

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

Министерства здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное учреждение
«ВОЛГОГРАДСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»

На правах рукописи

МАЛЬЦЕВ ДМИТРИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**5-НТ_{2A}-АНТАГОНИСТЫ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
БЕНЗИМИДАЗОЛА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

академик РАН,

Заслуженный деятель науки РФ,

доктор медицинских наук,

профессор

Спасов Александр Алексеевич

ВОЛГОГРАД – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. 5-НТ _{2A} -РЕЦЕПТОРЫ: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ. ЛИГАНДЫ 5-НТ _{2A} РЕЦЕПТОРОВ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1. Классификация, строение и распределение 5-НТ _{2A} -рецепторов	11
1.2. Локализация 5-НТ _{2A} -рецепторов.....	18
1.3. Функции 5-НТ _{2A} -рецепторов	19
1.4. Лиганды 5-НТ _{2A} -рецепторов.....	22
1.5. Производные бензимидазола: перспективы поиска новых веществ с 5-НТ _{2A} -антагонистическим действием.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Материалы исследования.....	34
2.2. Методы исследования.....	40
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, БЛОКИРУЮЩИХ 5-НТ _{2A} -РЕЦЕПТОРЫ, СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА.....	67
3.1. Изучение 5-НТ _{2A} -антагонистических свойств производных N ⁹ - имидазо [1,2-α]бензимидазола на модели серотонин-индуцированной активации тромбоцитов	68
3.2. Определение показателей IC ₅₀ , LD ₅₀ и терапевтического индекса соединений лидеров	70
3.3. Зависимость серотониноблокирующих свойств производных имидазобензимидазола от химической структуры	72
3.4. Зависимость антисеротонинового эффекта изучаемых веществ от их физико-химических свойств.....	76
3.5. Заключение	80
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-476 НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСУДИСТОГО ТОНУСА И КРОВОТОКА, ИНДУЦИРОВАННОГО СЕРОТОНИНОМ.....	81

4.1.1. Влияние соединения РУ-476 на вызванное серотонином изменение скорости кровотока во внутренней сонной артерии.....	82
4.1.2. Влияние соединения РУ-476 на серотонин индуцированное изменение скорости кровотока в мозговых артериях.....	84
4.2. Воздействие соединения РУ-476 на изменение скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина в условиях ишемии мозга крыс.....	87
4.3. Влияние соединения РУ-476 на системное артериальное давление	89
4.4. Влияние соединения РУ-476 на хронотропное действие серотонина.....	91
4.5. Заключение	95
ГЛАВА 5. АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-476.....	97
5.1. Действие соединения РУ-476 на агрегацию тромбоцитов	97
5.2. Изучение антитромботического действия соединения РУ-476	102
5.3. Заключение	102
ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦЕНТРАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-476	103
6.1. Влияние соединения РУ-476 на 5-НТ ₃ и 5-НТ ₄ - рецепторы <i>in vitro</i>	103
6.1.1. Влияние соединения РУ-476 на 5-НТ ₃ -рецептор.....	104
6.1.2. Влияние соединения РУ-476 на 5-НТ ₄ рецептор.....	105
6.2. Взаимодействие соединения РУ-476 с модуляторами основных нейромедиаторных систем <i>in vivo</i>	106
6.2.1. Воздействие соединения РУ-476 на гиперкинез, вызванный 5 гидрокситриптофаном у мышей	106
6.2.2. Воздействие соединения РУ-476 на ареколиновый тремор	109
6.2.3. Влияние соединения РУ-476 на никотиновый тремор.....	109
6.2.4. Влияние соединения РУ-476 на судорожный эффект пикротоксина.....	111
6.2.5. Действие соединения РУ-476 на стереотипное поведение, вызванное апоморфином	113

6.2.6. Влияние соединения РУ-476 на каталептогенный эффект галоперидола.....	114
6.2.7. Действие соединения РУ-476 на эффекты L-ДОФА.....	115
6.2.8. Влияние соединения РУ-476 на гипотермический эффект резерпина...	116
6.2.9. Влияние соединения РУ-476 на гипотермический эффект клофелина.....	116
6.2.10. Действие соединения РУ-476 на стереотипное поведение, вызванное фенамином.....	118
6.3. Заключение	119
ГЛАВА 7. АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-476.....	123
7.1. Обезболивающий эффект соединения РУ-476 на модели адьювантного артрита.....	124
7.2. Влияние соединения РУ-476 на формалиновую гиперальгезию	126
7.3. Заключение	128
ГЛАВА 8. ОБЩИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-476	129
8.1. Изучение острой токсичности вещества РУ-476.....	129
8.2. Изучение возможных нейротоксикологических эффектов соединения РУ-476.....	131
8.3. Заключение	140
ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	152
ВЫВОДЫ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Для серотониновых рецепторов 2 типа показано участие в различных функциях организма, как в норме, так и при патологиях [Мирзоян Р.С. и др., 2006; Чейдо М.А., 2010; Мирзоян Р.С. и др., 1999; Воронина Т.А. с соавт., 2010]. Опосредуемые 5-НТ_{2А} рецепторами эффекты вовлечены в процессы контроля функционального состояния тромбоцитов (активация, агрегация), тонуса сосудов, развития воспалительных реакций, а так же возникновения и проведения болевых импульсов [Berger M. et al., 2009; Макаров В.А. с соавт., 2005]. В связи с этим, 5-НТ_{2А} рецептор вызывает значительный интерес как фармакологическая мишень, при создании высокоэффективных препаратов для коррекции нервно-психотических расстройств, лечения цефалгий мигренозного типа [Амелин А.В., 2011; Воронина Т.А. с соавт., 2011].

В настоящее время в практической медицине используется ряд средств корректирующих нарушение гемостаза и транзиторные цереброваскулярные расстройства, в том числе мигрень, у которых доказана 5-НТ_{2А}-антагонистическая активность [Green A.R., 2006; Середенин С.Б. с соавт., 1998]. Однако уже имеющиеся лекарственные средства (ципрогептадин, метерголин, рисперидон) являются низкоэффективными препаратами второго ряда, которые так же обладают целым рядом побочных эффектов и противопоказаний [Амелин А.В., 2011].

На основании указанного выше актуальным и целесообразным стал поиск новых эффективных соединений с 5-НТ_{2А} антисеротониновым действием, и разработка на их основе средств для лечения функциональных нарушений сосудисто-тромбоцитарного звена, мигрени. В ранее проведенных исследованиях была обоснована перспективность изучения конденсированных производных бензимидазола с целью выявления новых антагонистов 2А подтипа серотониновых рецепторов [Горягин И.И., 2008; Tomić M. et al., 2003; Анисимова В.А. с соавт., 2010; Анисимова В.А. с соавт., 2012].

Степень разработанности. На сегодняшний день для 5-НТ_{2А} рецепторов доказано участие в формировании значительного количества патологических состояний - мигрень, гипертензия, обсессивно-компульсивные расстройства, ожирение [Krupali G. et al., 2011; Adams J. W. et al., 2008; Leysen с соавт., 1984; Gamoh S. et al., 2013; Nagatomo T. et al., 2004]. В России отсутствуют препараты, способные эффективно блокировать 2А подтип серотониновых рецепторов [Амелин А.В. с соавт., 2011].

Целью исследования является поиск новых веществ, обладающих 5-НТ_{2А}-антагонистической активностью в ряду новых производных бензимидазола и изучение их фармакологических свойств.

Для решения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние новых производных бензимидазола на 5-НТ_{2А}-рецепторы на модели *in vitro*.
2. Провести анализ зависимости между структурой и функциональной активностью изучаемых соединений по отношению к 2А подтипу серотониновых рецепторов с применением логико-структурных методов.
3. Определить активность новых соединений в отношении серотониновых 5-НТ_{2А}-рецепторов на экспериментальных моделях нарушения мозгового и системного кровотока и сравнить их с известными препаратами.
4. Исследовать антиагрегантные и антитромбогенные свойства наиболее активного соединения на моделях *in vivo* и *in vitro*.
5. Провести оценку влияния наиболее активного соединения на основные медиаторные системы мозга с определением возможного спектра рецепторной и нейротропной активности.

6. Изучить обезболивающую активность соединения на моделях периферической гипералгезии.
7. Изучить острую токсичность наиболее активных соединений.
8. Провести анализ возможных нейротоксикологических эффектов наиболее активного соединения.

Научная новизна.

Впервые была изучена 5-HT₂-серотониноблокирующая активность производных имидазо[1,2- α]бензимидазола, содержащих циклические и нециклические алкильные остатки в боковой цепи, присоединенные к атому N⁹.

Установлено, что выраженность 5-HT_{2A}-блокирующих свойств коррелирует с показателями заряда азотсодержащего радикала в положении N⁹. Диэтиламиноэтил и 4 - метоксифенил в N⁹ и C² положениях, вносили наиболее значимый вклад в уровень фармакологической активности.

В результате проведенных экспериментов установлено, что соединение РУ-476 (N⁹-пиперидиноэтил замещенное имидазо[1,2- α]бензимидазола) по уровню 5-HT_{2A}-антагонистической активности проявляет равную кетансерину активность и превосходит ципрогептадин. Установлена способность экспериментального соединения эффективно снижать уровень серотонин индуцированной активации и агрегации тромбоцитов. Получены данные об отсутствии у соединения РУ-476 антитромботической активности, на моделях артериального тромбоза индуцированного электрическим током и аппликацией хлоридом железа (III).

Впервые показана способность соединения РУ-476 снижать серотонин индуцированный спазм сосудов, болевую чувствительность, а также возможное взаимодействие с агонистами/антагонистами дофаминергической, серотонинергической и ГАМК-ергической медиаторными системами мозга.

Научно-практическая значимость.

Выявленные в ходе проведенного исследования закономерности между серотониноблокирующей активностью производных N⁹-имидазо[1,2-α]бензимидазола и их структурой и физико-химическими свойствами расширяют знания и могут быть полезны при целенаправленном поиске новых соединений с 5-HT_{2A}-блокирующей активностью.

Установленные для соединения РУ-476 эффекты связанные с возможностью блокировать 5-HT –индуцированную активацию и агрегацию тромбоцитов, снижать вызванный серотонином спазм сосудов, изменять эффекты медиаторов дофамин- и ГАМК–ергических нейромедиаторных систем, а также анальгетическое действие позволяют рекомендовать завершение доклинического цикла исследований для соединения под лабораторным шифром РУ-476.

Методология и методы исследования.

Учитывая поставленные задачи, выбор методических подходов осуществлялся из современных высокоинформативных методов имеющих в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ ВМНЦ. Исследование осуществлялось на нелинейных половозрелых самцах мышей, крыс и морских свинок, а также кроликах-самцах. Основные методы исследования, направленные на изучение сосудистых, антитромботических, нейромедиаторных и анальгетических свойств соединения РУ-476 проводились согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Мирзоян Р.С. с соавт., 2012; Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012].

Реализация результатов исследования.

Результаты выявленных закономерностей между структурной и физико-химической характеристикой исследованного ряда производных имидазо[1,2-α]бензимидазола, содержащих циклические и нециклические алкильные остатки

в боковой цепи, присоединенные к атому N⁹ с их 5-HT_{2A} антагонистической активностью, внедрены в работу по оптимизации синтеза соединений с 5-HT_{2A} блокирующей активностью, которая проводится на базе НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пермской государственной медицинской академии, кафедре фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. 2-замещенные 9-диэтиламиноэтил-имидазо[1,2- α]бензимидазола являются перспективным классом соединений для поиска новых антагонистов 5-HT_{2A}-рецепторов.

2. Соединение под лабораторным шифром РУ-476 (9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил) имидазо[1,2- α]бензимидазола) по влиянию на 5-HT_{2A}-рецепторы равно кетансерину и превосходит ципрогептадин.

3. Вещество РУ-476 способно эффективно блокировать серотонин индуцированную активацию и агрегацию тромбоцитов, но не обладает антитромботическим действием.

4. Соединение РУ-476 выражено блокирует серотонин индуцированное снижение скорости кровотока в общих сонных и области средней мозговой артериях, обладает анальгетическим действием.

Апробация работы.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на I Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, Москва, 2013 г.; XVII и XVIII Региональных конференциях молодых исследователей

Волгоградской области, 2012-13 гг.; 70, 71 и 72 итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 2012-14 гг.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 10 работ (из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Минобрнауки).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 рисунками, 34 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы (глава I), главы материалы и методы (глава II), экспериментальной части (главы III-VIII), обсуждения результатов (глава IX), выводов и списка литературы, включающего 187 источников, в том числе 141 зарубежных.

ГЛАВА 1. 5-НТ_{2A}-рецепторы: строение, функции, локализация. Лиганды 5-НТ_{2A} рецепторов и их терапевтический потенциал (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Классификация, строение и распределение 5-НТ_{2A}-рецепторов

Начиная со времени обнаружения серотонина в головном мозге в 1964 году Дальстремом и Фуксом, а также изучения опосредованных им эффектов, появилось множество работ по поиску и исследованию соединений, селективно взаимодействующих с серотониновыми рецепторами [Laura Cristina Verumen et al., 2012]. При этом непосредственно 2A подтип был обнаружен ещё в 1957 году Гаддумом и Пицарелли, хотя на тот момент его приняли за дофаминовый рецептор. Только через 22 года, в 1979 году, Пероутка и Снитке определили его как серотониновый рецептор 2A подтипа [Peroutka S.J., Snyder S.H., 1979]. В настоящее время сформировалось представление о разнообразии серотониновых рецепторов, которые представлены семью различными типами и более чем шестнадцатью подтипами [Alexander S.P.H. et al., 2010; Hannon J., Noyer D., 2008]. Расшифрована полипептидная структура серотониновых рецепторов различных подтипов, определена их топология.

Серотониновые рецепторы локализованы практически во всех органах и тканях [Hannon J., Noyer D., 2008].

Рецепторы для серотонина относятся к двум классам (рис. 1.1):

- Ионотропные, являющиеся катионными каналами, которые закрываются и открываются лигандами (5-НТ₃ рецепторы) [Kitson S.L., 2007].

- G- протеин сопряженные рецепторы (5-НТ₁, 5-НТ₂, 5-НТ₄₋₇).

5-НТ-рецепторы

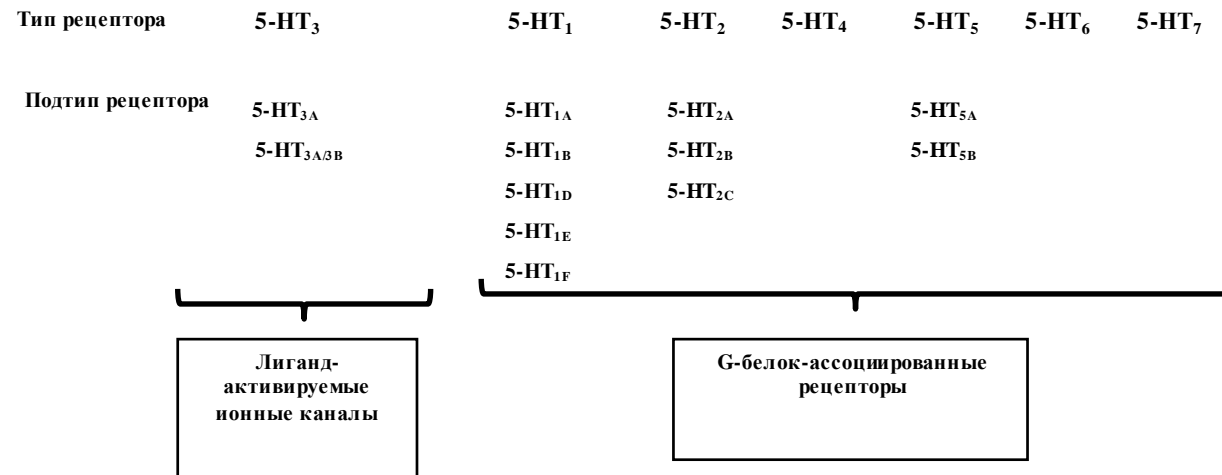


Рис. 1.1 Классификация серотониновых рецепторов (IUPHAR, 2014).

Тип 5-HT₂-рецепторов объединяет 3 подтипа: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} и 5-HT_{2C} рецепторы [Rahman W. et al., 2011]. Все эти рецепторы имеют альфа-спирали, семикратно пронизывающие мембрану (трансмембранные домены) (рис. 1.2).

Группы доменов соединены длинными цепочками белков, три петли которых направлены во внеклеточное пространство, а три – в сторону цитозоля. Третья внутриклеточная петля предназначена для связывания с G-белком. Отмечается, что каждый из трансмембранных сегментов состоит из 25-27 аминокислот. Макромолекула рецептора также имеет внеклеточный N- и внутриклеточный C – концевые участки [Weinstein H., 2006].

К активации рецептора приводит взаимодействие с аспартатом и глутаматом в ТМ III, а также ТМ VII, что характерно для многих G белок связанных рецепторов [Jufang Shan et al., 2012; Kristiansen K. et al., 2000]. Исследования по точечному мутагенезу свидетельствуют, что взаимодействие между основным азотом лигандов и боковой цепью аспартата 155 в III домene, содержащего карбоксильную группу, приводит к «заякориванию» лиганда. Аминогруппа серотонина и некоторых других 5-HT₂ лигандов, помимо вышеуказанного взаимодействия, может образовывать водородную связь с боковой цепью серина 159 и аспартата 155 в ТМ III [Kristiansen K. et al., 2000; Weinstein H., 2006]. Однако другая часть специфических лигандов, у которых аминогруппа является частью цикла, не склонна к данному взаимодействию из-за стерических затруднений. Также существуют данные о влиянии на уровень связывания различных участков в ТМ V: S239, F240, F243, и F244. Так, мутация ТМ на участке F243A приводила к снижению связывания α-метил-серотонина, кетансерина, ритансерина и спиперона, но не оказывала никакого эффекта на связывание серотонина и N-диметилтриптамина [Shapiro D. A. et al., 2000]. Также существует мнение об особом вкладе Asn 363 и Tyr 370 в связывании лиганда и передаче сигнала [Karupiah Kanagarajadurai et al., 2009].

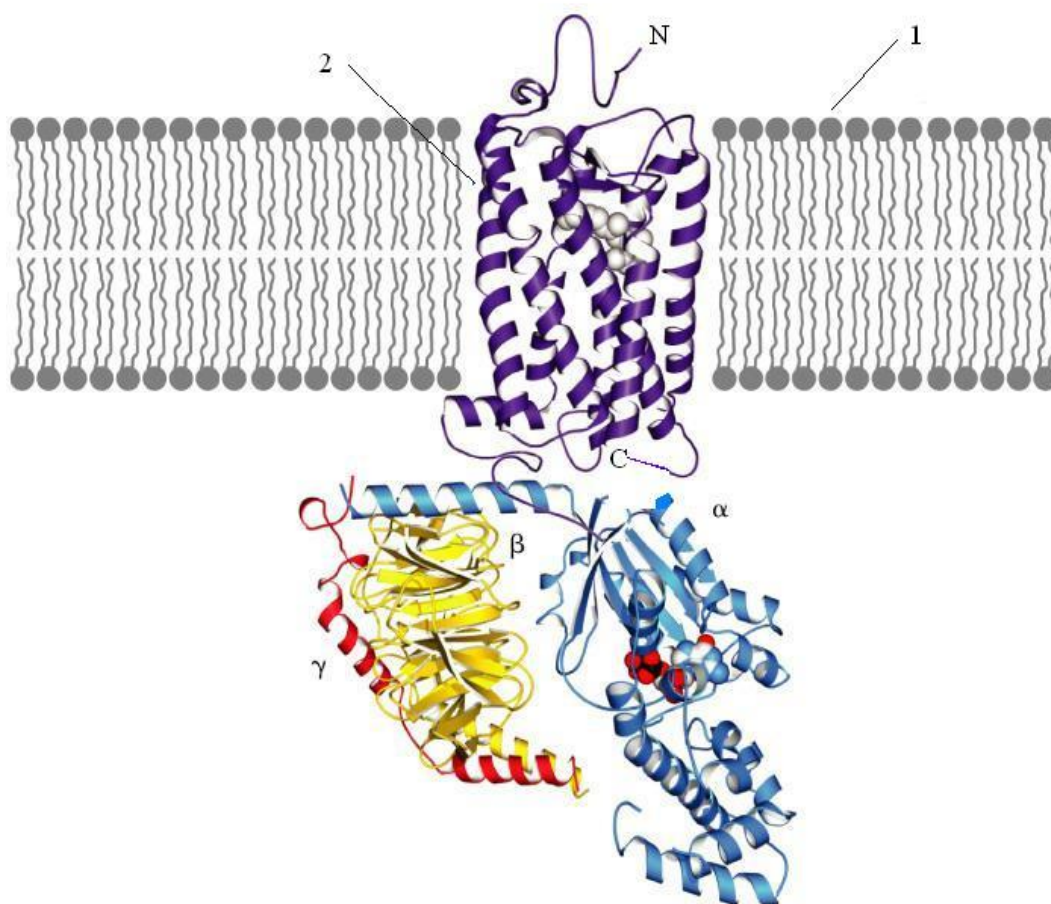


Рис. 1.2 Структура 5-НТ_{2А}-рецептора [Bubar M.J., Cunningham K.A., 2006]:

1 – клеточная мембрана

2 – трансмембранные спирали 5-НТ_{2А}-рецептора

α, β, γ – субъединицы G-белка.

Применяя наиболее используемые модели G-белок сопряженных рецепторов для построения 5-HT₂-рецептора, а также данные по точечному мутагенезу, можно предполагать, что высокостабильные остатки ароматических аминокислот в 6 и 7 доменах прямо участвуют в связывании лигандов [Kristiansen K. et al., 2000].

К ним относится триптофан в положениях 200, 336 и 367, фенилаланин в положениях 340 и 365, умеренно стабильный тирозин в положении 370. Кроме того остатки фенилаланина в положениях 243 и 244 специфически взаимодействуют как с агонистами, так и с антагонистами. Все вышеперечисленные аминокислоты образуют гидрофобный карман и принимают участие в связывании лигандов посредством π - π взаимодействия [Jufang Shan et al., 2012].

Остановившись на различиях в строении и синтезе этих белков у разных видов, стоит отметить, что ген человека, кодирующий 5-HT_{2A} рецептор, локализован в 13q14-q21 хромосоме [Krupali G. Mistry et al., 2011]. 5-HT_{2A} рецептор представляет собой гликопротеин, состоящий из 471 аминокислоты; отмечается сходство в строение рецептора у человека, крыс и мышей [Stam N.J. et al., 1992].

Следует учитывать, что лекарственные препараты в медицине разрабатываются для человека, а большая часть исследований проводится на тканях, клетках, органах животных, и следовательно, существуют проблемы гетерологичности этих рецепторов между собой. Обращает внимание, что 5-HT_{2A} подтип наименее отличается у этих видов, выделяется сходство по длине аминокислотной последовательности, в отличие от В и С подтипов. В то же время для В подтипа при одинаковой последовательности существуют различие по составу аминокислот [Garlow S.J. et al., 1993]. В целом аминокислотные последовательности 3-х подтипов гомологичны на 50%, а их трансмембранные регионы - на 70-80% [Krupali G., Mistry et al., 2011].

Давая общую характеристику трем подтипам 5-HT₂ рецепторов, следует отметить, что все 3 подтипа рецептора сопряжены с фосфолипазой C посредством α -субъединицы Gq ГТФ связывающего белка. 5-HT_{2A} рецептор в классическом представлении связан с Gi/Go белками. Указанные виды белков участвуют в активации фосфолипазы C [Bryan L. Roth, 2011], благодаря которой стимулируется образование инозитолтрифосфата (IP₃), диацилглицериновый (DAG) каскад, а также повышается внутриклеточный Ca²⁺ [Rang H.P. et al., 2001; Michelle Day et al., 2002]. Как частный случай конечным результатам может становиться стимулирование синтеза арахидоновой кислоты [Berumen L. C. et al., 2012].

Через G белок содержащий α , β и γ субъединицы [Masson J. et al., 2012], может активироваться не только PLC _{β} , но и PLD. Посредством данной липазы активируется фосфатидная кислота, через которую происходит влияние на PLC _{γ} , стимулирующей образование DAG. PLD также непосредственно влияет и на extracellular signal-regulated kinase (ERK) как 1, так и 2 [Berumen L. C. et al., 2012]. Так, методами *in silico* установлено, что PKL для 2A подтипа серотониновых рецепторов и PLA₂ для комбинации 5-HT_{2A/1A} серотониновых рецепторов снижали активность ERK как 1, так и 2 типов [Chang C. W. et al., 2008].

Фосфолипаза осуществляет гидролиз фосфатидинозитола в инозитолтрифосфат и диацилглицерол. Агонисты этих рецепторов индуцируют гидролиз фосфатидинозитола [Michelle Day et al., 2002].

Таким образом, как отмечает Сандерс-Буш, для 2A подтипа серотониновых рецепторов возможно взаимодействие и связь с различными G белками [Canal C. E. et al., 2010]. Такие вариации зависят не только от структуры рецептора, но и от места, где он располагается.

Хотя 5-HT_{2A} рецепторы известны как G - белок сопряженные рецепторы, у них существуют и альтернативные механизмы пострецепторной передачи [Massonn J. et al, 2012], одним из которых является связь с β аррестинным

путем (рис. 1.3). Это подтверждено рядом исследований с использованием β -arrestin 2 нокаутных животных [Cullen L. Schmid, Laura M. Bohn, 2010; Jonethan D. et al., 2007; Cullen L. Schmid et al., 2008; Fiorica-Howells E. et al., 2002].

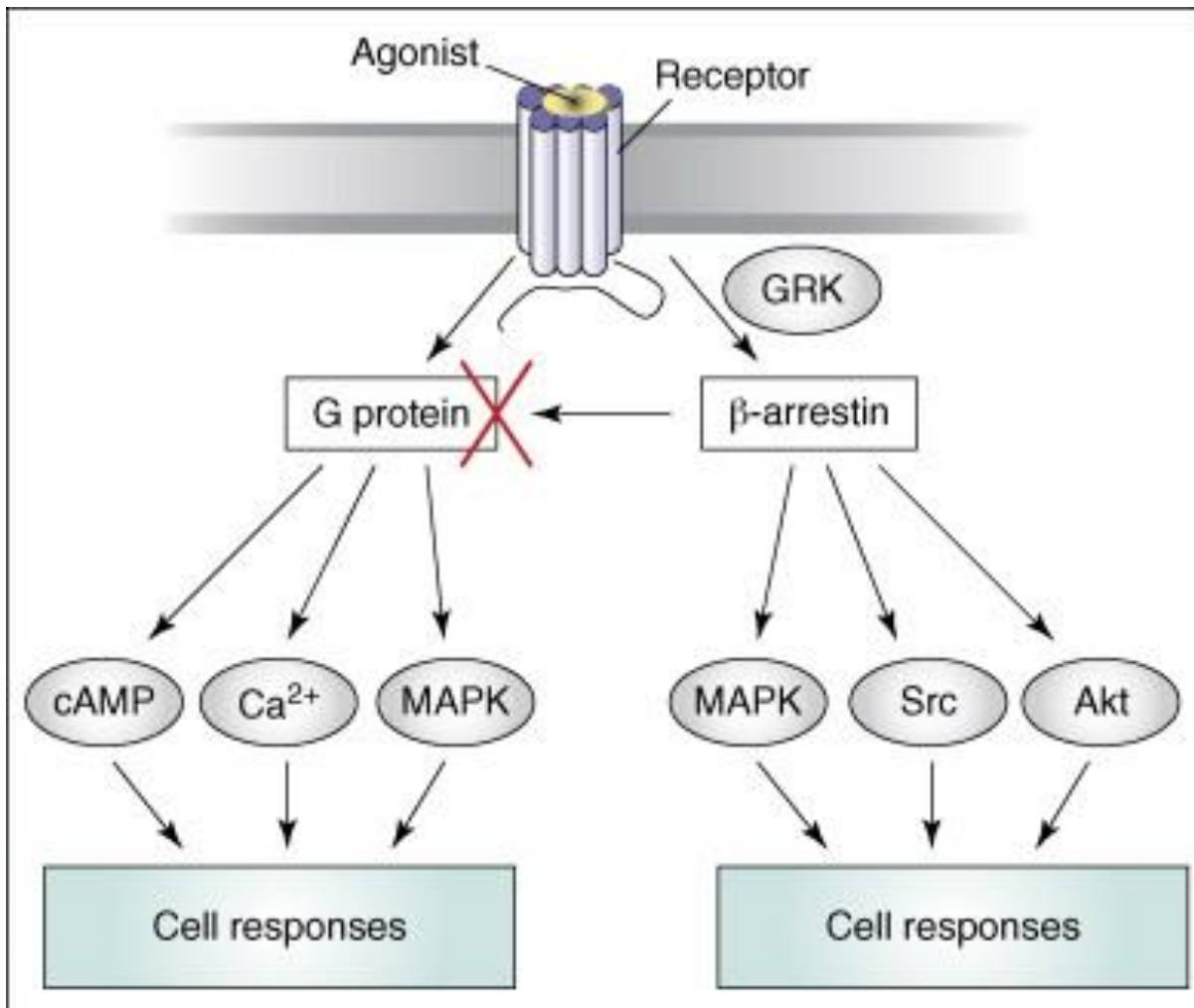


Рис. 1.3 Возможные пострецепторные механизмы действия 5-HT_{2A} рецептора. (Jonethan D et al., 2007).

стречается упоминание об участии серотониновых рецепторов 2A подтипа в регуляции гликоген синтаз - киназы 3 (GSK3). Отмечается, что в данном типе регуляции не задействованы стандартные механизмы через протеин липазу C и протеин киназу L [Abigail M. Polter and Xiaohua Li, 2011]. Однако результаты исследований, связанных с влиянием на GSK3 дофаминовые D₂ рецепторы, указывают на преобладание β аррестинового пути.

Такой механизм регуляции в дальнейших исследованиях косвенно был подтвержден и для 5-HT_{2A} рецептора [Schmid C. L., Bohn L. M., 2010]. При этом данный механизм инактивации отмечается как для агонистов, так и для антагонистов и зависит от состояния 5-HT_{2A} рецептора и других рецепторных систем. Механизм регуляции через β аррестинный путь изучался, в основном, для препаратов, преимущественно относящихся к атипичным нейролептикам [Polter A.M., Xiaohua Li, 2011].

Среди белков, способных регулировать действие Gq-связанные рецепторы, выделяются кавеолин-1 и синапс-связанный белок 90 (SAP 90), которые участвуют в передаче и корректировке сигнала, в том числе и у 5-HT_{2A}-рецептора [Anushree Bhetnagar et al., 2004; John A. Allen et al., 2008].

Весь рецепторный механизм является достаточно сложным биохимическим каскадом, приводящим к запуску ещё большего количества путей биохимических каскадов химических реакций [Chang C. W. et al., 2008; John A. Allen et al., 2008].

1.2. Локализация 5-HT_{2A}-рецепторов

Большинство исследователей говорит о локализации серотонина в теле нервной клетки [Хауликэ И., 1978]. Подтверждением этого они считают неравномерное распределение медиатора в разных структурах ЦНС: отсутствие его в мякотных волокнах и высокую концентрацию в сером веществе мозга [Pais D.J. et al., 1968]. При участии агониста 1-(2,5-диметокси-4-йодофенил)-2-аминопропана (DOI) была установлена постсинаптическая локализация 5-HT_{2A} рецептора [Muchimaru S. et al., 2003], а позднее рецептор был обнаружен и пресинаптически [Miner L. A. et al., 2003].

В центральной нервной системе наибольшая плотность 5-HT_{2A} серотониновых рецепторов находится в пирамидных нейронах, в большей части регионов коры головного мозга, базальных ганглиях и в меньшем

количестве в гиппокампе [Bombardi C., 2012; Mareka G. J. et al., 2001; Aghajanian G. K., Marek G. J., 1999; Stein D. J. et al., 2007].

С использованием поликлональных антител также были доказаны высокие уровни содержания серотониновых рецепторов в обонятельной луковице, неокортексе, кластруме, грушевидной коре, мамиллярных органах, ядрах моста, красном ядре и ядрах шва [Charnay Y., Leger L., 2010]. В коре головного мозга [Stein D. J. et al., 2007; Puig M. V, Gullledge A. T., 2011] многие иммунореактивные нейроны были обнаружены в II-VI слоях [Allen J.A. et al., 2008]. При использовании метода иммуноэлектронной микроскопии 5-НТ_{2А} рецептор зафиксирован непосредственно под утолщением постсинаптической мембраны асимметричных синапсов [Hamada S. et al., 1998].

Отмечается распределение 5-НТ_{2А} рецепторов в дорсальном и вентральном стриатуме [Borrito-Escuela D.O. et al., 2010]. Эти рецепторы широко распространены в периферических тканях. Они обнаружены в сосудах, мочевом пузыре, желудочно-кишечном тракте, миометрии матки, тромбоцитах [Hannon J., Noyer D. et al., 2008].

Высказывается мнение и о связи серотонина с митохондриями. Это предположение подтверждается данными экспериментов с гомогенатами тканей, согласно которым 60—70% серотонина мозга крыс осаждаются в митохондриях [Гребников В.А., 1981].

1.3. Функции 5-НТ_{2А}-рецепторов

Особый интерес специалистов по разработке лекарственных препаратов представляет 5-НТ_{2А} подтип рецепторов не только среди иных серотониновых рецепторов, но и в сравнении с 2С и 2В подтипами. Это обосновывается в посредничестве многих как центральных, так и периферических физиологических функций серотонина [Ramage A.G., Villalón C.M., 2008].

Так, для 5-НТ_{2А} типа рецепторов отмечается роль в регуляции сердечнососудистой системы [Nagatomo T. et al., 2004], в частности, наличие тромботических и сосудосуживающих эффектов [Krupali G. et al., 2011; Adams J. W. et al., 2008], влияние на агрегацию тромбоцитов [Leysen и соавт., 1984]. В связи с чем 2А подтип серотониновых рецепторов участвует в целом ряде заболеваний: возникновение приступов мигрени, легочной артериальной гипертензии, брадикардии, спазме коронарных артерий, ишемической болезни сердца и других [Gamoh S. et al., 2013; Nagatomo T. et al., 2004].

