ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Калитин Константин Юрьевич

НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА КОНДЕНСИРОВАННЫХ И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
Спасов Александр Алексеевич,
академик РАН, З.д.н. РФ,
профессор, д.м.н.

Волгоград – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....7
ГЛАВА 1. ПОИСК НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ С БЕНЗИМИДАЗОЛЬНЫМ КОРОМ 18
1.1. Обоснование актуальности поиска и исследования новых веществ с нейропсихотропной активностью....18
1.2. Современные подходы к поиску веществ с нейропсихотропной активностью....19
1.3. Виртуальный скрининг....21
1.4. Анализ сигналов мозговой активности в фармакологических исследованиях....24
1.5. G-белок смещенные агонисты каппа-опиоидных рецепторов....26
1.6. Фармакологические мишени в лечении расстройств психотического спектра....30
1.7. Фармакологические мишени в лечении эпилепсии....36
1.8. Нейропсихотропные свойства производных бензимидазола....39
1.8.1. ГАМК-рецепторы....41
1.8.2. Глутаматные рецепторы....45
1.8.3. Дофаминовые рецепторы....47
1.8.4. Серотониновые рецепторы....48
1.8.5. Каппа-опиоидные рецепторы....50
1.8.6. Пуриновые рецепторы....51
1.8.7. Ангиотензиновые рецепторы 1-го типа. Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма (PPARγ)....52
1.9. Исследования кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ....53
1.10. Заключение....55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ....57
2.1. Материалы исследования....57
2.1.1. Соединения и реактивы....57
2.1.2. Животные....58
2.1.3. Оборудование и программное обеспечение....58
2.2. Биоинформационные методы....59
2.3. Биопотенциал-опосредованный подход....65

2.4. Электрофизиологические методы....71
2.5. Методы in vitro....78
2.6. Поведенческие методы исследования....80
2.7. Моделирование патологических состояний....92
2.8. Статистическая обработка данных....103
ГЛАВА 3. АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА С КАППА-ОПИОИДНОЙ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ....105
3.1. Исследование молекулярных особенностей взаимодействия конденсированных производных бензимидазолов с каппа-опиоидным рецептором....105
3.1.1. Сетевое моделирование химического пространства производных бензимидазола для оценки перспективности соединений....105
3.1.2. Фармакофорный анализ наиболее перспективных соединений....108
3.1.3. Поиск карманов связывания в каппа-опиоидном рецепторе....110
3.1.4. Гибкий молекулярный докинг соединений....111
3.1.5. Молекулярная динамика взаимодействия соединений с рецептором....115
3.2. Биопотенциал-опосредованный подход к изучению механизма действия....116
3.2.1. Спектральный анализ сигналов мозговой активности....117
3.2.2. Когерентный анализ сигналов мозговой активности....122
3.2.3. Взвешенный индекс фазовой задержки с обработкой методом главных компонент и построением классификатора сигналов на основе гауссовских процессов....123
3.3. Изучение влияния соединения РУ-1205 на спайковую активность пирамидных нейронов миндалины на установке patch clamp....125
3.4. Оценка эффектов соединения РУ-1205 в модели дискриминации стимулов....128
3.5. Оценка локальных эффектов соединения РУ-1205 на структуры головного мозга....129
3.5.1. Околоводопроводное серое вещество....130
3.5.2. Большое ядро шва....130
3.5.3. Миндалевидное тело....131
3.5.4. Гиппокамп....132
3.5.5. Прилежащее ядро....133
3.6. Изучение противозудных свойств соединения РУ-1205....135
3.6.1. Модель острого нейрогенного зуда, вызванного серотонином....135

3.6.2. Индукция хронического зуда в модели «сухой кожи»..... 135
3.7. Оценка влияния соединения РУ-1205 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»..... 136
3.8. Оценка влияния соединения РУ-1205 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием..... 138
3.9. Заключение..... 139
ГЛАВА 4. АТИПИЧНАЯ АНТИПСИХОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 5-НТ2А-АНТАГОНИСТОВ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА..... 141
4.1. Исследование 5-НТ2А-антагонистической активности in silico..... 141
4.1.1. QSAR-моделирование 5-НТ2А-антагонистической активности с поиском перспективных соединений среди производных бензимидазола..... 141
4.1.2. Построение фармакофора на основе белок-лигандного комплекса с поиском перспективных соединений среди производных бензимидазола..... 144
4.1.3. Гибкий молекулярный докинг..... 146
4.1.4. Молекулярная динамика..... 149
4.2. Биопотенциал-опосредованная оценка нейропсихотропных эффектов..... 154
4.2.1. Кластеризация и классификация сигналов, полученных на здоровых крысах..... 154
4.2.2. Анализ LFP-сигналов, зарегистрированных у животных с индуцированным психотическим расстройством..... 157
4.2.3. Влияние соединения РУ-31 на мембранные токи пирамидных нейронов префронтальной коры..... 159
4.3. Нейрофармакологический анализ..... 161
4.3.1. Взаимодействие с галоперидолом..... 161
4.3.2. Взаимодействие с пикротоксином..... 161
4.3.3. Взаимодействие с клонидином..... 162
4.3.4. Влияние на 5-гидрокситриптофановый гиперкинез..... 163
4.3.5. Влияние на ареколиновый тремор..... 164
4.3.6. Взаимодействие с L-ДОФА..... 164
4.4. Оценка влияния соединения РУ-31 на медиальную префронтальную область коры путем локальных микроинъекций..... 165
4.5. Спектр антипсихотической активности соединения РУ-31..... 168
4.5.1. Оценка взаимодействия с апоморфином..... 168

