитик - резерпин, отмечалось снижение температуры на 0,9 и 0,5°C по сравнению с группой интактного контроля ($p < 0,05$) через 4 и 4,5 часа, соответственно. Соединения РУ-31, при введении в дозе 10 мг/кг не оказывало влияния на гипотермический эффект резерпина (Таблица 6.16).

Таблица 6.16 – Влияние соединения РУ-31 на гипотермию у крыс, вызванную резерпином (2,5 мг/кг) ($M \pm m$)

№ п/п	Группа	Показатели ректальной температуры (в градусах)		
		Исходная температура	4 часа	4,5 часа
1	Интактный контроль	37,9±0,04	38,0±0,02	37,9±0,05
2	Контроль резерпин (2,5 мг/кг)	37,9±0,04	37,1±0,06*	37,4±0,09*
3	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + резерпин (2,5 мг/кг)	38,90±0,04	37,0±0,07*	37,4±0,04*

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса

* – различие достоверно относительно показателей группы интактного контроля ($p < 0,05$).

На основании полученных данных можно предположить об отсутствии влияния соединения РУ-31 на гипотермический эффект резерпина в изучаемой дозе. Таким образом, на основании данных, полученных в тесте «резерпиновая гипотермия» не было выявлено значимого влияния соединения РУ-31 на адренергические структуры мозга, что позволяет предположить отсутствие у изучаемого вещества адренергической активности.

Изучение взаимодействия соединения РУ-31 с α -адренорецепторами мозга в тесте «клофелиновая гипотермия»

По полученным результатам выявлено, что α_2 -адреномиметик - клофелин при введении животным приводил к значительному снижению ректальной температуры на 1,4°C по сравнению с группой интактного контроля ($p < 0,05$) уже на 30 минуте исследования (Таблица 6.17). В опытной группе введение соединения РУ-31 не оказывало влияния на эффекты модулятора адренергической системы – клофелина (Таблица 6.17), так как не было обнаружено достоверных различий между показателями группы контроля и опытной группы.

Таблица 6.17 – Влияние соединения РУ-31 на гипотермию у крыс, вызванную клофелином (0,1 мг/кг) ($M \pm m$)

Термометрия	Ректальная температура (в градусах)		
	Интактный контроль	Контроль клофелин (0,1 мг/кг)	Соединение РУ-31 (10 мг/кг) + клофелин (0,1 мг/кг)
Исход	38,01±0,05	38,01±0,04	38,03±0,05
30 мин	38,03±0,05	36,68±0,07*	36,75±0,08*
60 мин	37,96±0,03	37,46±0,06*	37,5±0,07*
90 мин	37,98±0,04	37,98±0,03	37,98±0,05
120 мин	37,95±0,03	38,03±0,04	38,03±0,03

Примечание: Статистическая обработка GraphPad Prism v.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса

* – различие достоверно относительно показателей группы интактного контроля ($p < 0,05$).

По результатам данного теста можно сделать вывод, что исследуемое соединение РУ-31 не влияет на гипотермический эффект клофелина в изучаемой дозе, что, в совокупности с результатами теста с резерпином, свидетельствует об отсутствии у соединения РУ-31 взаимодействия с адренергической нейромедиаторной системой.

6.3. Заключение

Таким образом в ходе проведенных исследований было выявлено, что соединение РУ-31, блокатор 2А подтипа серотониновых рецепторов, в концентрации 1 мкМ не проявляет H_1 -гистаминблокирующих свойств, что позволяет предположить об отсутствии у него таких побочных эффектов, как седация и ulcerогенный эффект, характерных для известного противомигренозного средства – ципрогептадина (Liu H.Y, 2018), и делает его перспективным для дальнейшего изучения в роли противомигренозного агента.

В ходе изучения селективности антисеротонинового действия было показано отсутствие выраженного влияния соединения РУ-31 на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов.

При этом соединение РУ-31 проявляет М-холиноблокирующую активность на модели ацетилхолин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки в концентрации в 10 раз превышающей среднеэффективную концентрацию 5-НТ_{2А}-блокирующей активности и оказывает центральное холинблокирующее действие на модели ареколинового тремора.

Помимо этого, соединение РУ-31 может подавлять активность ГАМК-блокатора – пикротоксина в экспериментах *in vivo*, но при изучении его свойств *in vitro* собственного влияния на функционирование ГАМК-системы в отсутствие десинхронизирующего действия серотонина, для изучаемого вещества выявлено не было. Активность соединения РУ-31 проявлялась только в присутствии серотонина, за счет блокады его эффектов, посредством 5-НТ_{2А}-рецепторов. Полученные данные позволяют предположить, что оказываемые соединением РУ-31 *in vivo* ГАМК-миметические эффекты могут быть опосредованы через серотониновую систему.

На адренергические и дофаминергические рецепторы не было установлено значимого влияния, однако в тесте «фенаминовой стереотипии» для соединения РУ-31 была показана возможность влияния на обратный захват дофамина, норадреналина и серотонина (Таблица 6.18).

Учитывая наличие ряда данных о вовлеченности холинергического звена, посредством регуляции активности М-рецепторов в патогенез мигрени (Амелин А.В., 2014), такой рецепторный профиль изучаемого соединения весьма значим для повышения эффективности противомигренозной терапии. Помимо этого, в литературных данных имеется подтверждение вовлеченности ГАМК-ергической системы в формирование мигренозных приступов (Мирзоян Р.С., 2018; Амелин А.В., 2014). В связи с этим, наличие М-холиноблокирующего и ГАМК-миметического компонентов в механизме рецепторного действия изучаемого соединения является перспективным в контексте его противомигренозного профиля.

Таблица 6.18 – Нейрорецепторные аспекты механизма действия соединения РУ-31

Система	Тип рецепторов/ферментов/транспортёров	Эффект
серотонинергическая	5-НТ _{2А}	↓
серотонинергическая	5-НТ ₃	-
серотонинергическая	5-НТ ₄	-
адренергическая	α	-
адренергическая	МАО	-
дофаминергическая	D ₂	-
дофаминергическая	транспортёр	↑
гистаминергическая	H ₁	-
холинергическая	M	↓
холинергическая	H	-
ГАМКергическая	ГАМК _А	↑

Примечание:

↓ антагонистический эффект

↑ агонистический эффект

- отсутствие значимого эффекта

ГЛАВА 7. АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-31

Болевой синдром является наиболее значимым симптомом, во время мигренозных приступов и, учитывая разнородность в длительности атак, может сохраняться от нескольких часов до нескольких дней. В сочетании с хроническим характером заболевания, это может приводить к патологическому функционированию центральной нервной системы (ЦНС) пациентов и, в дальнейшем, развитию различных психоневрологических нарушений, сохраняющихся даже после завершения приступа (Baskin S. M, 2009). В связи с этим, при разработке новых противомигренозных средств особую роль отводят исследованию их обезболивающих свойств.

Для наиболее полной оценки анальгетического потенциала нового соединения необходимо исследовать его влияние на центральные и периферические звенья ноцицептивной системы. С этой целью были выбраны три модели: «Горячая пластина», «Отдергивание хвоста» и «Формалиновая гипералгезия», общепринятые для данного вида исследований (Арзамасцев Е.В., 2012; Воронина Т.А., 2012).

Тесты «Горячая пластина» и «Отдергивание хвоста» позволяют оценить возможность влияния изучаемого соединения на центральные механизмы регуляции формирования болевого синдрома (Wahlsten D., 2011). Тест «Формалиновая гипералгезия» дает возможность оценить влияние веществ на периферическую болевую иннервацию. Выбор животных, обоснование доз вводимых веществ, а также способ введения и время инкубации подробнее описаны в Главе 2.