Существует мнение, что почти все неблагоприятные эффекты серотонина в отношении сосудистой системы опосредуются рецепторами 5-НТ₂-типа [Wiernsperger N.F., 1994]. Однако, помимо 2 типа, сосудистая и тромботическая активность способна регулироваться и 1 типом серотонин чувствительных рецепторов, что отражается в возможной стратегии лечения артериальных тромбозов при одновременном блокировании 1В и 2А серотониновых рецепторов [Moerland M. et al., 2011], что показано на примере соединения SL65.0472-00.

Локализация 2А серотониновых рецепторов в тромбоцитах обуславливает как активацию, так и агрегацию тромбоцитов. В частности, для кетансерина и ципрогептадина экспериментальным путем показана способность снижать коллаген индуцированную агрегацию тромбоцитов [Nagatomo T. et al., 2004]. При этом интерес представляет и участие рецептора в увеличении ионов Ca²⁺ в сосудах, тем самым способствуя сокращению гладкомышечной мускулатуры [Krupali G. et al., 2011].

Известно, что некоторые 5-НТ₂- антагонисты способны снижать чувства тревоги и страха. Отмечается, что проявление анксиолитического эффекта для 5-НТ-ергических средств неоднозначно, а также более характерно для селективных блокаторов серотониновых рецепторов 2 типа, в том числе и 2А подтипа [Hearn J. K., 2005]. Кроме того, известно, что 5-НТ_{2А} рецепторы вовлечены в формирование множества поведенческих реакций, особенно в

процессы тревоги, оборонительной реакции, но не паники [Onaivi E.S. et al., 1995]. При этом за счет высокой концентрации рецепторов в центральной нервной системе особый акцент делается на психотропную активность [Celada P. et al., 2013]. Естественно, эффекты серотонина тесно сопряжены с другими медиаторными системами. Так, через 2A и 2C подтипы может опосредоваться негативное влияние на адренергическую и дофаминергическую системы, а посредством $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -адренергических рецепторов может происходить обратное влияние, это составляет, в целом, сложную по своему взаимодействию нейромедиаторную трансмиссию. Через 5-НТ_{2А} рецепторы осуществляется регуляция состояния беспокойства, настроения, реакционной способности к психологическому стрессу, самоконтроля, мотивации и когнитивных функций. Обращает на себя внимание и то, что моноаминергическая система является ключевой целью для действия антидепрессантов [Hamon M., Blier P., 2013]. Сами 5-НТ_{2А} рецепторы давно зарекомендовали себя как мишень для атипичных антипсихотических средств (клозапин, миртазапин и селективный 5-НТ_{2А}-антагонист М100907) [Celada P. et al., 2004]. Для таких соединений показана высокая эффективность в снижении негативных симптомов шизофрении [Krupali G. et al., 2011]. Существуют данные, указывающие на связь между 5-НТ_{2А}-активацией и галлюциногенезом [Halberstadt A.L. et al., 2013].

Среди всего многообразия процессов в центральной нервной системе, в котором задействуется серотонинергическая система, выделяется участие и, соответственно, возможность влияния на процессы обучения и памяти. Это подтверждается не только положительными эффектами D-диэтиламида лизергиновой кислоты, но и негативным воздействием на процесс обучения MDL11,939, ритансерина и миансерина. Однако не все соединения, проявляющие 5-НТ_{2А} антагонистическое действие, обладают таким влиянием. Для D-бром лизергиновой кислоты, LY53,857 и кетансерина данного эффекта отмечено не было [Harvey J. A., 2003].

Существуют экспериментальные данные об участии серотониновых рецепторов 2A подтипа в регуляции аппетита и метаболизма. Исследования на мышах, связанные с блокадой рецептора лекарственными соединениями, выявили негативные влияния, связанные с увеличением массы тела и гиперфагией, что, в свою очередь, приводило к снижению уровня глюкозы. При этом блокирование действия серотонина, в особенности 2A типа, может положительно сказаться на чувствительности к инсулину при диабете [Krupali G. et al., 2011].

Антагонизм в отношении 5-HT_{2A}-рецепторов имеет потенциал для защиты от факторов риска и вносит вклад в лечение сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе связанных с метаболическим синдромом, обусловленных ожирением [Krupali G. et al., 2011]. Одновременно с этим, за счет того что 2A подтип серотониновых рецепторов локализован в кардиомиоцитах, серотонин может приводить к развитию гипертрофии сердца и, как показывают исследования, через кальмодулин киназу/гистондеацетилазу 4 использование антагонистов серотонина приводит к снижению негативных эффектов серотонина на кардиомиоциты [Lairez O. et al., 2013].

1.4. Лиганды 5-HT_{2A}-рецепторов

Серотонин является эндогенным агонистом 5-HT_{2A}-рецепторов. В результате ряда проведенных исследований был получен препарат серотонина адипинат, который используется за рубежом в качестве антигеморрагического средства, связанного с его способностью повышать агрегацию тромбоцитов и тем самым укорачивать время кровотечения [Glennon R.A., 1987].

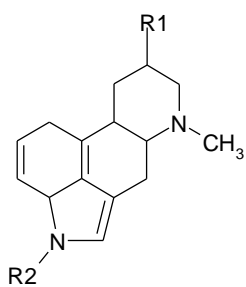
Полные или частичные агонисты 5-HT_{2A}-рецепторов оказывают эффекты "классических" галлюциногенов: ЛСД, псилобицина и мескалина [Chen C. S. et al., 2008; Weinstein, H., 2006]. Одними из потенциально известных галлюциногенов - агонистов 5-HT_{2A}-серотониновых рецепторов являются 1-

(2,5-диметокси-4-йодфенил)-2-аминопропан (DOI) , 1-(2,5-диметокси-4-бромфенол)-2-аминопропан (DOB) и 1-(2,5-диметокси-4-метилфенил)-2-аминопропан (DOM) [Glennon R.A., 1987]. Данные соединения используются в экспериментальных исследованиях.

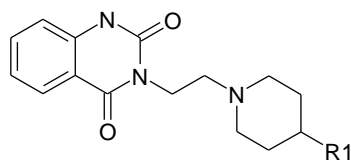
Группой ученых изучен новый антидепрессант миртазапин, который является антагонистом 5-HT₂ и 5-HT₃ рецепторов. Воздействуя на этот рецепторный комплекс, миртазапин приводит к снижению тревоги и эффективен как послеоперационный противорвотный препарат [Chen C. C. et al., 2008].

Одним из самых высокоафинных по отношению к 5-HT_{2A}-рецептору препаратом, проявляющим выраженный антагонизм, является кетансерин (рис. 1.4). Одновременно с этим антагонистические свойства проявляются у данного препарата к альфа-адренергическому рецептору [Janssen P. A. J., 1983]. Он способен блокировать 5-HT_{1C}-серотониновые рецепторы. Благодаря этому вызывает расширение кровеносных сосудов и оказывает антигипертензивное действие. Изначально данный препарат разработан для лечения гипертензии и используется на данный момент. Также возможно применение этого лекарственного средства при нарушениях периферического кровообращения (перемежающаяся хромота, болезнь Рейно и др.) [Du W. M. et al., 2003]. Благодаря влиянию препарата на 5-HT_{2A}-рецепторы тромбоцитов снижается тромбообразование, в связи с чем кетансерин назначают также при периферических тромбозах, геморроидальном тромбозе. Также было обнаружено, что кетансерин проявляет некоторую кардиотоксичность, удлиняя интервал QT на ЭКГ [Van Nueten J.M., 1984], при этом существуют экспериментальные данные о кардиопротективных свойствах при ишемических заболеваниях сердца [Grover G. J. et al., 1993]. Препарат используется только в зарубежной практике. К нему по химической структуре близок ритансерин, который обладает большей селективностью к 2A подтипу серотониновых рецепторов, более низкими показателями сродства к альфа-адренорецепторам.

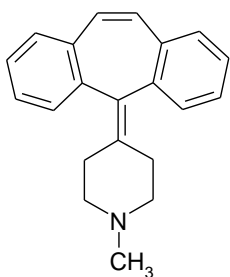
Для ряда препаратов, проявляющих 5-HT_{2A}-антагонистическое действие, характерно использование в лечении дискинезии, возникающей при длительном применении L-ДОФА, применение при лечении болезни Паркинсона. Это показано на примере соединения АСР-103, известного как пимавансерин, а также клозапина и ритансерина [Ferguson M.C. et al., 2010; McFarland K. et al., 2011; Henderson J. et al., 1992; Bersani G. et al., 1990]. В последнее время появились публикации о возможных негативных эффектах ритансерина, выявленных в клинических исследованиях. Отмечалось, что помимо снижения локомоторной активности, препарат отягощал симптомы самого заболевания, для АСР-103 и клозапина таких эффектов отмечено не было [Huot P. et al., 2012].



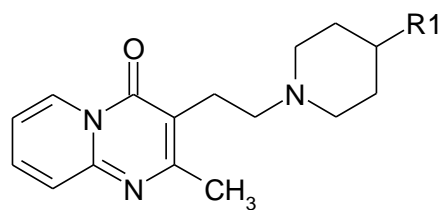
Месулергин, Метерголин,
Метисергид



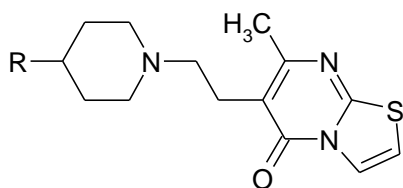
Кетансерин



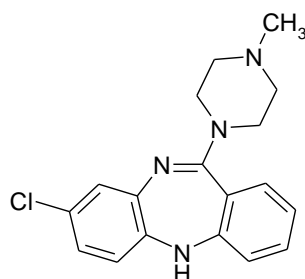
Ципрогептадин



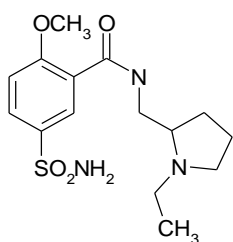
Пиренперон, Рисперидон



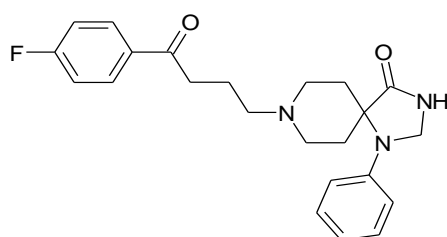
Ритансерин



Клозапин

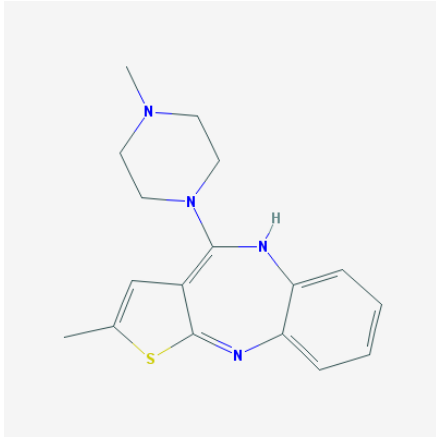


Сульпирид

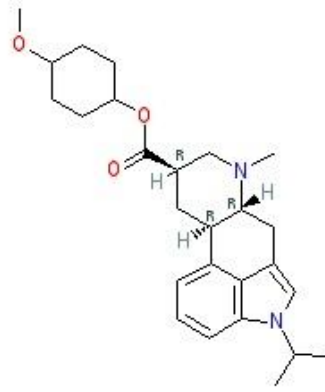


Спиперон

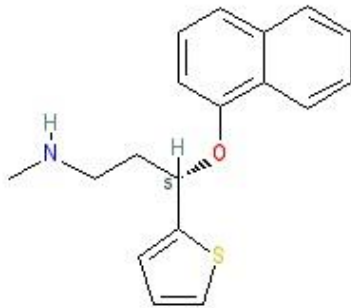
Рис. 1.4 Химические структуры антагонистов серотониновых рецепторов второго типа (5-HT₂).



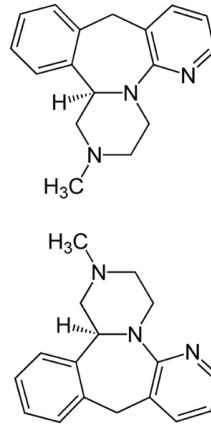
Оланзапин



Дулоксетин



Сарголексол



Митразапин

Рис. 1.4 (окончание) Химические структуры антагонистов серотониновых рецепторов второго типа (5-HT₂).

Рisperидон и оланзепам применяются в психиатрии в комплексном лечении шизофрении и других психотических состояний с преобладанием продуктивной, негативной или аффективной симптоматики; а также некоторых поведенческих расстройств на фоне деменции либо задержки умственного развития [Raja M., 2009; Jasović-Gasić M., Marić N., 2004].

Для антагонистов 5-НТ_{2A}-рецепторов, кетансерина и метисергида, характерно проявление анальгетических эффектов на моделях гипералгезии, вызванной 3%-й каолин-карегановой смесью [Radhakrishnan R. et al., 2003]. В свою очередь метисергид остается одним из эффективных профилактических средств при мигрени, для препарата также отмечается способность блокировать эффекты серотонина, приводящие к вазоконстрикции и изменению давления, эффективно снижать различные эффекты 5-гидрокситриптамина на сосуды скелетной мускулатуры [Fujiwara T., Chiba S., 1995]. Из осложнений наблюдается увеличение веса и периферические отёки. При использовании препарата более 6 месяцев может развиваться ретроперитонеальный, плевроперикардиальный и субэндокардиальный фиброз. Это осложнение встречается достаточно редко.

Препарат, использующийся в России, неселективный Н₁-5НТ₂-антагонист, ципрогептадин. Данное средство проявляет Н₁-антагонистическое действие и обладает более низкой специфичностью к серотониновым рецепторам [Glennon R.A., 1987]. Основные фармакологические действия - антигистаминное и противоаллергическое. Оказывает выраженное антисеротониновое действие, при этом ещё слабое м-холинолитическое и седативное. Отмечается эффективность ципрогептадина при ишемических поражениях головного мозга [Nagetomo T. et al., 2004]. Из представленных на Российском фармацевтическом рынке препаратов с 5-НТ_{2A} антагонистической активностью только для ципрогептадина показано применение при мигрени (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Известные препараты с 5-HT₂ - антагонистическим действием.

Название препарата	Химический класс	Применение
Метисергид	конденсированное производное индола	При профилактике мигрени
Метерголин	конденсированное производное индола	При профилактике мигрени, как вазодилатирующее средство
Месулергин	конденсированное производное индола	При болезни Паркинсона
Кетансерин	производное хиназолина	При артериальной гипертензии, при нарушениях периферического кровообращения
Ритансерин	производное тиазолопиримидина	При неврологических заболеваниях, анксиолитик и антидепрессант
Перитол	производное ципрогептадина	При аллергических заболеваниях, при мигрени, при потере аппетита различной этиологии
Пиренперон	производное пиримидопиримидина	Как «атипичный» нейролептик

Таблица 1.1 (окончание)

Клозапин	производное дибензодиазепины	При шизофрении, маниакальных состояниях, маниакально-депрессивных психозах, психомоторных возбуждениях при психопатиях, эмоциональных и поведенческих расстройствах
Спиперон	производное триазаспиродекана	Как «атипичный» нейролептик
Оланзапин	производное тиенобензодиазепина	При шизофрении и других психотических расстройствах
Дулоксетин	производное тиюфенамина	При депрессии, диабетической нейропатии
Сарпогрелат (АНПЛАГ)	производное 4-оксобутановой кислоты	При сахарном диабете, болезни Бюргера, болезни Рейно, ишемической болезни сердца, стенокардии и атеросклерозе

Для лечения расстройств сна применяют такие антагонисты 5-HT_{2A} серотониновых рецепторов как эпливансерин, пимавансерин и волинансерин. Имеются данные, что антагонист серотониновых рецепторов, ритансерин, улучшает качество сна [Hanley N.R., Hensler J.G., 2002]. Селективный антагонист 5-HT_{2A}-рецепторов сарпогрелат используется в клинике ряда зарубежных стран как препарат, снижающий агрегацию тромбоцитов при заболеваниях периферических артерий [Miyazaki M., Higashi Y. et al, 2007].

Рisperидон является антагонистом 5-HT_{2A} и D₂-рецепторов дофамина, относится к числу атипичных нейролептиков, действующих, в частности, на негативные симптомы шизофрении, и вызывает экстрапирамидные нарушения. Активность рisperидона обуславливается образованием активного метаболита -9-ОН-рисперидон [Fuller R.W., Steinberg M., 1976].

Из вышеизложенного видно, что антагонисты 5-HT₂-серотониновых рецепторов используются при коррекции нарушений гемостаза, транзиторных цереброваскулярных расстройства и психических расстройствах (табл. 1).

В связи с этим большое внимание уделяется синтезу и поиску новых высокоактивных веществ, способных блокировать 5-HT_{2A}- рецепторы.

Так, высокая антисеротониновая активность и достаточно низкая токсичность среди разрабатываемых в России соединений были обнаружены у тропоксина. Для него была показана антисеротониновая активность как в отношении 2A подтипа рецепторов, так и аффинность к 5-HT₁ типу [Горбунов А.А. с соавт., 2010; Ганьшина Т.С., 2004].

AT-1015 соединение с 5-HT_{2A} антагонистическим действием, способное снижать серотониндуцированную агрегацию тромбоцитов и вазоконстрикцию [Kihara H. et al., 2000], также может снижать лауреат - индуцированное поражение периферических сосудов у крыс, отмечалась потенциальная антитромботическая активность [Kihara H. et al., 2001]. Однако

при клиническом испытании соединения, направленного на изучение возможного лечения перемежающейся хромоты, для изучаемого соединения достоверных результатов терапевтической значимости получено не было [Hiett W. R. et al., 2004].

Соединение R-102444 является пролекарством, его активным метаболитом является R-96544, производное пирролидина. Для соединения R-102444 изучена способность снижать агрегацию тромбоцитов, вызванную серотонином с АДФ. [Ogawa T. et al., 2004]. Для соединения проводятся исследования возможности применения при остром и хроническом панкреатите [Ogawa T. et al., 2005].

Для соединения AR246686 экспериментальным путем была показана способность снижать вызванную АДФ агрегацию тромбоцитов, которая усиливалась серотонином, а также изменять скорость образования тромба и время кровотечения [Adams J. W. et al., 2008].

SL 65.0472 антагонист $5HT_{1B/2A}$, для которого экспериментальным путем была показана способность снижать вызванное серотонином сокращение сосудов, на модели ишемии задних конечностей собаки [Barbe F., et al., 2003].

Для гетероциклических аналогов 1192U90, 2-амино -N-(4-(4-(1,2-бензизотиазол-3-ил)-1-пиперазинил)бутил)бензамида была показана способность связываться с D_2 , $5-HT_2$ и $5-HT_{1A}$ рецепторами [Norman M.H. et al., 1996].

1.5. Производные бензимидазола: перспективы поиска новых веществ с $5-HT_{2A}$ -антагонистическим действием

Существует много данных о перспективе использования производных бензимидазола как лигандов различных типов серотониновых рецепторов [Sparatore A. et al., 1991; Borsini F. et al., 1991; Sukalović V. et al., 2005], в том числе и 2 типа [Moss N. et al., 2009]. Для производных арилпиперазин-1-ил-

этил-бензимидазола содержащих 2-метоксифенил и 2-хлорфенил показана способность к связыванию с 5-HT_{2A} и D₂ рецепторами [Tomić M. et al., 2011].

Также для веществ этого химического ряда были выявлены различные виды активностей: антигипоксическая, антиоксидантная, антиагрегантная, антиаритмическая [Спасов А.А. с соавт., 2006; Анисимова В.А. с соавт., 2010¹; Анисимова В.А. с соавт., 2010²]. Особое место занимают потенциальные антипсихотические эффекты среди производных бензимидазола, к примеру для 5-[2-[4-(2-метокси-фенил)-пиперазин-1-ил]-этил]-1,3-дигидро-бензимидазол-2-тиона [Tomić M. et al., 2003].

На базе Волгоградского Государственного Медицинского Университета и НИИ ФОХ Южного Федерального Университета проводятся исследования би- и трициклических конденсированных бензимидазольных систем как потенциальных антисеротониновых средств. Так, отмечается закономерность между способностью блокировать 5-HT₃-серотониновые рецепторы и физико-химическими свойствами трициклических конденсированных бензимидазольных систем – производных имидазобензимидазола [Черников М. В., 2008; Колобродова Н.А., 2012].

Для производных 1-арилпиперазина показана способность блокировать 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторы, а для 2-пиперазинобензимидазола оказывать 5-HT₃-антагонистическое действие [Сергеев, П.В., 2003]. Для производных имидазо[1,2-а]бензимидазола, 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола и триазоло[1,5-а]бензимидазола показана способность блокировать 5-HT₂-рецепторы [Горягин И.И., 2008].

Кроме того в рамках проводимых исследований на базе кафедры фармакологии Волгоградского Государственного Медицинского Университета методами прогнозирования антисеротониновой активности и 2D-QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) анализа *in silico* для N⁹ замещенных имидазобензимидазолов определена прогнозная оценка как

«активных» соединений с высокой вероятностью проявления 5-HT_{2A}-антагонистической активности.

Таким образом, представляется интересным проведение поиска 5-HT_{2A}-антагонистов в ряду новых производных бензимидазола и изучение их фармакологического действия.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В исследовании было изучено 25 производных N⁹-имидазо[1,2-α] бензимидазола, разделённых на 3 группы (табл. 2.1):

с диэтиламиноэтильным заместителем в N⁹ положении – 10 соединений;

с пиперидиноэтильным заместителем в N⁹ положении – 9 соединений;

с морфолиноэтильным заместителем в N⁹ положении – 6 соединений.

Все вещества синтезированы в НИИ физико-органической химии Южного федерального университета*.

¹При проведении экспериментов были использованы следующие реактивы: серотонина гидрохлорид («Sigma», США), кетансерина тартрат («Sigma», США), ципрогептадин («Sigma», США), ритансерин («Sigma», США), ондансетрон («Лэнс-Фарм», Россия), ацетилхолин йодистый («Спектр-Хим», Россия), тиклопидин (Тиклид, «Sanofi-syntelabo», Франция), атропина сульфат («Sigma», США), диклофенак-натрий («Хемофарм А.Д.», Сербия), буторфанола тартрат («Московская фармацевтическая фабрика», Россия), адьювант Фрейнда («Grand Island Biological Company», США), динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Sigma, США), адреналина гидрохлорид («Ренам», Россия), коллаген («Ренам», Россия), формалин («Биомед», Россия), диазепам (Реланиум, «Польфа», Польша), никотин («Sigma», США), ареколин («Фармакон», Россия), резерпин («Sigma», США), галоперидол («Мосхимфармпрепараты», Россия), апоморфин («ICN Biomedical», США), 3,4-диокси-L-фенилаланин («Sigma», США), 5-гидрокси-L-триптофан («Sigma», США), пикротоксин («Sigma», США), карбахол («Sigma»,

* Выражаем признательность ведущему научному сотруднику лаборатории синтеза биологически активных соединений, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для настоящего исследования.

США), натрия хлорида раствор 0,9% («Эском», Россия), а также химически чистые натрия хлорид, калия хлорид, калия дигидрофосфат, кальция хлорид, глюкоза («Агат-мед», Россия), магния сульфат, натрия гидрокарбонат, трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид, натрия цитрат, кислота соляная («Реахим», Россия).

Исследование проведено на 12 кроликах-самцах породы «шиншилла» массой 3 – 3,5 кг, 5 нелинейных морских свинках обоего пола массой 300-450 г, 303 белых аутбредных крысах-самцах массой 170-300 г, 267 белых аутбредных мышах-самцах массой 20-30 г. Животные содержались в виварии кафедры фармакологии ВолгГМУ с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной полнорационной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92). Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали Международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемым при экспериментальных исследованиях (1997), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н и приказ Минздравсоцразвития России протокол №6 от 22.12.2012). Все исследования были одобрены к проведению Региональным независимым этическим комитетом при ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» (протокол №89-2009 от 04.02.2009 г.)

Таблица 2.1

Химическое строение N⁹-замещенных имидазобензимидазола

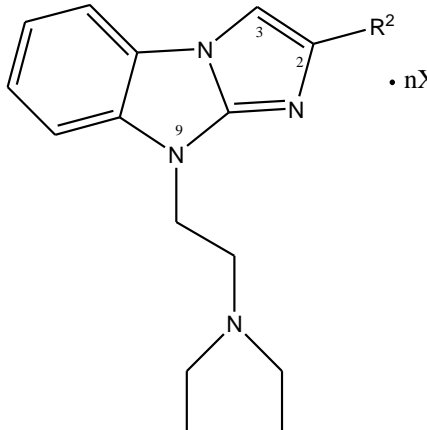
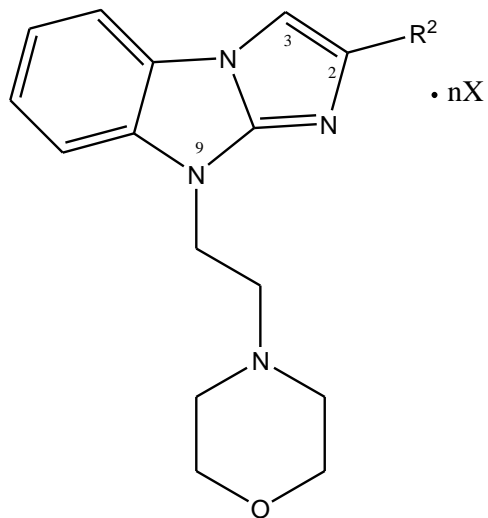
Шифр вещества	R ¹	R ²	nX
1	2	3	4
I. 2-замещенные 9-диэтиламиноэтил-имидазо[1,2-α] бензимидазола			
			
РУ-85	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₄ OH	2HBr
РУ-18	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	-CH ₃	HCl
РУ-204	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	-C ₄ H ₃ S	2HCl
РУ-36	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	-C(CH ₃) ₃	2HCl
РУ-185	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₃ (OH) ₂	2HBr

Таблица 2.1(продолжение).

ПУ-614	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	2HCl
ПУ-275	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$	2HCl
ПУ-30	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_5$	2HCl
ПУ-476	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	2HNO ₃
ПУ-180	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)_2$	2HCl

II. 2-замещенные 9-морфолиноэтил-имидазо[1,2-а] бензимидазола



ПУ-474	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N} \text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	2HBr
--------	--	-------------------------	------

Таблица 2.1 (продолжение).

ПУ-295	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	2HCl
ПУ-1332	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{CH}_3$	2HCl
ПУ-710	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	2HClO ₄
ПУ-397	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	2HBr
ПУ-374	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$	2HBr

III. 2-замещенные 9-пиперидиноэтил-имидазо[1,2-а] бензимидазола

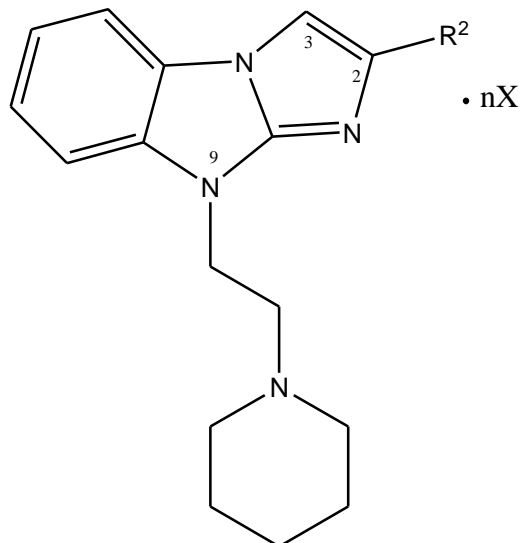


Таблица 2.1 (окончание).			
PY-693	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	2HClO_4
PY-213	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	2HNO_3
PY-1331	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{CH}_3$	2HCl
PY-205	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	2HCl
PY-526	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	2HCl
PY-188	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$	2HCl
PY-615	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	2HCl
PY-276	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$	2HCl
PY-183	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N C}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)_2$	2HCl

2.2. Методы исследования

2.2.1 Методы экспериментального поиска 5-HT_{2A}-блокирующего действия

5-HT_{2A} антагонистическое действие новых соединений изучалось на модели *in vitro* серотонин-индуцированной активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеивания [Деркачев Э.Ф. с соавт., 1998] на приборе «Ласка-1К» (С-Петербург, Россия).

Исследование проводилось на 12 кроликах-самцах породы «шиншилла» массой 3-3,5 кг. У кролика из краевой ушной вены забиралась кровь, стабилизировалась 3,2% раствором цитрата натрия (рН 6,0) в соотношении 9:1 и центрифугировалась в течении 12 минут при 1000 об/мин. Отобранные образцы обогащенной тромбоцитами плазмы помещались в кювету уже содержащую буферный раствор. Объем кюветы 8 мл. Вносимое количество тромбоцитов стандартизировали, основываясь на плотности светопропускания, равное 50-60 у.е. Перемешивание пробы в кювете осуществлялось с использованием магнитного волчка.

Изменения, происходящие в кювете, фиксировались благодаря узкому параллельному лучу света, направленного под углом в 90° к стенке кюветы. Поток света, проходя через кювету, попадал на расположенные на другой стороне фотодиоды, с шагом в 2 градуса расположенных в диапазоне углов от 0 до 90. Полученные через фотодиоды результаты через преобразующий блок поступали на персональное компьютерное устройство, где отображалось в графической форме.

После добавления в кювету с тромбоцитами плазмы индуктора - серотонина в концентрации 1 мкМ осуществлялась активация тромбоцитов кролика. Изменения светопропускания фиксировались до времени выхода показателей на стабильный уровень - плато. Измерения, в которых

наблюдались эффекты, вызванные введением только серотонина, принимались за контрольные.

В опытных измерениях за 2 минуты (время экспозиции) до введения индуктора в кювету вносилось изучаемое вещество. Первоначальный поиск высокоактивных соединений осуществлялся в концентрации 1 мкМ. Выявленные соединения - лидеры изучались в широком диапазоне концентраций, по результатам которого по средствам нелинейного регрессионного анализа осуществлялся расчет IC_{50} .

В качестве препарата сравнения использовали кетансерин в концентрации 1 мкМ.

2.2.2 Изучение влияния структуры изучаемых веществ на проявление их блокирующего действия в отношении серотониновых рецепторов

Для изучения зависимости между структурой исследуемых соединений и их биологической активностью использовался эмпирический метод, учитывающий базовую структуру, а также изменение заместителей в N⁹ и C² положениях.

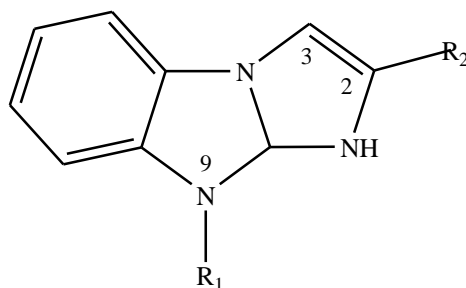


Рис. 2.1 Порядок нумерации радикалов производных бензимидазола, использованный при расчете физико-химических параметров.

Среди математических способов был выбран подход Фри – Уилсона [Голендер В.Е., Розенблит А.Б., 1978]. Для метода важным условием становится знание структуры химического соединения, а уже после - наблюдаемые проявления действия на мишень. Такой подход характерен при описании структуры с возможностью в дальнейшем использования её в построении уравнений регрессии.

Использованный подход предполагал, что вклад каждого заместителя в биологическую активность (применительно данного исследования - 5-НТ_{2A}-блокирующее действие) суммируется с другим, что согласно математическим закономерностям возможно отобразить в линейном регрессионном уравнении:

$$A = a_0 + a_1s_1 + a_2s_2 + a_3s_3 + \dots + a_ns_n$$

$s_{1,2,3\dots n}$ – набор заместителей;

a_0 – базовая активность ряда;

$0,1,2,3\dots n$ – вклады соответствующих заместителей в суммарную активность соединений.

При этом каждый элемент s принимает всего два значения:

1, если соответствующий заместитель присутствует в соединении;

0, если соответствующий заместитель отсутствует в соединении.

Тем самым переменные искусственно переводятся в бинарные, облегчая нахождение коэффициента регрессии.

В конечном итоге для определения вклада каждого отдельного заместителя в проявление биологического ответа использовалось следующее уравнение:

$$A = \frac{\sum a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{\sum s_1 + s_2 + s_3 + \dots + s_n} - a_0$$

2.2.3 Изучение зависимости влияния изучаемых веществ от их физико-химических свойств

Для всех изученных соединений были определены некоторые физико-химические характеристики:

- используя фрагментарное приближение по схеме Криппе, рассчитывался показатель липофильности, выраженный как коэффициент распределения вещества в системе n-октанол/вода, характеризуя способность вещества в преодолении биологических барьеров за счет способности растворяться в жирах (Vellarkad N. et al., 1989);
- для отображения возможности влияния внешних электрических полей на заряд вещества была рассчитана величина молекулярной рефракции, представляющая собой степень поляризуемости молекулы в электрическом поле ($\text{см}^3/\text{моль}$). Данный стерический параметр вычислялся по аддитивной схеме [Arup K., Gordon M., 1987];
- величины липофильности и молекулярной рефракции были рассчитаны как для заместителей в N° и C^2 положениях, так и для всей молекулы целиком.
- были построены первичные 3D модели молекул, исследуемых соединений с учетом солеобразующего и кислотного остатков. Проведена первичная оптимизация молекул путем минимизации стерической энергии. Конечные 3D модели строили с использованием программ МОРАС, в приближении Остина AM 1 [Минкин В.И. и соавт., 1997]. Были рассчитаны парциальные заряды атомов методом Хюкеля (Extended Huckel Charges) с использованием квантово-химических методов [Burkert U.N.L., 1982; Розенблит А.Б. и соавт., 1983].

Расчёты квантово-химических методов реализованы в программе обеспечения «CS Chem3D® 8.0».