4.5.2. Оценка нейролептической активности соединения РУ-31 на моделях расстройства психотического спектра в батарее поведенческих тестов.....172
4.6. Оценка влияния соединения РУ-31 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения».....181
4.7. Оценка влияния соединения РУ-31 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием.....183
4.8. Заключение.....184
ГЛАВА 5. ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА.....186
5.1. Исследование противосудорожной активности in silico.....186
5.1.1. QSAR моделирование с построением ландшафта каппа-опиоидной активности..186
5.1.2. Гибкий молекулярный докинг.....190
5.1.3. Молекулярная динамика.....191
5.2. Биопотенциал-опосредованная оценка противосудорожной активности новых соединений.....192
5.3. Изучение механизма действия активных соединений на модели активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.....195
5.4. Оценка противосудорожной активности соединений BIF-70 и BIF-72 в скрининговых тестах.....196
5.4.1. Максимальный электрошок.....196
5.4.2. Коразоловые судороги.....197
5.5. Изучение спектра противосудорожной активности соединения BIF-72.....198
5.5.1. Влияние соединения на фокальные судороги, вызванные пенициллином.....198
5.5.2. Изучение противоэпилептической активности соединения на модели эпилептогенеза со спонтанными рецидивирующими судорогами, вызванными пилокарпином.....199
5.5.3. Изучение противоэпилептической активности соединения на модели эпилептогенеза, методом коразолового киндлинга.....201
5.6. Нейропротективные и противовоспалительные свойства соединения BIF-72.....203
5.6.1. Изучение нейропротективных свойств соединения на модели нейровоспаления, вызванного ЛПС, на срезах мозга.....203
5.6.2. Изучение нейропротективных свойств соединения на модели обратимой окклюзии

средней мозговой артерии..... 204

5.6.3. Оценка влияния исследуемых соединений на уровни оксида азота (II) и лактатдегидрогеназы..... 208

5.7. Изучение нейротоксикологического профиля соединения BIF-72..... 209

5.7.1. Оценка влияния соединения BIF-72 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»..... 209

5.7.2. Влияние на координацию движений в тесте вращающегося стержня..... 211

5.7.3. Оценка влияния соединения BIF-72 на тонус мышц в тесте удержания на сетке.. 212

5.7.4. Оценка влияния соединения BIF-72 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием..... 213

5.7.5. Оценка аверсивных свойств..... 214

5.8. Заключение..... 215

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... 217

ВЫВОДЫ..... 239

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 242

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 243

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 246

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Разработка медикаментозного лечения заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) остается ключевой задачей современной медицины (Gribkoff V.K., 2017). Заболевания ЦНС существенно снижают качество жизни, приводят к инвалидизации и преждевременной смерти. Статистические данные подтверждают не только глобальный характер проблемы, связанной с расстройствами ЦНС, но и неуклонную тенденцию к ее усугублению. Между 1990 и 2019 годами показатель потерянных лет жизни (DALY, disability-adjusted life year) из-за психических расстройств возрос с 80,8 миллиона до 125,3 миллиона (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022). В 2017 году было зафиксировано 1,13 миллиона случаев шизофрении и в результате 12,66 миллиона DALY (Castelpietra G. et al., 2022). Исследования показывают, что эпилепсия в настоящее время затрагивает более 46 миллионов человек в мире и приводит к более чем 13 миллионам DALY. Число случаев идиопатической эпилепсии увеличилось на 6,0% с 1990 по 2016 год (Beghi E., 2020).

Официальные ведомственные данные ЦНИИОИЗ Минздрава России согласуются с указанными тенденциями. В 2023 г. общая заболеваемость составила: по классу «психические расстройства и расстройства поведения» 5 765 811 случаев (3 937,1 на 100 000), по классу «болезни нервной системы» 8 625 878 случаев (5 890,1 на 100 000) (Деев И.А. и др., 2024, Ч. II, с. 36). Первично выявленная заболеваемость: 621 344 случая (424,3 на 100 000) по психическим расстройствам и 2 098 899 случаев (1 433,2 на 100 000) по болезням нервной системы (Деев И.А. и др., 2024, Ч. I, с. 34). Для эпилепсии общая зарегистрированная численность пациентов в 2023 г. составила 392 412 человек (268,0 на 100 000) (Деев И.А. и др., 2024, Ч. II, с. 38), а число случаев с впервые установленным диагнозом 38 279 (26,1 на 100 000) (Деев И.А. и др., 2024, Ч. I, с. 36).