7.1. Изучение анальгетических свойств соединения РУ-31 в тесте «Горячая пластина»

В ходе исследования было установлено, что при помещении животного на разогретую до 55 ° пластину (группа контроля), наблюдается развитие следующих болевых реакций: в течение 6 - 7с полизывание задней лапки и через 8 - 9 с подпрыгивание. Для группы животных, получавших соединение РУ-31 было зафиксировано статистически значимое изменение в обоих показателях в сравнении с группой контроля. Так время развития реакции полизывания увеличилось на 47%, а реакции подпрыгивания – на 27%. Для известного 5-НТ₂-антагониста - ципрогептадина, не было зарегистрировано статистически значимых различий с показателями группы контроля, но наблюдалась тенденция к увеличению времени развития ответа на альгезирующий фактор. Препарат сравнения – анальгетик центрального действия - трамадол, при введении исследуемым животным оказывал выраженное обезболивающее действие, в 1,6 - 2 раза превосходя показатели контрольной группы (Таблица 7.1).

Таблица 7.1 - Анальгетическая активность соединения РУ-31, ципрогептадина и трамадола в тесте «Горячая пластина» у крыс (M±m)

Вещество	Латентность полизывания задней лапки, с	Латентность подпрыгивания, с
Контроль	6,7±0,8	8,5±0,5
Соединение РУ-31 10 мг/кг	9,9±0,9*#	10,8±1,3
Ципрогептадин 14 мг/кг	7,4±0,7	9,4±1,0
Трамадол 80 мг/кг	11,0±0,7*#°	14,2±1,5*#°

Примечание: Статистическая обработка GraphPadPrismv.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*-различия достоверны относительно показателей группы контроля ($p < 0,05$)

#-различия достоверны относительно показателей группы ципрогептадина ($p < 0,05$)

°-различия достоверны относительно показателей группы соединения РУ-31 ($p < 0,05$)

Таким образом, в тесте «Горячая пластина» была выявлена обезболивающая активность РУ-31, выраженная в изменении времени полизывания задней лапы, но при этом уступающая показателям препарата сравнения – трамадола. Для 5-

HT_{2A}-антагониста – ципрогептадина не было зафиксировано значимой активности в данном тесте.

7.2. Исследование анальгетических свойств соединения РУ-31 в тесте «Отдергивание хвоста»

В тесте «Отдергивание хвоста» было установлено, что в группе контроля, при помещении хвоста животного под пучок лазера, болевая реакция развивалась в течение 2 с. В группе животных, которым вводили соединение РУ-31 было зафиксировано статистически значимое различие, относительно показателей группы контроля. Латентное время отдергивания хвоста увеличилось в 2,25 раза. В группе животных, которым вводился препарат сравнения - ципрогептадин не было зафиксировано значимого изменения ноцицептивной реакции. Вторым препаратом сравнения – центральный анальгетик трамадол, при введении исследуемым животным оказывал выраженное обезболивающее действие, в 3,7 - 4 раза превосходя показатели контрольной группы (Таблица 7.2).

Таблица 7.2 - Анальгетическая активность соединения РУ-31, ципрогептадина и трамадола в тесте «Отдергивания хвоста» у крыс (M±m)

Вещество	Латентность отдергивания хвоста, с
Контроль	2,0±0,2
Соединение РУ-31 10 мг/кг	4,5±0,8 ^{*#}
Ципрогептадин 14 мг/кг	2,1±0,2
Трамадол 80 мг/кг	7,5±0,6 ^{*#°}

Примечание: Статистическая обработка GraphPadPrismv.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*-различия достоверны относительно показателей группы контроля (p<0,05)

#-различия достоверны относительно показателей группы ципрогептадина (p<0,05)

°-различия достоверны относительно показателей группы соединения РУ-31 (p<0,05)

Таким образом, в тесте «Отдергивания хвоста» для соединения РУ-31 была выявлена обезболивающая активность, уступающая показателям препарата сравнения – трамадола и превосходящая показатели препарата сравнения - ципрогептадина.

7.3. Исследование обезболивающих и противовоспалительных свойств соединения РУ-31 на модели «Формалиновая гипералгезия»

Введение крысам формалина в разведении 1:9 вызывало развитие двигательно-болевого реакции в виде подергиваний лапой, при этом воспалительная реакция формировалась в 2 этапа: с 0 по 10 минуты – острая фаза, и с 10 по 60 – хроническая фаза. Так в контрольной группе животных, после введения формалина воспалительно-болевая реакция начинала развиваться с 5 минуты и достигала максимальных значений к 35 минуте, после чего выраженность болевых реакций начинала снижаться. Для всех трех тестируемых соединений, была зарегистрирована выраженная обезболивающая активность, начиная с первых минут острой фазы, проявляющаяся в снижении двигательной – болевой реакции. При этом для ципрогептадина характерно более выраженное влияние на острую фазу воспаления - в диапазоне 0 – 10 мин, чем на хроническую фазу: с 10 по 60 мин. Соединение РУ-31 и диклофенак в исследуемых дозах способны снижать выраженность болевой реакции во всем временном промежутке эксперимента, при этом значительно превосходя показатели активности ципрогептадина (Таблица 8.3).

Таблица 7.3 - Анальгетическая активность соединения РУ-31, ципрогептадина и диклофенака в тесте «Формалиновая гипералгезия» ($M \pm m$)

Временной интервал	Количество подергиваний лапкой в мин			
	Контроль	Соединение РУ-31 10 мг/кг	Ципрогептадин 14 мг/кг	Диклофенак 2 мг/кг
0-5 мин	5,2±0,8	0,2±0,1*	1,5±0,6*	0,3±0,1*
5-10 мин	10,6±1,3	0,8±0,5*#	5,4±1,6*	1,1±0,2*#
10-15 мин	9,5±1,4	0,5±0,2*#	4,3±1,1*	0,9±0,3*#
15-20 мин	13,1±1,6	0,4±0,2*#	6,7±1,3*	0,1±0,1*#
20-25 мин	16,4±2,2	1,7±0,7*#	9,2±1,8*	0,5±0,2*#
25-30 мин	21,6±2,7#	2,8±1,3*#	11,9±2,1*	2,0±0,6*#
30-35 мин	27,9±3,2#	5,1±1,5*#	17,3±2,9*	5,0±1,8*#
35-40 мин	32,7±2,3*	6,7±2,2*#	16,4±3,3*	5,9±1,0*#
40-45 мин	30,6±5,1*	7,4±2,2*	14,6±2,2*	5,2±1,3*
45-50 мин	27,3±3,8*	3,3±1,1*#	13,9±2,7*	5,0±1,1*#
50-55 мин	18,4±2,2*	0,7±0,3*#	12,3±2,0*	2,9±1,2*#
55-60 мин	16,8±1,9*	0,2±0,1*#	10,9±0,9*	0,7±0,3*#

Примечание: Статистическая обработка GraphPadPrismv.5.0. с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Ньюмена-Кеулса.

*- различия достоверны относительно показателей группы контроля ($p < 0,05$)

#-различия достоверны относительно показателей группы ципрогептадина ($p < 0,05$)

Таким образом, в тесте «Формалиновая гипералгезия» для соединения РУ-31 была выявлена значимая анальгетическая активность, не уступающая показателям препарата сравнения - диклофенака, и превосходящая показатели известного 5-НТ_{2A}-антагониста – ципрогептадина.

7.4. Заключение

В ходе проведенного исследования было установлено, что в тестах, отражающих влияние на центральные звенья ноцицептивной системы, соединение РУ-31 проявляет анальгетические свойства, но статистически значимо уступает показателям препарата сравнения – трамадола. В тесте «Формалиновая гипералгезия», отражающем влияние на воспалительные звенья ноцицептивной системы, соединение РУ-31 проявляет анальгетическую активность, сопоставимую с показателями препарата сравнения - диклофенака и превосходящую показатели известного 5-НТ_{2A}- антагониста - ципрогептадина.