Для всех изученных соединений были рассчитаны:

1. Средний заряд с учетом и без учета знака для радикалов в C², C³ и N⁹ положениях, также для вышеуказанных радикалов были определены максимальные и минимальные положительные и отрицательные заряды;
2. Средний заряд с учетом и без учета знака, максимальные и минимальные положительные и отрицательные заряды для всей молекулы в целом;
3. Заряды на атомах N в 1, 4 и 9 положениях;
4. Суммарный заряд не водородных атомов бензольного кольца с учетом знака;
5. Суммарный заряд не водородных атомов среднего имидазольного кольца с учетом знака;
6. Суммарный заряд не водородных атомов внешнего имидазольного кольца с учетом знака;
7. Средний заряд на кислотном остатке у заместителя атома углерода в 3 положении с учетом знака;
8. Средний заряд на кислотном остатке у атома N в 1 положении с учетом знака.

Были вычислены квадраты изучаемых физико-химических характеристик соединений.

Проведен анализ корреляции между указанными параметрами изучаемых соединений и уровнем проявляемого 5-HT_{2A} -антагонистического действия в рядах производных с морфолиноэтильным, пиперидиноэтильным и диэтиламиноэтильным заместителями в N⁹ положении, а также для всех изученных соединений в целом.

Полученные показатели молекулярной рефракции, липофильности и зарядов производных бензимидазола использовались при построении многопараметрового регрессионного уравнения, для расчета применялась статистическая программа «Statistica 6.0».

2.2.4 Изучение изменения скорости кровотока во внутренней сонной артерии при введении серотонин

Изучение действия соединений на кровотоки в каротидной системе проводили на 28 наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 граммов, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных) [Мирзоян Р.С. с соавт., 2012].

Для введения веществ предварительно катетеризировалась бедренная вена. Повышенное содержание серотонина моделировали внутривенным введением 20 мкг/кг серотонина гидрохлорида в 0,2 мл изотонического раствора. Введение серотонина повторяли трехкратно с интервалом в 20 минут. Изучаемые 5-HT_{2A}-антагонисты вводились внутривенно за 30 мин до моделирования серотонинового спазма в эквимолярной дозировке: кетансерин 0,55 мг/кг, ципрогептадин 0,35 мг/кг и РУ-476 - 0,5 мг/кг. Группе контроля вводили изотонический раствор хлорида натрия 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. Диаметр датчика составлял 2 мм.

О результатах судили по уровню влияния исследуемого вещества на исходный уровень кровотока, а главное, по способности изменять разницу между скоростью до и после введения моноамина.

2.2.5 Изучение серотонининдуцированного изменения скорости кровотока в мозговых артериях

Эксперимент проводился на 26 половозрелых крысах самцах 250-300 граммов, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных). Регистрацию локального 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]. После фиксации головы животного в стереотаксисе, в теменной кости, бором просверливалось отверстие 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.

Для введения серотонина и исследуемых веществ катетеризировалась бедренная вена. Вещества исследовались в эквимолярных дозах: кетансерин 0,55 мг/кг, ципрогептадин 0,35 мг/кг и РУ-476 - 0,5 мг/кг. Серотонин вводился в дозе 20 мкг/кг.

После установки ультразвукового датчика фиксировали линейную скорость мозгового кровотока до введения вещества (исходные значения), после чего через бедренную вену вводили раствор с изучаемым соединением. С 18 по 20 минуту после введения вещества фиксировался уровень линейной скорости мозгового кровотока и влияние вещества на состояние мозговых

сосудов (посредством изменения скорости кровотока). На 20 минуте после введения вещества вводился серотонин, в течение 20 минут регистрировались изменения скорости кровотока в области средней мозговой артерии. Особое внимание уделялось максимальному падению линейной скорости в первые минуты после серотонинового спазма.

По итогам эксперимента определялся уровень влияния исследуемого вещества на исходный уровень кровотока, а главное, способность снижать констрикторные эффекты серотонина (посредством уменьшения разницы между скоростью до и после введения моноамина).

2.2.6 Изучение изменения скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина в условиях ишемии мозга крыс

Для изучения влияния 5-НТ_{2А} антагонистов на сосудистый тонус сосудов головного мозга в условиях ишемии использовалась модель неполной глобальной ишемии [Александрин В.В., 2012]. Эксперимент проводился на 27 половозрелых крысах самцах 250-300 граммов, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных). Так, на первом этапе после наркотизации хлоралгидратом (400 мг/кг) у грызунов осуществлялся доступ к общим сонным артериям, после чего сосуды выделялись и перевязывались. Перевязка осуществлялась на обеих сонных артериях нитью и дублировалась на расстоянии 5-6 мм. После чего за животным осуществлялось пристальное наблюдение и уход. Через 3 суток выжившие особи включались во второй этап эксперимента. Данный этап включал в себя непосредственный доступ к области среднемозговой артерии в теменной области и измерение мозгового кровотока в условиях серотониновой нагрузки, описанных выше.

На указанной модели вещества исследовались в эквимолярных дозах: кетансерин 0,55 мг/кг, ципрогептадин 0,35 мг/кг и РУ-476 - 0,5 мг/кг..

Контрольным животным вводился физиологический раствор в объеме, эквивалентном вводимым опытным животным.

2.2.7 Изучение системного артериального давления

Эксперимент проводился на 26 половозрелых крысах самцах 250-300 граммов, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных). Регистрация показателей диастолического и систолического артериального давления осуществлялась электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт.ст.), с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Москва, Россия) [Спасов А.А. с соавт., 2012].

Для введения серотонина и исследуемых веществ катетеризировалась бедренная вена. Вещества исследовались в эквимолярных дозах: кетансерин 0,55 мг/кг, ципрогептадин 0,35 мг/кг и РУ-476 - 0,5 мг/кг. Серотонин вводился в дозе 20 мкг/кг.

2.2.8 Изучение хронотропного эффекта

Изменение частоты сердечных сокращений фиксировали на основании полученных диаграмм в программе «Минимакс–доплер-К» на модели изучения серотонининдуцированного изменения скорости кровотока в мозговых артериях. После ручной обработки диаграмм (подсчета количества пиков) полученные результаты приводились к общепринятым значениям (количеству ударов за 1 мин).

Вещества исследовались в эквимолярных дозах: кетансерин 0,55 мг/кг, ципрогептадин 0,35 мг/кг и РУ-476 - 0,5 мг/кг. Был рассчитан уровень изменения частоты сердечных сокращений для контрольной группы животных.

Учитывались следующие показатели: исходный уровень частоты сердечных сокращений до введения вещества; уровень частоты сердечных сокращений на 20 минуте после введения вещества; максимальное падение уровня частоты сердечных сокращений после введения серотонина.

2.2.9 Модели артериального тромбоза

Экспериментальный тромбоз, индуцированный хлоридом железа (III).

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

Исследование проводилось на 22 крысах самцах массой 270-310 г. Период инкубации составлял 30 минут, вещества вводились внутрибрюшинно, так как на модели изменения скорости мозгового кровотока использовался парентеральный путь введения. Животные были разделены на 5 групп: 1 контрольную и 4 опытных. Вещества исследовались в эквимолярных дозах. Соединение РУ-476 было изучено в дозе 0,5 мг/кг. Препаратами сравнения по механизму действия были выбраны кетансерин в дозе 0,55 мг/кг и ципрогептадин в дозе 0,35 мг/кг, в качестве эталонного препарата по эффекту был выбран клопидогрел в дозе 7,32 мг/кг.

Предварительно крысы наркотизировались хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутрибрюшинно. Выделяли сонную артерию длиной до 4 см, очищая от сопутствующих тканей. Под артерию подводили парафиновую пленку с загнутыми краями, между которыми помещался ватный диск размером от 4 до 9 мм, на ватный диск 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 хлоридом железа фиксировался исходный уровень средней линейной (V_{am} , см/сек) скорости кровотока, после чего фиксировалось время и скорость образования тромба. Соединение РУ-476, кетансерин и ципрогептадин вводили предварительно за 30 мин, клопидогрел за 2 часа до начала эксперимента.

Фиксировалось время полной окклюзии, а также время снижения скорости кровотока на 50%, 90%, 95% и 99,9%.

Экспериментальный тромбоз, индуцированный электрическим током.

Изучение антитромботической активности на модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током, основывалось на модели Guglielmi G. [Guglielmi Getal, 1991] в модификации. Особенностью такого вида тромбообразования является вовлечение в процесс АТФ, который начинает активно вырабатываться как ответная реакция на повреждение эндотелия стенки сосудов, электрическим током. Результатом данного воздействия является образование тромба.

Исследование проводилось на 23 крысах самцах массой 270-310 г. Период инкубации составлял 30 минут, вещества вводились внутривентриально, так как на модели изменения скорости мозгового кровотока использовался парентеральный путь введения. Животные были разделены на 5 групп: 1 контрольную и 4 опытных. Вещества исследовались в эквимолярных дозах. Соединение РУ-476 было изучено в дозе 0,5 мг/кг. Препаратами сравнения по механизму действия были выбраны кетансерин в дозе 0,55 мг/кг и

ципрогептадин в дозе 0,35 мг/кг, в качестве эталонного препарата по эффекту был выбран клопидогрел в дозе 7,32 мг/кг.

Предварительно крысы наркотизировались хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутривенно. 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. Скорость кровотока регистрировалась с использованием ультразвукового доплерографа («Минимакс–доплер-К», г. Санкт-Петербург, ООО «СП Минимакс»). Индукция тромбоза наружной сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока соответствовала 10 мА. Стимуляцию прекращали только после полной окклюзии сосуда. Соединение РУ-476, кетансерин и ципрогептадин вводили предварительно за 30 мин, клопидогрел за 2 часа до начала электростимуляции. Регистрировалось время полной окклюзии, а также время снижения скорости кровотока на 50%, 90%, 95% и 99,9%.

2.2.10 Исследование агрегации тромбоцитов

Влияние на агрегацию тромбоцитов изучаемых веществ исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ("Биола", г. Москва) по методу [Born G.V., 1962] в модификации [Габбасова З.А. и др., 1989]. Метод основан на измерении светопропускания в оптическом канале изменяющегося количества тромбоцитов.

Была использована богатая тромбоцитами плазма крови кроликов, которую забирали из краевой ушной вены. Кровь центрифугировали в течение 12 мин при 1000 об/мин. В кювету агрегометра объемом 0,3 мкл вносили 270 мкл богатой тромбоцитами плазмы, после чего в опытном измерении добавляли 30 мкл индуктора. В контрольном измерении в кювету

предварительно вносилось изучаемое вещество объемом 10 мкл, после 5 мин инкубации добавлялся индуктор и фиксировался уровень агрегации. Агрегацию индуцировали коллагеном (50 мкг/мл), АДФ (5 мкМ), адреналином (10 мкМ) и серотонином (1 мкМ). В качестве препарата сравнения по механизму эффекту была выбрана ацетилсалициловая кислота (100 мкМ).

Об уровне антиагрегантного действия судили посредством расчета разницы между опытным и контрольным значением.

2.2.11 Методы исследований взаимодействия с модуляторами основных нейромедиаторных систем *in vivo*

Влияние на никотиновый тремор

Никотиновый тест позволяет изучить способность исследуемых соединений, воздействовать на N-холинрецепторы. Так, никотин в больших дозах (более 4 мг/кг) способен усиливать нервно-мышечную передачу. Такая способность никотина выражалась в возникновении тремора и судорог у испытуемых животных. При низких дозах вводимого никотина (до 2 мг/кг) возникновения судорог не наблюдается, что можно использовать для определения влияния изучаемого вещества на эффекты N-холиномиметика [Андреева Н.И., 2005].

Эксперименты были выполнены на 36 мышах, разделенных на 6 групп (2 контрольных, 2 опытных) по 6 животных в каждой. Контрольные группы животных получали физиологический раствор, опытные группы – соединение РУ-476 внутрибрюшинно в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг. Спустя 30 минут животным внутрибрюшинно вводился N-холиномиметик - никотин по следующей схеме: контрольной группе №1 в дозе 2 мг/кг, контрольной группе №2 – 4 мг/кг, опытным группам – 2 мг/кг. В ходе наблюдения за животными регистрировали латентный период развития тремора, отмечали наличие судорожных приступов

и их латентность. О влиянии на Н-холинорецепторы судили по изменению показателей в опытных группах в сравнении с контрольными.

Влияние 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 18 крысах, разделенных на 3 группы (1 контрольную, 2 опытных) по 6 животных в каждой. Соединение РУ-476 вводили внутривентриально в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг за 30 минут до введения центрального М-холиномиметика ареколина (15 мг/кг, внутривентриально). Контрольная группа животных получала физиологический раствор. 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 опытных группах по сравнению с контрольной.

Влияние 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].

Тестирование проводилось на 18 крысах, разделенных на 3 группы (1 контрольную, 2 опытных) по 6 животных в каждой. Соединение РУ-476 вводили внутрибрюшинно в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг, контрольной группе вводился изотонический раствор хлорида натрия. Через 1 час производилась инъекция галоперидола (3 мг/кг, внутрибрюшинно) 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. Моргуго (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.

Влияние на гиперкинез, вызванный введением 5-гидрокситриптофана

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 18 беспородных мышях, разделенных на 3 группы (1 контрольную, 2 опытные) по 6 животных в каждой. Животным опытных групп внутрибрюшинно вводилось соединение РУ-476 в дозах 0,5 и

5,0 мг/кг, контрольным мышам производилась инъекция физиологического раствора. Через 1 час внутрибрюшинно 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.

Влияние на эффекты резерпина

Тест с резерпином позволяет оценивать влияние новых веществ на эффекты лигандов адренергической системы, 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 24 мышах самцах, разделенных на 2 контрольные и 2 опытные 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 4 часов, после чего животным контрольных групп вводился внутрибрюшинно изотонический раствор хлорида натрия, животным опытных групп – соединение РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг. Через 30 минут после введения веществ и 4 часа 30 минут после введения резерпина оценивали развитие у мышей гипотермии. Измерение ректальной температуры проводили электронным термометром («OMRON», Германия). О действии изучаемых веществ судили по изменению наблюдаемых реакций в опытных группах по сравнению с контрольными показателями.

Влияние на эффекты 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 внутрибрюшинно вводилось соединение РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг, животным контрольных групп – изотонический раствор хлорида натрия. На 30 минуте после введения вещества и физиологического раствора мышам контрольной группы №1 внутрибрюшинно вводился L-ДОФА в дозе 500 мг/кг, контрольной группе №2 и опытным группам – 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 экспериментатор оценивал 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.

Влияние на судорожный эффект пикротоксина

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 18 мышах самцах, разделенных на 1 контрольную и 2 опытные группы по 6 животных в каждой. РУ-476 изучалось в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг, контрольной группе вводился изотонический раствор хлорида натрия. Все растворы вводились внутривентриально за 30 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.

Влияние на эффекты апоморфина

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 18 крысах, разделенных на 3 группы по 6 животных в каждой (1 контрольную, 2 опытных). Соединение РУ-476 вводилось животным внутривентриально в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг, контрольная группа получала физиологический раствор. 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 принюхивание; 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.

Влияние на фенаминовую стереотипию

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 18 крысах, разделенных на 3 группы по 6 животных в каждой (1 контрольную, 2 опытных). Соединение РУ-476 вводилось животным внутрибрюшинно в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг, контрольная группа получала физиологический раствор. Спустя 30 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.

2.2.12 Методы исследований взаимодействия с различными серотониновыми рецепторами in vitro

Метод изучения 5-HT₄-серотонинергической активности на изолированном пищевом поведении крысы

Связь между серотониновой системой и системой холинергических нейронов разнообразна. Так, было показано расслабляющее влияние моноамина на спазм гладкой мускулатуры пищевода, оказываемый холинергическими нейронами спазм [Reeves J., Bunce K., Humphrey P., 1991; Nagakura Y. et al., 1997; Smith J. et al., 2008]. Преимущественное влияние, за счет высокой концентрации рецепторов на данном участке ЖКТ, отдается 4 типу серотониновых рецепторов. Данный тип рецепторов, как отмечают некоторые авторы, связан не только с непосредственным влиянием на рецепторы, но и через терминалы нервной системы посредством коррекции выделения ацетилхолина [Kilbinger H., Wolf D., 1992].

Исследование проводилось на пищеводе крыс самцов методом К. Miyeta [Miyeta K. et al., 1992]. Перед забором препарата животное умерщвлялось путём цервикальной дислокации. Препарат представлял собой фрагмент грудного отдела пищевода длиной 1,8-2,2 мм. После этого участок пищевода фиксировался в ванночке, заполненной раствором Кребса, объем ванночки составлял 10 мл (модель 4000, "UgoBasileS.R.L.", Италия). Производилась постоянная аэрация, также поддерживалась стабильная температура 37°C. После фиксации препарат в обязательном порядке проходил адаптацию в течение 60 минут. Регистрация данных производилась посредством изометрического датчика (модель 7006, "Ugo Basile S.R.L.", Италия), соединённого с образцом, на самописце (модель 7050, "Ugo Basile S.R.L.", Италия). В начале эксперимента регистрировались исходные значение тонуса пищевода, посредством карбохолина в концентрации 3×10^{-6} моль/л вызывали сокращение гладкой мускулатуры. В контрольном измерении релаксацию мышечной ткани вызывали введением в ванночку неселективного агониста серотониновых рецепторов - серотонина гидрохлорида в концентрации 1

мкМ/л. Между экспериментами препарат отмывался. О результатах судили по способности изменять разницу между контрольным и опытным значениями.

Метод определения 5-HT₃-антагонистической активности.

Активность в отношении блокирования третьего типа серотониновых рецепторов изучалась на изолированной подвздошной кишке морской свинки [Yoshida S. et al., 2007].

Из-за высокого уровня взаимосвязи серотониновых рецепторов для устранения миметического влияния серотонина использовался 5-HT₂-антагонист кетансерин в концентрации 1×10^{-7} моль/л.

Исследование проводилось на самцах морских свинок. Животные наркотизировались хлоралгидратом (400 мг/кг) и умерщвлялись. Срединным разрезом вскрывалась брюшная полость и осуществлялось извлечение отрезка подвздошной кишки на 4-5 см выше илеоцекального угла. Участок кишки помещался в раствор Кребса (состав в ммоль/л: NaCl 118,0; KCl 4,70; CaCl₂ 2,52; MgSO₄ 1,64; NaHCO₃ 24,88; KH₂PO₄ 1,18; глюкоза 5,55), где при постоянной аэрации отпрепарировались, получая препарат длиной 1,9-2,1 см. Выделенные препараты закреплялись в ванночке объемом 10 мл (модель 4000, “Ugo Basile S.R.L.”, Италия), где осуществлялась постоянная аэрация, а также поддерживалась стабильная температура 37°C. Адаптационный период составлял 30 минут. Регистрация данных производилась посредством изотонического датчика (“Ugo Basile”, Италия), соединённого с образцом, на самописце (модель 7050, “Ugo Basile S.R.L.”, Италия). После регистрации исходных данных в ванночку добавлялся кетансерин и серотонин, далее записывались контрольные значения изменения мышечного тонуса. В опытном измерении предварительно вводилось изучаемое соединение и после 5 минутной инкубации в ванночку вводили неселективный агонист

серотониновых рецепторов. Все соединения изучались в концентрации 1 мкМ. Отмывка препарата осуществлялась буферным раствором в течение 15 минут. Степень блокирования рецепторов оценивалась путём сравнения значений спазмогенного эффекта в контрольном и опытном измерениях. В качестве препарата сравнения был выбран блокатор 5-НТ₃-рецепторов - ондансетрон.

2.2.13 Методы изучения анальгетической активности

Модель гипералгезии, вызванной адьювантом Фрейнда.

Данный метод позволяет изучить обезболивающее действие изучаемого соединения в условиях гипералгезии, формирующейся на фоне хронического воспаления [Iadarola M.J., 1988].

Исследование выполнено на 30 крысах, разделенных на 5 групп (1 интактного контроля, 1 контрольную, 3 опытных) по 6 особей в каждой.

Для моделирования воспаления за 4 дня до эксперимента животным подкожно в вентролатеральную поверхность правой задней лапки вводился адьювант Фрейнда (взвесь БЦЖ в вазелиновом масле) в объеме 0,05 мл. Группе интактного контроля адьювант Фрейнда не вводился. В день исследования опытным группам внутривентриально вводилось соединение РУ-476 0,5 мг/кг, ципрогептадин – 0,6 мг/кг, либо диклофенак натрия в дозе 2 мг/кг. Контрольная группа крыс получала физиологический раствор хлорида натрия. Через 30 минут после введения препаратов определялся уровень гипералгезии при точечном механическом давлении на тыльную поверхность лапы. Критерием достижения ноцицептивного порога, выражаемого в граммах, являлся рефлекс отдергивания лапы. Уровень анальгетического действия оценивали по изменению измеряемого показателя в опытных группах по сравнению с группой контроля.

Метод формалиновой гиперальгезии

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

Тестирование проводилось на 28 крысах, разделенных на 4 группы (1 контрольную, 3 опытных) по 7 особей в каждой.

В день исследования опытным группам внутрибрюшинно вводилось соединение РУ-476 - в дозе 0,5 мг/кг, ципрогептадин – 0,6 мг/кг, либо диклофенак натрия в дозе 2 мг/кг. Контрольная группа крыс получала физиологический раствор хлорида натрия. 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.

2.2.14 Изучение острой токсичности наиболее активных веществ

Острую токсичность соединений изучали на 30 белых половозрелых инбридных мышах–самцах, массой 18-25г, при однократном внутрибрюшинном введении. За животными осуществлялся контроль в течение 14 дней, на протяжении которых регистрировались сроки гибели особей. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального

развития. На основании полученных результатов методом нелинейного регрессионного анализа рассчитывался токсикологический показатель - LD_{50} [Березовская И.В., 2010].

Для соединений - лидеров рассчитывался условный терапевтический индекс, отражающий широту терапевтического действия вещества, выраженный в отношении показателей летальной дозы (LD_{50}) к эффективной концентрации (EC_{50}).

2.2.15 Метод изучения нейротоксикологических эффектов соединения лидера

Для наиболее активного соединения была проведена оценка нейротоксикологического действия. Изучение проводилось при использовании широкого набора тестов по S. Irwin [Irwin S., 1964]. Для исследования были отобраны 15 мышей - самцов, разделенных на 3 группы (1 контрольную, 2 опытные). Исследуемое соединение вводилось внутривентриально в дозах 5,0 и 0,5 мг/кг. Контрольная группа получала изотонический раствор хлорида натрия. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 3 часов после непосредственного введения растворов. Перед введением у животных определялись исходные показатели в зависимости от проводимых тестов. Изучаемые параметры повторно оценивались для каждого животного через каждые 30 минут после введения вещества.

Уровень влияния исследуемого соединения на организм животного оценивали при сравнении результатов всей батареи тестов между контрольной и опытной группами.

Изучаемые параметры были разделены на следующие группы:

1. Поведенческие реакции: возбудимость, реактивность, настороженность, пугливость.
2. Нервно-мышечная возбудимость: наличие тремора, судорог, симптома Штрауба, характер походки, положение тела в обычной позе и после придания ему необычной позы, положение конечностей, общий мышечный тонус, болевая реакция.
3. Рефлексы (роговичный, слуховой, ипсилатеральный/сгибательный).
4. Вегетативные эффекты: величина зрачка, наличие птоза, экзофтальма, саливация, взъерошивание, частота дыхания.

Поведенческие реакции.

Для изучения возбудимости животного исследования проводились в установках "открытое поле" и актометре. В актометре определялась возбудимость по уровню двигательной активности. Тест "открытое поле", проводившийся в одноименной установке позволил оценить как уровень ориентировочно-исследовательского поведения, так и влияние на показатели эмоционального реагирования животных [Воронина Т.А., 2002]. Установка «открытое поле» представляла собой площадку диаметром 80 см с имеющимися 16 отверстиями в полу и разделенной на 25 квадратов с выделением центральной зоны поля, с освещенностью площадки 90 Лк. Животное помещалось в центральный квадрат площадки хвостом к экспериментатору. После помещения животного в установку регистрировался ряд показателей [Буреш Я., Бурешова О., 1991], общее время наблюдения за каждой мышью составляло 2 минуты.

Показатели отражали:

-двигательную активность - горизонтальную (число пересеченных квадратов) и вертикальную (число вставаний на задние лапки, независимо осуществлялся он с опором на стенку установки или самостоятельно);

-ориентировочно-исследовательскую активность, выражающуюся в количестве заглядываний в отверстия;

-эмоциональный фактор - число актов груминга, количество выходов в центральную зону, количество фекальных болюсов (эмоциональность).

Для оценки реактивности животное перемещалось на открытое пространство (стол) хвостом к экспериментатору, после чего фиксировалось время принятия решения, результатом которого становилось целенаправленное движение животного. Таким образом производилась оценка характера реакции на изменение окружающей обстановки.

Настороженность определялась ориентировочными рефлексам, так, в непосредственной близости производился громкий хлопок посредством звукового раздражителя.

Пугливость животных оценивалась при прикосновении корнцангом.

Нервно-мышечная возбудимость

Тремор, судороги, характер походки, изменения положения тела и конечностей оценивались посредством визуального наблюдения за животным.

Болевая реакция регистрировалась с помощью наложения на основание хвоста зажима (фиксирувалось время вокализации).

Общий тонус скелетных мышц оценивался при попытке отдергивания передней лапки после её захвата (животному подносился металлический стержень, за который мышшь хваталась передними лапками, после чего фиксировался факт попытки удержать стержень при попытке отнять его).

Изучение влияния соединения на рефлексы

Роговичный рефлекс фиксировался по реакции отдергивания головы при раздражении роговицы (по наличию, либо отсутствию реакции на раздражение).

Слуховой рефлекс оценивался по реакции отдергивания головы при раздражении слухового прохода (по наличию, либо отсутствию реакции на раздражение).

Ипсилатеральный сгибательный рефлекс измерялся путём сдавливания лапы зажимом с постоянным уровнем компрессии, во время которого производилась оценка времени возникновения и силы реакции.

Частота дыхания определялась при подсчёте числа дыхательных движений у бодрствующих животных в течение 1 минуты.

2.2.16 Методы статистической обработки данных

При парном сравнении независимых данных использовались Т-тест и тест Манна-Уитни, для анализа зависимых данных использовали тест Вилкоксона. Достоверность величины IC_{50} оценивалась методом линейного регрессионного анализа. Для многопараметровых исследований статистическая обработка результатов проводилась с использованием теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уолиса 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 2002».

ГЛАВА 3. Экспериментальный поиск соединений, блокирующих 5-НТ_{2A}-рецепторы, среди производных бензимидазола

Одним из актуальных направлений поиска новых лекарственных средств для лечения различных патологических состояний тонуса сосудов, состояния тревоги и страха, участие в процессах болевой чувствительности считается разработка соединений с 5-НТ_{2A}-серотонинергическим действием [Roth V. L., 2011]. В связи с этим особое внимание уделяется изучению уже существующих блокаторов 2A типа серотониновых рецепторов. Так, была показана возможность для некоторых антагонистов взаимодействия с сайтом связывания, расположенным в третьем трансмембранном домене рецептора, где после присоединения к Asp (3.32) нейтрализовался катионный участок лиганда [Rashid M. et al., 2003].

В ряде предшествующих работ, проводившихся на базе кафедры фармакологии Волгоградского медицинского университета, были изучены различные производные бензимидазола, индола, триазола, бензимидазолия, имидазобензимидазола на проявление активности в отношении 2 типа серотониновых рецепторов [К.Ф. Suzdalev et al., 2013; А. А. Spasov et al., 2013; Анисимова В.А. с соавт., 2010]. По результатам кластерного анализа ранее проведенных исследований был определен перспективный ряд соединений в отношении проявления высокого уровня серотоноблокирующего действия, относящийся к производным N⁹-замещенных имидазо[1,2-α]бензимидазола [П.М. Васильев, 2013].

В связи с этим для поиска новых соединений с высоким уровнем 5-НТ_{2A}-антагонистического действия был выбран ряд соединений производных N⁹-имидазо[1,2-α]бензимидазола, синтезированных в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета.

3.1. Изучение 5-НТ_{2A}-антагонистических свойств производных N⁹-имидазо [1,2- α]бензимидазола на модели серотонин-индуцированной активации тромбоцитов

Для всех исследовавшихся соединений был изучен уровень их 5-НТ_{2A}-антагонистического действия. Всего в скрининговом исследовании было протестировано 25 соединений (табл. 3.1), являющихся производными N⁹-имидазо[1,2- α]бензимидазола.

Все изученные соединения демонстрировали различный уровень влияния на серотониновые рецепторы 2 типа. Лишь пять производных имидазобензимидазола блокировали серотонин индуцированную активацию тромбоцитов выше 50%. Четыре соединения не проявили активности в отношении изучаемого типа рецептора. Для исследуемых соединений не было отмечено серотонин позитивного эффекта. 16% из изучаемой группы оказали незначительное влияние на эффекты серотонина, так, блокирующие эффекты РУ-615 не превышали -20 $\Delta\%$. Остальные соединения в большинстве своем проявили себя как умеренно активные с диапазоном антагонистической активности от -50 до -20 $\Delta\%$. Вещества с умеренным уровнем активности можно было условно поделить на 2 группы, различия в уровнях активности внутри групп были незначительны. Производные бензимидазола под шифрами РУ-1332, РУ-85, РУ-276 и РУ-295 снижали эффекты серотонина на 25,7 – 27,1%. Вторая группа демонстрировала более выраженное антагонистическое действие, так, у РУ-213, РУ-275, РУ-693 и РУ-205 этот диапазон составил от -34,9 до -36,1 $\Delta\%$. Промежуточное положение занимали соединения РУ183, РУ-188 и РУ-374. Самый высокий показатель 5-НТ_{2A}-блокирующего действия среди умеренно активных соединений был у РУ-36 и составил $-47,4 \pm 7,21 \Delta\%$.

Таблица 3.1

5-НТ_{2A}-серотониноблокирующая активность N⁹-замещенные имидазо[1,2- α]бензимидазола в концентрации 1×10^{-6} М (M \pm m)

Соединения	5-НТ _{2A} -блокирующая активность, $\Delta\%$
1	2
N⁹-замещенные имидазо[1,2-α]бензимидазола	
РУ-476	-84.7 \pm 4.44 ^{*\times}
РУ-204	-72.7 \pm 6.42 ^{*\times}
РУ-30	-70.5 \pm 7.11 [*]
РУ-180	-60.9 \pm 8.96 [*]
РУ-614	-59.2 \pm 4.35 ^{*\cdot}
РУ-36	-47.4 \pm 7.21 ^{*\cdot}
РУ-374	-37.3 \pm 3.12 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-205	-36.1 \pm 6.04 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-693	-35.6 \pm 9.51 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-275	-35.6 \pm 6.12 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-213	-34.9 \pm 5.89 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-188	-33.8 \pm 4.10 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-183	-30.1 \pm 21.17 ^{*\cdot}
РУ-295	-27.1 \pm 3.15 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-276	-27.0 \pm 6.45 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-85	-26.5 \pm 8.27 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-1332	-25.7 \pm 4.99 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-615	-19.2 \pm 8.71 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-526	-15.9 \pm 5.23 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-1331	-12.8 \pm 6.00 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-185	-10.1 \pm 4.14 ^{*$\times$$\cdot$}
РУ-397	-8.1 \pm 7.93 ^{*\times}
РУ-18	-4.5 \pm 7.33 ^{*\times}
РУ-474	0.0 \pm 4.56 ^{*\times}
РУ-710	14.9 \pm 7.58 ^{*\times}
Препарат сравнения	
Кетансерин	-77,3 \pm 4,14 ^{*\times}
Ципрогептадин	-51,3 \pm 2,5 [*]

Примечание:

^{*}- статистически значимо различаются по отношению к контролю, тест Манна-Уитни (p<0,05)

^{*}- статистически значимо различаются по отношению к кетансерину, тест Манна-Уитни (p<0,05)

^{\times} - статистически значимо различаются по отношению к ципрогептадину, тест Манна-Уитни (p<0,05)

В группе высокоактивных соединений РУ-180 и РУ-614 уступали препарату сравнения кетансерину и равны ципрогептадину. В качестве соединений лидеров было выбрано два вещества РУ-30 и РУ-476. Соединение РУ-30 незначительно уступало препарату сравнения кетансерину. Вещество под шифром РУ-476 проявило наиболее выраженное серотонинергическое действие и превосходило препараты сравнения на используемой модели.

3.2. Определение показателей IC_{50} , LD_{50} и терапевтического индекса соединений лидеров

Для соединений с наибольшим уровнем блокирования серотонин-индуцированной активации тромбоцитов РУ-476 и РУ-30 были определены концентрации ингибирования. Так, показатель IC_{50} для указанных веществ и препарата сравнения незначительно различался.

Для получения терапевтического индекса был рассчитан показатель LD_{50} , который составил 77,6 мг/кг и 76,97 мг/кг для РУ-476 и РУ-30 соответственно, что несколько ниже токсической дозы кетансерина.

На основании полученных результатов для соединений - лидеров и препарата сравнения был рассчитан условный терапевтический индекс (табл. 3.2). Исследуемый интегральный показатель вещества РУ-476 превосходил таковой у препарата сравнения - кетансерина, а также в 1,7 раза условный терапевтический индекс для соединения РУ-30 соответственно.

Таблица 3.2

Показатели IC_{50} , LD_{50} и условный терапевтический индекс для соединений РУ-476, РУ-30 и препарата сравнения кетансерина

Вещество	IC_{50} , М	LD_{50} , мг/кг	Условный терапевтический индекс, у.е. (LD_{50}/IC_{50})
РУ-476	$3,8 \times 10^{-8}$	77,62	4295
РУ-30	$6,9 \times 10^{-8}$	76,97	2482
Кетансерин	$4,3 \times 10^{-8}$	71,50	3736

Основываясь на полученных результатах фармакологических и токсикологических исследований соединение РУ-476 было выбрано для дальнейшего изучения (рис. 3.1) как наиболее перспективное.

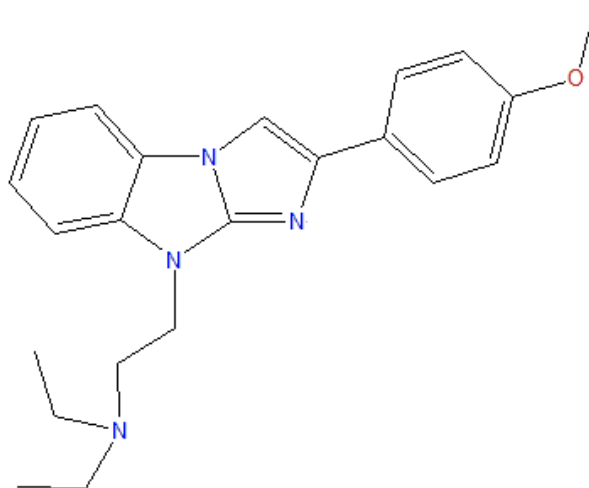


Рис 3.1. Химическая структура 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола (соединения РУ-476).