Хотя за последние десятилетия разработано множество противосудорожных препаратов, около трети пациентов продолжают испытывать эпилептические приступы (Beghi E., 2020; Löscher W. et al., 2020). Шизофрения, несмотря на широкий выбор антипсихотических препаратов, остается хроническим расстройством, сложно поддающимся лечению, при этом около 20–30% пациентов проявляют терапевтическую резистентность (Correll C.U. et al., 2021; Siskind D. et al., 2022).

Учитывая значительные социальные и экономические потери, необходимость создания более эффективного фармакологического лечения сохраняет свою актуальность для расстройств психотического спектра (Симашкова Н.В., 2015; Read J., 2019), депрессии (Bschor T., 2016; Котова О.В. и др., 2021), эпилепсии (Народова Е.А. и др., 2018; Chen Z. et al., 2018), ПТСР (Merz J. et al., 2018) и болевого синдрома (Kessler A. et al., 2020). В контексте терапии заболеваний,

сопровождающихся зудом, проблема недостаточной эффективности лекарственных средств также не решена (Lipman Z.M. et al., 2021). Зуд значительно ухудшает качество жизни пациентов, вызывая дискомфорт, нарушения сна и повышенную раздражительность.

В государственной программе правительства Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на главную позицию выдвинута подпрограмма 1 «Развитие производства лекарственных средств», в которой первоочередной задачей является разработка лекарственных средств для лечения социально значимых заболеваний, в том числе психоневрологических. Исследование согласуется с приоритетами государственной политики в сфере реализации программы ФАРМА-2030, одной из основных задач которой является создание и совершенствование условий для разработки инновационных лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Одной из многообещающих групп соединений для поиска новых нейро- и психотропных препаратов являются производные бензимидазола. Они привлекли внимание ученых благодаря их широкому спектру биологической активности. В частности, они проявляют антипсихотические (Chino A. et al., 2019; Czopek A. et al., 2020; Al-Wasidi A.S. et al., 2021; Saini A. et al., 2023), противосудорожные (Brishty S.R. et al., 2021; Gajanan G. et al., 2021; Raghu M.S. et al., 2023; Shabana K. et al., 2023) и нейропротективные свойства (Imran M. et al., 2021; Anastassova N. et al., 2022; Vicente-Zurdo D. et al., 2023), что делает их перспективными кандидатами для разработки новых препаратов. Производные бензимидазола оказывают воздействие на различные нейротрансмиттерные системы мозга, такие как дофаминовая (Мальцев Д.В. и др., 2021), серотониновая (Черников М.В., 2015; Яковлев Д.С. и др., 2015) и ГАМК-ергическая системы (Агацарская Я.В. и др., 2019; Перфильев М.А., 2023), что подтверждает их высокий потенциал в терапии психоневрологических расстройств.

Таким образом, поиск и исследование новых соединений с нейропсихотропной активностью среди производных бензимидазола являются актуальными задачами современной медицины и фармакологии. Это направление включает в себя разработку новых обезболивающих, антипсихотических, противосудорожных, нейротропных и противозудных средств. Изучение механизмов действия конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола позволит не только глубже понять природу нейропсихотропной активности, но и открыть новые возможности для разработки более безопасных и эффективных лекарственных средств.

Степень разработанности темы

В лечении шизофрении наиболее широко используются препараты, воздействующие на дофаминовую и серотониновую системы. Среди них можно выделить такие атипичные

антипсихотики, как клозапин, оланзапин, рисперидон, кветиапин и арипипразол (McCutcheon R.A. et al., 2020; Correll C.U. et al., 2022). Эти средства практически не вызывают экстрапирамидных нарушений и показали высокую эффективность в способности контролировать позитивные симптомы шизофрении, включая галлюцинации и бред (Клинические рекомендации РФ: «Шизофрения у взрослых», 2024), однако их влияние на негативные и когнитивные симптомы остается недостаточным (Maroney M., 2022), что существенно ограничивает возможности терапии психотических расстройств. Более того, атипичные антипсихотики часто вызывают такие побочные эффекты, как метаболические нарушения, увеличение массы тела (Балашова А.В. и др., 2023), сонливость (Stroup T.S., 2018) и проявляют кардиотоксические свойства (Насырова Р.Ф. и др., 2024).