Учитывая значимость болевого синдрома при мигренозной патологии, как фактора, существенно снижающего качество жизни пациента, наличие собственной анальгетической активности, на центральном и на периферическом уровне, будет являться значимым при разработке нового противомигренозного средства.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Мигрень с учетом возникающих осложнений отнесена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к самым инвалидизирующим среди всех неврологических расстройств (Goadsby P. J, 2017.). На сегодняшний день основная терапия заболевания направлена на лечение острого приступа: уменьшение интенсивности, длительности болевого эпизода и сопутствующих симптомов, а также на улучшение общего состояния пациента. Для купирования приступа используются анальгетики и/или НПВС (предпочтительно не комбинированные), триптаны, реже эрготаминсодержащие препараты (Steiner T.J., 2007; Осипова В.В., 2017). Однако для представленных групп препаратов характерно наличие ряда побочных эффектов и невозможность длительного применения (Ваена, и др., 2017; F. Antonaci, 2016). Учитывая разнородность теорий патогенеза мигрени и отсутствие высокоэффективных лекарственных препаратов для купирования приступов, а также возможность длительного применения существующих препаратов в целях профилактики, создание и разработка новых соединений является актуальным направлением современной нейрофармакологии (Osipova V.V., 2018). При этом одной из наиболее перспективных мишеней для новых потенциальных кандидатов в противомигренозные препараты считают 2 подтип серотониновых рецепторов (B.N. Mason, 2018).

Учитывая опыт предыдущих исследований, проводимых на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, совместно с НИИ ФОХ ЮФУ, наиболее перспективным классом соединений, потенциальных антисеротониновых агентов, являются имидазобензимидазолы (Спасов А.А., 2015; Черников М.В., 2010; Яковлев Д.С., 2016). Было выделено 3 соединения: дигидрохлорид, дигидронитрат и дигидробромид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (Мальцев Д.В., 2014). Для данных соединений была предварительно изучена острая токсичность и наличие

антисеротониновых свойств, а также показана целесообразность дальнейшей их разработки, по совокупности данных свойств. В связи с чем возникла необходимость выбора наиболее активной из указанных солей и расширенное исследование ее фармакологических свойств, что легло в основу настоящего исследования.

На первом этапе настоящего исследования проводилось сравнение данных соединений с целью обоснования выбора одного, наиболее активного в отношении 2A подтипа рецепторов. В ходе проведенных исследований было установлено, что все три соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола обладают высоким уровнем антисеротониновой активности. При сравнении 5-HT_{2A}-блокирующих свойств на модели серотонин-индуцированного сокращения рога матки крыс, наибольший уровень активности был зарегистрирован для соединения РУ-31 (дигидрохлорид).

Несмотря на то, что сродство к рецепторам во многих случаях, несомненно, является ключевым моментом для потенциальных кандидатов лекарственных соединений, тем не менее, другие факторы, такие как растворимость, распределение в несмешивающихся фазах, абсорбционные свойства, характеристики активного и пассивного транспорта не менее значимы для *in vivo* процессов (Surov A.O., 2018). Необходимо учитывать данные факторы на ранних этапах создания новых ЛС для того чтобы избежать в дальнейшем невозможности создания на основе потенциальных кандидатов («соединений-лидеров») лекарственных препаратов, ввиду низкой стабильности.

В связи с этим, помимо основных аспектов фармакологической активности, при дизайне молекулярной структуры нового соединения, в том, что касалось выбора противоиона, принимались во внимание высокая стабильность аниона хлора к окислению, отсутствие у него существенного собственного фармакологического влияния, присущего, например, иону бромида, и, в целом, более высокая стабильность гидрохлоридов, в частности, по сравнению с нитратами, склонными, например, к фотодегградации (L. Deng, 2014). Таким образом, по совокупности данных о химической структуре, токсикологическом

профиле и 5-HT_{2A}-активности, для дальнейших исследований было выбрано соединение РУ-31: дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола.

Учитывая необходимость детализации фармакодинамических аспектов противомигренозного действия, на 1 этапе исследования изучались сосудистые эффекты РУ-31. В первую очередь оценивалось влияние на тонус экстракраниальных и интракраниальных сосудов. Для соединения РУ-31 была показана вазодилатирующая активность в бассейне средней мозговой артерии, и в системе внутренней сонной артерии, в условиях серотониновой нагрузки. При этом в бассейне церебрального микроциркуляторного русла для РУ-31 характерно развитие стойкого антисеротонинового эффекта в области более низких доз, статистически значимо превосходящего показатели ципрогептадина. В диапазоне доз 15 – 30 мг/кг показатели серотонин-блокирующей активности соединения РУ-31 не уступают показателям препарата сравнения – ципрогептадина. В бассейне внутренней сонной артерии для соединения РУ-31 также был зафиксирован выраженный антисеротониновый эффект, не уступающий показателям ципрогептадина. Таким образом, было показано, что соединение РУ-31 имеет влияние на тонус как экстракраниальных, так и интракраниальных сосудов, не уступая показателям известного и рекомендованного для лечения и профилактики мигрени препарата – ципрогептадина.

На 2 этапе оценивали влияние изучаемого соединения на тромбоцитарные звенья периферического уровня патогенеза мигрени. Учитывая наличие изменений в активности тромбоцитарного звена у пациентов с мигренью, в частности снижение содержания гранул серотонина в период атак (Изати-Зааде., 2007), а также данные о том, что самопроизвольное высвобождение гранул серотонина из тромбоцитов приводит к активации ими 5-HT_{2A}-рецепторов, расположенных на мембране тромбоцитов (Sarchielli, P 2001) и, в дальнейшем, к активации тромбоцитов и высвобождению из них целого ряда индукторов агрегации, которые в дальнейшем усиливают процессы активации-агрегации, делает необходимым комплексное исследование антиагрегантных свойств для

прогнозирования эффективности нового кандидата в ЛП. Для соединения РУ-31 было выявлено наличие значимой антиагрегантной активности в условиях моделирования серотонин-индуцированной агрегации *in vitro*, превосходящей показатели препаратов сравнения: ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой. С неспецифическими индукторами: при моделировании АДФ-индуцированной агрегации и адреналин-индуцированной агрегации *in vitro*, для соединения РУ-31 была зафиксирована антиагрегантная активность в концентрациях 10-100 мкМ, при этом уступающая показателям препаратов сравнения. При моделировании коллаген-индуцированной агрегации и А23187-индуцированной агрегации, для соединения РУ-31 была зафиксирована ингибирующая активность в более широком диапазоне: 1-100 мкМ ($p < 0,05$), при этом в условиях коллаген-индуцированной агрегации, в концентрации 100 мкМ достоверно превышающая показатели ципрогептадина и не отличающаяся от показателей кислоты ацетилсалициловой. При исследовании влияния соединения РУ-31 на кальциевый ток в условиях агрегации индуцированной кальциевым ионофором - А23187 показатели опытной группы не уступали показателям препаратов сравнения во всем изучаемом диапазоне, но выраженное антиагрегантное действие для всех трех групп проявляется только в высоких концентрациях, что вероятнее всего, как и в случае с неспецифическими индукторами может свидетельствовать не о прямом, а об опосредованном влиянии на процессы агрегации. На модели ристоцетин-индуцированной агрегации соединение РУ-31 не проявило значимую антиагрегантную активность, что дает возможность предположить, что данное вещество не оказывает влияния на связывание фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib. Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что соединение РУ-31 оказывает выраженное и поликомпонентное антиагрегантное действие, в большей степени опосредуемое серотонином и, вероятнее всего способно изменять содержание внутриклеточного кальция в тромбоцитах. Это позволяет предположить эффективность разрабатываемой субстанции в условиях реальной мигренозной патологии, на фоне увеличения вязкости крови высокими концентрациями серотонина, что сопоставимо с

литературными данными для ципрогептадина и пизотифена, для которых было показано снижение АДФ-индуцированной агрегации и внутриклеточных уровней кальция в тромбоцитах, в присутствии серотонина *in vitro* и *ex vivo* (O. A. Lin, 2014). Таким образом, антиагрегантная активность соединения РУ-31 на изученных моделях агрегации, по величине полуингибирующей концентрации располагается в следующем порядке: серотонин (Log IC₅₀ = -5,8) > АДФ (Log IC₅₀ = -5,7) > A23187 (Log IC₅₀ = -5,1) > адреналин (Log IC₅₀ = -4,8) > коллаген (Log IC₅₀ = -4,7) > ристоцетин (Log IC₅₀ = -4,5).