3.3. Зависимость серотониноблокирующих свойств производных имидазобензимидазола от химической структуры

По результатам анализа зависимости 5-HT_{2A}-блокирующей активности от химической структуры веществ была выявлена необходимость изучения значения физико-химических характеристик соединений на проявление фармакологического эффекта.

На первом этапе был проведен эмпирический анализ полученных результатов экспериментальной части исследования, зависимости серотонин блокирующей активности от химической структуры изучаемых соединений, относящихся к производным N⁹-имидазо[1,2-α] бензимидазола.

Исследованные соединения проявили различный уровень 5-HT_{2A}-блокирующей активности. Для изученных соединений отмечены четко выраженные закономерности, связанные с заменой в N⁹-положении различных радикалов. Наиболее активные соединения оказались в группе с диэтиламиноэтильным заместителем (РУ-180, РУ-30, РУ-476, РУ-614, РУ-204 и РУ-36).

При изменении радикала на заместитель, содержащий циклический участок, у атома азота в 9 положении базовой структуры приводило к снижению серотонинергической активности. Это было характерно для группы с пиперидиноэтильным заместителем. Вещества с атомом кислорода в алифатическом участке заместителя, группа с морфолиноэтильным радикалом, не приводили к увеличению активности, а скорее имели тенденцию нивелировать влияние на 2A подтип серотониновых рецепторов.

Среди всех изученных соединений наибольшую активность проявило соединение РУ-476, у которого в качестве заместителя в C² положении находилось фенильное кольцо с метокси группой в пара положении и относившееся к ряду диэтиламиноэтил замещенных по N⁹ положению.

В молекулах, у которых метокси группа радикала была в мета положении, 5-НТ_{2А} блокирующая активность была ниже (РУ-614), нежели у соединения РУ-476. У вещества под шифром РУ-180 в С² положении присутствовал радикал, содержащий бензольное кольцо с 2 метокси группами, что негативно сказывалось на уровне активности (РУ-180), оставаясь на уровне 3-метоксифенильного радикала. В целом, присутствие метокси группы, связанной с бензольным кольцом в С² положении способствовало проявлению высоких 5-НТ_{2А} блокирующих свойств (рис. 3.2). Высокий уровень серотониноблокирующего действия был также у соединений с 4-этоксифенильным (РУ-30) и 2-тиениловым (РУ-204) заместителями, по уровню 5-НТ_{2А}-антагонистического действия незначительно уступавших соединению-лидеру. При замене фенила в С² положении на бензольное кольцо с гидроксо группой снижалось серотониноблокирующее действие изученных соединений (РУ-85, РУ-185). Незначительное влияние на активность соединений оказывали толил (РУ-275) и третбутил (РУ-36). У структуры с метильным радикалом в С² положении активности в отношении 5-НТ_{2А} рецепторов не выявлено.

У соединений с пиперидиноэтильным заместителем в N⁹ положении отмечен умеренный уровень антисеротониновой активности, уступавший препарату сравнения - кетансерину в 2,3 раза и более. В данном ряду можно выделить группу соединений с показателями, имеющими незначительное различие при замене радикала в С² положении: 2-тиенил (РУ-205) > фенил (РУ-693) > 4-гидроксифенил (РУ-213) > 3,4-дигидроксифенил (РУ-188) > 3,4-диметоксифенил (РУ-183). Несколько менее активными оказались соединения с толилом (РУ-276) и 3 метоксифенилом (РУ-615) в качестве С²-заместителей. Исследуемые соединения с пиперидиноэтильным заместителем в N⁹ положении четко выраженной зависимости между химической структурой и антисеротониновой активностью не имели, за исключением снижения активности при отсутствие в С² положении радикала, содержащего циклическую структуру. Так, соединения РУ-526 и РУ-1331 имевшие

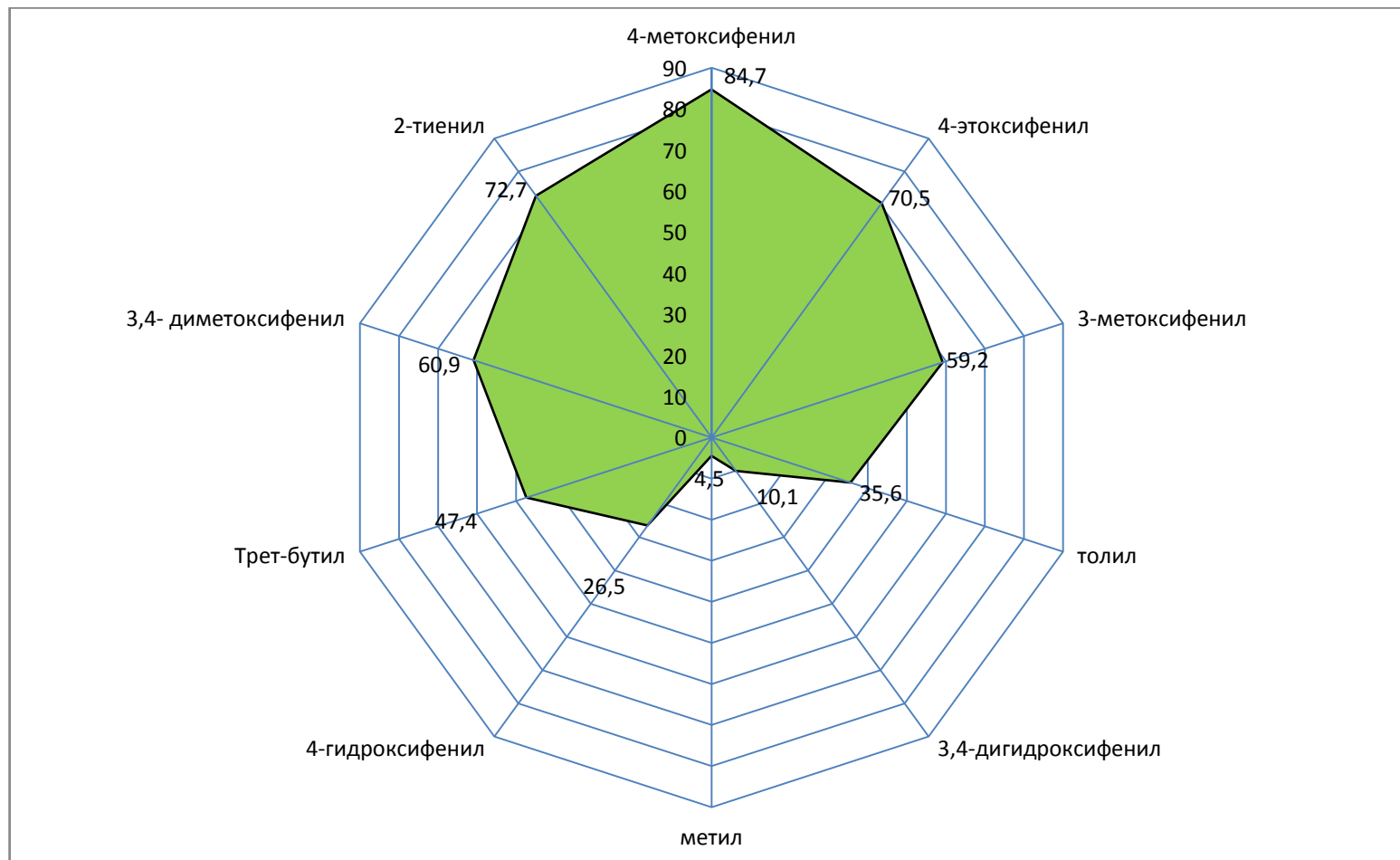


Рис. 3.2. Влияние заместителей в С² положении на уровень 5-НТ_{2А} блокирующей активности (%) в производных имидазо[1,2- α]бензимидазола, с диэтиламиноэтилом в N⁹ положении.

третбутильный и метильный радикалы уступали более, чем в 2 раза наиболее активному соединению из изученного ряда (РУ-205).

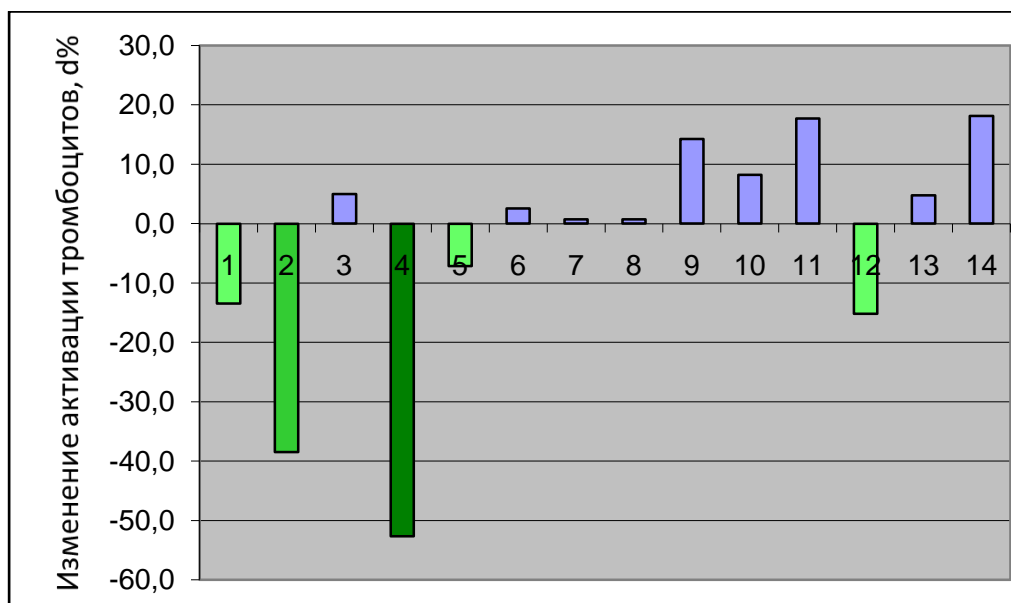
Морфолиноэтил замещенные по N⁹ положению, как и пиперидиноэтил замещенные уступали ряду с диэтиламиноэтильным радикалом, по возможности снижать серотониновый ответ. Наиболее значимыми для морфолиноэтил замещенных оказались группы с наличием гидроксо группы (РУ-374 и РУ-295). В отличие от ранее рассмотренных рядов производных имидазобензимидазола для морфолиноэтил замещенных характерно более значимое влияние метильной группы в C² положении в сравнении с другими радикалами (РУ-1332). Производные с иными заместителями не приводили к значимым эффектам (РУ-397, РУ-474 и РУ-710).

На втором этапе был проведен анализ математическим методом Фри-Уилсона, позволяющий оценить уровень вклада изучаемого радикала в 5-НТ_{2А} блокирующий эффект молекулы².

Согласно проведенным расчетам диэтиламиноэтильный радикал в N⁹ положении увеличивал антисеротониновую активность на 15,2%, в то время как морфолиноэтил оказывал негативное влияние на серотониновые эффекты соединений.

Среди изучаемых радикалов в C² положении трет-бутил, фенил и метил ощутимо снижали эффекты производных имидазобензимидазола. Для 3-метоксифенила, 3,4 - диметоксифенила, 4 - этоксифенила и 4 - метоксифенила был установлен значимый вклад в антисеротониновую активность. Так, 4-этоксифенил повышал 5-НТ_{2А}-блокирующий эффект соединений на 38,5%, а для 3-метоксифенила, 3,4 - диметоксифенила этот показатель составил 7,2% и 13,5% соответственно (рис. 3.3).

² Выражаем признательность старшему научному сотруднику НИИ фармакологии д.б.н. П.М. Васильеву за помощь при изучении зависимости между структурой исследуемых соединений и их биологической активностью



$$R=0,75 \quad F_{(2,23)}=29,56 \quad p=1,56 \cdot 10^{-5}$$

- 1) 3,4- диметоксифенил 8) 2- тиенил
- 2) 4-этоксифенил 9) фенил
- 3) 3,4-дигидроксифенил 10) Трет-бутил
- 4) 4-метоксифенил 11) метил
- 5) 3-метоксифенил 12) диэтиламиноэтил
- 6) 4-гидроксифенил 13) пиперидиноэтил
- 7) толил 14) морфолиноэтил

Рис. 3.3. Зависимость вклада заместителей в N⁹ и C² положении на 5-HT_{2A} антисеротониновую активность.

Среди всех радикалов наибольший вклад был у 4 метоксифенильного заместителя (РУ-476) и составлял -52,7%. Остальные радикалы оказывали незначительное влияние на уровень исследуемого вида активности.

3.4. Зависимость антисеротонинового эффекта изучаемых веществ от их физико-химических свойств

При анализе стерических, липофильных и электронных параметров соединений был определен коэффициент корреляции как параметр, отображающий количественную степень зависимости уровня 5-HT_{2A}

блокирующего действия химической структуры от различных физико-химических параметров.

Таблица 3.3

Коэффициент корреляции между физико-химическими параметрами изученных N⁹-замещенные имидазо[1,2-α]бензимидазола с диэтиламиноэтильным радикалом в N⁹-положении и 5-HT_{2A}-антагонистической активностью

№	Физико-химический параметр	Коэффициент корреляции, R ²
1	2	3
1.	Средний заряд N ⁹ с учетом знака	-0.8
2.	Минимальный отрицательный заряд в N ⁹ положении	-0.8
3.	Суммарный заряд неводородных атомов бензольного кольца (с учетом знака)	-0.7
4.	Средний заряд радикала в C ² положении с учетом знака	0.7

Для производных с пиперидиноэтильным заместителем в N⁹-положении отмечена тенденция обратной корреляции между зарядом радикала в C² положении и проявлением антисеротонинового действия (табл. 3.4).

Для изученных соединений, относящихся к производным N⁹-имидазо[1,2-α]бензимидазола с диэтиламиноэтильным заместителем в N⁹ положении, значимый вклад внесли заряды изучаемых структур. Наиболее значимые показатели имели обратную зависимость, исключение составил заряд радикала в C² положении (табл. 3.3).

При анализе всех производных имидазобензимидазола наиболее значимым показателем стал средний заряд радикала в N⁹ положении, что подтверждает выводы, сделанные посредством эмпирического анализа, и

коррелирует с результатами математического анализа структуры активности соединений.

Таблица 3.4

Коэффициент корреляции между физико-химическими параметрами изученных N⁹-замещенные имидазо[1,2-α]бензимидазола с пиперидиноэтильным радикалом в N⁹-положении и 5-HT_{2A}-антагонистической активностью

№	Физико-химический параметр	Коэффициент корреляции, R ²
1	2	3
1.	Максимальный положительный заряд у радикала в C ² положении	-0.7
2.	Минимальный отрицательный заряд у радикала в C ² положении	0.7
3.	Минимальный отрицательный заряд	-0.7
4.	Максимальный отрицательный заряд у радикала в C ² положении	-0.6
5.	Средний заряд радикала в C ² положении с учетом знака	0.6

Среди иных физико-химических параметров можно отметить минимальный отрицательный заряд радикала в C² положении и суммарный заряд неводородных атомов бензольного кольца (с учетом знака), для которых коэффициент корреляции составлял 0,6 и -0,6 соответственно.

При изучении соединений по изменению радикала в N⁹ положении отмечалось резкое увеличение коэффициента корреляции липофильности в группе с морфолиноэтильным заместителем, что свидетельствует о существенном вкладе морфолиноэтила в изменение физико-химических характеристик соединений (табл. 3.5). Однако, как показали результаты экспериментальной части исследования, данный радикал в N⁹ положении

негативно влиял на уровень серотониноблокирующей активности базовой структуры соединения.

В целом, обращает на себя внимание незначительное влияние на активность соединений в отношении серотониновых рецепторов их липофильности и молекулярной рефракции. Это указывает на преимущественное влияние заряда лигандов.

Таблица 3.5

Коэффициент корреляции между физико-химическими параметрами изученных N^9 -замещенные имидазо[1,2- α]бензимидазола с морфолиноэтильным радикалом в N^9 -положении и 5-НТ_{2A}-антагонистической активностью

№	Физико-химический параметр	Коэффициент корреляции, R^2
1	2	3
1.	Средний заряд N^9 с учетом знака	-0.7
2.	Log P_{All}	0.7
3.	Log P_{C2}	0.7
4.	Min(Q-) C^2	0.7
5.	Min(Q+) N^9	-0.7
6.	Max(Q-) C^2	-0.6
7.	Max(Q+) C^2	-0.6
8.	Средний заряд C^2 с учетом знака	0.6

Среди множества показателей наиболее значимые взаимоотношения между физико-химическими параметрами и активностью были зафиксированы в группе N^9 -замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола с диэтиламиноэтильным радикалом в N^9 -положении, для них суммарный заряд не водородных атомов

бензольного кольца с учетом знака и минимальный отрицательный заряд всей молекулы в целом были обратно пропорциональны активности изучаемых структур.

3.5. Заключение

В результате проведенного поиска соединения с высоким уровнем 5-HT_{2A} блокирующего действия среди 25 производных имидазобензимидазола и изучения зависимости фармакологической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств позволило установить, что производные N⁹-имидазо[1,2-α]бензимидазола способны проявлять 5-HT_{2A} антагонистическое действие различной степени выраженности.

Наиболее значимый вклад в уровень фармакологической активности вносил 4 метоксифенильный заместитель в C² положении, а также диэтиламиноэтильный заместитель в N⁹ положении. Немаловажный вклад в развитие изученного вида активности вносили показатели зарядов атомов, в частности, средний заряд заместителей в положении N⁹, учитывающий знак заряда, и минимальный отрицательный заряд радикала в N⁹ положении.

Для наиболее активных веществ были определены показатели IC₅₀ и LD₅₀, а в дальнейшем рассчитан условный терапевтический индекс. Полученные результаты позволили выбрать соединение РУ-476 для последующего изучения его фармакологического действия.

ГЛАВА 4. Влияние соединения РУ-476 на изменение сосудистого тонуса и кровотока, индуцированного серотонином

Серотонин как нейромедиатор активно участвует в функционировании сердечно-сосудистой системы [Berger M. et al., 2009; Bianchi P. et al., 2005]. Среди всех подтипов наибольшая концентрация 5-НТ рецепторов в сердечно-сосудистой системе отмечена для 5-НТ_{1B,1D,1F}, 5-НТ_{2A,2B}, 5-НТ₃, 5-НТ₄ и 5-НТ₇ типов. Особое внимание сегодня отводится 5-НТ_{2A} рецептору, локализованному в миоцитах артерий, активация которого приводит к сужению сосудов.

Широко известно участие 5-НТ_{2A} подтипа рецепторов в патогенезе целого ряда заболеваний, основанных на нейрональной модуляции тонуса церебральных сосудов и функционировании эндогенного серотонина [Leszek A., Rybaczyk et al., 2005], таких как нарушение мозгового кровотока, возникновение мигренозных приступов, энцефалопатия и других. В регуляции сердечно-сосудистой системы принимают участие и иные нейромедиаторные системы. Примером в таком случае может служить норадренергическая, холинергическая, NO система, дефицит кислорода и другие. Стоит учитывать и возможное их влияние на серотонинергическую регуляцию сердечно-сосудистой системы. К примеру, в условиях ишемической нагрузки сосудистые эффекты 5-гидрокситриптамина не только не ослабляются, но и несколько возрастают [Мирзоян Р.С. и др., 2006].

Отмечается, что в связи с вовлеченностью серотонина в различные формы гипертензии, немаловажной является роль 5-гидрокситриптамина в регуляции артериального давления [Diaz, 2008]. Степень участия 2A подтипа серотониновых рецепторов в регуляции артериального давления до конца не ясна [Dempsie Y., 2008]. Так, значительные эффекты 5-НТ_{2A}-антагониста кетансерина в большей степени обуславливаются его неселективным действием на α -адренорецепторы, что приводит к снижению артериального давления напрямую после введения препарата [Jean-Louis Vincent et al., 1984].

В связи с этим представляется важным изучение влияния нового соединения антагониста 5-HT_{2A} рецепторов соединения РУ-476 на сосудистые эффекты серотонина.

4.1.1. Влияние соединения РУ-476 на вызванное серотонином изменение скорости кровотока во внутренней сонной артерии

В контрольной группе животных на модели серотонин индуцированного спазма внутренней сонной артерии после введения 5-гидрокситриптамина наблюдалось резкое падение скорости кровотока с 11,9 до 7,5 см/сек. При повторных введениях серотонина в течение 1 часа потеря чувствительности рецепторов к индуктору не отмечалась. Так, линейная скорость кровотока снижалась на 4,1 см/сек и 4,3 см/сек при 2 и 3 введении 5-НТ соответственно. В среднем падение кровотока в каротидной системе в ответ на введение серотонина составило $36,3 \pm 3,56\%$.

Изученные 5-HT_{2A} антагонисты с различной эффективностью снижали констрикторные эффекты серотонина (рис. 4.1).

Неселективный блокатор серотониновых рецепторов ципрогептадин оказывал незначительное влияние на действие индуктора после 20 минутного периода инкубации, скорость кровотока падала на $31,6 \pm 11,98\%$. Однако при повторном введении антисеротониновый потенциал препарата возрастал, скорость кровотока снижалась в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой при повторных введениях серотонина. Средний уровень антисеротонинового действия ципрогептадина составил $21,3 \pm 4,52\%$.

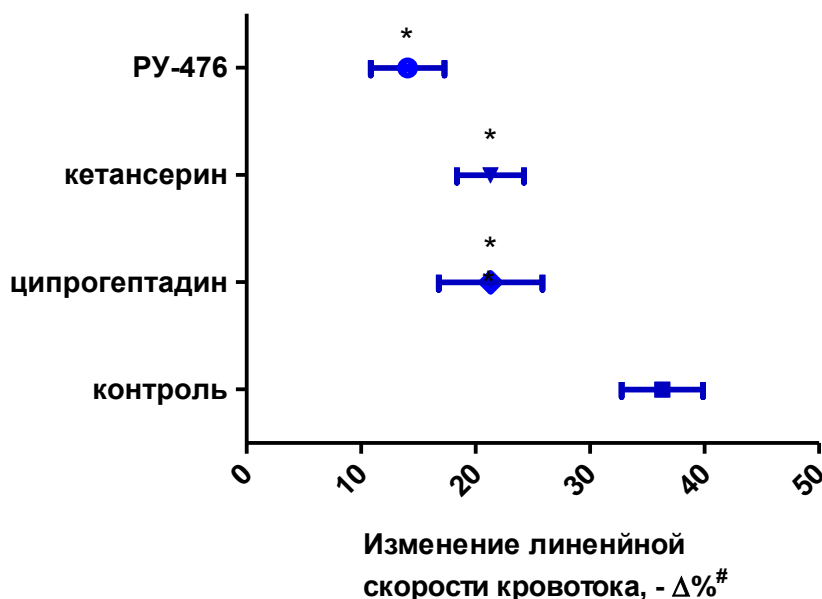


Рис. 4.1 Влияние ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 в эквивалентных дозах на уровень максимального падения скорости кровотока во внутренней сонной артерии, вызванного серотонином (* - статистически значимы по отношению к контрольной группе, тест Краскела – Уоллеса с постобработкой тестом Данна).

Несколько более эффективным при сравнении с ципрогептадином в регуляции тонуса сосудов был препарат сравнения с высоким уровнем аффинности к 5-НТ_{2А} рецептору - кетансерин. Так, вещество при первом введении более чем в 2 раза снижал серотонин индуцированное падение линейной скорости кровотока во внутренней сонной артерии. Скорость кровотока в каротидной системе при введении серотонина на фоне кетансерина в среднем опускалась на 18,6±1,72%.

Соединение РУ-476 при внутривенном введении уменьшало сосудистые эффекты серотонина, практически в 4 раза при первичном введении 5-гидрокситриптамина. Линейная скорость во внутренней сонной артерии снижалась под воздействием серотонина на 1,3 и 1,5 см/сек при повторных введениях 5-НТ. В среднем скорость кровотока во внутренней сонной артерии падала на 14,5±3,23%.

Таким образом, соединение РУ-476 эффективно снижало вызванный серотонином спазм внутренней сонной артерии, незначительно превосходя ципрогептадин и кетансерин. Также антисеротониновые эффекты вещества в сравнении с препаратами сравнения развивались несколько быстрее.

4.1.2. Влияние соединения РУ-476 на серотонин индуцированное изменение скорости кровотока в мозговых артериях

Учитывая значительное влияние 2А типа серотониновых рецепторов на тонус сосудов головного мозга, а также их высокую концентрацию в центральной нервной системе, особый интерес представляло изучение

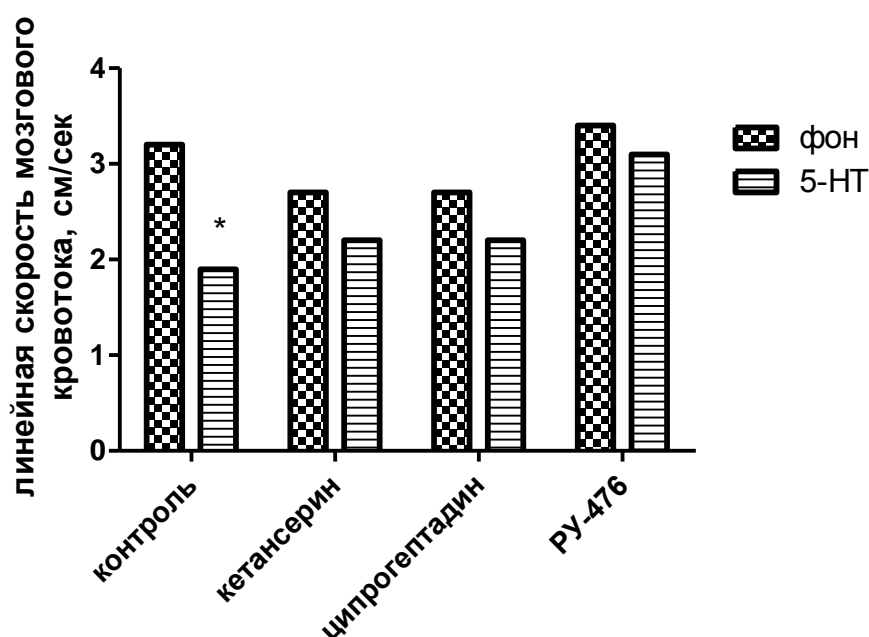


Рис. 4.2 Влияние ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 на падение линейной скорости мозгового кровотока в области средней мозговой артерии при внутривенном введении серотонина (* - изменения статистически значимы по отношению к скорости кровотока на 20 минуте после введения соединений, тест Манна – Уитни).

Таблица 4.1

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина в эквимолярных дозах на скорость кровотока в области средней мозговой артерии, при внутривенном введении серотонина ($M \pm m$, 20 мкг/кг).

	Линейная скорость кровотока до введения соединений, см/сек	Линейная скорость кровотока на 20 минуте после введения соединений, см/сек	Максимальное снижение линейной скорости кровотока после внутривенного введения серотонина	
			Δ , см/сек	$\Delta\%$
контроль	3,5±0,15	3,2±0,18	1,3±0,14	-40,3±4,39
кетансерин 0,55 мг/кг	3,0±0,18	2,7±0,12	0,6±0,22*	-19,9±8,37*
РУ-476 0,5 мг/кг	3,6±0,25	3,4±0,21	0,3±0,06*	-8,2±1,80*
ципрогептадин 0,35 мг/кг	3,3±0,33	2,7±0,55	0,5±0,07*	-18,0±1,19*

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

уровня влияния соединения РУ-476 на констрикторные эффекты серотонина в средней мозговой артерии.

Известно, что серотонин вызывает сужение сосудов, что в совокупности с иными парасимпатическими эффектами приводит к изменению скорости кровотока в бассейне мозговых артерий [Мирзоян Р.С. и др., 2006]. В наших опытах уровень максимального падения линейной скорости составил $40,3 \pm 4,39\%$ от исходного значения.

При введении соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина скорость кровотока не менялась (табл. 4.1). Так, на 20 минуте инкубационного периода колебания уровня скорости мозгового кровотока для кетансерина и соединения РУ-476 не превышали изучаемый показатель у контрольной группы. Изменение исходного уровня кровотока в группе животных с предварительно введённым ципрогептадином было незначительным в сравнении с контрольным значением.

Соединение РУ-476, кетансерин и ципрогептадин демонстрировали высокий уровень блокирования сосудистых эффектов серотонина (рис. 4.2). Так, при предварительном введении кетансерина, 5-НТ снижал линейную скорость в мозговых сосудах на 0,6 см/сек. В группе ципрогептадина максимальное падение было в 2,6 раза ниже, чем в контрольной группе.

Соединение РУ-476 эффективно уменьшало констрикторные эффекты 5-гидрокситриптамина на 79,8%. Исследуемое соединение по уровню коррекции, вызванного серотонином падения линейной скорости кровотока в области средней мозговой артерии, несколько превосходило изученные блокаторы 2А типа серотониновых рецепторов.

На основании вышеизложенного соединение РУ-476 наиболее эффективно из изученных соединений, влияло на сосудистые эффекты 5-гидрокситриптамина в системах каротидной и средней мозговой артерий, превосходя антисеротониновые эффекты кетансерина и ципрогептадина практически в 2 раза.

4.2. Воздействие соединения РУ-476 на изменение скорости кровотока в мозговых артериях при введении серотонина в условиях ишемии мозга крыс

В условиях нарушения кровоснабжения головного мозга изменяется чувствительность различных систем рецепторов [Мирзоян Р.С. и др., 1999]. На использованной модели неполной глобальной ишемии головного мозга скорость кровотока в контрольной группе на третий день после перевязки общих сонных артерий составила 2,5 см/сек, что на 28,9% ниже, чем у животных без ишемии. Несколько возросла и реакция на серотонин, составляя у животных с ишемией головного мозга, $-47,8 \pm 5,79 \Delta\%$.

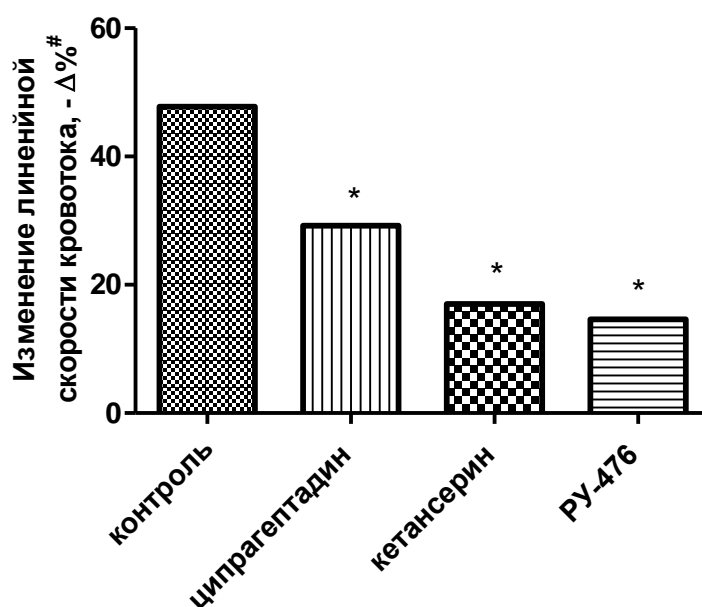


Рис. 4.3 Влияние ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 в эквимольных дозах на уровень максимального падения скорости мозгового кровотока в области средней мозговой артерии, вызванного серотонином на фоне искусственно созданной ишемии (* - изменения статистически значимы по отношению к контрольной группе, по тесту Краскела – Уолесса с постобработкой тестом Данна).

Таблица 4.2

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина в эквимолярных дозах на скорость кровотока в области средней мозговой артерии, при внутривенном введении серотонина (20 мкг/кг), на фоне развитой ишемии ($M \pm m$).

	Линейная скорость кровотока до введения соединений, см/сек	Линейная скорость кровотока на 20 минуте после введения соединений, см/сек	Максимальное снижение линейной скорости кровотока после внутривенного введения серотонина	
			Δ , см/сек	$\Delta\%$
контроль	2,5±0,12	2,4±0,09	1,1±0,09	-47,8±5,79
кетансерин 0,55 мг/кг	2,4±0,13	2,2±0,11	0,3±0,07*	-17,0±4,13*
РУ-476 0,5 мг/кг	2,3±0,04	2,4±0,11	0,4±0,10*	-14,6±3,38*
ципрогептадин 0,35 мг/кг	2,2±0,08	2,1±0,07	0,6±0,18*	-29,2±8,49*

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Соединение РУ-476, кетансерин и ципрогептадин после внутривенного введения не изменяли линейную скорость мозгового кровотока в области средней мозговой артерии (табл. 4.2). Соединения в различной степени влияли на снижение скорости кровотока, вызванное серотонином, в условиях ишемии головного мозга (рис. 4.3).

Антисеротониновые эффекты неселективного блокатора серотониновых рецепторов ципрогептадина в условиях ишемической нагрузки мозговых сосудов были несколько ниже в сравнении с результатами на модели без ишемии. Изучаемый показатель для ципрогептадина был равен $-29,2 \pm 8,49\%$. Кетансерин в условиях дефицита кислорода несколько усиливал свои блокирующие свойства, так вещество блокировало констрикторное действие серотонина на 64,4%.

При использовании соединения РУ-476 вызванный серотонином спазм сосудов в области средней мозговой артерии уменьшался на 69,5% в сравнении с контрольными показателями. Соединение РУ-476 несколько превосходило эффекты кетансерина и, практически в 2 раза, превышало способность ципрогептадина корректировать сосудистые эффекты серотонина в условиях ишемического повреждения тканей головного мозга.

Таким образом, соединение РУ-476 в значительной степени влияет на серотонин индуцированное падение скорости кровотока в сосудах головного мозга в условиях ишемии, превосходя ципрогептадин и кетансерин.