Терапия эпилепсии направлена на подавление приступов и улучшение качества жизни пациентов (Лусникова И.В., 2022; Munaf Z.A., 2024). Базовый арсенал противоэпилептических препаратов (ПЭП) включает несколько поколений средств с различными механизмами действия, такими как блокирование потенциал-зависимых натриевых каналов (карбамазепин, ламотриджин), усиление ГАМК-ергической нейротрансмиссии (вальпроаты, бензодиазепины) и модуляция синаптического высвобождения нейромедиаторов (леветирацетам, бриварацетам) (Тадтаева З.Г. и др., 2023; Welty T.E. et al., 2024). Несмотря на это, ключевой проблемой остается фармакорезистентность, затрагивающая около 30% пациентов (Löscher W. et al., 2020), у которых приступы не удается контролировать даже при использовании двух и более адекватно подобранных ПЭП. Важно подчеркнуть, что большинство существующих на сегодняшний день ПЭП являются симптоматическими. Это определяет основное направление современных исследований: поиск соединений с антиэпилептогенными или болезнь-модифицирующими свойствами (French J.A. et al., 2021).

Коррекция болевого синдрома включает применение нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), таких как ибупрофен и диклофенак, и опиоидных анальгетиков (морфин, промедол, трамадол и др.) (Phillips J.K. et al., 2017). Несмотря на их широкое применение, НПВС обладают серьезными побочными эффектами, такими как гастро- и кардиотоксичность, что ограничивает их длительное использование (Lanas Á. et al., 2015; Bally M. et al., 2017). Опиоидные анальгетики, являясь «золотым стандартом» для купирования выраженной боли, сопряжены с высоким риском развития толерантности, зависимости и угнетения дыхания. Их немедицинское применение привело к глобальному опиоидному кризису (Degenhardt L. et al., 2019; Bateman J.T. et al., 2023). Особую сложность представляет лечение хронической нейропатической боли, где стандартные анальгетики часто неэффективны. В связи с этим современные исследования направлены на поиск новых ненаркотических анальгетиков с инновационными механизмами действия (Bernatoniene J. et al., 2023).

В лечении зуда различной этиологии применяется широкий спектр противозудных средств, включая антигистаминные препараты первого и второго поколения, топические кортикостероиды, ингибиторы кальциневрина и лиганды опиоидных рецепторов (Lipman Z.M. et al., 2021). Несмотря на разнообразие доступных средств, лечение хронического зуда остается сложной задачей, так как существующие препараты не всегда обеспечивают достаточный контроль симптомов и могут вызывать нежелательные побочные эффекты. В частности, установлен противозудный эффект у каппа-опиоидных агонистов, однако аверсивные нежелательные явления ограничивают их применение (Inan S., 2020; Elmariah S. et al., 2022; Kim B.S. et al., 2022; Beck T.C. et al., 2023).

На сегодняшний день накоплен значительный объем данных, свидетельствующих о широком спектре биологической активности соединений с бензимидазольным ядром. В частности, для представителей данного класса установлено наличие нейропротекторного (Imran M. et al., 2021; Anastassova N. et al., 2022; Vicente-Zurdo D. et al., 2023), анксиолитического (Maryanoff B.E. et al., 1995; Nannapaneni D. et al., 2010; Mahajan B.S. et al., 2024), антипсихотического (Czopek A. et al., 2020; Al-Wasidi A.S. et al., 2021; Saini A. et al., 2023), анальгетического (Le A. et al., 2004; Achar K.C.S. et al., 2010; Idris Z. et al., 2019) и противосудорожного (Gajanan G. et al., 2021; Raghu M.S. et al., 2023; Shabana K. et al., 2023) действия. Высокий фармакологический потенциал некоторых из этих соединений послужил основанием для их внедрения в клиническую практику (Leucht S., 2005; Pringsheim T., 2009; Khokhar M.A., 2016). Вместе с тем, несмотря на существенный прогресс, достигнутый в области химии и фармакологии производных бензимидазола, степень изученности отдельных ключевых аспектов остается недостаточной. Так, одним из наименее исследованных вопросов являются молекулярные механизмы, лежащие в основе их фармакологического действия. Кроме того, не исчерпан потенциал для поиска новых высокоактивных агентов в ряду производных бензимидазола, что определяет актуальность как скрининга уже известных веществ, так и целенаправленного синтеза новых структур.

Цель исследования

Поиск веществ, проявляющих нейропсихотропную активность, в ряду новых конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, изучение их механизма действия и спектра фармакологических эффектов.

Задачи исследования

1. Провести комплексную оценку структурного многообразия конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола с целью обоснования перспективности

бензимидазольного кора в качестве многофункционального скаффолда для целенаправленного поиска новых соединений, обладающих нейропсихотропной активностью.