Помимо этого, в результате проведенных исследований при формировании тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III) и тромбоза, индуцированного анодным током, действие РУ-31 превосходит показатели в период наиболее выраженного формирования окклюзии, демонстрируя различия с показателями группы контроля в точках 90, 95 и 100% окклюзии. На модели тромбоза, аппликацией 50% хлорида железа (III), соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг на 30% увеличивло время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, превосходя показатели ципрогептадина и проявляя активность равную кислоте ацетилсалициловой. На модели тромбоза, индуцированного анодным током, активность соединения РУ-31 была ниже, чем на модели железо-апплицированного тромбоза, на 40% увеличивалось время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, в 2 раза превосходило показатели ципрогептадина, но в 1,8 раза уступая показателям кислоты ацетилсалициловой. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в условиях реальной мигренозной патологии, при высоких концентрациях серотонина, как триггер-фактора, инициирующего начало процессов тромбообразования и наличии у известных 5-HT_{2A}-антагонистов влияния на увеличение времени окклюзии у мышей *in vivo* на моделях тромбоза сонной артерии, соединение РУ-31 будет эффективно снижать выраженность вязкости крови (O. A. Lin, 2014).

Несмотря на то, что на сегодняшний день актуальным направлением является создание и разработка новых лекарственных средств из ряда 5-HT_{2A}-

антагонистов, в связи с эффективностью применения с целью лечения и профилактики мигренозных приступов препаратов, имеющих данный механизм действия (А. Krasaelap, 2017), рядом исследований было показано, наибольшую эффективность демонстрируют препараты с мультирецепторным профилем. В частности, ципрогептадин и пизотифен являлись более эффективными при лечении мигрени, чем высокоселективный 5-HT_{2A}- антагонист – кетансерин (Mylecharane E.J., 1991). Однако наличие ряда рецепторных эффектов, в частности α -адреноблолирующего или H₁- гистаминблолирующего, может лечь в основу ряда побочных эффектов, таких как гипотензия, кардиотоксичность, седация и ульцерогенность, тем самым ограничив возможность длительного применения данных ЛС. В связи с этим, детальное изучение рецепторных аспектов механизма действия, является необходимым фактором, для прогнозирования возможного спектра побочного действия нового кандидата в лекарственные препараты.

В связи с этим, на 3 этапе проводилось изучение рецепторного профиля соединения РУ-31 методами *in vivo* и *in vitro*. Исследование показало, что в концентрации 1 мкМ соединение РУ-31 не обладает H₁-гистаминблолирующей активностью, что выгодно отличает его от препарата сравнения – ципрогептадина, для которого характерны седативный, ульцерогенный и кардиотоксический эффекты, опосредованные гистамином (reference.medscape.com). Помимо этого, было показано отсутствие влияния соединения РУ-31 на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов, что может свидетельствовать о селективности антисеротонинового действия. На *in vitro* модели ацетилхолин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки и *in vivo* модели ареколинового тремора, соединение РУ-31 оказывает ингибирующий эффект. Учитывая вовлеченность парасимпатической системы в формирование приступов мигрени (Амелин А.В., 2014) и эффективность ряда препаратов из группы атропина (Shelukhina I., 2017), наличие данного компонента в рецепторном профиле нового соединения будет усиливать его антимигренозное действие.

Помимо этого, соединение РУ-31 может подавлять активность ГАМК-блокатора – пикротоксина *in vivo*, значительно увеличивая время развития

судорог и снижая количество судорожных эпизодов. Учитывая важность регуляции функциональной активности нервной системы во время приступов мигрени на надсегментарном уровне, а также имеющиеся данные о возможности регуляции серотонином активности пресинаптических NMDA-рецепторов и постсинаптических ГАМК-рецепторов посредством 2A- подтипа рецепторов, при разработке новых антисеротониновых агентов необходимо уделять внимание возможности прямой или опосредованной регуляции активности данных систем. С этой целью в настоящем исследовании, с использованием patch-clamp технологий были проведены эксперименты на переживающих нейронах крыс возраста P4 – P25. Почти все подтипы рецепторов серотонина экспрессируются в гиппокампе, локализуясь как аутоинаптически, пресинаптически и постсинаптически, так и колокализуясь в одной и той же клетке, и формируя сложную модулирующую систему (L. C. Verumen, 2012). Учитывая вовлеченность гиппокампальной формации в патогенез мигренозного процесса (Liu H.Y, 2018), а также вовлеченность ГАМК системы в регуляцию сосудистого тонуса мозга и формирование приступов головных болей (P.C. Мирзоян, 2018) изучение ГАМК-ергических компонентов действия новых противомигренозных агентов целесообразно проводить в гиппокампальной формации. В экспериментах *in vitro* собственного влияния на ГАМК-систему для изучаемого соединения выявлено не было, как в СА1 зоне, так и в СА3 зоне. При этом введение высоких концентраций серотонина приводило к увеличению нейрональной активности в СА1 и СА3 зонах, как внутриклеточно, так и при системной фиксации потенциалов (R-Y. Shen, 1998). На фоне серотонин-опосредованной гиперактивации интернейронов на границе зон лучистого слоя (*stratum radiatum*) и молекулярного слоя (*stratum locunosum moleculare*), увеличивалась активность ГАМК-ергической системы. Однако по данным ряда источников, гиперстимуляция нейронов может привести к депрессии нейрональной активности и спровоцировать явление РКД. Введение соединения РУ-31 в диапазоне концентраций 0,1 мкМ – 5 мкМ значительно снижало выраженность эффектов серотонина, как системных, так и регистрируемых внутриклеточно. При

этом наблюдались различия в действии серотонина на срезы, полученные из тканей мозга молодых крыс (до 12 дня после рождения) и на срезы мозга 23-25 дня после рождения, который соответствует активности уже взрослой особи. На развивающемся мозге, где ГАМК играет возбуждающую роль (Хазипов Р.Н., 2012), введение серотонина увеличивает системную активность и вызывает десинхронизацию нейрональных ответов. На сформированном мозге наблюдался обратный эффект: введение серотонина снижало нейрональную активность СА3 зоны гиппокампа и приводило к «депрессии» нейронов. И в том и в другом случае, соединение РУ-31 устраняло эффекты высокой концентрации серотонина, что может иметь ключевое значение в терапии неврологических симптомов мигрени. Таким образом, в ходе проведенных исследований было выявлено, что оказываемые соединением РУ-31 эффекты на гиппокампальную формацию, проявлявшиеся ГАМК-миметическим действием на моделях *in vivo*, были опосредованы через серотониновую систему.

На последнем этапе оценивалось проявление анальгетических свойств изучаемой субстанции на периферическом, сегментарном и надсегментарном уровнях. В ходе проведенного исследования было установлено, что в тестах, отражающих влияние на центральные звенья ноцицептивной системы, соединение РУ-31 проявляет анальгетические свойства, превышая активность ципрогептадина на 25% и 53% в тестах «Горячая пластина» и «Отдергивание хвоста» соответственно, но статистически значимо уступает показателям препарата сравнения – трамадола. В тесте «Формалиновая гиперальгезия», отражающем влияние на воспалительные звенья ноцицептивной системы, соединение РУ-31 подавляет воспалительную гиперальгезию как в острой, так и в хронической фазах, наравне с показателями препарата сравнения – диклофенака и превосходящую показатели ципрогептадина на 85% в острой фазе и на 57,2% в хронической фазе. Учитывая значимость болевого синдрома при мигренозной патологии, как фактора, существенно снижающего качество жизни пациента, а также участие серотонина в воспалительном «супе», являющимся ключевым компонентом мигренозного приступа, наличие собственной анальгетической

активности, при том как на центральном, так и на периферическом уровне, будет являться существенным плюсом для данного соединения и делает его перспективным кандидатом для дальнейшей разработки.

Заключение.