4.3. Влияние соединения РУ-476 на системное артериальное давление

Были изучены эффекты 5-НТ_{2А}-антагонистов - ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 на артериальное давление в условиях серотониновой нагрузки. Так, при введении интактным животным

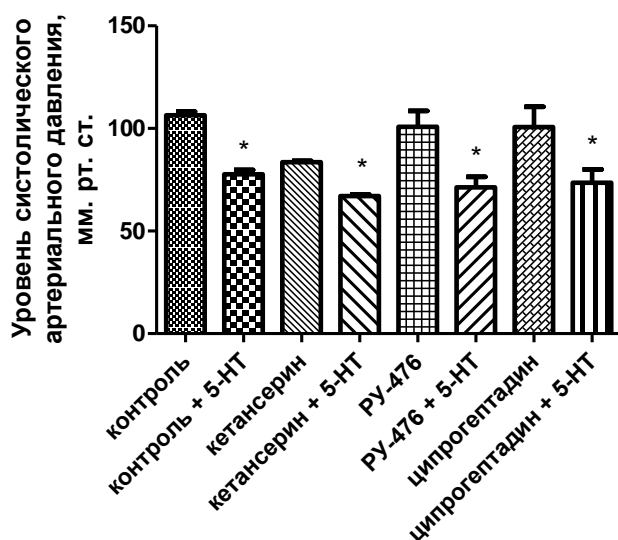


Рис. 4.4 Влияние ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 в эквимолярных дозах на изменение систолического артериального давления после введения серотонина (* - изменения статистически значимы по отношению к группе без введенного серотонина, парный t-тест).

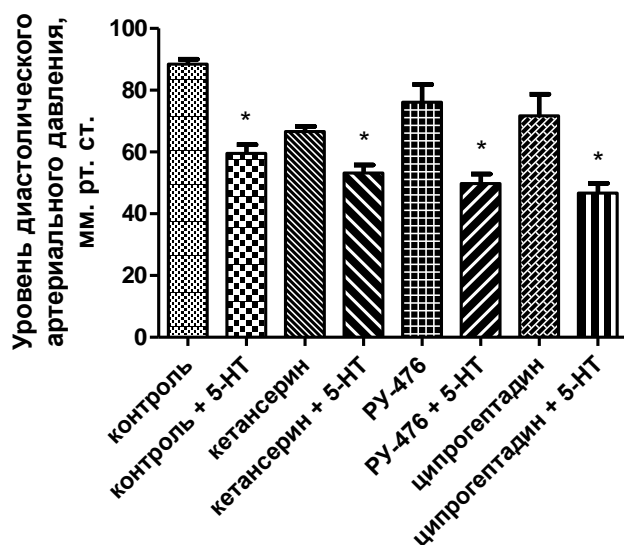


Рис. 4.5 Влияние ципрогептадина, кетансерина и соединения РУ-476 в эквимолярных дозах на изменение диастолического артериального давления после введения серотонина (* - изменения статистически значимы по отношению к группе без введенного серотонина, парный t-тест).

серотонина артериальное давление падало: систолическое на 27,0% (рис. 4.4) и диастолическое на 32,7% (рис. 4.5).

После введение животным кетансерина отмечалось понижение исходного уровня как систолического, так и диастолического давления на 21,0% и 19,8% соответственно.

Соединение РУ-476 и препараты сравнения – кетансерин и ципрогептадин не оказывали существенного влияния на вызванное серотонином снижение артериального давления (табл. 4.3).

В отличие от кетансерина, для соединения РУ-476 и ципрогептадина не было отмечено влияния на исходный уровень артериального давления.

4.4. Влияние соединения РУ-476 на хронотропное действие серотонина

Доказана возможность серотонина изменять частоту сердечных сокращений, тем самым вызывая брадикардию. 5-НТ рецепторы могут изменять ЧСС, что наиболее характерно для 5-НТ_{1А} подтипа. Однако такая возможность не исключена и для иных типов серотониновых рецепторов, участвующих в регуляции сердечно-сосудистой системы, в том числе и 5-НТ_{2А} подтипа [Jordan D.,2004].

В наших исследованиях серотонин при внутривенном введении приводил к снижению частоты сердечных сокращений практически в 2 раза, на $45,8 \pm 7,03\%$.

Соединение РУ-476 и ципрогептадин не приводили к существенному изменению исходного уровня частоты сердечных сокращений. Кетансерин недостоверно приводил к брадикардии (табл. 4.4).

Исследуемые соединения в различной степени корректировали влияние серотонина на частоту сердечных сокращений (табл. 4.5). Так, ципрогептадин на 31,8% уменьшал отрицательное хронотропное действие серотонина.

Таблица 4.3

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина в эквимольных дозах на артериальное давление ($M \pm m$, мм. рт. ст.).

	Уровень артериального давления до введения вещества		Уровень артериального давления на 20 минуте после введения вещества		Максимальное падение артериального давления при введении серотонина (20мкг/кг)	
	Систолическое	диастолическое	систолическое	диастолическое	систолическое	диастолическое
Контроль	106,5±1,67	88,5±1,57	106,5±1,67	88,5±1,57	77,7±2,14 [#]	59,54±2,86"
Кетансерин (0,55 мг/кг)	105,7±2,17	83,0±2,26	83,5±0,60 [*]	66,6±1,69 ^{*×}	67,1±0,67" [×]	53,2±2,53"
РУ-476 (0,5 мг/кг)	97,1±5,45	86,7±4,88	100,9±7,70	76,2±5,71 ^{*×}	71,4±5,07"	49,8±3,08"
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	117,9±10,47	94,8±8,10	100,7±9,86	71,7±7,00	73,3±6,57	46,7±3,15

Примечания:

* - $p < 0,05$ по отношению к уровню артериального давления на 20 минуте контрольной группы, по Краскелу-Уолесу, с посттестом Данна.

× - $p < 0,05$ по отношению к контролю, по однофакторному дисперсионному анализу и посттестом теста Ньюмана-Кеулса.

' - $p < 0,05$ по отношению к исходу группы кетансерина, парный t-тест.

" - $p < 0,05$ по отношению к соответствующему уровню артериального давления на 20 минуте после введения вещества, парный t-тест.

- $p < 0,05$ по отношению к соответствующему уровню артериального давления на 20 минуте после введения вещества, тест Вилкоксона.

Таблица 4.4

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина в эквимолярных дозах на изменение уровня частоты сердечных сокращений ($M \pm m$).

	Исходный уровень частоты сердечных сокращений до введения вещества, уд/мин	Уровень частоты сердечных сокращений на 20 минуте после введения вещества, уд/мин
Контроль	303,0 ± 3,76	293,3 ± 5,53
Кетансерин (0,55 мг/кг)		263,0 ± 15,02
РУ-476 (0,5 мг/кг)		289,5 ± 9,35
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)		303,9 ± 7,67

Таблица 4.5

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина в эквимолярных дозах на изменение уровня частоты сердечных сокращений, при внутривенном введении серотонина ($M \pm m$, 20 мкг/кг).

	Изменение уровня частоты сердечных сокращений			
	Уровень частоты сердечных сокращений на 20 минуте после введения вещества, уд/мин	Максимальное падение уровня частоты сердечных сокращений после введения серотонина, уд/мин	Δ , уд/мин	$\Delta\%$
Контроль	293,3 \pm 5,53	158,0 \pm 19,71	135,3 \pm 21,10	-42,5 \pm 5,89
Кетансерин (0,55 мг/кг)	263,0 \pm 15,02	215,3 \pm 16,14	47,7 \pm 12,83*	-18,4 \pm 4,86*
РУ-476 (0,5 мг/кг)	289,5 \pm 9,35	257,0 \pm 2,54	32,5 \pm 9,41*	-10,4 \pm 2,54*
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	303,9 \pm 7,67	202,8 \pm 20,42	88,7 \pm 16,24	-29,0 \pm 5,94

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

Кетансерин и соединение РУ-476 более выражено блокировали вызванное серотонином урежение ритма.

Соединение РУ-476 ограничивало отрицательное хронотропное действие серотонина на -75,5%, несколько превосходя антисеротониновые эффекты кетансерина.

Таким образом, у соединения РУ-476 не выявлено отрицательного хронотропного действия, в отличие от кетансерина. Экспериментальное соединение было несколько выше ципрогептадина и кетансерина по способности снижать эффекты серотонина, связанные с изменением ЧСС.

4.5. Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что соединение РУ-476 эффективно снижало вызванное серотонином падение линейной скорости мозгового кровотока в средней мозговой и внутренней сонной артериях. Изменение линейной скорости кровотока после введения соединения РУ-476 не отмечалось.

Соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг в 2,5 раза снижало сосудистые эффекты серотонина во внутренней сонной артерии. Указанный эффект сохранялся при повторных введениях 5-гидрокситриптамина. Соединение РУ-476 недостоверно превосходило препараты сравнения, ципрогептадин и кетансерин, по изучаемому показателю, а также для соединения РУ-476 было характерно несколько более быстрое развитие эффекта.

На модели серотонин индуцированного изменения скорости кровотока в средней мозговой артерии соединение РУ-476 практически в 5 раз снижало вызванное 5-гидрокситриптамином падение линейной скорости кровотока, практически в 2 раза превосходя препараты сравнения, кетансерин и ципрогептадин.

В условиях неполной глобальной ишемии головного мозга на сосудах в области средней мозговой артерии для соединения РУ-476 отмечена

способность достоверно уменьшать вызванное внутривенным введением 5-НТ изменение скорости, составляя $-14,6 \pm 3,38\%$. Экспериментальное соединение РУ-476 практически в 2 раза превосходило антисеротониновые эффекты ципрогептадина.

Соединение РУ-476 не изменяло исходный уровень артериального давления, в отличие от кетансерина, вызывающего понижение артериального давления на 20%. Соединение РУ-476 не влияло на серотонин опосредованное падение артериального давления.

Соединение РУ-476 уменьшало отрицательный хронотропный эффект серотонина на 76%, несколько превосходя эффекты кетансерина. В отличие от соединения РУ-476, кетансерин проявлял отрицательный хронотропный эффект.

ГЛАВА 5. Антитромботические свойства соединения РУ-476

Наиболее активное участие 5-гидрокситриптамин принимает в активации и агрегации тромбоцитов [Moerland M. et al., 2011], что опосредуется через 5-НТ_{2А}-подтип серотониновых рецепторов [Nishihira K. et al., 2006], локализованный на мембране тромбоцитов [Ramadan N.M. et al., 1997].

Как для уже существующих антагонистов 5-НТ_{2А} рецепторов, кетансерин и ципрогептадин, так и новых соединений отмечается возможность блокировать агрегацию тромбоцитов [Adams JW. et al., 2008]. Данная способность 5-НТ_{2А}-блокаторов используется при профилактике мигрени, а также ряда других заболеваний (болезнь Рейно и др.), в том числе и тромбозах (периферических тромбозах, геморроидальном тромбозе и др.) [Dormandy J.A. et al., 1988; Marasini B. et al., 1988; Klimuiuk P.S. et al., 1989; Alhaider A.A., 1991].

Для соединения РУ-476 показана способность блокировать активацию тромбоцитов и изменять эффекты серотонина на скорость кровотока в каротидных и мозговых сосудах (см. главы 3-4), в связи с чем целесообразно провести изучение влияния соединения на агрегацию тромбоцитов и скорость тромбообразования.

5.1. Действие соединения РУ-476 на агрегацию тромбоцитов

Был изучен спектр антиагрегантного действия соединения РУ-476, исследованный в отношении ряда физиологических активаторов агрегации тромбоцитов: адреналина, АДФ, коллагена и серотонина (см. главу 2).

Таблица 5.1

Влияние соединения РУ-476, кетансерина и ципрогептадина (в эквимольной концентрации 1 мкМ) и клопидогрел (7,32 мг/л) на АДФ-, коллаген-, адреналин - и серотонин - индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика

Изучаемое вещество	Антиагрегантная активность (M±m), Δ% ^Δ			
	индукторы агрегации			
	АДФ (5 мкМ)	Коллаген (50 мкг/мл)	Адреналин (10 мкМ)	Серотонин (1 мкМ)
кетансерин	-16,2±3,48* [×]	-14,3±2,78*	-17,3±2,99*	-95,6±1,85* [×]
РУ-476	-18,2±2,31* [×]	-30,2±4,35*	-25,6±2,90*	-96,7±0,07* [×]
ципрогептадин	-3,6±0,93*	-12,9±2,07*	-19,8±3,49*	-72,0±3,62*
Кислота ацетил- салициловая	-32,8±4,6* [×]	-54,9±10,94*	-68,4±12,13* [×]	---

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

× – статистически значимо по отношению к ципрогептадину ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

В результате проведенного исследования установлено, что соединение РУ-476 способно снижать коллаген - индуцированную агрегацию тромбоцитов (табл. 5.1), несколько превосходя по уровню проявляемой активности препараты сравнения, по механизму действия, ципрогептадин и кетансерин. Соединение РУ-476 в концентрации 1 мкМ изменяло коллаген - индуцированную агрегацию тромбоцитов, превосходя более чем в 2 раза ципрогептадин и кетансерин. При этом все изучаемые соединения незначительно различались по уровню влияния на тромбоцитарные эффекты адреналина, демонстрируя уровень подавления агрегации в диапазоне от 17,3 до 25,6 Δ%. В то же время соединение РУ-476, кетансерин и ципрогептадин демонстрировали низкий уровень активности в тесте АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов, более чем в 2 раза уступая кислоте ацетилсалициловой.

В исследованиях установлено, что соединение РУ-476 подавляло серотонининдуцированную активацию тромбоцитов. Соединение РУ-476 не уступало препарату сравнения кетансерину и даже несколько превосходило по уровню антиагрегантного действия ципрогептадин на 25,5 %.

Таким образом, для соединения РУ-476 показана способность снижать, вызванную серотонином агрегацию тромбоцитов не только не уступая кетансерину и ципрогептадину, но и превосходя их. При этом в отношении агрегации тромбоцитов вызванной иным индуктором (АДФ) для соединения РУ-476 был характерен низкий уровень антиагрегантной активности.

Таблица 5.2

Влияние соединения РУ-476 (0,5 мг/кг), кетансерина (0,55 мг/кг) и клопидогреля (7,32 мг/кг) на динамику линейной скорости кровотока в сонной артерии интактных крыс при моделировании экспериментального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III) ($M \pm m$)

Изучаемое вещество	Динамика снижения линейной скорости кровотока (V_{am}) на 50%-99,9%, мин.			
	50%	90%	95%	99,9%
контроль	14,0±0,78	21,4±1,10	23,9±1,47	24,0±0,34
клопидогрел	26,3±1,97*	44,2±2,26*	50,2±3,19*	69,2±0,89*
РУ-476	12,7±0,82	21,2±1,02	24,1±1,39	30,3±3,57
Кетансерин	10,3±0,43	14,3±0,77	15,7±1,01	18,0±2,88

Примечание:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

Таблица 5.3

Влияние соединения РУ-476 (0,5 мг/кг), кетансерина (0,55 мг/кг), ципрогептадина (0,35 измг/кг) и клопидогреля (7,32 мг/кг) на динамику линейной скорости кровотока в сонной артерии интактных крыс при моделировании экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током ($M \pm m$)

Изучаемое вещество	Динамика снижения линейной скорости кровотока (V_{am}) на 50%-99,9%, мин.			
	50%	90%	95%	99,9%
контроль	7,6±0,61	12,3±0,83	13,4±1,04	20,9±2,60
клопидогрел	26,0±4,57*	48,3±4,90*	55,8±7,12*	95,9±20,23*
РУ-476	6,9±0,91	11,1±1,28	12,1±1,54	18,3±3,73
Кетансерин	6,2±1,44	11,7±1,36	11,8±1,39	19,1±3,56
Ципрогептадин	8,8±0,83	13,2±0,76	14,4±1,23	22,0±2,90

Примечание:

* – статистически значимо по отношению к контролю и ципрогептадину ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

5.2. Изучение антитромботического действия соединения РУ-476

В результате серии опытов по изучению антитромботического эффекта соединения РУ-476 на моделях артериального тромбоза, основанных на стимуляции электрическим током (табл. 5.2) и поверхностной аппликации 50% раствора хлорида железа (III) (табл. 5.3), значимых эффектов для изучаемого экспериментального соединения РУ-476 отмечено не было. Препарат сравнения кетансерин, также не имел статистически значимых отличий в динамике снижения линейной скорости кровотока от показателей контрольной группы животных. Препарат сравнения с известной антитромботической активностью - клопидогрел изменял скорость образования тромба как при повреждении эндотелия сосудистой стенки электрическим током, так и при формировании тромба посредством аппликации хлорида железа (III), увеличивая время образования тромба в среднем в 2 раза.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что для соединения РУ-476 не характерно проявление антитромботического действия на моделях, основанных на неспецифических путях образования тромба.

5.3. Заключение

В результате проведенной серии опытов было установлено, что соединение РУ-476 не уступает кетансерину в способности блокировать вызванную серотонином агрегацию тромбоцитов и превосходит ципрогептадин на 25,5%, а также проявляет низкий уровень блокирующей активности в отношении АДФ зависимой агрегации тромбоцитов, уступая по уровню активности кислоте ацетилсалициловой.

На моделях артериального тромбоза соединение РУ-476 не оказывало влияния на скорость образования тромба, вызванного как хлоридом железа, так и электрическим током.

ГЛАВА 6. Фармакологический анализ центральных механизмов нейротропного действия соединения РУ-476

Благодаря своему широкому распространению в ЦНС 5-HT_{2A} рецепторы способны участвовать в регуляции большого количества процессов. При этом значительным оказывается количество связей и взаимных влияний с иными нейромедиаторами. Отмечается возможность регуляции антагонистами 5-HT_{2A} рецептора активности дофаминовых рецепторов в области среднего мозга (вентральная область покрышки), а так же взаимодействия с GABA- и Глутергическими системами [Di Giovanni G. et al., 2008].

Существующие на сегодняшний день антагонисты 2A типа серотониновых рецепторов способны взаимодействовать и с иными мишенями. Неселективный блокатор 5-HT_{2A} рецепторов, ципрогептадин, проявляет высокий уровень сродства к 1H-гистаминовым рецепторами [Hargrove V. et al., 2009]. Метисергид взаимодействует с различными подтипами рецепторов серотонина [Knight A.R. et al., 2004; Rothman R.B. et al., 2000]. Селективный блокатор 5-HT_{2A} рецепторов, кетансерин, проявляет активность в отношении α -адренорецепторов [Wenting G.J. et al., 1987].

Такой полирецепторный механизм действия уже существующих 5-HT_{2A} антагонистов подводит к необходимости проведения фармакологического анализа на возможность проявления иных нейромедиаторных взаимодействий.

6.1. Влияние соединения РУ-476 на 5-HT₃ и 5-HT₄ - рецепторы *in vitro*

Особое внимание отводится возможным эффектам, основанным на рецепторном действии внутри класса серотониновых рецепторов. Это связано не только с исходной близостью происхождения целей, но и различными аспектами регуляции одних и тех же систем в организме. Для изучения вероятного проявления активности в отношении иных типов серотониновых

рецепторов была проведена оценка влияния соединения РУ-476 на 5-НТ₃ и 5-НТ₄ подтипы серотониновых рецепторов.

6.1.1. Влияние соединения РУ-476 на 5-НТ₃-рецептор

Изучение блокирующего влияния веществ на третий подтип серотониновых рецепторов соединения РУ-476 и антагониста 5-НТ₃ рецептора ондансетрона проводился на модели серотонин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки морской свинки [Yoshida S. et al., 2007].

Таблица 6.1

Влияние соединения РУ-476 и ондансетрона на серотонин-индуцированный спазм изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ Моль ($M \pm m$).

Вещество	5-НТ ₃ -блокирующая активность, $\Delta\%^x$
РУ-476	$-10,8 \pm 0,11^*$
Ондансетрон	$-80,1 \pm 2,1$

Примечание:

* – статистически значимо по отношению к ондансетрону ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни)

x – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни)

В результате проведенного исследования установлено, что серотонин достоверно приводил к возникновению спазма на изолированном участке подвздошной кишки морской свинки (табл. 6.1). Препарат сравнения селективный блокатор 5-НТ₃ рецептора, ондансетрон, достоверно подавлял вызванное серотонином сокращение выделенного участка кишечника животного. При этом исследуемое соединение РУ-476 значительно ниже блокировал серотонин-индуцированный спазм, практически в 8 раз, уступая ондансетрону по уровню 5-НТ₃ блокирующей активности.

Таким образом, по результатам проведенного исследования соединение РУ-476 не оказывало влияния на серотонин-индуцированный спазм, что, скорее всего, связано с отсутствием взаимодействия с 5-НТ₃-рецептором.

6.1.2. Влияние соединения РУ-476 на 5-НТ₄ рецептор

Соединение РУ-476 изучалось на модели карбохолин индуцированного спазма изолированного отрезка пищевода крысы, где оценивалась способность веществ снижать спазм за счет агонистического действия в отношении 5-НТ₄ рецептора [Kilbinger H., Wolf D., 1992].

По результатам проведенного исследования установлена способность карбохолина к повышению тонуса изолированного участка пищевода крысы (табл. 6.2). При этом соединение РУ-476 приводило к незначительному расслаблению спазмированного пищевода. Серотонин оказывал агонистическое действие на 5-НТ₄ тип серотониновых рецепторов, что приводило к снижению тонуса спазмированных тканей пищевода, в несколько раз превосходя эффекты соединения РУ-476.

Таблица 6.2

Влияние соединения РУ-476 и серотонина на карбохолин индуцированный спазм изолированного отрезка пищевода крысы в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ Моль (M \pm m).

Вещество	5-НТ ₄ -агонистическая активность, $\Delta\%$
РУ-476	$-8,4 \pm 8,43^*$
Серотонин	$-93,3 \pm 2,55^x$

Примечание:

* – статистически значимо по отношению к серотонину ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни)

x – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни)

Таким образом, можно заключить, что изучаемое вещество РУ-476 не оказывало выраженного влияния на карбохолин-индуцированный спазм

пищевода крысы, что, скорее всего, свидетельствует об отсутствии влияния на эффекты, связанные с 5-HT₄-рецепторами.

6.2. Взаимодействие соединения РУ-476 с модуляторами основных нейромедиаторных систем *in vivo*

При исследовании возможного влияния соединения РУ-476 на иные нейромедиаторные системы использовались методики *in vivo*, позволяющие оценить активность в отношении холинергической, дофаминергической, адренергической, ГАМК-ергической и серотонинергической систем. Изучена MAO-ингибирующая активность.

6.2.1. Воздействие соединения РУ-476 на гиперкинез, вызванный 5 гидрокситриптофаном у мышей

Серотонин при внутрибрюшинном введении приводил к возникновению гиперкинезии [Peroutka S. et al., 1981; Pranzetelli M.R. et al., 1989]. В контрольной группе животных максимальное количество встряхивания головой отмечалось на 20 минуте после введения 5-ГТФ, превышая иные результаты минимум на треть (табл. 6.3). В дальнейшем уровень гиперкинеза снижался.

Соединение РУ-476 в тесте 5-гидрокситриптофанового гиперкинеза достоверно влияло на количество встряхиваний головой мышей, отражающий уровень гиперкинеза животных. Так, соединение РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг достоверно снижало эффекты 5-гидрокситриптофана уже на 20 минуте после введения 5-ГТФ. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными о 5-HT_{2A} рецепторной

Таблица 6.3

Влияние соединения РУ-476 на гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном в дозе 300 мг/кг ($M \pm m$)

Мин.	Количество встряхиваний головой		
	Контроль (5-ГТФ)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + 5-ГТФ	РУ-476 (5,0 мг/кг) + 5-ГТФ
10	24.5±4.89	18.0±2.94	12.3±3.21
20	34.0±3.93	24.3±3.13 ^Δ	15.8±1.42 ^Δ
30	21.2±3.23	7.7±1.61 ^Δ	9,7±0,49 ^Δ
40	8.7±1.94	2.3±0.56 ^Δ	6.3±1.43
50	5.8±1.20	2.2±0.79 ^Δ	2,2±0,83 ^Δ
60	3.2±1.25	1.8±0.7	0,3±0,21

Примечание:

Δ - статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторному дисперсионному анализу с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса)

Таблица 6.4

Влияние соединения РУ-476 на длительность вызванного ареколином (15 мг/кг) тремора у мышей ($M \pm m$)

	Контроль ареколин	РУ-476 0,5 мг/кг + ареколин	РУ-476 5,0 мг/кг + ареколин
Латентный период возникновения тремора (сек.)	66,3±13,9	60,5±5,23	87,5±10,5
Длительность тремора (сек.)	405,8±37,75	418,3±36,17	359,7±23,74

активности соединения РУ-476 (глава 3), возбуждение которых, в основном, и приводит к развитию данного феномена [Cuadra G.R., Molina V.A., 1989; Pranzetelli M.R. et al., 1989].

6.2.2. Воздействие соединения РУ-476 на ареколиновый тремор

В контрольной группе животных посредством известного стимулятора М холинорецепторов – ареколина у мышей отмечались гиперсаливация и тремор [Андреева Н., 2005]. Латентный период возникновения тремора в контрольной группе был около 1 минуты (табл. 6.4). Длительность тремора составляла более 6,5 минут.

Соединение РУ-476 в дозах 5,0 и 0,5 мг/кг не вызывало статистически значимых изменений латентного периода возникновения ареколинового тремора. Влияние на длительность тремора у мышей соединение РУ-476 не оказывало.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что соединение РУ-476 не способно изменять центральные М-холинергические эффекты ареколина.

6.2.3. Влияние соединения РУ-476 на никотиновый тремор

В ходе данного теста после введения никотина в дозе 2 мг/кг животным контрольной группы №1 (группа интактных животных, которым вводилась низкая доза никотина, приводившая к возникновению тремора, но еще не способная приводить к судорогам) наблюдалось развитие тремора, что связано с усилением нервно-мышечной передачи (табл. 6.5). Мышам из группы контроля №2 вводилась высокая доза Н-холиномиметика (минимальная доза никотина, приводившая к возникновению судорожных припадков у 100% животных), 4 мг/кг, что дополнительно приводило к

Таблица 6.5

Влияние соединения РУ-476 на выраженность тремора и судорог, вызванных никотином

	Контроль 1 никотин 2 мг/кг	Контроль 2 никотин 4 мг/кг	РУ-476 (0,5 мг/кг) + никотин 2 мг/кг	РУ-476 (5 мг/кг) + никотин 2 мг/кг	РУ-476 (0,5 мг/кг) + никотин 4 мг/кг	РУ-476 (5 мг/кг) + никотин 4 мг/кг
Количество животных у которых возник тремор (%)	100	100	100	100	100	100
Количество животных у которых возникли судороги (%)	0	100 [#]	0	0	100 [#]	100 [#]

Примечание:

– данные статистически значимы по отношению к контрольной группе №1 ($p \leq 0,05$, критерий Хи-квадрат)

возникновению судорог у всех животных в изучаемой группе [Андреева Н., 2005]. Для соединения РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг не наблюдалось усиление эффектов никотина в низкой дозе, ни у одного животного не возникало судорог. Также для соединения РУ-476 в исследуемых дозах не отмечено снижения эффектов никотина в дозе 4 мг/кг, характеризующегося в количестве животных, у которых фиксировались судорожные припадки.

Таким образом, соединение РУ-476 не приводило к изменению возникновения судорог у животных под воздействием Н-холинергического влияния никотина.

6.2.4. Влияние соединения РУ-476 на судорожный эффект пикротоксина

В ходе настоящего исследования пикротоксин в дозе 2,5 мг/кг опосредовал возникновение тремора и судорог [Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2005]. Так, латентный период возникновения тремора составил более 5 минут (табл. 6.6). Первый приступ клонических судорог (латентный период возникновения судорог) у животных в группе контроля в среднем возникал через 9,5 минут после введения пикротоксина. За период наблюдения в контрольной группе количество приступов судорог было более 5 повторений.

В группах с предварительно введённым соединением РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг отмечалось достоверное увеличение латентного периода возникновения как тремора, так приступа судорог. Так, в опытной группе с высокой дозой исследуемого вещества (5,0 мг/кг) время возникновения тремора превосходило более чем в 2 раза изучаемый показатель в группе контроля. У опытных животных также отмечалось сокращение количества судорожных припадков: у группы с предварительно введенным соединением РУ-476 в дозе 5,0 мг/кг в 3 раза, а в дозе 0,5 мг/кг практически в 3,5 раза.

Таблица 6.6

Влияние соединения РУ-476 на эффекты пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг ($M \pm m$)

	Контроль (пикротоксин)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + пикротоксин	РУ-476 (5,0 мг/кг) + пикротоксин
Латентное время возникновения тремора (сек)	324,0±39,17	468,7±28,02 [△] [©]	715,4±40,87 [△]
Латентное время возникновения судорог (сек)	585,3±29,08	815,5±51,09 [△]	788,0±48,93 [△]
Количество судорог (ед.)	5,2±0,83	1,5±0,34*	1,7±0,42*

Примечания:

[△] – данные статистически значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постробработкой критерием Ньюмана-Кеулса)

[©] – данные статистически значимы по отношению к группе с предварительно введенным РУ-476 в дозе 5,0 мг/кг ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постробработкой критерием Ньюмана-Кеулса)

* – данные статистически значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постробработкой критерием Данна)

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что соединение РУ-476 в изученных дозах обладает способностью снижать эффекты пикротоксина.

6.2.5. Действие соединения РУ-476 на стереотипное поведение, вызванное апоморфином

В результате полученных данных апоморфин приводил к возникновению стереотипного поведения у животных [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005]. Так, на 30 минуте после введения дофаминового агониста показатель составлял 3 бала, дальнейшее наблюдение показывало постепенное снижение эффектов апоморфина (табл. 6.7).

Таблица 6.7

Влияние соединения РУ-476 на вызванную апоморфином (0,1 мг/кг) стереотипию ($M \pm m$)

Мин.	Выраженность стереотипии, баллы		
	Контроль (апоморфин)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + апоморфин	РУ-476 (5,0 мг/кг) + апоморфин
30	3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00
60	0,8±0,17	1,0±0,00	1,5±0,34
90	0,3±0,21	0,2±0,17	1,0±0,00 ^{*Δ}
120	0,0±0,00	0,0±0,00	0,3±0,21

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

Δ - статистически значимо по отношению к РУ-476 (0,5 мг/кг) ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

Соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг не изменяло выраженность апоморфинового ответа у животных. В дозе 5,0 мг/кг соединение РУ-476 незначительно пролонгировало влияние апоморфина в используемом тесте.

Таким образом, по результатам эксперимента установлено, что для соединения РУ-476 в дозе 5,0 мг/кг отмечалось незначительное увеличение действия апоморфина.

6.2.6. Влияние соединения РУ-476 на каталептогенный эффект галоперидола

Галоперидол при внутрибрюшинном введении в контрольной группе животных приводил к возникновению каталепсии [Карпов В.Н., 1976; Маймете М.О. и соавт., 1985; Андреева Н.И., 2005].

Таблица 6.8

Влияние соединения РУ-476 на вызванную галоперидолом (3 мг/кг) каталепсию (M±m)

Мин.	Выраженность каталепсии, баллы		
	Контроль (галоперидол)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + галоперидол	РУ-476 (5,0 мг/кг) + галоперидол
15	3,0±0,00	2,8±0,17	2,8±0,17
30	3,0±0,00	2,8±0,17	3,0±0,00
45	3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00
60	3,0±0,00	2,8±0,17	2,7±0,21
120	2,2±0,54	2,7±0,21	2,8±0,17

Максимальный эффект отмечался уже на 15 минуте исследования и соответствовал максимальному баллу (табл. 6.8). Соединение РУ-476 в изучаемых дозах не оказывало влияния на выраженность каталептического эффекта галоперидола.

Таким образом, соединение РУ-476 не оказывало существенного влияния на дофаминергические эффекты галоперидола.

6.2.7. Действие соединения РУ-476 на эффекты L-ДОФА

По результатам проведенного исследования установлено, что L-ДОФА после введение в дозе 500 мг/кг (контроль 1) приводила к повышению двигательной активности мышей с элементами стереотипного поведения.

Таблица 6.9

Влияние соединения РУ-476 на эффекты L-ДОФА ($M \pm m$)

Мин.	Выраженность стереотипии, баллы			
	Контроль 1 (L-ДОФА 500 мг/кг)	Контроль 2 (L-ДОФА 100 мг/кг)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг	РУ-476 (5,0 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг
30	2,5±0,22	0,0±0,00*	0,3±0,21*	0,2±0,17*
60	2,2±0,17	0,0±0,00*	0,3±0,21*	0,2±0,17*
90	1,8±0,31	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*

Примечание:

* - статистически значимо по отношению к контролю 1 ($p \leq 0,05$, критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Даннета)

Максимальная выраженность эффекта была отмечена на 30 минуте после введения L-ДОФА (табл. 6.9), когда интенсивность стереотипии достигала 2,5 балла по 3-х балльной шкале. При введении L-ДОФА в дозе 100 мг/кг (контроль 2) эффектов, характерных для высоких доз, отмечено не было [Андреева Н.И., 2005]. Соединение РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг не потенцировало эффектов малых доз L-ДОФА.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение РУ-476 не обладает MAO-ингибирующим действием, основанном на потенцировании эффектов L-ДОФА.

6.2.8. Влияние соединения РУ-476 на гипотермический эффект резерпина

В ходе данного теста установлено, что в группе интактных животных показатель ректальной температуры не изменялся [Андреева Н.И., 2005]. У мышей из контрольной группы, которым вводили симпатолитик, отмечалось снижение температуры на 0,8 и 0,6 °С через 4 и 4,5 часа соответственно. Соединение РУ-476 в различных дозах не оказывало влияния на гипотермические эффекты резерпина (табл. 6.10).

Таким образом, для соединения РУ-476 не отмечено эффектов, связанных с изменением действия резерпина.