2. Осуществить многоэтапное исследование молекулярных механизмов взаимодействия потенциально-активных производных бензимидазола с ключевыми биологическими мишенями с использованием комплекса вычислительных методов *in silico*, включающих QSAR, фармакофорное моделирование и молекулярный докинг, с целью прогнозирования их нейропсихотропной активности и последующего отбора наиболее перспективных соединений-лидеров для углубленного экспериментального изучения.
3. Провести детальное изучение анальгетического действия и нейрофизиологических механизмов его реализации для производных бензимидазола, проявляющих каппа-опиоидную агонистическую активность, с применением электрофизиологических методов *ex vivo* и комплекса поведенческих тестов *in vivo*, а также оценить их потенциальные противозудные свойства.
4. Выявить и охарактеризовать атипическую антипсихотическую активность в ряду производных бензимидазола с установленным 5-HT_{2A}-антагонистическим профилем посредством оценки их нейрофизиологических механизмов действия и определения спектра фармакологической эффективности на валидных экспериментальных моделях психотических расстройств.
5. Осуществить целенаправленный поиск соединений с противосудорожными и нейропротективными свойствами среди ранее неисследованных производных бензимидазола, изучить их фармакологические механизмы и охарактеризовать спектр противосудорожной активности в экспериментальных моделях острой генерализованной, фокальной и хронической эпилепсии для определения их терапевтического потенциала.
6. Провести комплексную оценку нейротоксикологического профиля наиболее активных соединений-лидеров, выявленных в ходе исследования, с использованием батареи поведенческих тестов и автоматизированного анализа двигательной активности для установления их потенциального влияния на когнитивные функции и координацию движений.

Научная новизна

В рамках настоящего исследования была разработана и внедрена система целенаправленного поиска соединений с нейропсихотропной активностью среди новых конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. Применение комплексного подхода, включающего методы биопотенциал-опосредованного анализа

биоэлектрической активности мозга, а также современные технологии QSAR-моделирования и фармакофорного анализа, позволило впервые выявить ряд перспективных соединений с противозудной, антипсихотической, противосудорожной и нейропротективной активностью.

Новизну представляет усовершенствованный биопотенциал-опосредованный метод изучения нейропсихотропной активности, который, в комплексе с алгоритмами машинного обучения, позволяет эффективно дискриминировать различные классы психотропных веществ по их воздействию на биоэлектрическую активность мозга. Данный подход впервые был применен для анализа механизмов действия бензимидазольных производных, что открыло новые перспективы в исследовании их нейропсихотропных эффектов.

Впервые была показана смещенная агонистическая активность соединения РУ-1205 по отношению к каппа-опиоидным рецепторам, изучено его влияние на спайковую активность пирамидных нейронов миндалины методом patch-clamp с последующей оценкой анальгетических и противозудных свойств. Установлены структуры головного мозга, вовлеченные в реализацию анальгетического действия. Полученные результаты подтверждают, что соединение РУ-1205 является перспективным кандидатом для дальнейших исследований в области разработки обезболивающих и противозудных средств.

Кроме того, впервые была выявлена атипичная антипсихотическая активность у производных бензимидазола с 5-HT_{2A} антагонистической активностью, что подтверждено с помощью *in silico* методов, а также поведенческих и электрофизиологических исследований на животных моделях психотических расстройств. Соединение РУ-31 продемонстрировало способность восстанавливать нарушенные поведенческие и когнитивные функции, что подтверждает его потенциал в лечении психозов.

В ходе исследования впервые были выявлены противосудорожные и нейропротективные свойства соединения BIF-72, которое проявило высокую активность на моделях эпилептогенеза и нейровоспаления, вызванного липополисахаридом. Соединение BIF-72 также продемонстрировало способность подавлять образование оксида азота и снижать площадь инфаркта при ишемии мозга. Это открывает новые возможности для применения производных бензимидазола в терапии неврологических расстройств, в том числе с нейродегенеративным компонентом.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты исследования имеют высокую научно-практическую значимость для разработки новых лекарственных средств с нейропсихотропной активностью, направленных на лечение психоневрологических расстройств, таких как шизофрения, эпилепсия, а также заболеваний, сопровождающихся болью.

Показана целесообразность поиска веществ с нейропсихотропной активностью среди производных бензимидазола. Построены QSAR- и фармакофорные модели, которые могут быть эффективно применены для продолжения исследований в данном направлении. Разработана база данных производных бензимидазола, в том числе с установленной активностью, которая может служить как источником для поиска новых нейропсихотропных веществ, так и обучения новых компьютерных моделей.

Применение биопотенциал-опосредованного подхода в сочетании с алгоритмами машинного обучения открывает новые перспективы для ранней идентификации специфической нейропсихотропной активности химических соединений, что может существенно сократить время и затраты на доклинические исследования новых средств.