Таким образом, соединение РУ-31 было выбрано, как наиболее активная и стабильная солевая форма (дигидрохлорид) 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола среди трех соединений – лидеров. На 2 этапе исследования, в ходе детализации фармакодинамических аспектов его механизма действия было установлено, что соединение РУ-31 обладает выраженным эффектом, в отношении серотонин-индуцированного спазма, не уступающим показателям препарата сравнения – ципрогептадина. Величина ED₅₀ на данной модели составила 10 мг/кг. На 3 этапе исследования были выявлены антитромбоцитарные и антитромбогенные свойства соединения РУ-31 при моделировании агрегации с рядом индукторов, в частности с серотонином, АДФ, коллагеном и кальциевым ионофором – А23187. На 4 этапе исследования проводилась детализация нейротропных механизмов действия соединения РУ-31. Было установлено, что изучаемая субстанция обладает селективным 5-HT_{2A}-блокирующим действием, не влияя на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов, М-холиноблокирующим и ГАМК-миметическим эффектом. При этом ГАМК-миметический эффект опосредован серотониновой системой. В заключительной части исследования оценивался анальгетический потенциал соединения РУ-31 на периферическом, сегментарном и надсегментарном уровнях. Было показано, что данное соединение обладает выраженной обезболивающей активностью на всех уровнях проведения болевых сигналов, но в наибольшей степени для нее характерно влияние на периферический компонент формирования ноцицепции (Модель «формалиновой гипералгезии»).

Выводы

1. Неорганические соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-a]бензимидазола по уровню 5-HT_{2A}-блокирующей активности *in vitro* располагаются в следующем порядке: дигидрохлорид (соединение РУ-31) > дигидробромид (соединение РУ-477) > дигидронитрат (соединение РУ-476).
2. Соединение РУ-31 способно устранять серотонин-индуцированный спазм в бассейне средней мозговой артерии (ED₅₀ = 10 мг/кг), и в системе внутренней сонной артерии, демонстрируя равную активность с ципрогептадином.
3. Для соединения РУ-31 характерны антиагрегантные свойства, наиболее выраженные в условиях индукции агрегации серотонином (IC₅₀=1 мкМ). На моделях агрегации индуцированной коллагеном, АДФ, адреналином и ионофором А23187 антиагрегантная активность значительно ниже и наиболее выражена в диапазоне концентраций 10 – 100 мкМ. В условиях ристоцетин-индуцированной агрегации значимой активности выявлено не было.
4. Соединение РУ-31 проявляет антитромбогенную активность на модели тромбоза, индуцированного хлоридом железа, в дозе 10 мг/кг на 30% увеличивая время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, превосходя показатели ципрогептадина и проявляя активность равную кислоте ацетилсалициловой. На модели сосудистого повреждения анодным током, соединение РУ-31 на 40% на увеличивало время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, в 2 раза превосходило показатели ципрогептадина, но в 1,8 раза уступало показателям кислоты ацетилсалициловой.
5. Соединение РУ-31 оказывает влияние на функциональную активность нейроцитов срезов гиппокампа, снижая амплитуду и частоту серотонин-индуцированных ГАМК-индуцированных токов в гиппокампальной

формации мозга крыс в равной степени с препаратом сравнения – ципрогептадином.

6. Для соединения РУ-31 характерна блокирующая активность в отношении М-холинорецепторов на модели ацетилхолин-индуцированного сокращения подвздошной кишки *in vitro* ($pIC_{50} = 5,12 \pm 0,9$), и *in vivo*, в дозе 10 мг/кг (сокращение длительности ареколинового тремора в 1,3 раза). Соединение РУ-31 в 3 раза увеличивает латентность и снижает длительность пикротоксин-индуцированных судорог, а также в 5,4 раза и потенцирует длительность стереотипного поведения, индуцированного фенамином в 3 раза. Влияния на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов выявлено не было.
7. Соединение РУ-31 оказывает анальгетический эффект в тестах «Горячая пластина» и «Отдергивание хвоста», превышая активность ципрогептадина на 25% и 53% соответственно. В условиях формалиновой гиперальгезии соединение РУ-31 превосходит показатели ципрогептадина на 85% и 57,2% в соответствующих фазах и не уступает диклофенаку.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Поиск соединений, блокирующих 5-HT_{2A}-рецепторы, в качестве потенциальных средств для коррекции мигренозных состояний является перспективным.

Рекомендуется использовать результаты, полученные в ходе настоящего исследования, для планирования завершающей стадии расширенного доклинического исследования специфической фармакологической активности нового противомигренозного средства.

Полученные результаты рекомендуется использовать для формирования брошюры исследователя.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)

5-НТ1А/1В/2А/2С/3/4/7 – 1А/1В/2А/2С/3/4/7 типы серотонинового рецептора

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан

АДФ – натриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты

в/б – внутрибрюшинно

в/в – внутривенно

в/ж – внутрижелудочно

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ЛС – лекарственное средство

ЛП – лекарственный препарат

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

РКД – распространяющаяся корковая депрессия

СGRP – кальцитонин-ген родственный пептид

ЕС50 – полумаксимальная эффективная концентрация

ED50 – полуэффективная доза

GPCR – G-protein-coupled receptor; рецептор, сопряженный с G-белком

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования

LD50 – доза, вызывающая гибель 50% животных

L-DOPA - леводопа

mCPP – мета-хлорфенилпиперазин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрин, В.В. Влияние серотонина на дыхание, мозговой кровоток и артериальное давление у крыс [Текст] / В.В. Александрин, Н.Н. Тарасова, И.А. Тараканов // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2005. – Т.139. – №1. – С.72-76.
2. Агацарская, Я.В. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а] бензимидазола [Текст] / Агацарская Я.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.С. [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2019. – Т.69. - № 1. - С. 120-124.
3. Амелин, А.В. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия [Текст]/ А.В. Амелин, Ю.Д. Игнатов, А.А. Скоромец, А.Ю. Соколов. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 256 с.
4. Андреева, Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ [Текст] / Н.И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.
5. Анисимова, В.А. Гидробромид 9-(2-диэтиламиноэтил)2- фенилимидазо[1,2-а]бензимидазола, проявляющий свойства антагониста серотониновых 5-НТ3-рецепторов [Текст]: пат. 2285006 Рос. Федерация: С07D487/04, А61Р1/08, А61К31/415 / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, М.В. Черников [и др.]; заявители и патентообладатели Юж. науч. центр Рос. акад. наук, Волгогр. гос. мед. универ.", Науч.-иссл. инс. физ. и орг. химии Рост. гос. унив., Волгогр. науч. центр РАМН и Админ. Волгогр. обл. - № 2005118284/04; заявл. 14.06.05; опубл. 10.10.06, Бюл.№ 28. – 5 с. 244
6. Воронина, Т.А. (а) Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью [Текст] / Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман, Л.Н. Неробкова, 245 И.Г. Капица // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 212-235.

7. Воронина, Т.А. (б) Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.С. Гузеватых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 197-218.
8. Воронина, Т.А. (в) Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 235-250.
9. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов [Текст] / З.А. Габбасов, Б.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов [и др.] // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 15-18.
10. Горягин, И.И. Поиск и изучение 5-HT₂ антисеротониновой активности в ряду конденсированных производных бензимидазола [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.00.25 / Горягин Иван Иванович. – Пятигорск, 2008. – 24 с.
11. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия [Текст]. – Введ. 1994-01-01. – М.: Издво стандартов, 1994.
12. ГОСТ Р 51000.3-96. Общие требования к испытательным лабораториям [Текст]. – Введ. 1996-04-01. – М.: Изд-во стандартов, 1996.
13. Гусев Е.И. Неврология. Национальное руководство. Краткое издание [Текст] / Е.И. Гусев, А.Н. Коновалов, В.И. Скворцовой - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 880 с.
14. Деркачев, Э.Ф. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов [Текст]: пат. 2108579 Рос.Федерация: G01N33/49 / Э.Ф. Деркачев, И.В. Миндукшев А.И. Кривченко, А.А. Крашенинников; заявители и патентообладатели Э.Ф. Деркачев, И.В. Миндукшев А.И. Кривченко, А.А.