6.2.9. Влияние соединения РУ-476 на гипотермический эффект клофелина

По полученным результатам α_2 -адреномиметик – клофелин в контрольной группе уже на 30 минуте приводил к значительному снижению температуры по сравнению с группой интактного контроля [Андреева Н.И.,

Таблица 6.10

Влияние соединения РУ-476 на гипотермию, вызванную резерпином в дозе 2,5 мг/кг ($M \pm m$)

Время измерения	Ректальная температура, °С			
	Интактный контроль	Контроль (резерпин)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + резерпин	РУ-476 (5,0 мг/кг) + резерпин
0 (исход)	38,2±0,07	38,2±0,14	38,2±0,08	38,2±0,06
4 часа	38,2±0,05	37,4±0,11 ^{*Δ}	37,3±0,10 ^{*Δ}	37,4±0,09 ^{*Δ}
4,5 часа	38,2±0,04	37,6±0,10 ^{*Δ}	37,6±0,11 ^{*Δ}	37,8±0,09 ^{*Δ}

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к интактному контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Δ - статистически значимо по отношению к своему исходу ($p \leq 0,05$, парный t-тест)

Таблица 6.11

Влияние соединения РУ-476 на гипотермический эффект клофелина в дозе 0,1 мг/кг ($M \pm m$).

Мин.	Ректальная температура, °С			
	Интактный контроль	Контроль (клофелин)	РУ-476 (0,5 мг/кг) + клофелин	РУ-476 (5,0 мг/кг) + клофелин
0	38.2±0,11	38,2±0,20	38,1±0,12	38,4±0,25
30	38,3±0,11	36,3±0,14*	36,0±0,10*	36,5±0,17*
60	38,2±0,07	36,2±0,18*	36,1±0,13*	36,3±0,18*
90	38,1±0,10	36,4±0,13*	36,0±0,23*	36,4±0,31*
120	38,3±0,10	36,5±0,10*	36,1±0,16	36,9±0,25

Примечание:

* - статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Даннета)

2005]. Так, изучаемый показатель опускался на 1,9 °С. В опытных группах соединение РУ-476 существенного влияния на эффекты модулятора адренергической системы не оказывало (табл. 6.11).

По результатам теста можно сделать вывод, что изучаемое вещество в исследованных дозах не влияет на эффекты клофелина, что в совокупности с результатами резерпинового теста свидетельствует о слабом влиянии либо отсутствии взаимодействия с адренергической нейромедиаторной системой.

6.2.10. Действие соединения РУ-476 на стереотипное поведение, вызванное фенамином

Фенамин при внутрибрюшинном введении в контрольной группе животных приводил к возникновению беспокойства и стереотипного поведения [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005].

Таблица 6.12

Влияние соединения РУ-476 на стереотипию, вызванную фенамином в дозе 5,0 мг/кг ($M \pm m$).

	Латентный период возникновения беспокойства (мин)	Длительность беспокойства (мин)	Длительность стереотипии (мин)
Контроль (фенамин)	5,3±0,33	7,3±0,76	279,8±18,57
РУ-476 (0,5 мг/кг) + фенамин	6,0±0,26	6,2±0,40	803,±24,73*
РУ-476 (5,0 мг/кг) + фенамин	4,8±0,31	5,7±0,61	895,3±20,58*

Примечания:

* - $p < 0,05$ по отношению к длительности стереотипии контрольной группы, по однофакторному дисперсионному анализу с посттестом Ньюмана-Кеулса.

Так, латентный период развития беспокойства, как и длительность фиксируемого состояния у крыс, во всех исследуемых группах был равен. При изучении влияния соединения РУ-476 на продолжительность стереотипного поведения у животных отмечалось существенное увеличение продолжительности стереотипного поведения в 2,9 и 3,2 раза в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг соответственно.

Таким образом, по результатам эксперимента установлено, что для соединения РУ-476 отмечалось увеличение действия апоморфина.

6.3. Заключение

Результатом настоящего исследования стало определение способности исследуемого соединения РУ-476 изменять эффекты различных модуляторов основных нейромедиаторных систем организма. Была изучена способность соединения РУ-476 оказывать влияние на эффекты, опосредуемые иными типами серотониновых рецепторов (табл. 6.12).

На модели 5-гидрокситриптофанового гиперкинеза отмечалось снижение эффектов 5-ГТФ в опытных группах с соединением РУ-476.

В тестах, оценивающих способность влиять на эффекты, связанные с 5-НТ₃ и 5-НТ₄ типами серотониновых рецепторов, значимых результатов для соединения РУ-476 получено не было.

По результатам исследований, основанных на потенцировании эффектов ареколина и никотина, соединение РУ-476 не влияло на возникновение тремора и судорожных припадков, вызванных никотином, связанных с н-холиномиметическим действием никотина, и не взаимодействовало с модулятором центрального м-холинергического звена нейротрансмиссии – ареколином.

При изучении влияния соединения РУ-476 на дофаминергические соединения исследуемое соединение в дозе 5,0 мг/кг незначительно

Таблица 6.12

Влияние соединения РУ-476 на эффекты индукторов нейромедиаторных систем.

Тест	Наличие влияния на эффекты индуктора
Серотонинергическая система	
5 гидрокситриптофановый гиперкинез. Влияние на 5-HT ₂ -рецептор.	↓
Серотонин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки морской свинки. Влияние на 5-HT ₃ -рецептор.	0
Карбохолин индуцированного спазма изолированного отрезка пищевода крысы. Влияние на 5-HT ₄ -рецептор.	0
Холинергическая система	
Влияние на никотиновый тремор	0
Влияние на ареколиновый тремор	0
Дофаминергическая нейропередача	
Влияние на стереотипное поведение вызванное апоморфином	0
Влияние на каталептогенный эффект галоперидола	0
Влияние на стереотипное поведение вызванное фенамином	↑
MAO ингибирующее влияние	
Влияние на изменение двигательной активности и стереотипного поведения вызванные L-ДОФА	0

Таблица 6.12 (окончание)	
ГАМК ергическая система	
Влияние на судорожные эффекты пикротоксина	↓
Адренергическая система	
Влияние на гипотермический эффект резерпина	0
Влияние на гипотермический эффект клофелина	0

Примечания:

↑/↓ - усиление/ослабление эффекта индуктора

0 - отсутствие изменений в эффектах индуктора

продолговало эффекты апоморфина. В то же время соединение РУ-476 не влияло на эффекты галоперидола. Однако в тесте, изучающем влияние на фенаминовую стереотипию, соединение РУ-476 практически в 3 раза увеличивало продолжительность эффектов фенамина.

В экспериментах, основанных на изменении MAO-ингибирующего влияния L-ДОФА, было показано отсутствие влияния со стороны соединения РУ-476.

В тесте пикротоксин индуцированных тремора и судорог, основанных на взаимодействии указанного индуктора с ГАМК-рецептором, отмечено снижение эффектов пикротоксина в опытных группах. Соединение РУ-476 во всех изучаемых дозах как увеличивало время возникновения тремора и судорог, так и снижало количество судорожных припадков.

В тесте, позволяющем оценить взаимодействие изучаемого вещества на индукторы адренергической системы, соединение РУ-476 не приводило к изменению гипотермических эффектов резерпина и клофелина.

Таким образом, для соединения РУ-476 определена возможность изменять эффекты индуктора (табл. 12), преимущественно осуществляемые через 2 тип серотониновых рецепторов, снижать эффекты антагониста ГАМК-рецептора, а также пролонгировать эффекты фенамина.

ГЛАВА 7. Анальгетическая активность соединения РУ-476

Существенное значение придается серотонину в деятельности антиноцицептивной системы [Kesim M. et al., 2005; Вейн А.М. с соавт., 1997.]. Один из типов ноцицепторов представлен плотными немиелиновыми С - волокнами. Эти афферентные волокна реагируют как на механические, так и на температурные и химические раздражения. Они активируются химическими веществами, возникающими при повреждении тканей, являясь одновременно и хеморецепторами. С - волокна распределяются по всем тканям, за исключением центральной нервной системы, но присутствуют в периферических нервах. Так, передача тонической боли идет через палеоспинальный тракт с участием волокон типа С, нейромедиатором которых является вещество Р. Доказано, что блокировка серотонина приводит к подавлению синтеза этого нейромедиатора [Вейн А.М. с соавт., 1999]. Такой тип ноцицепторов также содержит кальцитонин - связанный пептид, а волокна из внутренних органов - вазоактивный интестинальный пептид [Xu W. et al., 2003; Корепанов В.И., 1998; Лебедева Р.Н. с соавт., 1998].

Особый интерес представляют эффекты, реализуемые через 2А подтип серотониновых рецепторов. Для известных на сегодняшний день для препаратов (кетансерин, ритансерин), проявляющих 5-НТ_{2А}-антагонистическую активность, были проведены исследования, доказывающие их эффективность на моделях точечного механического давления и термального воздействия [Rahman W. et al., 2011]. Для тианептина проявление анальгетического эффекта показано на модели с регистрацией висцеромоторного ответа методом электромиографии [Chae E. et al., 2012]. На ряде таких моделей как *in vivo*, так и *in vitro* показана эффективность таких соединений как кломипрамин [Kostadinov I.D. et al., 2012], 44R [Chae E. et al., 2012].

Таким образом особый интерес представляет изучение эффектов соединения РУ-476 на моделях гипералгезии основанных на периферическом механизме действия

7.1. Обезболивающий эффект соединения РУ-476 на модели адьювантного артрита

Воспаление, возникшее в задней лапке, после введённого адьюванта Фрейнда, приводило к выраженному падению порога болевой чувствительности. Для исследования на выбранной модели использовали препарат сравнения по эффекту диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг, доза была выбрана согласно литературным источникам [Hasani A.S. et al., 2011; Macedo-Junior S.J. et al., 2013]. В качестве препарата сравнения со схожим механизмом действия был выбран ципрогептадин, который, как и соединение РУ-476, исследовался в дозе $1 \cdot 10^{-6}$ Моль (0,35 мг/кг и 0,5 мг/кг, соответственно), что соответствовало рабочим дозам в ранее проводившихся исследованиях.

Так, у животных с гипералгезированными тканями в группе контроля, болевой порог при механическом надавливании снижался в сравнении с крысами интактного контроля в 2,6 раза (табл. 7.1).

Соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг, как и препарат сравнения по механизму действия ципрогептадин в дозе 0,6 мг/кг, увеличивали порог болевой чувствительности животных по сравнению с контрольной группой в 2,8 и 2,6 раза. Незначительно уступая диклофенаку натрия в способности снижать вызванную адьювантом Фрейнда гиперальгезию, повышавшего максимальную массу груза вызывающего отдергивание лапки 2,9 раза.

Таким образом, соединение РУ-476 проявляет анальгетическую активность на модели адьювантного артрита на уровне препаратов сравнения - диклофенака натрия и ципрогептадина.

Таблица 7.1

Влияние соединения РУ-476 (0,5 мг/кг), ципрогептадина (0,35 мг/кг) и диклофенака натрия (10 мг/кг) при внутрибрюшинном введении на величину болевого порога при механическом давлении в тесте адьювантной гипералгезии ($M \pm m$)

Группы	Максимальная масса, вызывающая отдергивание лапки (г)
Интактный контроль	187,2±16,38*
Контроль	72,8±7,24
Диклофенак натрия (10 мг/кг)	211,0±22,17*
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	189,7±27,80*
РУ-476 (0,5 мг/кг)	200,0±28,80*

Примечания:

* $p < 0,05$ - статистически значимо по отношению к контролю, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса.

7.2. Влияние соединения РУ-476 на формалиновую гипералгезию

По результатам проведенного исследования наблюдалось развитие воспалительной и как следствие болевой реакции после введения формалина, уровень гипералгезии отражался в количестве вздрагиваний поражённой конечности. В группе контроля изучаемый показатель составлял более 100 встряхиваний за первые 10 минут, а во второй фазе количество вздрагиваний постепенное снижалось (табл. 7.2).

В исследуемой дозе соединение РУ-476 на 45,9% повышало уровень болевой чувствительности животных в острой фазе, превосходя ципрогептадин более чем в 1,6 раза по количеству вздрагиваний лапкой, который не имел статистически достоверного влияния на эффекты формалина. Соединение РУ-476 уступало диклофенаку натрия, имевшего наиболее выраженный эффект в острой фазе: количество вздрагиваний снижалось на 58,5% в сравнении с группой контроля.

По полученным результатам во второй фазе соединение РУ-476 оказывало значимое влияние на частоту встряхиваний, снижая её на 62,4% относительно группы контроля. Соединение РУ-476 превосходило диклофенак натрия, который изменял частоту встряхиваний конечностью на -36,5% в условиях гипералгезии. Для ципрогептадина в изучаемой дозе сходных эффектов выявлено не было.

Таблица 7.2

Влияние соединения РУ-476 (0,5 мг/кг), ципрогептадина (0,35 мг/кг) и диклофенака натрия (10 мг/кг) при внутрибрюшинном введении на выраженность формалиновой гипералгезии ($M \pm m$)

	Количество вздрагиваний лапкой	
	Острая фаза (0-10 мин)	Фаза воспаления (11-60 мин)
контроль	107,3±7,65	370,0±24,78
Диклофенак натрия (10 мг/кг)	44,5±7,22* ^Δ	235,0±31,82*
Ципрагептадин (0,35 мг/кг)	93,1±8,74	313,0±39,27
РУ-476 (0,5 мг/кг)	58,1±8,73* ^Δ	139,0±28,87* ^Δ

Примечания:

* $p < 0,05$ - статистически значимо по отношению к контролю, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса.

^Δ $p < 0,05$ - статистически значимо по отношению к ципрогептадину, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что изучаемое соединение РУ-476 способно снижать вызванную формалином гиперальгезию, превосходя эффекты ципрогептадина в обеих фазах исследования. А во второй фазе даже несколько превосходить действие диклофенака натрия, что согласуется с результатами, полученными на модели адьювантного артрита, где соединение РУ-476 проявляло анальгетическую активность, что, учитывая особенности используемых моделей, скорее всего, связано с устранением эффектов серотонина как медиатора ноцицептивной реакции, особенно в условиях воспаления.

7.3. Заключение

По результатам проведенных тестов установлена возможность проявления соединением РУ-476 анальгетической активности. Так, на модели хронического воспаления, вызываемого адьюванта Фрейнда, экспериментальное соединение РУ-476 более чем в 2,5 раза увеличивало болевой порог животных, несколько превосходя эффекты ципрогептадина. На модели острого воспаления, вызванного формалином, соединение РУ-476 практически в 2 раза увеличивало уровень болевого порога животных как в острой фазе, так и в фазе воспаления, не уступая как традиционному нестероидному противовоспалительному средству, диклофенаку натрия, так и неселективному антагонисту 5-HT_{2A}-рецепторов – ципрогептадин.

ГЛАВА 8. Общие фармакологические свойства соединения РУ-476

Для полученного по результатам поиска соединения РУ-476 (см. главу 3), значимым является поиск его среднесмертельной дозы - LD_{50} , учитывая, что 5- HT_{2A} подтип серотониновых рецепторов очень широко задействован в регуляции процессов центральной нервной системы [Celada P. et al, 2013]. А также отмечая вовлеченность серотонина в физиологические и поведенческие процессы [Seitz P. K et al, 2012], считается важным изучить возможные неврологические эффекты соединения РУ-476 в дозе, оказывающей значимые специфические эффекты 0,5 мг/кг (см. главу 4) на различные виды активностей, отражающих неврологический статус.

8.1. Изучение острой токсичности вещества РУ-476

Изучение острой токсичности соединения РУ-476 осуществляли при однократном внутрибрюшинном введении мышам-самцам (глава 2).

Соединение РУ-476 исследовалось до дозы 200 мг/кг, в которой регистрировалась 100% летальность (Рис. 8.1). В дозе 100 мг/кг количество летальных исходов было в соотношении 2:1 (к количеству выживших животных). При введении мышам соединения РУ-476 в дозе 50 мг/кг наблюдалась 75% выживаемость. При этом картина гибели во всех изученных дозах была примерно, одинакова: после введения препарата отмечалась резкая седация, наблюдались клонико-тонические судороги и нарушения дыхания по типу дыхания Биота, после чего регистрировалась смерть животного.

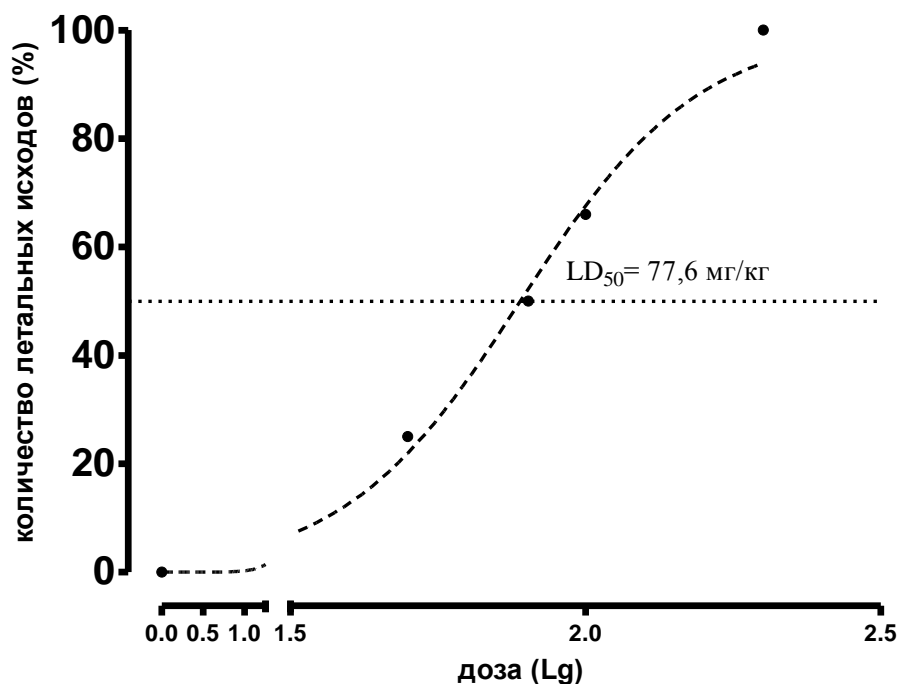


Рис. 8.1 Влияние соединения РУ-476 на смертность мышей-самцов при внутрибрюшинном введении.

Для соединения РУ-476 в случае введения сублетальных доз наблюдалась следующая картина интоксикации: снижение подвижности, боковое положение, урежение частоты дыхания животных, наблюдалось состояние, близкое к дремотному. В дозах выше 80 мг/кг дополнительно наблюдалось значительное снижение реакции на болевое раздражение, это состояние сохранялось от нескольких часов до суток. Многие из наблюдаемых симптомов указывают на угнетение центральной нервной системы [Березовская И.В., 2010].

На основании полученных результатов был рассчитан показатель LD_{50} , который для соединения РУ-476 составил 77,6 (68,6-87,9) мг/кг.

Ориентируясь на классификацию токсичности веществ [Березовская И.В., 2003], исследуемое соединение РУ-476 отнесли к группе умеренно токсичных соединений.

8.2. Изучение возможных нейротоксикологических эффектов соединения РУ-476

При проведении исследований, направленных на изучение возможных нейротоксикологических эффектов соединения РУ-476, был использован набор методик по S. Irwin [S. Irwin, 1964]. Во всех тестах животные были разделены на 3 группы (контрольную и 2 опытные). Для исследования соединения были выбраны дозы 5,0 и 0,5 мг/кг, которые оказывали выраженное специфическое действие (см. главу 4), а также эквивалентны средней терапевтической дозе известного 5-НТ_{2А} антагониста - кетансерина и средним дозам, используемым в экспериментальных исследованиях на животных [Давыдова С.М. с соавт., 2010; Кулинский В.И., Гаврилов С.С., 2006; Федин А.Н. с соавт, 2011; Федотова Ю.О., 2010]. В результате изучения исследования на эмоциональный статус установлено: в группе животных, получавших соединение РУ-476, изменения нервно-мышечного гипервозбуждения не наблюдалось на протяжении всего 3 часового периода наблюдения.

Также у мышей опытной группы отсутствовало отличие от контрольной группы по такому показателю как эмоциональное состояние. Соединение РУ-476 в дозах 5,0 и 0,5 мг/кг не вызывало агрессивного поведения и усиления чувства страха животного при прикосновении карнцанга. Случаев вокализации отмечено не было.

При изучении возможного действия соединения РУ-476 в дозах 5,0 и 0,5 мг/кг на состояние рефлексов у мышей, за весь период наблюдения статистически значимых изменений в реализации ипсилатерального, роговичного и слухового рефлексов не отмечалось (табл. 8.1).

По результатам проведенного исследования соединение РУ-476 в изучаемых дозировках не приводило к изменению положения тела и конечностей в пространстве, у животных не отмечалось изменения походки, а также каких либо нарушений, связанных с координацией в пространстве и расстройством равновесия. Двигательная активность в тесте, оценивающим

способность мышей удерживаться определенный период времени на вращающемся стержне, также не претерпела изменений в сравнении с контрольной группой. На моделях, оценивающих влияние на мышечную координацию, животные как контрольной, так и опытных групп справились с удержанием на сетке. Однако в тесте удержания на проволоке наблюдалось незначительное снижение мышечной координации в опытной группе: к концу периода наблюдения фиксировалась некоторая неспособность животных удерживаться на проволоке. Так, в опытной группе в дозе 0,5 мг/кг изучаемый показатель максимально снижался до $3,4 \pm 0,40$ балла (табл. 8.2). В более высокой концентрации отмечалось усиление действия соединения на изучаемый показатель, на 150 и 180 минутах изучаемый показатель снижался на 25%. При изучении реактивности, соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг значимых отличий в сравнении с контрольной группой обнаружено не было (табл. 8.3). Однако в опытной группе с более высокой концентрацией изучаемого соединения отмечалось увеличение периода принятия решения целенаправленного движения в 7 и 5,7 раза через 2 и 2,5 часа после начала эксперимента соответственно.

На следующем этапе было изучено действие соединения РУ-476 на функциональное состояние вегетативной нервной системы путем оценки изменения цвета кожи, наличия или отсутствием птоза, экзофтальма, динамики дыхательных движений, изменения порога ноцицепции.

После введения соединения РУ-476 во всех группах животных птоза и экзофтальма не наблюдалось. Также у крыс не наблюдалось изменения цвета кожных покровов. При изучении влияния соединения РУ-476 на болевую чувствительность отмечалось некоторое увеличение порога болевой чувствительности. Максимальный эффект составлял 40 $\Delta\%$ (рис. 8.4). При введении исследуемого соединения в дозе 0,5 мг/кг достоверного изменения частоты дыхания у мышей не наблюдалось, но в более высокой концентрации отмечалось снижение частоты дыхательных движений на 17 $\Delta\%$ в сравнении с

показателями контрольной группы, данный эффект фиксировался на 60 минуте периода наблюдения.

Изучение возможного влияния соединения РУ-476 на реакции, связанные с поведением животных, исследовались с использованием теста «открытое поле» [Воронина Т.А., 2005]. В используемой методике оценивались такие параметры как спонтанная двигательная активность, ориентировочно-исследовательское поведение, локомоторная активность (вертикальная, горизонтальная) и уровень эмоционального реагирования (выходы в центр поля, количество актов дефекации, груминг).

В результате проведенного исследования выявлена тенденция снижения горизонтальной двигательной активности, максимальный эффект для соединения РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг достигался на 120 минуте периода наблюдения, уступая группе контрольных животных в 4,7 раза, по исследуемому показателю (табл. 8.5). В группе животных с соединением РУ-476 в дозе 5,0 мг/кг наблюдалось снижение горизонтальной активности уже на 30 минуте наблюдения, изучаемый показатель в 5,6 раза уступал результатам мышей контрольной группы. При этом отмечалось незначительное изменение вертикальной двигательной активности в опытных группах, которая была несколько ниже, чем в группе контрольных животных, но статистически значимо не было. Критерий, оценивающий исследовательскую активность мышей в опытных группах, был несколько ниже на 30 минуте наблюдения. Оценивая влияние соединения РУ-476 на характер эмоционального реагирования крысы, отражающийся в груминге, количестве выходов в центр и количестве болюсов, было отмечено некоторое снижения тревожного поведения животного в дозе 0,5 мг/кг в сравнении с контрольной группой мышей. Это выражалось в увеличении выходов на освещенный центральный участок прибора, максимальный эффект составлял $2,3 \pm 1,32$. Также отмечалось некоторое снижение показателей груминга.

Таблица 8.2

Действие соединения РУ-476 (при однократном внутрибрюшинном введении) на мышечную координацию мышей (M±m)

	Время измерения, мин						
	Исход	30	60	90	120	150	180
Мышечная координация (удержание на проволоке), баллы							
Контроль (физ. р-р)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	3,8±0,20	3,6±0,25	3,4±0,40*
РУ-476 (5,0 мг/кг)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	3,8±0,25	3,3±0,48	3,0±0,58*	3,0±0,41*
Мышечная координация (удержание на сетке), баллы							
Контроль (физ. р-р)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00
РУ-476 (5,0 мг/кг)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони)

Таблица 8.3

Действие соединения РУ-476 (при однократном внутрибрюшинном введении) на двигательную координацию, реактивность мышей ($M \pm m$)

	Время измерения, мин						
	Исход	30	60	90	120	150	180
Реактивность, сек.							
Контроль (физ. р-р)	5,6±1,36	4,2±1,07	11,8±5,86	4,6±0,87	6,0±2,55	6,6±1,44	5,6±1,72
РУ-476 (0,5 мг/кг)	5,4±1,33	7,4±1,81	5,4±1,50	5,4±0,51	6,8±1,59	6,6±0,68	7,8±0,80
РУ-476 (5,0 мг/кг)	6,8±2,56	19,0±4,45	20,3±13,63	21,8±3,47	43,0±11,57*	37,5±13,22*	27,8±12,21
Время удержания на вращающемся стержне, сек.							
Контроль (физ. р-р)	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00
РУ-476 (5,0 мг/кг)	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00	<30,0±0,00

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони)

Таблица 8.4

Влияние соединения РУ-476 (при однократном внутрибрюшинном введении) на болевую чувствительность и частоту дыхания мышей ($M \pm m$)

	Время измерения, мин						
	Исход	30	60	90	120	150	180
Болевая чувствительность, сек							
Контроль (физ. р-р)	1,9±0,10	2,1±0,24	2,0±0,02	2,0±0,13	1,9±0,10	2,0±0,32	1,9±0,25
РУ-476 (0,5 мг/кг)	2,0±0,00	2,8±0,20	2,6±0,25	2,6±0,25	2,6±0,25	2,4±0,25	2,2±0,20
РУ-476 (5,0 мг/кг)	2,0±0,00	2,5±0,29	2,8±0,25	2,5±0,29	2,3±0,25	2,5±0,29	2,0±0,00
Частота дыхательных движений за 1 мин.							
Контроль (физ. р-р)	170,0±5,73	173,0±4,58	164,8±1,50	165,6±2,04	166,6±2,27	169,2±5,57	165,2±5,20
РУ-476 (0,5 мг/кг)	148,0±15,44	163,2±3,44	150,2±14,05	150,6±7,72	161,6±1,94	160,4±11,29	168,4±4,26
РУ-476 (5,0 мг/кг)	162,0±1,16	156,3±2,96	136,8±15,54*	144,5±10,91	148,5±10,47	154,0±8,08	156,5±5,91

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони)

Таблица 8.5

Влияние соединения РУ-476 (при однократном внутривенном введении) на поведенческую активность мышей в тесте «открытое поле» ($M \pm m$)

	Время измерения, мин						
	Исход	30	60	90	120	150	180
Горизонтальная двигательная активность							
Контроль (физ. р-р)	34,4±7,20	23,8±3,73	22,0±4,89	9,8±3,48	21,4±6,33	6,8±2,58	8,8±1,96
РУ-476 (0,5 мг/кг)	31,4±3,52	12,8±2,89	9,4±1,97	6,2±1,32	4,6±0,93*	6,6±1,08	4,4±1,93
РУ-476 (5,0 мг/кг)	36,3±12,31	4,3±1,46*	6,5±1,29	6,8±2,15	6,5±3,04	6,3±1,16	4,0±1,30
Вертикальная двигательная активность							
Контроль (физ. р-р)	5,8±2,85	2,2±1,74	2,2±2,20	0,8±0,37	0,4±0,25	0,2±0,20	0,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	3,2±1,16	0,6±0,40	0,4±0,40	1,2±0,97	0,6±0,60	0,4±0,25	0,2±0,20
РУ-476 (5,0 мг/кг)	0,8±0,48	0,0±0,00	0,8±0,48	0,3±0,25	0,3±0,25	0,8±0,75	0,0±0,00
Исследовательская активность (число заглядываний в отверстия)							
Контроль (физ. р-р)	2,0±0,71	3,0±0,63	1,4±0,87	0,2±0,20	1,8±0,86	0,4±0,25	0,4±0,25
РУ-476 (0,5 мг/кг)	1,8±0,49	0,6±0,40*	0,6±0,40	0,6±0,25	0,8±0,49	0,6±0,40	0,2±0,2
РУ-476 (5,0 мг/кг)	1,3±0,25	0,8±0,48	1,3±0,95	0,3±0,25	0,3±0,25	1,5±0,50	0,0±0,00

Таблица 8.5 (окончание)

Груминг							
Контроль (физ. р-р)	2,0±0,63	0,8±0,49	1,4±0,75	0,0±0,00	0,6±0,25	1,4±0,68	0,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	1,4±0,60	0,6±0,40	0,4±0,40	0,2±0,20	0,0±0,00	0,2±0,20	0,4±0,25
РУ-476 (5,0 мг/кг)	2,0±0,91	0,3±0,25	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,3±0,25	0,5±0,50
Количество выходов в центр							
Контроль (физ. р-р)	0,0±0,00	0,0±0,00	0,2±0,20	0,0±0,00	0,2±0,20	0,0±0,00	0,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	0,0±0,00	0,5±0,29	1,3±1,30	0,3±0,25	2,3±1,32*	0,0±0,00	0,0±0,00
РУ-476 (5,0 мг/кг)	0,0±0,00	0,0±0,00	0,5±0,50	0,0±0,00	0,8±0,48	0,0±0,00	0,0±0,00
Эмоциональность (число болюсов)							
Контроль (физ. р-р)	0,2±0,20	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
РУ-476 (0,5 мг/кг)	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
РУ-476 (5,0 мг/кг)	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00

Примечания:

* – статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони)

8.3. Заключение

Таким образом, соединение РУ-476 в дозах 5,0 и 0,5 мг/кг не влияет на функциональное состояние вегетативной нервной системы, рефлексов (ипсилатеральной, роговичной и слуховой). Также отсутствует выраженное влияние на эмоциональный статус (при эмпирическом наблюдении за мышами). При этом отмечается незначительное снижение двигательной активности с усилением эффекта в высокой дозе, а также увеличение порога болевой чувствительности и некоторое изменение психотропных эффектов, отражающихся повышением противотревожного действия.

ГЛАВА 9. Обсуждение результатов

5-НТ_{2A} подтип - первый из серотониновых рецепторов, который был обнаружен Гаддумом и Пицарелли [Peroutka S.J. et al, 1979], являющийся гликопротеином и представляющий собой последовательность из 471 аминокислоты. Состоит 2A подтип серотониновых рецепторов из семи трансмембранных доменов. Три петли направлены во внеклеточное пространство, а три – в сторону цитозоля. Третья внутриклеточная петля связана с G-белком. Согласно литературным данным, основным местом «заякоревания» лигандов является III трансмембранный домен [Shapiro D.A. et al., 2007; Roth B.L., 2011; Verumen L. C. et al., 2012]. В клинической практике препараты с 5-НТ_{2A} - блокирующей активностью применяются, в основном, при лечении эмоциональных и психотических расстройств (значительное количество 5-НТ_{2A} антагонистов относятся к группе атипичных антипсихотических средств), для коррекции сердечно – сосудистых заболеваний (артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, стенокардии, атеросклероза и др.), профилактике и лечении мигрени. При этом в отечественной клинической практике 2A серотонинергические средства представлены слабо. Так, единственным препаратом, показанным для профилактики мигрени в России является неселективный блокатор Н₁-5-НТ_{2A} рецепторов - ципрогептадин (перитол).

В связи с этим, на базе Волгоградского государственного медицинского университета в рамках проводимой научно-исследовательской работы «Поиск модуляторов рецепторных образований среди синтетических азолов» (№ государственной регистрации 01201177991), а также государственного задания «Направленный поиск противомигренозных средств – блокаторов серотониновых рецепторов 2A типа – среди гетероциклических азотсодержащих соединений» (№ государственной регистрации 01201264568), проводится поиск веществ, обладающих 5-НТ_{2A} -серотонинблокирующей активностью.

При выборе класса соединений для поиска новых 5-HT_{2A}-антагонистов руководствовались результатами ранее проведенных на базе Волгоградского государственного медицинского университета исследований по изучению серотониноблокирующих свойств производных бензимидазола (все соединения синтезированы в НИИ ФОХ при Южном федеральном университете), а также результатами метода прогнозирования антисеротониновой активности и 2D-QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) анализа *in silico*. Полученные данные позволяют предполагать высокую перспективность изучения производных N⁹-имидазо[1,2- α]бензимидазола на антисеротониновой активности.

Для исследования было выбрано 25 гетероциклических соединений, являющихся производными N⁹-имидазо[1,2- α]бензимидазола.

По результатам скринингового исследования изученные соединения проявили различный уровень 5-HT_{2A} антагонистической активности, из них не проявили активности 4 соединения, низкую активность продемонстрировали 4 соединения, для 12 соединений был характерен умеренный уровень активности, 5 соединений проявили высокий уровень антисеротониновой активности. В ходе исследования отмечалось изменение 5-HT_{2A} блокирующей активности соединения от его химической структуры и физико-химической характеристики. Так, наиболее активные соединения оказались в группе с диэтиламиноэтильным заместителем в N⁹ положении, изменение заместителя на радикал, содержащий циклический участок, приводило к снижению серотониноблокирующего действия. В C² положении наиболее активное соединение содержало метоксифенил. С помощью математического метода Фри-Уилсона можно утверждать, что диэтиламиноэтил и 4-метоксифенил вносят значимый вклад, увеличивающий антисеротониновую активность имидазобензимидазола на 15,2% и 52,7% соответственно. Иные радикалы у атома азота в 9 положении: согласно проведенному расчету не влияли на возрастание 5-HT₂-блокирующего действия исходного фрагмента имидазобензимидазола. Существенное влияние также оказывал 4-этоксифенил,

повышая 5-НТ_{2А} антагонистический эффект на 38,5%, остальные радикалы оказывали незначительное влияние на уровень серотонин блокирующей активности соединений.