Выявленные в ходе исследования соединения РУ-1205, РУ-31 обладают значительным терапевтическим потенциалом и могут стать основой для создания новых препаратов с каппа-опиоидной и антипсихотической активностью, отличающихся улучшенным профилем безопасности по сравнению с существующими средствами. Кроме того, соединение BIF-72 продемонстрировало противосудорожные и нейропротективные свойства, что делает его перспективным кандидатом для болезнь-модифицирующей терапии эпилепсии и заболеваний, сопровождающихся нейровоспалением.

Настоящее исследование согласуется с актуальной проблематикой нейрофармакологии и нейронауки в целом. Усилия, направленные на сбор и обработку данных, разработку алгоритмов поиска нейротропных средств центрального действия и математических моделей, а также экспериментальные исследования влияния соединений с нейро- и психотропной активностью на функции центральной нервной системы будут способствовать расширению теоретических знаний в области биоинформатики, медицинской химии и фармакологии.

Результаты исследования применимы для решения конкретных проблем здравоохранения.

Методология и методы исследования

Исследование проводилось на базе Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, с использованием современных методов машинного обучения, QSAR-моделирования, фармакофорного анализа, молекулярного докинга и динамики для *in silico* изучения механизмов нейропсихотропной активности производных бензимидазола.

В ходе изучения механизма действия производного бензимидазола с каппа-опиоидной агонистической активностью (РУ-1205) применялся биопотенциал-опосредованный подход, включающий спектральный и когерентный анализ сигналов мозговой активности, анализ

фазовой задержки. Также использовались алгоритмы машинного обучения для построения классификаторов сигналов, спайковая активность нейронов изучалась методом patch clamp. Изучение анальгетических свойств выполнено путем локальных микроинъекций вещества в целевые структуры мозга. Противозудные свойства соединения оценивались на моделях острого нейрогенного зуда, вызванного серотонином, и хронического иммуногенного зуда в модели «сухой кожи».

Исследование атипичной антипсихотической активности 5-HT_{2A}-антагонистов среди производных бензимидазола включало биопотенциал-опосредованную оценку эффектов соединения РУ-31. Кластеризация сигналов LFP (Local Field Potentials), регистрация мембранных токов нейронов и нейрофармакологический анализ с использованием моделей взаимодействия с галоперидолом, пикротоксином и апоморфином позволили изучить механизмы действия. Поведенческие тесты на моделях психотических расстройств использовались для оценки антипсихотической активности соединения РУ-31.

Противосудорожная активность исследуемых соединений изучалась с помощью *in silico* методов, анализа биопотенциалов и тестов, основанных на различных моделях судорог (максимальный электрошок, коразоловые судороги, пенициллиновая модель). Хроническую эпилепсию моделировали с помощью пилокарпина и длительного введения коразола. Изучение механизмов противовоспалительного и нейропротективного действия BIF-72 проводилось на моделях нейровоспаления и окклюзии средней мозговой артерии. Были использованы биохимические методы для оценки образования оксида азота, а также жизнеспособности клеток по уровню ЛДГ.

Для поведенческих исследований на здоровых животных применялись автоматизированные методы анализа с технологиями компьютерного зрения, а также классические методы оценки когнитивных функций.

Реализация результатов исследования

Разработанная методология поиска и изучения соединений с потенциальной нейропсихотропной активностью внедрена в научно-исследовательскую работу Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, включена в учебно-методический процесс на кафедрах фармакологии и биоинформатики, фармацевтической, токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Полученные данные о взаимосвязи структура-активность исследованных соединений используются в направленном синтезе новых химических структур в лаборатории

органического синтеза Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного федерального университета.

Исследования, изложенные в работе, частично финансированы Грантом ВолГМУ №155 «Оригинальный метод полимодальной оценки фармакологического действия психотропных веществ, основанный на декодировании электрофизиологических паттернов нервной активности с помощью искусственных нейронных сетей и глубокого машинного обучения». РНФ № 24-25-20154 «Роль инфламмасомы NLRP3 как мишени терапии инсулинорезистентности и иммунометаболических нарушений».

Положения, выносимые на защиту

1. Конденсированные и неконденсированные производные бензимидазола представляют собой перспективную основу для поиска и разработки новых средств с нейропсихотропной активностью, что подтверждается их способностью связываться с различными нейрональными рецепторами, изменять электрофизиологическую активность мозга и проявлять широкий спектр фармакологических эффектов, включая обезболивающую, антипсихотическую, противосудорожную и нейропротективную активности.
2. Биопотенциал-опосредованный подход к изучению нейропсихотропных свойств соединений, основанный на анализе биоэлектрической активности мозга с применением алгоритмов машинного обучения, является гибким и многоцелевым инструментом доклинических исследований, позволяющим прогнозировать механизм действия и терапевтический потенциал веществ на ранних этапах разработки.
3. Соединение РУ-1205 проявляет косвенные признаки G-белок-смещенного агонизма в отношении каппа-опиоидного рецептора, что было подтверждено характерными конформационными изменениями трансмембранных доменов TM6 и TM7 при моделировании взаимодействия с рецептором, а также электрофизиологическими и поведенческими методами. Для соединения РУ-1205 показаны нейротропные противозудные эффекты, выявленные в моделях острого и хронического зуда. Установлены ключевые структуры, вовлеченные в анальгетический эффект вещества: околоводопроводное серое вещество, а также в меньшей степени большое ядро шва и миндалевидное тело.
4. Соединение РУ-31, обладающее 5-HT_{2A} антагонистическим механизмом действия, проявляет атипичную антипсихотическую активность и, в отличие от традиционных нейролептиков, имеет более безопасный фармакологический профиль, что подтверждено результатами поведенческих исследований на моделях психотических расстройств и электрофизиологическими данными, указывающими на его способность модулировать серотонинергическую систему в головном мозге.