- Крашенинников. – № 96116232/14; заявл. 30.07.96; опубл. 10.04.98, Бюл.№ 10. – Т.2. – С. 298.
15. Жуковская, О.Н. Синтез и фармакологическая активность производных С(2)-замещенных бензимидазола [Текст] / Жуковская О.Н., Спасов А.А., Яковлев Д.С. [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2019. - Т.53. - № 3. - С. 10-15.
16. Зефирова, О.Н. Физиологически активные соединения, взаимодействующие с серотониновыми (5HT) рецепторами [Текст] / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефирова // Успехи химии. – 2001. – Т. 70. - №4. – С. 382-407.
17. Иззати-Заде К.Ф., Мигрень — болезнь тромбоцитов периферической крови [Текст] / К.Ф. Иззати-Заде, А.А. Шутов // Новости медицины и фармации. – 2007. – Т.10. – 214.
18. Ковалев, Г.И. Качественные и количественные особенности взаимодействия с рецепторами нейромедиаторов *in vitro*: пантогам и пантогам-актив [Текст] / Г.И. Ковалев, Ю.Ю. Фирстова, Д.А. Абаимов, Н.А. Старикова // Ж. невр. и псих. – 2012. – №3. – С. 39-43.
19. Колобродова, Н.А. Метод изучения 5-НТ4-серотонинергической активности *in vitro* [Текст] / Н.А. Колобродова, Д.С. Яковлев // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – Прил. – С. 101.
20. Косточка, Л.М. Синтез и антисеротониновая активность новых производных тропана [Текст] / Л.М. Косточка, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян, С.Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. – №9. – С. 6-9.
21. Люсов, В.А. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов [Текст] / В.А. Люсов, Ю.Б. Белоусов // Лаб. дело. - 1975. – №8. – С. 463-468.
22. Мальцев Д.В. (а) 5-НТ2А-антагонисты в ряду новых производных бензимидазола и изучение их фармакологического действия [Текст]. Волгоград: 2014. - дисс.... канд. биол. наук: 14.03.06/Мальцев Дмитрий Васильевич.

23. Мальцев Д.В. (б) Структурно-функциональная зависимость производных бензимидазола и индола в развитии 5-HT_{2A}-ергического действия [Текст] / Мальцев Д.В., Яковлев Д.С., Васильев П.М. [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2014. - № S. - С. 78-79.
24. Мирзоян, Р.С. Изыскание и изучение новых цереброваскулярных и противомигренозных средств [Текст] / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, А.В.Топчян [и др.] // Бюлл. сибирской мед. - 2006. - Т. 5 - Прил. 2. – С. 55-57.
25. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени [Текст] / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 478-485.
26. Морковина, Я.В. Метод фармацевтической альтернативы при разработке нового 5-HT_{2A}-антагониста [Текст] / Морковина Я.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Салихов Д.А. // Фармация и фармакология. - 2015. - № S1. - С. 76-77.
27. Надеев, А.Д. Серотонин и рецепторы серотонина в клетках сердечнососудистой системы [Текст] / А.Д. Надеев, ИЛ. Жарких, П.В. Авдонин, Н.В. Гончаров // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. – Т. 77. – №5. – С. 32-37.
28. Науменко, В.С. Участие 5-HT_{2A} рецепторов в генетических механизмах ауторегуляции серотониновой системы мозга [Текст] / В.С. Науменко, А.С. Цыбко, Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Молекулярная Биология. – 2012. – Т. 46. – №2. – С. 1-7.
29. Осипова, В. В. Современные подходы к диагностике и лечению мигрени. [Текст] / В.В. Осипова // Вестник семейной медицины. - 2010. - №2. – С.19-24.

- 30.Петров, В.И. Фундаментальные и прикладные достижения ученых ВолгГМУ в области фармакологии [Текст] / В.И. Петров, А.А. Спасов, 249 И.Н. Тюренков [и др.] // Актуальные проблемы стратегии развития Волгограда: под ред. В.С. Боровик. – 2012. – Городские вести.
- 31.Сергеев, В.П. Рецепторы физиологически активных веществ [Текст] / В.П. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров // изд. 2, перераб.и доп. Москва – Волгоград, 1999 – 640 с.
- 32.Сергиенко, В.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева, Е.И. Маевский // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронов. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. - С. 889-940.
- 33.Середенин, С.Б. Тропоксин - новый антагонист серотонина и потенциальное противомигренозное средство [Текст] / С.Б. Середенин, Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – №3. – С. 28-31.
- 34.Спасов, А.А. Направленный поиск противомигренозных средств – блокаторов серотониновых рецепторов 2А типа – среди гетероциклических азотсодержащих соединений [Текст]: отчет о НИР 250 (заключит.) / Волгоград. гос. мед. унив. ; рук. Спасов А.А.; исполн.: Васильев П.М. [и др.]. - Волгоград : [б.и.], 2015.
- 35.Спасов, А.А. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем [Текст] / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – №11. – С. 23-26.
- 36.Султанова, К.Т. Влияние нового 5-НТ2А-антагониста на кровоток в области средней мозговой артерии в условиях ишемии [Текст] / Султанова К.Т., Бригадирова А.А., Морковина Я.В. [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2018. - Т.81. - № 5. - С. 235.

- 37.Топчян, А.В. Фармакологическая коррекция кровоснабжения и функционального состояния мозга при его локальном ишемическом поражении [Текст]: дисс. ... докт. Мед. наук: 14.00.25 / Акоп Варданович Топчян – М., 1998. – 340 с.
- 38.Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений [Текст] / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский Химический Журнал - 2006. – Т.1 – №2. – С. 66-75.
- 39.Цыбко, А.С. Серотониновые 5-НТ2А рецепторы в механизмах ауторегуляции и пластичности серотониновой (5-НТ) системы мозга [Текст]: дисс. ... канд. биол. наук 03.03.01. / Антон Сергеевич Цыбко - Новосибирск., 2013. – 125 с. 251
- 40.Черников М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ [Текст] / Волгоград. - 2008. - дис. док. мед. наук. 14.00.25 Черников Максим Валентинович
- 41.Черников, М.В. Анализ функционально значимых структурных фрагментов веществ с 5-НТ2- и 5-НТ3-антагонистической активностью [Текст] / М.В. Черников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. - 11(3). - 38-41.
- 42.Шимановский Н.Л. Молекулярная и нанофармакология. [Текст] / Шимановский Н.Л. Епинетов М.А. Мельников М.Я. // Москва: ООО Издательская фирма "Физико-математическая литература". -2009.
- 43.Яковлев Д.С. Конденсированные азолы - новый класс лигандов серотониновых рецепторов [Текст] / Волгоград:2016. - дисс.... докт. мед. наук: 14.03.06/Яковлев Дмитрий Сергеевич.
- 44.Alexander, S.P. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview [Text] / S.P. Alexander, H.E. Benson, E. Faccenda [et. al.] // Br. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 170. –№8. – P. 1449-1458.
- 45.Anighoro, A. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discover [Text] / A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastell // J. Med. Chem. – 2014. – Vol. 57. – №19. – P. 7874-7887.