На основании результатов анализа влияния физико-химических показателей на рецепторную активность соединений можно сделать вывод, что превалирующее значение имеют показатели заряда, нежели значения липофильности и молекулярной рефракции. Так, среди целого ряда изученных показателей, наиболее значимыми оказались средний и минимальный отрицательный заряды заместителей в положении N⁹, при этом зависимость в большинстве случаев была обратной.

По результатам скринингового исследования были выбраны соединения с наиболее высоким уровнем 5-НТ_{2А} антагонистического действия – РУ-30, РУ-204 и РУ-476. Указанные соединения изучались в широком диапазоне концентраций с последующим расчетом показателей IC₅₀ и LD₅₀. Соединение РУ-476 превосходило показатели IC₅₀ и LD₅₀ соединений РУ-30 и РУ-204. Показатель условного терапевтического индекса соединений РУ-30 и РУ-204 также уступал значению РУ-476 в 1,7 и 4,5 раза соответственно. В итоге, для дальнейшего углубленного фармакологического изучения было выбрано соединение РУ-476.

Следующим этапом стало изучение влияния соединения РУ-476 на нарушение мозгового кровообращения. Это связано, прежде всего, с участием 5-НТ_{2А} рецепторов в регуляции тонуса внутренней сонной и мозговых артериях и занимающего особое место в сосудистых эффектах серотонина. Вследствие этого при нарушении функционирования серотонинергической системы и, в частности, 2А подтипа может возникать значительное количество цереброваскулярных патологий. Так, после введения серотонина (20 мкг/кг) в системный кровоток наблюдалось резкое падение скорости, достигавшее своего максимального значения в течение первых 15-60 секунд. Затем наблюдалось восстановление с последующим кратковременным увеличением уровня скорости кровотока (данный процесс характеризуется как компенсаторная

реакция, реализуемая парасимпатическими эффектами серотонина). Описываемый процесс до момента полного восстановления к исходному уровню занимал 5-7 минут (рис. 9.1).

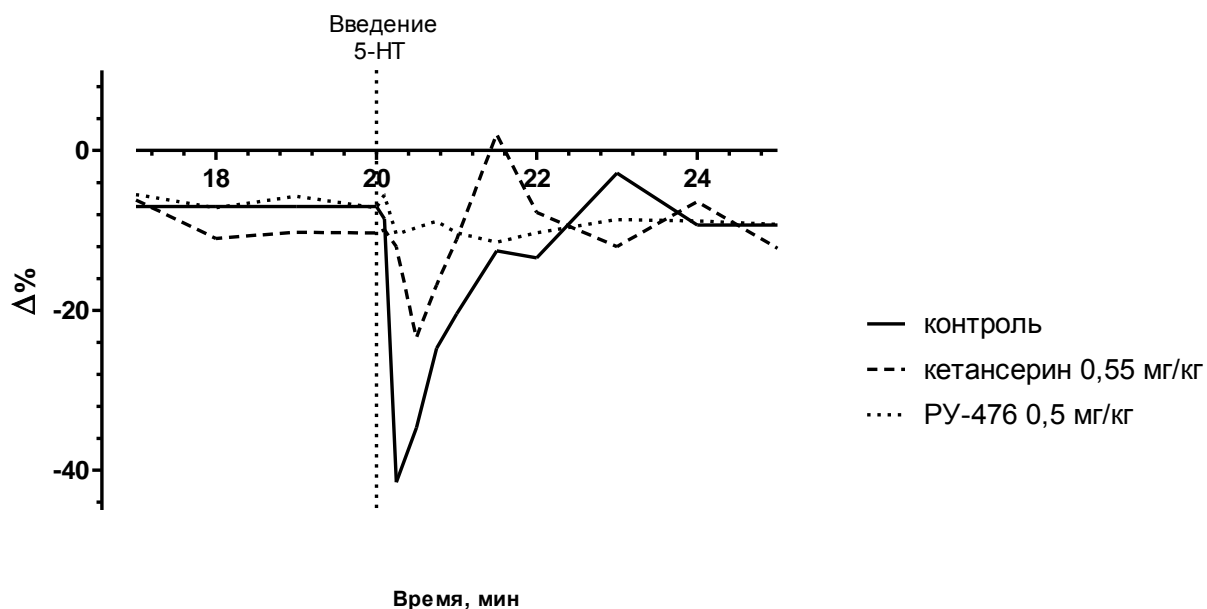


Рис. 9.1 Влияние кетансерина и соединения РУ-476 в эквимольных концентрациях на изменение скорости мозгового кровотока ($\Delta\%$), вызванного введением серотонина (20 мкг/кг).

В различных сосудах выраженность серотонинового спазма была неодинаковой, во внутренней сонной артерии максимальное снижение линейной скорости кровотока составляло $36,3 \pm 3,56\%$. При этом отмечалось, что при 3х кратной повторности изменения чувствительности тканей не наблюдалось, что соответствует существующим литературным данным [Мирзоян Р.С. и др., 2006]. Изменение скорости кровотока в бассейне мозговых артерий носило несколько более выраженный характер. Так, уровень максимального падения линейной скорости составил $40,3 \pm 4,39\%$ от исходного значения. Используемые 5-НТ_{2A}-антагонисты существенно снижали сосудистые эффекты серотонина. Средний уровень 5-НТ блокирующего действия ципрогептадина составил $21,3 \pm 4,52\%$ в сосудах внутренней сонной артерии и

18,0±1,19% в области средней мозговой артерии. Несколько эффективнее в сравнении с ципрогептадином себя проявил кетансерин: скорость кровотока в каротидной системе на фоне серотонина в среднем опускалась на 18,6±1,72%. Однако в мозговых сосудах этого отмечено не было. Соединение РУ-476 на модели серотонин индуцированного спазма внутренней сонной артерии практически в 4 раза снижало спазм, вызванный 5-гидрокситриптамимином (при первичном введении 5-НТ). Экспериментальное соединение эффективно уменьшало констрикторные эффекты 5-гидрокситриптамина на 79,8% в области средней мозговой артерии. В целом полученные результаты позволили сделать вывод, что соединение РУ-476 было более эффективным по способности снижать влияние серотонина на тонус систем каротидной и средней мозговой артерий.

Целесообразным также представлялось изучить влияние соединения РУ-476 на эффекты 5-гидрокситриптамина в условиях ишемического расстройства мозгового кровообращения, что связано с изменением чувствительности различных моноаминергических систем в условиях ишемического поражения мозга, где серотонинергическая система не теряет своей активности, в отличие от иных систем [Мирзоян Р.С. и др., 1999; Мирзоян Р.С. и др., 2006]. Это в частности связано со снижением уровня поступления крови в мозг, что характерно для пусковой фазы приступа мигрени [Миронов А.Н., 2012]. Также в результате эксперимента несколько возрастал ответ на серотонин, скорость мозгового кровотока снижалась на 47,8±5,79 Δ%. Действие соединения РУ-476 не претерпело существенного изменения в сравнении с результатами, полученными на неишемизированных животных. Так, вещество блокировало действие серотонина на 64,4%. Соединение РУ-476, как и кетансерин, превосходило ципрогептадин по влиянию на сосудистые эффекты 5-гидрокситриптамина в условиях ишемического расстройства мозгового кровообращения практически в 2 раза.

Известно, что основным типом рецепторов, который регулирует серотонин опосредованное падение системного артериального давления и

выраженной брадикардии, является 5-НТ₃ рецептор [Александрин В.В. с соавт., 2005]. Для 2А подтипа серотониновых рецепторов такой механизм остается до конца не изученным [Dempsey Y., 2008]. В проведенных исследованиях соединение РУ-476 и ципрогептадин не оказывали существенного влияния на гипотензивное действие 5-гидрокситриптамина, что, скорее всего, связано с отсутствием существенного влияния 5-НТ_{2А} подтипа на уровень артериального давления в сравнении с парасимпатическими механизмами [Горбунов А.А. с соавт., 2010]. Кетансерин на используемой модели приводил к снижению исходного уровня артериального давления, что обуславливалось наличием у препарата $\alpha_{1A/B}$ -адреноблокирующего действия [Zwieten P.A. et al., 1992]. При этом непосредственное влияние на гипотензивные эффекты серотонина кетансерин не оказывал.

Особое внимание обращает на себя влияние соединения РУ-476 и кетансерина на хронотропное действие серотонина. Полученные в результате экспериментальных исследований результаты для кетансерина, скорее всего, связаны с имеющейся у препарата аффинностью к некоторым подтипам 5-НТ₁-серотониновым рецепторам [Jeggo R.D. et al., 2007]. Так, по литературным данным, возникновение брадикардии опосредуется 5-НТ_{1А} рецептором. Сходным механизмом, вероятно, обладает и соединение РУ-476.

5-НТ_{2А} рецепторы локализируются на мембранах тромбоцитов, что обуславливает их участие в процессах активации и агрегации тромбоцитов [Moerland M. et al., 2011]. На модели серотонин-индуцированной активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеивания [Деркачев Э.Ф. и др., 1998] была показана способность соединения РУ-476 блокировать ранние этапы трансформации тромбоцитов. В результате изучения антиагрегантного действия для соединения РУ-476 была показана способность эффективно блокировать проагрегантное действие серотонина, не уступая кетансерину и даже превосходя ципрогептадин по уровню проявляемого эффекта. При изучении влияния 5-НТ_{2А}-антагонистов (кетансерина и ципрогептадина) на иные активаторы агрегации тромбоцитов, в частности коллагена и адреналина,

отмечалась способность блокировать активность индукторов, что подтверждается литературными данными [Nagatomo T. et al., 2004]. Соединение РУ-476 несколько превосходило препараты сравнения по уровню коллаген - и адреналин - блокирующей активности. В то же время для кетансерина и соединения РУ-476 была показана активность в тесте АДФ - индуцированной агрегации тромбоцитов, уступавшая при этом ацетилсалициловой кислоте практически в 2 раза.

При изучении антитромботической активности соединения РУ-476 было показано отсутствие влияния на неспецифические пути образования тромба. Это не исключает возможного антитромботического действия, в основе которого находится способность серотонина через 5-НТ₁₋₂ рецепторы осуществлять свои сосудистые и тромботические эффекты [Moerland M. et al., 2011].

Известно, что 5-НТ_{2A} рецепторы широко распространены в центральной нервной системе [Bombardi C., 2012; Stein D. J. et al., 2007], с их участием осуществляется значительное количество процессов. В связи с чем отмечается значительное количество связей серотонинергической системы с иными нейромедиаторными системами. Так, было показано влияние 5-НТ_{2A}-рецептора на ГАМК-опосредованную регуляцию поведенческих и вегетативных эффектов [Casarotto P.C. et al., 2010], в частности панического состояния [de Oliveira Sergio T. et al., 2011]. На примере галлюциногенных эффектов установлено двунаправленное взаимодействие с D₂ рецепторами [Borrito-Escuela D.O. et al., 2014]. В ряде случаев такое взаимодействие отмечается и в способностях лиганда. Так, блонансерин обладает сродством как 5-НТ_{2A}, так и к D₂ рецепторам, что используется для повышения эффективности в улучшении когнитивных нарушений при шизофрении. Блонансерин также является примером неселективного взаимодействия с серотониновыми рецепторами, так как для него характерно агонистическое действие и в отношении 1A типа 5-НТ рецепторов [Huang M. et al., 2014]. Для ципрогептадина характерно сродство к 1H-гистаминовым рецепторам [Hargrove V. et al., 2009], активность кетансерина

в отношении α -адренорецепторов [Wenting G.J. et al., 1987], метисергида - с различными подтипами рецепторов серотонина [Knight A.R. et al., 2004]. Таким образом, следующим этапом изучения эффектов соединения РУ-476 являлось определение центральных механизмов нейротропного действия. Исследование проводилось в отношении основных нейромедиаторных систем: холинергической, дофаминергической, адренергической, ГАМК-ергической, серотонинергической и МАО-ингибирующего влияния.

Соединение РУ-476 в тестах *in vivo* изучалось в 2 дозах – 0,5 мг/кг (основная доза, выбранная для исследования специфической активности) и 5,0 мг/кг. В результате проведенного исследования изучаемое соединение не влияло на эффекты никотина и ареколина (холинергическая система), резерпина и клофелина (адренергическая система), изменение двигательной активности и стереотипного поведения вызванные L-ДОФА (МАО-ингибирующее влияние).

При изучении влияния соединения РУ-476 на эффекты индукторов дофаминергической нейротрансмиссии для экспериментального соединения не отмечалось изменения каталептогенных эффектов галоперидола, механизм действия которого связан с блокадой дофаминовых рецепторов. В то же время соединение РУ-476 в дозе 5,0 мг/кг приводило к незначительному усилению действия апоморфина. Также отмечалась пролонгирование эффектов фенамина на центральную нервную систему.

На модели «пикротоксиновых судорог» было установлено, что исследуемое соединение как в низкой (0,5 мг/кг), так и в высокой (5,0 мг/кг) дозах снижало эффекты пикротоксина. Учитывая, что пикротоксин является антагонистом ГАМК - рецепторов, а также свидетельства об опосредованной регуляции 5-HT_{2A} рецептором ГАМК - ергической нейротрансмиссии, полученные результаты свидетельствуют о ГАМК - стимулирующем действии соединения РУ-476.

В сериях экспериментов *in vitro*, связанных с изучением влияния на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов, для соединения РУ-476 значимых

эффектов в отношении исследуемых типов рецепторов обнаружено не было. Так, исследуемое соединение в концентрации 1 мкМоль снижало серотонин – индуцированный спазм изолированной подвздошной кишки морской свинки на $-10,8 \pm 0,11 \Delta\%$, практически в 8 раз уступая препарату сравнения ондансетрону.

Дальнейшее изучение сертонинергических эффектов соединения РУ-476 проводилось в тесте *in vivo*. Так, по результатам проведенной серии опытов экспериментальное соединение достоверно снижало выраженность гиперкинеза, вызванного 5-гидрокситриптофаном уже на 20 минуте. Полученные данные дополняют более ранние результаты о 5-НТ_{2А} рецепторной активности соединения РУ-476 [Cuadra G.R., Molina V.A., 1989; Pranzatelli M.R. et al., 1989].

Известно, что серотонин способен участвовать в деятельности антиноцицептивной системы [Вейн А.М. с соавт., 1999; Вейн А.М. с соавт., 1997], а также является одним из медиаторов воспалительных процессов [Kato S., 2013; Nau F. Jr. et al., 2013]. Изменение уровня содержания серотонина может приводить к ослаблению анальгетического эффекта, понижению болевых порогов, большей частоте развития болевых синдромов [Сергеев П.В., 2003]. Отмечается участие и 5-НТ₂ - рецептора. Так, анальгетическое действие показано для селективных блокаторов 2А подтипа серотониновых рецепторов - ритансерина и кетансерина, его эффективность была изучена на моделях точечного механического давления и термального воздействия [Rahman W. et al., 2011]. Для кетансерина также экспериментально показана способность снижать воспалительные процессы, вызванные формалином и адьювантом Фрейнда, с сопутствующим возникновением анальгетического эффекта [Okamoto K. et al., 2005]. На модели висцеромоторного ответа методом электромиографии показано наличие анальгетического эффекта у тианептина, а на моделях *in vivo* и *in vitro* выявлена эффективность кломипрамин и 44R [Kostadinov I.D. et al., 2012; Chae E. et al., 2012].

В связи с этим особый интерес представляло изучение действия соединения РУ-476 на моделях хронического воспаления, индуцированного адьювантом Фрейнда, и острого воспаления, вызванного формалином. Так, в результате проведенной серии опытов исследуемое вещество заметно увеличивало уровень порога болевой чувствительности, не уступая, по уровню проявляемого эффекта, препаратам сравнения ципрогептадину и диклофенаку натрия. Полученные данные позволяют говорить о наличии анальгетической активности РУ-476 на моделях острого и хронического воспаления, что скорее всего связано с периферическим механизмом обезболивания.

В завершении исследования была проведена оценка влияния соединения РУ-476 в дозах, используемых для исследования общей и специфической активности (0,5 и 5,0 мг/кг) на выявление возможных нейротоксикологических эффектов. Отмечалось повышение противотревожного действия, что согласуется с результатами, полученными при непосредственном изучении анксиолитического действия соединения РУ-476, в высокой дозе незначительно снижалась двигательная активность мышей. Некоторое увеличение порога болевой чувствительности также соотносится с ранее полученными результатами в блоке изучения анальгетической активности вещества.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что производные N⁹-замещенные имидазо[1,2-α]бензимидазола проявляли 5-HT_{2A} антагонистическую активность различной степени выраженности. Наличие 4-метоксифенила у второго атома углерода гетероциклического ядра и диэтиламиноэтила в положении N⁹ обуславливало наличие наиболее выраженного серотонин блокирующего действия. Так, наибольший вклад в численном выражении составил -52,7% (4-метоксифенила). Из физико-химических свойств молекул наиболее значимым стали зарядовые показатели молекул, в частности, минимальный отрицательный и средний заряды заместителя у 9-ого атома азота.

Результатом проведенного поиска явилось определение 3 наиболее активных соединений (РУ-476, РУ-204 и РУ-30), из которых только соединение

РУ-476 превосходило кетансерина по уровню 5-НТ_{2А}-серотониноблокирующей активности, токсичности, ингибирующей активности и широте терапевтического действия, что обуславливало выбор соединения под лабораторным шифром РУ-476 для дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

При последующем изучении, для найденного соединения была изучена способность снижать серотонин индуцированный спазм сосудов каротидной системы и головного мозга как на интактных животных, так и в условиях ишемического поражения. В ходе исследования отмечена высокая эффективность соединения РУ-476, несколько превосходившая эффекты кетансерина и ципрогептадина. В дальнейшем были изучены антитромботические свойства соединения РУ-476, в которых показаны антиагрегантные эффекты исследуемого вещества. Комплекс моделей *in vivo* и *in vitro* позволил изучить поливариантность механизмов рецепторного взаимодействия. Также были изучены анальгетические и общие фармакологические свойства исследуемого соединения.

Полученные результаты позволяют считать целесообразным проведение дальнейшего поиска соединений с 5-НТ_{2А} - антагонистической активностью среди производных N⁹-замещённых имидазо[1,2-α]бензимидазола, а также рекомендовать для дальнейших расширенных доклинических фармакологических исследований соединение под лабораторным шифром РУ-476.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-НТ – 5-гидрокситриптамин, серотонин

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

L-ДОФА – *L*-3,4-диоксифенилаланин

МАО – моноаминооксидаза

ТМ – трансмембранный домен

ЦНС – центральная нервная система

DOB – 2,5 – Диметокси – бромомфетамин гидробромид

DOI – 2,5 – Диметокси – йодоамфетамин гидробромид

ВЫВОДЫ

1. Производные имидазо[1,2- α]бензимидазола содержащие в положении N⁹ диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный и морфолиноэтильный заместители проявляют 5-HT_{2A}-блокирующую активность различной степени выраженности.
2. Высокая 5-HT_{2A}-блокирующая активность в ряду N⁹-замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола определяется наличием 4 метоксифенильного заместителя в C² положении, а так же диэтиламиноэтильного заместителя в N⁹ положении. Выраженность эффекта исследуемого ряда соединений, так же коррелирует с зарядом заместителя в положении N⁹. Максимальная серотонинблокирующая активность в отношении 2A подтипа серотониновых рецепторов выявлена у соединения РУ-476 - 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил) имидазо [1,2- α] бензимидазола.
3. Соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг способно устранять эффекты серотонина на скорость кровотока на моделях "спазма мозговых сосудов, вызванные серотонином" у интактных крыс и животных с ишемией головного мозга, превосходя эффекты ципрогептадина в 2 раза и в равной степени с кетансеринном.
4. Вещество РУ-476 *in vitro* в концентрации 1 мкМ по способности снижать серотонин индуцированную агрегацию тромбоцитов равен кетансерину и превосходит ципрогептадин. Вещество РУ-476 и препараты сравнения кетансерин и ципрогептадин в равной степени подавляют адреналин-, коллаген- и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.
5. При изучении действия соединения РУ-476 на эффекты лигандов нейромедиаторных систем в тестах *in vitro* изучаемое вещество не демонстрировало активности в отношении 3 и 4 типов серотониновых

рецепторов. В тестах *in vivo*, исследуемое соединение уменьшало судорожные эффекты пикротоксина и пролонгировало стереотипию вызванную фенамином, а так же снижало уровень гиперкинеза вызванного 5-гидрокситриптофаном, но не влияло на эффекты никотина, ареколина, галоперидола, L-ДОФА, резерпина, клофелина и апоморфина.

6. Соединение РУ-476 в дозе 0,5 мг/кг на моделях хронического воспаления индуцированного адьювантом Фрейнда и острого воспаления вызванного формалином увеличивало уровень болевого порога животных, в равной степени с ципрогептадином и диклофенаком натрия.
7. Экспериментальное вещество под лабораторным шифром РУ-476 относится к классу умеренно токсичных соединений. Величина LD₅₀ для соединения РУ-476 составляла 77,6 (68,6-87,9) мг/кг.
8. При изучении нейротоксикологических свойств по S. Irwin соединение РУ-476 в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг не оказывало влияния на рефлексы и вегетативные эффекты. При этом отмечалось повышение порога болевой чувствительности, а так же увеличение груминга и количества выходов в центр в установке "открытое поле".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams J. W. Anti-thrombotic and vascular effects of AR246686, a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist / J. W. Adams, J. Ramirez, D. Ortuno, Y. Shi, W. Thomsen, J. G. Richman, M. Morgan, P. Dosa, B. R. Teegarden, H. Al-Shamma, D. P. Behan, D. T. Connolly // *European Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 586, Is. 1–3. – P. 234–243.
2. Aghajanian G. K. Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release / G. K. Aghajanian, G. J. Marek // *Brain Research*. – 1999. – Vol. 825, Iss. 1-2. – P. 161-171.
3. Alexander S.P.H. et al., 2010 Alexander, S.P.H. Guide to receptors and channels / S.P.H. Alexander, A. Methie, J.A Peters // *Br. J. Pharmacol.* - 2010. - № 141. - P. S36-S37.
4. Alhaider A.A. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: involvement of supraspinal 5-HT₂ receptors in nociceptive transmission / A.A. Alhaider // *Brain Res.* – 1991. – Vol.543(2). – P. 335-40.
5. Allen J.A. Insights into the regulation of 5-HT_{2A} serotonin receptors by scaffolding proteins and kinases / J. A. Allen, P. N. Yadav, B. L. Roth // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55(6). – P. 961-8.
6. Anushree Bhetnagar Caveolin-1 Interacts with 5-HT_{2A} Serotonin Receptors and Profoundly Modulates the Signaling of Selected Gq-coupled Protein Receptors / Anushree Bhetnagar, D. J. Sheffler, Wesley K. Kroeze, Beth Ann Compton-Toth, Bryan L. Roth. // *The journal of biological chemistry*. – 2004. - Vol. 279, №33. - P. 34614 –34623.
7. Arup K.G. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. Modeling dispersive and hydrophobic interactions / K.G. Arup, M.C. Gordon // *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* – 1987. – Vol. 27. – №21. – P. 21-35.

8. Barbe F. SL65.0472 blocks 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstriction in a dog hindlimb ischemia model / F. Barbe, E. Gautier, J.P. Bidouard, A. Grosset, S.E. O'Connor, P. Janiak // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 474(1). – P. 117-20.
9. Bell R. Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT₂/5-HT₃/5-HT₄ ligands / R. Bell, A. A. Duke, P. E. Gilmore, D. Page, L. Begue // *Scientific reports.* - 2014. - P.1-7.
10. Benekareddy M. Postnatal Serotonin Type 2 Receptor Blockade Prevents the Emergence of Anxiety Behavior, Dysregulated Stress-Induced Immediate Early Gene Responses, and Specific Transcriptional Changes that Arise Following Early Life Stress / M. Benekareddy, K. C. Vadodaria, A. R. Nair, V. A. Vaidy // *Biol. Psychiatry.* - 2011. - Vol.70. - P.1024 –1032.
11. Berger M. The expanded biology of serotonin / M. Berger, J.A. Gray, B.L. Roth // *Annu. Rev. Med.* – 2009. – Vol.60. – P.355-66.
12. Bersani G. 5-HT₂ antagonist ritanserin in neuroleptic-induced parkinsonism: a double-blind comparison with orphenadrine and placebo / G. Bersani, A. Grispini, S. Marini, A. Pasini, M. Valducci, N. Ciani // *Clin. Neuropharmacol.* – 1990. – Vol. 13(6). – P. 500-6.
13. Berumen L. C. Serotonin receptors in hippocampus / L.C. Berumen, A. Rodríguez, R. Miledi, G. García-Alcocer // *The Scientific World Journal* Volume. -2012. - P. 15.
14. Bombardi C. Neuronal localization of 5-HT_{2A} receptor immunoreactivity in the rat hippocampal region. / C. Bombardi // *Brain Research Bulletin.* – 2012. – Vol. 87, Iss. 2–3. – P. 259–273.
15. Born G.V. The effect of 5-hydroxytryptamine in a smooth muscle and in connective tissue / G.V. Born // *J. Physiol.* – 1962. – P. 160-74.
16. Borroto-Escuela D.O. Dopamine D₂ and 5-hydroxytryptamine 5-HT_(2A) receptors assemble into functionally interacting heteromers / D.O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, A.O. Tarakanov, D. Marcellino, F. Ciruela,

- L.F. Agneti, K. Fuxe // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. –Vol. 401(4). – P. 605-10.
17. Borsini F. Evidence that imipramine activates 5-HT_{1C} receptor function / F. Borsini, R. Cesana, A. Vidi, T. Mennini // *Eur J Pharmacol.* – 1991.- Vol. 203(3). – P.359-63. 1991 Jun;41(6):573-80.
18. Borsini F. Potential antidepressant activity and enhancement of serotonin uptake of a new dibenzothiadiazepine derivative / F. Borsini, G. Volterra, A. Lecci, S. Evangelista, A. Mancinelli, C. Cutrufo, M., T. Parlani Mennini, D. Barone, A. Meli // *Eur J Pharmacol.* – 1991.- Vol. 203(3). – P.359-63. 1991 Jun;41(6):573-80.
19. Bubar M. J. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. / M. J. Bubar, K. A. Cunningham // *Curr Top Med Chem.* – 2006. – Vol. 6(18). – P. 1971-85.
20. Canal C. E. The serotonin 2C receptor potently modulates the head-twitch response in mice induced by a phenethylamine hallucinogen / C.E. Canal, U.B. Olaghere da Silva, P.J. Gresch, E.E. Wett, E. Sanders-Bush, D.C. Airey // *Psychopharmacology.* – 2010. – Vol. 209(2). – P. 163-74.
21. Casarotto P.C. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA / P.C. Casarotto, V.C. de Bortoli, F.M. Corrêa, L.B. Resstel, H. Jr. Zangrossi // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* - 2010. - Vol. 3(5). - P.573-82.
22. Celada P. Serotonin modulation of cortical neurons and networks / P. Celada, M. V. Puig, F. Artigas // *Front Integr Neurosci.* - 2013. – Vol.7. - P. 25.
23. Celada P. The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression / P. Celada, M. V. Puig, M. Amargós-Bosch, A. Adell, F. Artigas // *J. Psychiatry Neurosci.* - 2004. – Vol.29(4). – P. 252–265.
24. Chae E. Analysis of incidental focal hypermetabolic uptake in the breast as detected by 18F-FDG PET/CT: clinical significance and differential diagnosis / E.Y. Chae, J.H. Cha, H.H. Kim, H.J. Shin, H.J. Kim, H.Y. Oh, Y.H. Koh, D.H. Moon // *Acta Radiol.* – 2012. - Vol.53(5). – P. 530-5.

25. Chang C. W. Towards a quantitative representation of the cell signaling mechanisms of hallucinogens: measurement and mathematical modeling of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor-mediated ERK1/2 activation / C.W. Chang, E. Poteet, J.A. Schetz, Z.H. Gümüş, H. Weinstein // *Neuropharmacology*. – 2009. – Suppl.1. – P.213-25.
26. Charnay Y. Brain serotonergic circuitries / Y. Charnay, L. Leger // *Dialogues Clin Neurosci*. – 2010. – Vol. 12(4). - P. 471–487.
27. Chen C. C. Premedication with mirtazapine reduces preoperative anxiety and postoperative nausea and vomiting / C.C. Chen, C.S. Lin, Y.P. Ko, Y.C. Hung, H.C. Lao, Y.W. Hsu // *Anesth Analg*. – 2008. – Vol. 106(1). – P.109-13.
28. Day M. Stimulation of 5-HT₂ Receptors in Prefrontal Pyramidal Neurons Inhibits Cav 1.2 L-Type Ca²⁺ Currents Via a PLC/IP₃/Calcineurin Signaling Cascade / M. Day, P. A. Olson, J. Pletzer, J. Striessnig, D. J. Surmeier // *J. Neurophysiol*. – 2002. - Vol. 87. – P.2490-2504.
29. De Oliveira Sergio T. Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA / S. T. de Oliveira, V.C. de Bortoli, H. Jr. Zangrossi // *Psychopharmacology (Berl)*.- 2011. -Vol. 4. - P. 725-32.
30. Dempsie Y. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system / Y. Dempsie, M.R. MacLean // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 155. – P. 455–462
31. Di Giovanni G. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence / G. Di Giovanni, V. Di Matteo, M. Pierucci, E. Esposito // *Prog. Brain Res*. – 2008. – Vol.172. – P. 45-71.
32. Diaz J. 5-Hydroxytryptamine Lowers Blood Pressure in Normotensive and Hypertensive Rats / J. Diaz, Wei Ni, J. Thompson, A. King, G. D. Fink, S. W. Watts // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2008. - Vol. 325, №3. – P. 1031-1038.

33. Dormandy J.A. The use of the selective serotonin S₂ receptor antagonist Ketanserin in the treatment of Raynaud's phenomenon / J.A. Dormandy, A. Berent, S.J. Downes // *Eur. J. Vasc. Surg.* – 1988. – Vol. 2(6). – P. 371-5.
34. Du W. M. Effects of long-term treatment with ketanserin on blood pressure variability and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats / W.M. Du, C.Y. Miao, J.G. Liu, F.M. Shen, X.Q. Yang, D.F. Su // *Cardiovasc. Pharmacol.* – 2003. – Vol.41(2). – P.233-9.
35. Dubuisson D. Pathophysiology of pain. In: *Principles and Practice of Pain Management* / D. Dubuisson - Washington, 1993. - P. 13-25.
36. Ferguson M.C. 5-HT_{2A} receptor antagonists improve motor impairments in the MPTP mouse model of Parkinson's disease / M.C. Ferguson, T. Nayyar, A.Y. Deutch, T.A. Ansah // *Neuropharmacology.* - 2010. – Vol.59(1-2). – P. 31.
37. Fiorica-Howells E. 5-HT_{2A} receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT_{2A} knockout mice / E. Fiorica-Howells, R. Hen, J. Gingrich, Z. Li, M. D. Gershon // *J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. – Vol.282. – P. G877–G893.
38. Fujiwara T. Augmented responses to 5-HT₂-receptor-mediated vasoconstrictions in atherosclerotic rabbit common carotid arteries / T. Fujiwara, S.J. Chiba // *Cardiovasc. Pharmacol.* – 1995. – Vol.26(3). – P. 503-10.
39. Fuller R.W. Regulation of enzymes that synthesize neurotransmitter monoamines / R.W. Fuller, M. Steinberg // *Adv. Enzyme Regul.* – 1976. – Vol.14. – P. 347-390.
40. Gamoh S. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases / S. Gamoh, H. Hisa, R. Yamamoto // *Biol. Pharm. Bull.* – 2013. – Vol. 36(9). – P. 1410.
41. Garlow S.J. Production and characterization of a specific 5-HT₂ receptor antibody / S.J. Garlow, D.A. Morilak, R.R. Dean, B.L. Roth // *Ciaranello RD Brain Res.* – 1993. – Vol.25. – P. 113-20.

42. Garlow S.J. Transcriptional control of the rat serotonin-2 receptor gene / Garlow, R.D. Ciaranello // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1995. – Vol. 31(1-2). – P. 201-9. S.J.
43. Glennon R.A. β -Oxygenated Analogues of the 5-HT_{2A} Serotonin Receptor Agonist 1-(4-Bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane / R. A. Glennon, M. L. Bondarev, N. Khorana, R. Young // *J. Med. Chem.* 2004. - Vol.47. – P.6034-6041.
44. Grover G. J. Protective effect of serotonin (5-HT₂) receptor antagonists in ischemic rat hearts / G.J. Grover, C.A. Sargent, S. Dzwonczyk, D.E. Normandin, M.J. Antonaccio // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1993.- Vol.22(4). – P. 664-72.
45. Guglielmi G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 1: Electrochemical basis, technique, and experimental results / G. Guglielmi et al. // *J. Neurosurg.* – 1991. – V.75. – P. 1-7.
46. Halberstadt A. L. Role of the 5-HT_{2A} receptor in the locomotor hyperactivity produced by phenylalkylamine hallucinogens in mice / A.L. Halberstadt, S.B. Powell, M.A. Geyer // *Neuropharmacology.* – 2013. – Vol.70. – P.218-27.
47. Hamada S. Localization of 5-HT_{2A} Receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken / Shun Hamada, Kouji Senzaki, Kayoko Hamaguchi-Hamada, Katsuhiko Tabuchi, Hideko Yamamoto, Toshifumi Yamamoto, Shingo Yoshikawa, Hideyuki Okano, Nobuo Okada // *Molecular Brain Research.* – 1998. – Vol. 54, Is. 2. – P. 199–211.
48. Hamon M. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments / M. Hamon, P. Blier. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* – 2013. - 19 April.
49. Hanley N.R. Mechanisms of ligand-induced desensitization 5-hydroxytryptamine(2A) receptor / N.R. Hanley, J.G. Hensler // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2002. - Vol. 300. - P. 468-477.