5. Соединение BIF-72 обладает выраженными нейропротективными и болезнь-модифицирующими антиэпилептогенными эффектами, изменяя течение эпилепсии, что проявляется в моделях эпилептогенеза снижением тяжести судорог, увеличением выживаемости нейронов в условиях нейровоспаления, сокращением зоны инфаркта и улучшением двигательных функций при ишемии, а также отсутствием значительных цитотоксических и побочных эффектов, что делает его перспективным кандидатом для разработки новых противоэпилептических препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность результатов подтверждается массивом экспериментальных данных, полученных с применением передовых методов и подходов, релевантных поставленным исследовательским задачам. Заключения, сформулированные в диссертации, корреспондируют с данными научной литературы.

Ключевые аспекты диссертационного исследования были представлены, подвергнуты всестороннему обсуждению и получили признание на следующих научно-практических конференциях: 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MedChem-Russia 2022» (г. Волгоград, 2022), LXXXIII научно-практической конференции с международным участием, посвященной 125-летнему юбилею ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины - 2022» (г. Санкт-Петербург, 2022), XXIV съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (г. Санкт-Петербург, 2023), на 9th international electronic conference on medicinal chemistry (Sciforum, MDPI), III научно-образовательном форуме "Всероссийская научная школа "Медицина молодая" (г. Москва, 2023), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием учение академика И. П. Павлова в современной системе нейронаук (г. Санкт-Петербург, 2024), Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения выдающегося отечественного фармаколога, академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана (г. Санкт-Петербург, 2024).

По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, из них 13 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 учебных пособия. Получено 1 свидетельство о регистрации базы данных и 2 свидетельства о регистрации программы для ЭВМ.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно определил актуальную научную проблему и подготовил план исследования для ее решения. Автором разработана оригинальная методология поиска новых

нейропсихотропных соединений, включающая биопотенциал-опосредованный подход в комплексе с компьютерной обработкой на этапе предварительного анализа соединений. Разработана электронная база данных о производных бензимидазола. Автор принимал активное участие во всех этапах экспериментальных работ. Автором проведены статистический анализ и интерпретация результатов, что обеспечило формулирование обоснованных выводов и рекомендаций по дальнейшему изучению производных бензимидазола в фармакологии. Информационной основой исследования послужил глубокий анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме нейропсихотропных соединений. Результаты исследования получили свое отражение в научных публикациях автора, подготовленных и опубликованных в рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 286 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 93 рисунками и содержит 30 таблиц. Библиографический указатель включает 470 источников, из них 51 отечественных, 419 иностранных.

ГЛАВА 1. ПОИСК НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ С БЕНЗИМИДАЗОЛЬНЫМ КОРОМ

1.1. Обоснование актуальности поиска и исследования новых веществ с нейропсихотропной активностью

Разработка и поиск новых лекарственных средств, влияющих на центральную нервную систему (ЦНС), представляет собой одну из наиболее актуальных задач современной фармакологии и медицины, что обосновывается комплексом медико-социальных и демографических факторов (ВОЗ, 2022, A75/10 Add.4; Owolabi M.O. et al., 2023). ЦНС, являясь биологической основой для реализации когнитивных, сенсорных и двигательных функций, играет ключевую роль в жизнедеятельности организма. Психические и неврологические расстройства влекут за собой не только значительное снижение качества жизни пациентов, но и сопряжены с существенным социально-экономическим бременем для общества (Крот К.В. и др., 2016).

Одним из ключевых факторов, определяющих актуальность проблемы, является высокая и неуклонно растущая распространенность психоневрологических заболеваний. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, различные психические и неврологические расстройства диагностированы у более чем 3 млрд человек в глобальном масштабе (WHO, 2022; GBD Collaborative Network, 2024). Наблюдаемая тенденция к росту заболеваемости обусловлена такими факторами, как увеличение средней продолжительности жизни и повышение уровня психоэмоциональных нагрузок.