46. Baena, C., D'Amico, R., Slongo, H., Brunoni, A., Goulart, A., & I. Benseñor. The effectiveness of aspirin for migraine prophylaxis: a systematic review. *Sao Paulo Med J.* 2017. - (135(1)), 42-49.
47. Bardin, L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain [Text] / L. Bardin // *Behav. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 22. – №5-6. – P. 390-404. 253
48. Begg, D.P. Attenuation of benzodiazepine withdrawal anxiety in the rat by serotonin antagonists [Text] / D.P. Begg, K.T. Hallam, T.R. Norman // *Behav. Brain Res.* – 2005. – Vol. 161. – №2. – P. 286-290.
49. Bell R., D. A. Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT₂/5-HT₃/5-HT₄ ligands. [Text] // *Sci. Rep.* 2014. - (4), 3881.
50. Benyamina A., N. M. Potential role of cortical 5-HT_{2A} receptors in the anxiolytic action of cyamemazine in benzodiazepine withdrawal. [Text] // *Psychiatry Res.*, 2012. - 198(2), 307-312.
51. Berg, K.A. Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors [Text] / K.A. Berg, J.A. Harvey, U. Spampinato, W.P. Clarke // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2005. – №26. – P. 625.
52. Bockaert, J. 5-HT₄ receptors, a place in the sun: act two [Text] / J. Bockaert, S. Claeysen, V. Compan, A. Dumuis // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 11. – №1. – P. 87-93.
53. Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal [Text] / G.V.R. Born // *Nature.* – 1962. – Vol. 194. – P. 927-929.
54. Borroto-Escuela, D.O. Hallucinogenic 5-HT_{2A} agonists LSD and DOI enhance dopamine D₂R protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes [Text] // D.O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, M. Narvaez [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 443. – №1. – P. 278-284.
55. Branes, M. Neuronal 5-HT Receptors and SERT [Text] / M. Branes, F. Neumaier // *Tocris Bioscience Scientific Review Series.* – 2011. – №34. – P. 1-16. 255

56. Branes, N. A review of central 5-HT receptors and their function [Text] // N. Branes, T. Sharp / *Neuropharmacology*. – 1999. – №38. – P. 1083-1152.
57. Carrol, N.M. Observations of neuropharmacology of morphine – like analgesia [Text] / N.M. Carrol, P.K. Lim // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1960. – №125. – P. 383-403. 256
58. Chernova K, Inhibitory Effects of Ethanol in the Neonatal Rat Hippocampus In Vivo [Text] / K. Chernova, G. Burkhanova, A. Zakharov // *BioNanoScience*. - 2017. - Vol.7. - Is.1. - P.159-161.
59. Clinard, C.T. Activation of 5-HT_{2a} receptors in the basolateral amygdala promotes defeat-induced anxiety and the acquisition of conditioned defeat in Syrian hamsters [Text] / C.T. Clinard, L.R. Bader, M.A. Sullivan, M.A. Cooper // *Neuropharmacology*. – 2015. №90. – P. 102-112.
60. Damaj, M.I. Pharmacological Characterization of Nicotine-Induced Seizures in Mice [Text] / M. I. Damaj, W. Glassco, M. Dukat, B. R. Martin // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. – 1999. – Vol. 291. – №3. – P. 1284-1291.
61. Danese, E. Platelets and migraine [Text] / E. Danese, M. Montagnana, G. Lippi // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 134. – №1. – P. 17-22.
62. de Greck, M. Pain therapy in irritable bowel syndrome [Text] / M. de Greck, P. Layer, V. Andresen // *Schmerz*. – 2014. – Vol.28. – №3. – P. 289-293.
63. DeSimone, R.W. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery [Text] / R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell [et al.] // *Combinat. Chem. High Thr. Screening*. – 2004. – №7. – P. 473-493.
64. Diener, H.C. New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine [Text] / H.C. Diener, A. Charles, P.J. Goadsby, D. Holle // *Lancet Neurol*. – 2015. – Vol. 14. – №10. – P. 1010-1022.
65. Engelhardt, G. On the pharmacology of 9,10-dihydro-10-(1-methyl-4-piperidylidene)-9-anthrol (WA 335), a histamine and serotonin antagonist (author's transl) [Text] / G. Engelhardt // *Arzneimittel-Forschung Drug Research*. – 1975. – Vol. 25. – P. 1723.

66. Färber, L. Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor [Text] / L. Färber, U. Haus, M. Späth [et al.] // *Scand. J. Rheumatol.* – 2004. – №119. – P. 2-8.
67. Fozard, J.R. MDL 72222: a potent and highly selective antagonist at neuronal 5-hydroxytryptamine receptors [Text] / J.R. Fozard // *Naunyn-Schmiedenberg Arch. Pharmacol.* – 1984. – №326. – P. 36–44.
68. García-Oscos, F. Activation of 5-HT receptors inhibits GABAergic transmission by pre- and post-synaptic mechanisms in layer II/III of the juvenile rat auditory cortex [Text] / F. García-Oscos, O. Torres-Ramírez, L. Dinh [et al.] // *Synapse.* – 2015. – Vol. 63. – №3. – P. 115-127.
69. Gathers, C. Characterization of muscarinic receptors on the isolated guinea pig ileum at pharmacologically low concentrations [Text] / C. Gathers, W. Colbert, J. Berger // *Gen. Pharmacol.* – 1993. – Vol.24. – №3. – P. 659-961.
70. Goadsby, P.J., / P.J. Goadsby, P.R. Holland, M. Martins-Oliveira [et al.] // *Physiol. Rev.*, 2017, vol. 97, no. 2, pp. 553–622.
71. Goitia, B. Modulation of gaba release from the thalamic reticular nucleus by cocaine and caffeine: role of serotonin receptors [Electronic resource] : B. Goitia, M.C. Rivero-Echeto, N.V. Weisstaub [et al.] // *Journal of Neurochemistry*; [Wiley Online Library]. - URL: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13398>
72. Gomes, K.S. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice [Text] / K.S. Gomes, R.L. Nunes-De-Souza // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2009. – Vol. 33. – №7. – P. 1261-1269.
73. Guglielmi, G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach, 1: electrochemical basis, technique and experimental results [Text] / G. Guglielmi, F. Vinuela, I. Sepetka, V. Macellari // *J. Neurosurg.* – 1991. – Vol. 75. – P. 1-7.
74. Hannon, J. Molecular biology of 5-HT receptors [Text] / J. Hannon, D. Hoyer // *Behav. Brain Res.* – 2008. – Vol. 195. – №1. – P. 198-213.

75. Hayat, F. Synthesis and biological evaluation of 4-nitroindole derivatives as 5-HT_{2A} receptor antagonists [Text] / F. Hayat, A.N. Viswanath, A.N. Pae [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2015. – Vol. 23. – №6. – P. 1313-1320.
76. Hopkins, A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [Text] / A.L. Hopkins // Nature Chemical Biology. – 2008. – №11. – Vol. 4. – P. 6982-6990.
77. Huang, B.Q. Effects of blockade of 5-HT_{2A} receptors in inflammatory site on complete Freund's adjuvant-induced chronic hyperalgesia and neuropeptide Y expression in the spinal dorsal horn in rats [Text] / B.Q. Huang, B. Wu, Y. Hong, W. Hu // Sheng Li Xue Bao. – 2015. – Vol. 67. – №5. – P. 463-469.
78. Kawa K. Distribution and functional properties of 5-HT₃ receptors in the rat hippocampal dentate gyrus: a patch-clamp study [Text] / K. Kawa // J. Neurophysiol. – 1994. – №71. – P. 1935–1947.
79. Kesim, M. The different roles of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice [Text] / M. Kesim, E.N. Duman, M. Kadioglu // J. Pharmacol. Sci. – 2005. – Vol. 97. – №1. – P. 61-66.
80. Ketanserin [Electronic resource]: Drug future Base [Data Base]. – URL: <http://www.drugfuture.com/toxic/q121-q638.html> (дата обращения 14.06.2019).
81. Kolobrodova, N.A. Anxiolytic profile of 5-HT₃-antagonist RU-1204 versus tropisetron and diazepam [Text] / N.A. Kolobrodova, D.S. Yakovlev, A.A. Spasov, V.A. Anisimova // Eur. Neuropsychopharmac. – 2011. – S2. – P. S147-263
82. Kovács, A. Vasoconstrictor 5-HT receptors in the smooth muscle of the rat middle cerebral artery [Text] / A. Kovács, L.G.Jr. Hársing, G. Szénási // Eur. J. Pharmacol. – 2012. – Vol. 689. – №1-3. – P. 160-164.
83. Krasaelap, A. Cyproheptadine: A Potentially Effective Treatment for Functional Gastrointestinal Disorders in Children [Text] / Pediatric Annals. - 2017. – Vol.46. - №3. – P.120-125.

84. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [Text] / K.D. Kurz // *Thromb. Res.* – 1990. – Vol. 15. – P. 269-280.
85. Yoon, M. Lack of reciprocity between opioid and 5-HT₃ receptors for antinociception in rats / M. Yoon, H. Bae, J. Choi [et al.] // *Pharmacology.* – 2006. – Vol. 77. – №4. – P. 195-202.
86. Lin, O.A. The antidepressant 5-HT_{2A} receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function [Text] / O.A. Lin, Z.A. Karim, H.P. Vemana [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – №1. – P. 7026-64
87. Lipton, R. B. Aspirin Is Efficacious for the Treatment of Acute Migraine [Text] / R. B. Lipton, J. Goldstein, J. S. Baggish [et al.] // *The Journal of Head and Face Pain.* – 2005. – Vol.1. - 283-292.
88. Liu, H.Y. Migraine and the Hippocampus [Text] / H.Y. Liu // *Curr Pain Headache.* – 2018. - Vol. 5. - №2
89. Liu, Y. Photodegradation of paracetamol in nitrate solution [Text] / J. Huan, K. Xue // *Chem. Med. J.* - 2007. – Vol.28. – №6. -P.1274-9.
90. Lu, R. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2a} receptor-mediated contraction in aorta [Text] / R. Lu, A. Alioua, Y. Kumar [et al.] // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 586. – P. 3855-3869.
91. Maltsev, D.V. Anxiolytic action of a new 5-HT_{2a} antagonist RU-476 [Text] / Maltsev D.V., Yakovlev D.S., Matokhin D.G. [et al.] // *European Neuropsychopharmacology.* - 2013. – Vol.23. - № S2. – P. S519-S520.
92. Mason, B.N. Vascular Contributions to Migraine: Time to Revisit? *Front Cell Neurosci.*, 2018. - V. 12, 1 - 10.
93. Mengod, G. Cartography of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptor Subtypes in Prefrontal Cortex and Its Projections / G. Mengod, J.M. Palacios, R. Cortés // *ACS Chem. Neurosci.* – 2015. – Vol. 6. – №7. – P. 1089-1098.
94. Mestre, T.A. 5-Hydroxytryptamine 2A receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders [Text] / T.A. Mestre, M. Zurowski, S.H. Fox // *Expert Opin. Investig Drugs.* – 2013. – Vol. 22. – №4. – P. 411- 421.

95. McCorvy, J.D. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors [Text] / J.D. McCorvy, B.L. Roth // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – №150. – P. 129-142.
96. McMahon, L.L. Hippocampal interneurons are excited via serotonergic ion channels [Text] / L.L. McMahon, J.A. Kauer // *J. Neurophysiol.* – 1997. – №78. – P. 2493-2502.
97. Nagatomo, T. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system [Text] / T. Nagatomo, M. Rashid, H. Abul Muntasir, T. Komiyama // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 104. – №1. – P. 59-81.
98. Nichols, D.E. Structure-activity relationship of serotonin 5-HT_{2A} agonists [Text] / D.E. Nichols // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. – 2012. – Vol.1. – №5. – P. 559–579.
99. Nielsen C.K. Head and whole-body jerking in guinea pigs are differentially modulated by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{2A} receptor antagonists [Text] / C.K. Nielsen // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – №2-3. – Vol. 361. – P. 185-190.
100. Ohlsson, L. Algesimetric studies by the hot plate method in mice [Text] / L. Ohlsson // *Act. Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. – 1953. – Vol. 9. – №4. – P. 322-331.
101. Okamoto, K. 5-HT_{2a} receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats [Text] / K. Okamoto, H. Imbe, Y. Morikawa [et al.] // *Pain*. – 2002. – Vol. 99. – P. 133-143.
102. Olivier, J.D. The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders [Text] / J.D. Olivier, C.H. Vinkers, B. Olivier // *Front Pharmacol.* – 2013. – №4. – P. 74.
103. Osipova V.V., Diagnosis and treatment of migraine: recommendations of Russian experts [Text] / Osipova V.V., Artemenko A.R., Sergeev A.V., [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2018. – Vol.48. – № 5. – P.621-635.
104. Ponnalaa, S. Evaluation of structural effects on 5-HT_{2A} receptor antagonism by aporphines: Identification of a new aporphine with 5-HT_{2A}

- antagonist activity [Text] / S. Ponnalaa, J. Gonzalesa, N. Kapadi, W. Hardinga // Bioorganic & Med. Chem. Leters. – 2014. – Vol.24. – №.7. – P. 1664-1667.
105. Pranzatelli, M.R. Brainstem serotonergic hyperinnervation modifies behavioral supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in the rat [Text] / M.R. Pranzatelli, Y.Y. Huang [et al.] // Brain Res. Dev. Brain Res. – 1989. – Vol.50. – №501. – P. 89-99.
106. Preston, A.R. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory [Text] / A.R. Preston, H. Eichenbaum // Curr. Biol. – 2013. – Vol. 23. – P. R764–R773.
107. Quesseveur, G. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression [Text] / G. Quesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier, B.P. Guiard // Expert Opin. Investig. Drugs. – 2012. – Vol. 21. – №11. – P. 1701-1725.
108. Ruiu, S. The 5-HT₂ antagonist ritanserin blocks dopamine re-uptake in the rat frontal cortex [Text] / S. Ruiu, G. Marchese, P.L. Saba [et al.] // Molecular Psychiatry. – 2000. – №5. – P. 673-677.
109. Sokolov, Y. The role of serotonin receptors in migraine headaches [Text] // Neurochemical Journal, 2011. - 28(2), 104-112.
110. Srikiatkachorn, A. Pathophysiology of medication overuse headache - an update [Text] / A. Srikiatkachorn, S.M. le Grand, W. Supornsilpchai, R.J. Storer // Headache. – 2014. – Vol. 54. – №1 – P. 204-210.
111. Supornsilpchai, W. Involvement of pro-nociceptive 5-HT_{2A} receptor in the pathogenesis of medication-overuse headache [Text] / W. Supornsilpchai, S.M. le Grand, A. Srikiatkachorn // Headache. – 2010. – Vol. 50.– №2. – P. 185-197.
112. Voronova, I.P. 5-HT_{2A} receptors control body temperature in mice during LPS-induced inflammation via regulation of NO production [Text] / I.P. Voronova, G.M. Khramova, E.A. Kulikova [et al.] // Pharmacol. Res. – 2015. – №103. – P. 123-131.

113. Watts, S.W. Serotonin and blood pressure regulation [Text] / S.W. Watts, S.F. Morrison, R.P. Davis, S.M. Barman // Pharmacol. Rev. – 2012. – Vol. 64. – №2. – P. 359-388.
114. Wischhof, L. 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor interactions: on their relevance to cognitive function and psychosis [Text] / L. Wischhof, M. Koch // Behav. Pharmacol. – 2016. – №1. – Vol. 27. – P. 1-11.
115. Xie, H. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats [Text] / H. Xie, Z.Q. Dong, F. Ma [et al.] // Brain Res. – 2008. – №1210. – P. 76-83.
116. Yakovlev, D.S. Effect of 5-HT(2A) receptor antagonists on blood flow in the carotid vessels upon elevation of serotonin level [Text] / Yakovlev D.S., Spasov A.A., Maltsev D.V., Anisimova V.A. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2014. – Vol.157. - № 3. – P.350-352.
117. Yang, Y. Novel serotonin receptor 2 (5-HT_{2R}) agonists and antagonists: a patent review (2004-2014) [Text] / Y. Yang, S. An, Y. Liu [et al.] // Expert Opin. Ther. Pat. – 2016. – Vol. 26. – №1. – P. 1-18.
118. Zeitz, K.P. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors [Text] / K.P. Zeitz, N. Guy, A.B. Malmberg [et al.] // J. Neurosci. – 2002. – №3. – Vol. 22. – P. 1010-1019.
119. Zhang, G. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition [Text] / G. Zhang, R.W.Jr. Stackman // Front Pharmacol. – 2015. – №6. – P. 225. 275