- 50.Hannon J. Molecular biology of 5-HT receptors / J. Hannon, D. Hoyer // *Behav. Brain Res.* – 2008. – Vol.195(1). – P. 198-213.
- 51.Hargrove V. A fatality due to cyproheptadine and citalopram / V. Hargrove, D.K. Molina // *J. Anal Toxicol.* – 2009. – Vol. 33(8). – P.564-7.
- 52.Harvey J. A. Role of the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor in Learning / J. A. Harvey // *Learn. Mem.* - 2003. – P. 355-362
- 53.Hasani A.S. Preemptive analgesic effect of diclofenac: experimental study in rats / A.S. Hasani, M. Soljakova, M.H. Jakupi, S.Z. Ustalar-Ozgen // *Middle East J. Anesthesiol.* – 2011.- Vol.21(3). – P.355-60.
- 54.Hearn J. K. Effects of 5-HT₂ receptor ligands on tail pinch-induced stress responding and open field behavior / J. K. Hearn // A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College In partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Arts In The Department of Psychology. – 2005. – P. 81.
- 55.Henderson J. Effect of ritanserin, a highly selective 5-HT₂ receptor antagonist, on Parkinson's disease / J. Henderson, C. Yiannikas, J.S. Graham // *Clin. Exp. Neurol.* – 1992. – Vol. 29. – P. 277-82.
- 56.Hiatt W. R. Randomized trial of AT-1015 for treatment of intermittent claudication. A novel 5-hydroxytryptamine antagonist with no evidence of efficacy / W.R. Hiatt, A.T. Hirsch, J.P. Cooke, J.W. Olin, D.C. Brater, M.A. Creager // *Vasc. Med.* – 2004. – Vol.9(1).- P.18-25.
- 57.Huang M. Comparative effect of lurasidone and blonanserin on cortical glutamate, dopamine, and acetylcholine efflux: role of relative serotonin (5-HT)_{2A} and DA D₂ antagonism and 5-HT_{1A} partial agonism / M. Huang, J.J. Panos, S. Kwon, Y. Oyamada, L. Rajagopal, H.Y. Meltzer // *J. Neurochem.* - 2014. - Vol.128(6). - P.938-49.
- 58.Huot P. Anatomically Selective Serotonergic Type 1A and Serotonergic Type 2A Therapies for Parkinson's Disease: An Approach to Reducing Dyskinesia without Exacerbating Parkinsonism / P. Huot, S. H. Fox, A. Newman-

- Tancredi, J. M. Brotchie. // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 2012. - Vol. 339, №1.
59. Iadarola M.J. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioural parameters and opioid receptor binding / M.J. Iadarola, L.S. Brady // Pain. – 1988. – № 35. – P. 313-326.
60. Irwin S. Determination of variability in drug response. / S. Irwin // Psychosomatics. – 1964. – Vol.5. – P. 174-179.
61. Jasović-Gasić M. Risperidon vs. Other antipsychotics in schizophrenia: the assessment of patients' attitudes / M. Jasović-Gasić, N. Marić // Psychiatr Danub. – 2004. – Vol.16(3). – P.127-31.
62. Jeggo R.D. Activation of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the rat nucleus tractus solitarius: opposing action on neurones that receive an excitatory vagal C-fibre afferent input / R.D. Jeggo, Y. Wang, D. Jordan, A.G. Ramage // Br. J. Pharmacol. - 2007. - Vol.150(8). - P.987-95.
63. Jiang X. Pharmacology of 5-HT₂ Modulation of Amygdala & Hypothalamus in Anxiety Disorders / X. Jiang, A. Chen, S. Smerin, L. Zhang, H. Li // Anxiety Disorders. - 2011. - P.39-50.
64. John A. Allen Insights into the regulation of 5-HT_{2A} serotonin receptors by scaffolding proteins and kinases / John A. Allen, Prem N. Yadav, Bryan L. Roth // Permissions & Reprints. Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, Is. 6. – P. 961–968.
65. Jonathan D. β -Arrestin-biased ligands and seven-transmembrane receptors / D. V. Jonathan, R. J. Lefkowitz // Trends in Pharmacological Sciences. – 2007. – Vol. 28, Is. 8. – P. 416–422.
66. Jordan D. Vagal control of the heart: central serotonergic (5-HT) mechanism / D. Jordan // Exp. Physiol. – 2004. – Vol.90(2). – P.175-181.
67. Karupiah Kanagarajadurai Molecular modeling and docking studies of human 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) receptor for the identification of hotspots for ligand binding / Karupiah Kanagarajadurai, Manoharan Malini, Aditi

- Bhattacharya, Mitradas M. Panickera, Ramanethan Sowdhamini // *Mol. BioSyst.* – 2009. – Vol.5. – P.1877-1888.
- 68.Kato S. Role of serotonin 5-HT₃ receptors in intestinal inflammation / S. Kato // *Biol. Pharm. Bull.* - 2013. - Vol.36(9). - P.1406-9.
- 69.Kesim M. J. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice / M. Kesim, E.N. Duman, M. Kadioglu, E. Yaris, N.I. Kalyoncu, N. Erciyes // *Pharmacol. Sci.* – 2005. – Vol.97(1). – P.61-6.
- 70.Kihara H. Antithrombotic activity of AT-1015, a potent 5-HT(2A) receptor antagonist, in rat arterial thrombosis model and its effect on bleeding time / H. Kihara, H. Koganei, K. Hirose, H. Yamamoto, R. Yoshimoto // *Eur. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol.433(2-3). P.157-62.
- 71.Kihara H. Inhibitory effects of a newly synthesized 5-HT₂ receptor antagonist, AT-1015 (N-[2-[4-(5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-ylidene)piperidino]-ethyl]-1-for myl-4-piperidinecarboxamide monohydrochloride monohydrate), on contraction and relaxation of pig coronary arteries induced by 5-HT and alpha-methylserotonin: comparison with ketanserin / H. Gong, M. Rashid, T. Nakamura, K. Hattori, M. Nakazawa, H. Kihara, R. Yoshimoto, T. Nagatomo // *Biol Pharm Bull.* – 2000. – Vol.23(9). – P.1105-7.
- 72.Kihara H. J. AT-1015, a novel serotonin (5-HT)₂ receptor antagonist, blocks vascular and platelet 5-HT_{2A} receptors and prevents the laurate-induced peripheral vascular lesion in rats / H. Kihara, K. Hirose, H. Koganei, N. Sasaki, H. Yamamoto, A. Kimura, T. Nishimori, M. Shoji, R. Yoshimoto // *Cardiovasc. Pharmacol.* – 2000. – Vol.35(4). – P.523-30.
- 73.Kilbinger H. Effects of 5-HT₄ receptor stimulation on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric plexus / H. Kilbinger // *Arch. Pharmacol.* – 1992. – Vol.345(3). – P.270-5.
- 74.Kitson S.L. 5-Hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands. / S.L. Kitson // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – №13(25). – P. 2621–2637.

75. Klimuiuk P.S. Ketanserin: an effective treatment regimen for digital ischaemia in systemic sclerosis / Klimiuk P.S., Kay E.A., Mitchell W.S., Taylor L., Gush R., Gould S., Jayson M.I. // *Scand. J. Rheumatol.* - 1989. –Vol.18(2). – P.107-11.
76. Knight A.R. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors / A.R. Knight, A. Misra, K. Quirk, K. Benwell, D. Revell, G. Kennett, M. Bickerdike // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2004. – Vol.370(2). – P.114-23.
77. Kostadinov I.D. Antinociceptive effect of clomipramine through interaction with serotonin 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes / I.D. Kostadinov, D.P. , I.I. Kostadinova // *Folia Med (Plovdiv).* - 2012. -Vol. 54(4). - P.69-77.
78. Kristiansen K. A Highly Conserved Aspartic Acid (Asp-155) Anchors the Terminal Amine Moiety of Tryptamines and Is Involved in Membrane Targeting of the 5-HT_{2A} Serotonin Receptor But Does Not Participate in Activation via a “Salt-Bridge Disruption” Mechanism / K. Kristiansen, W. K. Kroeze1, D. L. Willins, E. I. Gelber1, J. E. Savage, R. A. Glennon, B. L. Roth // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* – 2000. - Vol. 293, №3. - P. 735-46.
79. Krupali G. 5-HT_{2A} Receptor: A Newer Target for Obesity / Krupali G. Mistry, Priyanshee V. Gohil // *International Journal of PharmTech Research.* – 2011. - Vol.3, №4. – P. 2089-92.
80. Krupali G. Mistry 5-HT_{2A} Receptor: A Newer Target for Obesity / Krupali G. Mistry, Priyanshee V. Gohil // *International Journal of PharmTech Research.* - 2011Ю - Vol.3, №4, P. 2089-2095.
81. Lairez O. Role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the development of cardiac hypertrophy in response to aortic constriction in mice / O. Lairez, T. Cognet, S. Schaak, D. Calise, C. Guilbeau-Frugier, A. Parini, J. Mialet-Perez // *Journal of Neural Transmission.* - 2013. - Vol. 120 (6). - P. 927-35.
82. Macedo-Junior S.J. Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K⁺ channels, and voltage-gated Ca²⁺ channels in the antinociceptive effect of inosine / S.J.

- Macedo-Junior, F.P. Nascimento, M. Luiz-Cerutti, A.R. Santos // *Purinergic Signal.* – 2013. – Vol.9(1). – P. 51-8.
83. Marasini B. Ketanserin treatment and serotonin in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon / B. Marasini, M.L. Biondi, E. Bianchi, P. Dell'Orto, A. Agostoni // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 1988. – Vol.35(4). – P. 419-21.
84. Mareka G. J. A major role for thalamocortical afferents in serotonergic hallucinogen receptor function in the rat neocortex / G. J. Mareka, R. A. Wright, J. C. Gewirtz, D. D. Schoepp // *Neuroscience.* – 2001. - Vol. 105, Is. 2. – P. 379-392.
85. Massé F. Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonists) in the four-plate test / F. Massé, M. Hascoët, E. Dailly, M. Bourin // *Psychopharmacology.* - 2006.- Vol. 183, Is. 4. - P. 471-481.
86. Masson J. Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects / J. Masson, M. B. Emerit, M. Hamon, M. Darmon // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling.* – 2012. – Vol. 1, Is. 6. – P. 685–713.
87. McFarland K. Pimavanserin, a 5-HT_{2A} inverse agonist, reverses psychosis-like behaviors in a rodent model of Parkinson's disease / K. McFarland, D.L. Price, D.W. Bonhaus // *Behav. Pharmacol.* – 2011. – Vol.22(7). - P.681-92.
88. Miyazaki M. J. Sarpogrelete hydrochloride, a selective 5-HT_{2A} antagonist, improves vascular function in patients with peripheral arterial disease / M. Miyazaki, Y. Higashi, C. Goto, K. Chayama, M. Yoshizumi, H. Sanada, K. Orihashi, T. Sueda // *Cardiovasc. Pharmacol.* – 2007. – Vol.49(4). – P.221-7.
89. Miyata K. J. Role of the serotonin₃ receptor in stress-induced defecation / K. Miyata, T. Kamato, A. Nishida, H. Ito, H. Yuki, M. Yamano, R. Tsutsumi, Y. Katsuyama, K. Honda // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 1992. – Vol.261(1). – P.297-303.
90. Moerland M. Modulation of Vasoactivity and Platelet Aggregation by Selective 5-HT Receptor Antagonism in Humans / M. Moerland, M. Kemme

- A. Dijkmans, L. Bergougnan, J. Burggraaf // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2011. – Vol. 58 – Is. 6. – P. 575–580.
91. Moss N. A new class of 5-HT_{2B} antagonists possesses favorable potency, selectivity, and rat pharmacokinetic properties / N. Moss, Y. Choi, D. Cogan, A. Flegg, A. Kahrs, P. Loke, O. Meyn, R. Nagaraja, S. Napier, A. Parker, T. J. Peterson, P. Ramsden, C. Sarko, D. Skow, J. Tomlinson, H. Tye, M. Whitaker // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol.19(8). – P.2206-10.
92. Muchimapura S. Effect of isolation rearing on pre- and post-synaptic serotonergic function in the rat dorsal hippocampus / S. Muchimapura, R. Mason, C. A. Marsden // *Synapse*. – 2003. - Vol. 47, №3, P. 209–217.
93. Nagakura Y. The selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄-receptor agonist RS67506 enhances lower intestinal propulsion in mice / Y. Nagakura, H. Ito, T. Kiso, Y. Naitoh, K. Miyata // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol.74(2). – P.209-12.
94. Nagatomo T. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system / T. Nagatomo, M. Rashid, H. Abul Muntasir, T. Komiyama // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol.104(1). – P.59-81.
95. Nau F. Jr. Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo / F. Jr. Nau, B. Yu, D. Martin, C.D. Nichols // *PLoS One*.- 2013. - Vol.8(10). - P.e75426.
96. Nishihira K. J. Inhibition of 5-hydroxytryptamine receptor prevents occlusive thrombus formation on neointima of the rabbit femoral artery / K. Nishihira, A. Yamashita, N. Tanaka, R. Kawamoto, T. Imamura, R. Yamamoto, T. Eto, Y. Asada // *Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol.4(1). – P.247-55.
97. Norman M.H. Structure-activity relationships of a series of substituted benzamides: potent D₂/5-HT₂ antagonists and 5-HT_{1a} agonists as neuroleptic agents / M.H. Norman, G.C. Rigdon, W.R. Hall, F. Navas // *J. Med. Chem.* – 1996. – Vol.39(5). – P.1172-88.
98. Ogawa T. Effects of R-102444 and its active metabolite R-96544, selective 5-HT_{2A} receptor antagonists, on experimental acute and chronic pancreatitis:

- Additional evidence for possible involvement of 5-HT_{2A} receptors in the development of experimental pancreatitis / T. Ogawa, A. Sugidachi, N. Tanaka, K. Fujimoto J. , Fukushige, Y. Tani, F. Asai // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol.521(1-3). – P.156-63.
99. Ogawa T. Effects of R-102444, an orally active 5-HT_{2A} receptor antagonist, in rat models of peripheral vascular disease / T. Ogawa, A. Sugidachi, N. Tanaka, K. Fujimoto, F. Asai // *Vascul. Pharmacol.* – 2004. – Vol.41(1). – P.7-13.
100. Okamoto K. The role of peripheral 5HT_{2A} and 5HT_{1A} receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation / K. Okamoto, H. Imbe, A. Tashiro, A. Kimura, T. Donishi, Y. Tamai, E. Senba // *Neuroscience.* - 2005. - Vol.130(2). - P.465-74.
101. Onaivi E.S. Behavioral effects of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, (DOI) in the elevated plus-maze test / E.S. Onaivi, C. Bishop-Robinson, N.A. Darmani, E. Sanders-Bush // *Life Sci.* – 1995. - Vol.57(26). – P. 2455-66.
102. Onaivi E.S. Behavioral effects of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, (DOI) in the elevated plus-maze test / E.S. Onaivi, C. Bishop-Robinson, N.A. Darmani, E. Sanders-Bush // *Life Sci.* – 1995. - Vol.57(26). – P. 2455-66.
103. Pais D.J. / D.J. Pais, M. Weinbern, A. Corvelli // *J. Pharmacology Expel. Ther.* – 1968. – P.134-164.
104. Peroutka S. Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions / S.J. Peroutka, R.M. Lebovitz, S.H. Snyder // *Science.* – 1981. – Vol.212(4496). – P.827-9.
105. Peroutka S.J. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxy tryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol / S. J. Peroutka, S. H. Snyder // *Molecular Pharmacology.* -1979. - Vol. 16, №3. - P. 687–699.

106. Polter A.M. Glycogen synthase kinase-3 is an intermediate modulator of serotonin neurotransmission / A. M. Polter, X. Li // *Front. Mol. Neurosci.* – 2011. - 24 October.
107. Pranzetelli M.R. Brainstem serotonergic hyperinnervation modifies behavioral supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in the rat / M.R. Pranzetelli, Y.Y. Huang, A.M. Dollison, M. Stanley // *Brain. Res. Dev. Brain Res.* – 1989. – Vol.50(1). – P.89-99.
108. Puig M.V. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits / M.V. Puig // *Mol. Neurobiol.* – 2011. – Vol.44(3). – P.449-64.
109. Quesseveur G. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression / G. Quesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier, B.P. Guiard // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* - 2012. - Vol.21(11). - P.1701-25.
110. Radhakrishnan R. Spinal 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors mediate low, but not high, frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats / R. Radhakrishnan, E.W. King, J.K. Dickman, C.A. Herold, N.F. Johnston, M.L. Spurgin, K.A. Sluka // *Pain.*- 2003. - Vol.105(1-2). - P.205-13.
111. Rahman W. A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat / W. Rahman, K. Bannister, L.A. Bee, A.H. Dickenson // *Brain. Res.* – 2011. – Vol.1382. – P. 29-36.
112. Raja M. J. Delayed loss of efficacy and depressogenic action of antidepressants / M. J. Raja // *Clin. Psychopharmacol.* – 2009. – Vol.29(6). – P.612-4.
113. Ramadan N. M. Migraine prophylactic drugs: proof of efficacy, utilization and cost / N.M. Ramadan, L.L. Schultz, S.J. Gilkey // *Cephalalgia.* – 1997. – Vol.17(2). – P.73-80.
114. Ramage A.G. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation / A.G. Ramage // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2008. – Vol.29(9). – P.472-81.

115. Rang H. P. Other peripheral mediators: 5-hydroxytryptamine and purines / H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter // Edinburgh In: Pharmacology, 4th edition., UK: Harcourt Publishers Ltd. – 2001. – P.164–176.
116. Rashid M. Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modeling / M. Rashid, P. Manivet, H. Nishio, J. Pratuangdejkul, M. Rajab, M. Ishiguro, J.M. Launay, T. Nagatomo // Life Sci. – 2003. – Vol.73(2). – P.193-207.
117. Reeves J. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus / J. Reeves // Br. J. Pharmacol. – 1991. – Vol.103(1). P.1067-72.
118. Roth B. L. 5-HT(2A) serotonin receptor biology: interacting proteins, kinases and paradoxical regulation / B. L. Roth // Neuropharmacology. – 2011. – Vol. 61(3).- P. 348-54.
119. Rothman R.B. Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications / R.B. Rothman, M.H. Baumann, J.E. Savage, L. Rauser, A. McBride, S.J. Hufeisen, B.L. Roth // Circulation. – 2000. – Vol.102(23). – P. 2836-41.
120. Rybaczyk L. A. An overlooked connection: serotonergic mediation of estrogen-related physiology and pathology / L. A. Rybaczyk, M. J. Bashaw, D. R. Pathak, S. M. Moody, R. M. Gilders, D. L. Holzschu // BMC Women's Health. – 2005. –P.5:12.
121. Schmid C. L. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on β -arrestin-2 interactions in vivo / C. L. Schmid, K. M. Raehal, L. M. Bohn // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2008. – Vol. 105(3). – P.1079–1084.
122. Schmid C. L. Serotonin, but not N-methyltryptamines, activates the serotonin 2A receptor via a β -arrestin2/Src/Akt signaling complex in vivo / Schmid C.L., L.M. Bohn // J. Neurosci. – 2010. – Vol. 30(40). – P.13513-24.

123. Schmid C. L. Serotonin, but not N-methyltryptamines, activates the serotonin 2A receptor via a ss-arrestin2/Src/Akt signaling complex in vivo / C. L. Schmid, L. M. Bohn // *J. Neurosci.* - 2010. - Vol. 30. - P.13513–13524
124. Seitz P. K. Quantitative changes in intracellular calcium and extracellular-regulated kinase activation measured in parallel in CHO cells stably expressing serotonin (5-HT) 5-HT 2A or 5-HT 2C receptors / P. K Seitz , N. M Bremer , A. G McGinnis , K. A Cunningham, C. S Watson // *BMC Neuroscience.* - 2012. - 13:25.
125. Shan J. Ligand-Dependent Conformations and Dynamics of the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Determine Its Activation and Membrane-Driven Oligomerization Properties / J. Shan, G. Khelashvili, S. Mondal, E. L. Mehler, H. Weinstein // *PLoS Computational Biology.* – 2012. – Vol. 8., Is.4.
126. Shapiro D. A. Differential Modes of Agonist Binding to 5-Hydroxytryptamine_{2A} Serotonin Receptors Revealed by Mutation and Molecular Modeling of Conserved Residues in Transmembrane Region / D. A. Shapiro, K. Kristiansen, W. K. Kroeze, B. L. Roth // *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* - 2000. - Vol. 58, № 5.- P. 877-86.
127. Smith J. The in vitro pharmacological profile of TD-5108, a selective 5-HT₄ receptor agonist with high intrinsic activity / J.A. Smith, D.T. Beattie, D. Marquess, J.P. Shaw, R.G. Vickery, P.P. Humphrey // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* - 2008. - Vol.378(1). - P. 125-37.
128. Sparatore F. 2-Amino phenylhydrazine derivatives in the synthesis of heterocyclic compounds of pharmacological interest / F. Sparatore, A. Boido //
129. Stam N.J. Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor genes / N.J. Stam, F. Van Huizen, C. Van Alebeek, J. Brands, R. Dijkema, J.A. Tonnaer, W. Olijve // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol.227(2). - P.153-62.

130. Stein D. J. 5-HT_{2A}: Its Role in Frontally Mediated Executive Function and Related Psychopathology / D. J. Stein, S. Hemmings, H. Moolman-Smook, K. Audenaert // *CNS Spectr.* - 2007. - Vol.12(7). - P.512-516.
131. Sukalović V. Synthesis, dopamine D₂ receptor binding studies and docking analysis of 5-[3-(4-arylpiperazin-1-yl)propyl]-1H-benzimidazole, 5-[2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethoxy]-1H-benzimidazole and their analogs / V. Sukalović, D. Andrić, G. Roglić, S. Kostić-Rajčić, A. Schrattenholz, V. Soskić // *Eur. J. Med. Chem.* - 2005. - Vol.40(5). - P.481-93.
132. Tomić M. Pharmacological evaluation of 5-[2-[4-(2-methoxy-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethyl]-1,3-dihydro-benzimidazole-2-thione as a potential atypical antipsychotic agent / M. Tomić, M. Kundaković, B. Butorović, V. Vasilev, D. Dragović, G. Roglić, D.J. Ignjatović, V. Soskić, S. Kostić-Rajčić // *Pharmazie.* - 2003. - Vol.58(9). - P.677-8.
133. Tomic M. Pharmacological evaluation of halogenated and non-halogenated arylpiperazin-1-yl-ethyl-benzimidazoles as D(2) and 5-HT(2A) receptor ligands / M. Tomić, D. Vasković, G. Tovilović, D. Andrić, J. Penjišević, S. Kostić-Rajčić // *Arch. Pharm. (Weinheim).* - 2011. - Vol.344(5). - P.287-91.
134. Van Nueten J.M. Cardiovascular pharmacology of ketanserin / J.M. Van Nueten, P.M. Vanhoutte // *Bibl. Cardiol.* -1984, vol. 38. – P. 222-223.
135. Vellarkad, N. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics / N. Vellarkad, A.K. Viswanadhan [et al.] // *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* – 1989. – Vol. 29. – P. 163-172.
136. Weinstein H. Hallucinogen Actions on 5-HT Receptors Reveal Distinct Mechanisms of Activation and Signaling by G Protein-coupled Receptors / H.Weinstein // *The AAPS Journal.* - 2006. - Vol.7(4). - P.85.

137. Wenting G.J. Mechanism of action of ketanserin in hypertension and vasospastic disease / G.J. Wenting, R.M. Brouwer, A.J. Meiracker, A.J. Veld, M.A. Schalekamp // *Acta Cardiol.* - 1987. - Vol.42(5). - P.339-54.
138. Wiernsperger N.F., Serotonin, 5-HT₂ receptors, and their blockade by naftidrofuryl: a targeted therapy of vascular diseases./ N.F. Wiernsperger // *J. of Cardiovasc. Pharmacol.* — 1994. — V. 23.— Suppl. 3.— P. 37—43
139. Xu W. Antinociceptive effect of calcitonin gene-related peptide in the central nucleus of amygdala: activating opioid receptors through amygdala-periaqueductal gray pathway / W. Xu, T. Lundeberg, Y.T. Wang, Y. Li, L.C. Yu // *Neuroscience.* - 2003. - Vol.118(4). - P.1015-22.
140. Yoshida S. Regulatory molecules for the 5-HT₃ receptor ion channel gating system / S. Yoshida, T. Wetanabe, Y. Seto // *Bioorg. Med. Chem.* - 2007. - Vol.15(10). - P.3515-23.
141. Zwieten P.A. Serotonergic receptors and drugs in hypertension. / P.A. Zwieten, G.F. Blauw, P. Brummelen // *Pharm. & Toxic.* -1992.- № 70.- P.17-22.
142. Александрин В.В. Ауторегуляция мозгового кровотока в норме и в период постишемической гипоперфузии / В.В. Александрин // *Патогенез.* - 2012. - Т.10, №1. - С. 27 -30
143. Александрин В.В. Ауторегуляция мозгового кровотока в норме и в период постишемической гипоперфузии / В.В. Александрин, Н.Н. Тарасова, И.А. Тараканов // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* - 2005. - Т. 139. №1. - С. 72-76.
144. Амелин А.В. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия / А.В. Амелин, Ю.Д. Игнатов, А.А. Скоромец, А.Ю. Соколов. - Москва: ООО «МЕДпресс-информ». - 2011. - С.256.
145. Андреева Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ / 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.
146. Анисимова В.А.¹ Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенилимидазо[1,2-а]бензимидазолов / В. А. Анисимова, А. А. Спасов, И. Е. Толпыгин, В. И. Минкин, М. В. Черников, Д. С. Яковлев, А. Ю. Стуковина, И. И. Горягин, О. Ю. Гречко, Н. В. Кириллова, В. А. Косолапов, Е. В. Тибирькова, О. А. Салазникова, Л. В. Науменко, Н. А. Гурова // Химико-фармацевтический журнал. - 2010. - Т. 44, № 7. - С. 7-13.
147. Анисимова В.А.² Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов / В. А. Анисимова, И. Е. Толпыгин, А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, Н. А. Колобродова, Н. А. Гурова, О. А. Салазникова, Л. В. Науменко, В. А. Косолапов, Л. В. Ельцова, Т. М. Митина, М. П. Воронкова, К. В. Ленская // Химико-фармацевтический журнал. - 2012. - Т. 46, № 6. - С. 3-8.
148. Анисимова В.А.² Синтез и фармакологическая активность солей 3-ацетил-2-R-9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазолов / В. А. Анисимова, А. А. Спасов, И. Е. Толпыгин, В. А. Косолапов, А. Ф. Кучерявенко, Н. А. Гурова, О. Ю. Гречко, Н. В. Кириллова, Л. В. Ельцова, Л. В. Науменко, В. Д. Сысуева// Химико-фармацевтический журнал. - 2010. - Т. 44, № 3. - С. 8-13.
149. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / Березовская И.В. / Химико-фармацевтический журнал.- 2003. – Т.37, №3. – С. 32-34.
150. Березовская И.В., Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях/ И.В. Березовская // Токсикологический вестник. - 2010. - №5(104). - С.17-23.
151. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон // М.: 1991. – С. 399.

152. Вейн А.М. Болевые синдромы в неврологической практике / А.М. Вейн, Т.Г. Вознесенская, А.Б. Данилов // М.: МЕДпресс, 1999.
153. Вейн А.М. Боль и обезболивание / А.М. Вейн, М.Я. Авруцкий // М.: Медицина, 1997.
154. Воронина Т.А. Влияние сколопамина и ноотропного препарата фенотропила на рецепторы нейромедиаторов мозга крыс в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) / Т.А. Воронина, Г.И. Ковалев, И.Г. Капица, Д.А. Абаймов, Ю.Ю. Фирстова // Нейрохимия. - 2011.- №2.-С.130-141.
155. Воронина Т.А. Изучение эффектов субхронического введения гимантана на дофаминовые и серотониновые рецепторы головного мозга крыс в норме и при МРР+-вызванной патологии *ex vivo* / Т.А. Воронина, И.Г. Капица, Г.И. Ковалёв, И.А. Зимин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2010.-№11.-С.2-5.
156. Воронина Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ / Воронина Т.А., Неробкова Т.Л. // 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. 277-295.
157. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // 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. 253-263.
158. Воронина, Т.А. Перспективы поиска новых анксиолитиков / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2002. – Т. 65. – №5. – С. 4-17.

159. Ганьшина Т.С. Разработка поиска новых противомигреновых средств: дис. д-ра. биол.наук. 14.00.25./ Т.С. Ганьшина. - Москва, 2004. - С. 230;
160. Голендер В.Е. Вычислительные методы конструирования лекарств / Голендер В.Е., Розенблит А.Б. // Рига: Зинатне. - 1978. – С. 238.
161. Горбунов А.А. Влияние тропоксина на цереброваскулярные эффекты мета-хлорфенилпиперазина и серотонина / А.А. Горбунов, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян // Эксп. и клин. фармакология. - 2010. - Т. 73, № 9. - С. 13-16.
162. Горягин И.И. Поиск и изучение 5-НТ2 антисеротониновой активности в ряду конденсированных производных бензимидазола: дис. к.фарм.н. 14.00.25./ И.И.Горягин. - Пятигорск, 2008. - С. 168;
163. Гребников В.А. Исследование обмена серотонина у больных ограниченным нейродермитом / В.А. Гребников // Вестн дерматол и венерол. - 1981. - №9. - С.44—47.
164. Давыдова С.М. Влияние активации и блокады 5-НТ2А-рецепторов на иммунный ответ / Давыдова С.М., Чейдо М.А., Геворгян М.М., Идова Г.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2010. - №8. -С. 184-186.
165. Деркачев, Э.Ф. Патент RU 2108579 C1 6 G01 №33/49 / Э.Ф. Деркачев [и др.] // Бюл. Изобретений. –1998. –10(II). – С.298.
166. Карпов В.Н. Влияние аминазина и галоперидола на каудатное торможение условнорефлекторной реакции избегания у кошек / Карпов В.Н. // Фарм. Токс. – 1976. – Т. XXXIX, № 2. – С. 141-144.
167. Колобродова Н.А. Направленный поиск новых блокаторов 5-НТ3-рецепторов среди производных индола и бензимидазола и изучение их фармакологических свойств: Автореф... канд. мед. наук / Н.А. Колобродова. – Волгоград, 2012. – С. 24.
168. Кулинский В.И. Влияние селективных лигандов дофаминовых и серотониновых рецепторов на толерантность к глобальной ишемии

- головного мозга / В.И. Кулинский, С.С. Гаврилов // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2006.- №6. - С.20-23.
169. Лебедева Р.Н. Фармакотерапия острой боли / Р.Н. Лебедева, а В.В. Никод // М.: Издательство "Аир-Арт".- 1998. — С. 184.
170. Маймете М. О. Роль серотониновых и дофаминовых рецепторов в механизме действия галоперидола и пиренпирона / М.О. Маймете, Э.Э. Васар, А.М. Нурк // Фарм. Токс. – 1985. – Т. XLVIII, № 2. – С. 15-18.
171. Макаров В.А. Действие противомигренового препарата антагониста серотониновых рецепторов тропоксина на агрегацию тромбоцитов / В.А. Макаров, Г.Н. Петрухина, Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, Н.Т. Мифтахова, Т.М. Васильева, С.Г. Бежанян // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2005.- №3.-С.30-33
172. Мирзоян Р.С. Изыскание и изучение новых цереброваскулярных и мигренозных средств / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, А.В. Топчян, Е.В. Луньшина, И.В. Силкина // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - прил. 2. - С.55-57.
173. Мирзоян Р.С. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина, А.В. Топчян, Г.А. Чернышева; под общ. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 478–485.
174. Мирзоян Р.С. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина, А.В. Топчян, Г.А. Чернышева; под общ. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 478–485.
175. Мирзоян Р.С. Цереброваскулярные эффекты серотонина и тропоксина / Р.С. Мирзоян, А.В. Топчян, Т.С. Ганьшина, Л.М. Косточка // Методология флоуметрии. - 1999. - С.153-160.
176. Мирзоян, Р.С. Изменение локального мозгового кровотока при глобальной преходящей ишемии мозга у крыс / Р.С. Мирзоян,

- В.В. Александрин, Е.В. Лунышина // Методология флоуметрии. – 2001. – № 6. – С.143-149.
177. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов — М.: Гриф и К, 2012. — С. 944.
178. Раевский К.С. Методические указания по изучению нейрорептической активности фармакологических веществ / Раевский К.С., Наркевич В.Б. // 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. 230-244.
179. Сергеев, П.В., Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров. – Волгоград, 2003. – С. 178.
180. Середенин С.Б. Тропоксин - новый антагонист серотонина и потенциальное противомигренозное средство / С.Б. Середенин, Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, Л.М. Косточка, Н.А. Романычева, Д.Ю. Русаков // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1998.-№3.-С.28-31.
181. Спасов А.А. Изучение антисеротониновых свойств производных трициклических бензимидазольных систем / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Хим.-фарм. журнал.-2006.-Том 40.-№11.- С.26-29.
182. Спасов А.А. Средство, обладающее кардиотонической активностью / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, Н.А. Гурова, В.И. Петров, В.И. Минкин // Бюлл. изобрет. - 2012. - Заявка № 2012157881.
183. Федин А.Н. Гетерогенность реакций дыхательных путей крысы на серотонин / А.Н. Федин, Т.Ю. Постникова, В.М. Кирилина, А.И. Кривченко // Российский физиологический журнал. - 2011. - №8. -С. 862-869.

184. Федотова Ю.О. Поведенческие эффекты m-CPP и кетансерина у самок крыс в течение полового цикла / Федотова Ю.О. // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2010. - №11.- С.6-9.
185. Хауликэ И., Вегетативная нервная система / И. Хауликэ // Бухарест: Медицинскоеиздательство, 1978. - С.121—132.
186. Чейдо М.А. Сопоставление эффектов блокады постсинаптических серотониновых 5-HT_{1A}- И 5-HT_{2A}-рецепторов на иммунный ответ при активации каппа- и дельта - опиоидных систем. Бюллетень СО РАМН. - 2010. - Т. 30, №4. - С. 42-45
187. Черников М. В. Производные бензимидазола-модуляторы рецепторов биологически активных: дис. ... док. мед. наук. 14.00.25 / Черников Максим Валентинович. – Волгоград, 2008. – С. 267.