Несмотря на определенный прогресс, достигнутый в фармакотерапии ряда нозологий, эффективность существующих терапевтических подходов во многих случаях остается неудовлетворительной. Установлено, что значительная доля пациентов является рефрактерной к стандартным схемам лечения или демонстрирует лишь частичный терапевтический ответ (Beghi E., 2020; Correll C.U. et al., 2021). Дополнительным ограничивающим фактором выступает наличие у большинства применяемых препаратов выраженных нежелательных побочных эффектов, что существенно лимитирует их клиническое использование (Kaar S.J. et al., 2020). Совокупность вышеизложенных факторов обусловливает необходимость создания инновационных лекарственных средств для лечения заболеваний ЦНС, характеризующихся более оптимальным профилем эффективности и безопасности.

1.2. Современные подходы к поиску веществ с нейропсихотропной активностью

Развитие фундаментальных нейронаук в последние десятилетия привело к существенному углублению понимания молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза психоневрологических заболеваний (Kharibegashvili A., 2022). Были выявлены новые мишени для фармакологического воздействия (Baird D.A. et al., 2021), а также открыты ранее неизвестные сигнальные пути и нейромедиаторные системы, что создало научную базу для разработки лекарственных препаратов с принципиально новыми механизмами действия (Pasquini S. et al., 2022).

Тем не менее, современная психофармакология сталкивается с проблемой терапевтической устойчивости, во многом обусловленной несоответствием между клинической классификацией психических расстройств и их фундаментальной нейробиологической гетерогенностью. За условными нозологическими рамками шизофрении, депрессии или биполярного расстройства скрываются различные патофизиологические эндофенотипы (Greenwood T.A. et al., 2019; Guglielmo R. et al., 2021), которые могут включать дисфункцию глутаматергической передачи (Li C.T. et al., 2019; Kruse A.O. et al., 2022), нарушения синаптической пластичности (Appelbaum L.G. et al., 2023), нейровоспалительные процессы (Thylur D.S., 2022) или дефицит конкретных нейрональных осцилляций (Su Z. et al., 2024). Это формирует запрос на переход от разработки препаратов, направленных на популяционно-обобщенный клинический диагноз, к созданию таргетных агентов, ориентированных на специфические биологические мишени или патогенетические каскады, лежащие в основе конкретного эндофенотипа. Такой подход, известный как прецизионная или стратифицированная медицина, позволяет не только повысить вероятность терапевтического ответа у определенной подгруппы пациентов, но и открывает возможность для транснозологического применения лекарственных средств, воздействующих на общий для нескольких расстройств биологический механизм (Baldwin H. et al., 2022; Williams L.M., 2024).

Прогресс в области геномики и персонализированной медицины открывает перспективы создания таргетных препаратов, учитывающих индивидуальные генетические особенности пациента (Klein P. et al., 2024). Благодаря развитию технологий секвенирования генома стало возможным выделение генетических маркеров, связанных с повышенным риском развития психоневрологических расстройств, а также факторов, определяющих индивидуальную реакцию на лекарственные средства (Nasyrova R.F. et al., 2022). Однако информация о последовательности ДНК недостаточна для объяснения динамики заболевания и вариабельности терапевтического ответа, так как не учитывает влияние факторов среды (Breton C.V. et al., 2021). При этом эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК и модификация гистонов, представляют собой молекулярный интерфейс между геномом и

средой, обратимо регулируя экспрессию генов (Yuan M. et al., 2023). Это открывает принципиально новую терапевтическую возможность: создание препаратов, способных корректировать не генетическую предрасположенность, а ее патологическую реализацию на уровне экспрессии генов (Grezenko H. et al., 2023).

Важным направлением современных исследований является переход от симптоматической терапии к патогенетической и этиологической. Это особенно актуально для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (Passeri E. et al., 2022) или болезнь Паркинсона (Vijiaratnam N. et al., 2021), где существующие методы лечения преимущественно направлены на купирование симптомов и не способны существенно замедлить развитие патологического процесса. Разработка препаратов с нейропротективными, нейрорегенеративными и модулирующими синаптическую пластичность свойствами может кардинально изменить подход к лечению этих заболеваний, предоставив возможности для эффективной коррекции и восстановления утраченных функций мозга.

Технологии высокопроизводительного скрининга и компьютерного моделирования открыли новые горизонты в более быстром и эффективном поиске потенциальных лекарственных веществ среди миллионов молекул (Phatak S.S. et al., 2009). Высокопроизводительный скрининг позволяет одновременно тестировать огромные библиотеки соединений на предмет их взаимодействия с биологическими мишенями, что значительно ускоряет процесс поиска активных веществ (Aldewachi H. et al., 2021). Программная реализация молекулярного докинга и динамики в сочетании с искусственным интеллектом обеспечивает предсказание фармакодинамических свойств новых соединений, позволяя не только повысить эффективность поиска, но и снизить затраты на проведение экспериментальных исследований (Iqbal D., 2023). В условиях растущей потребности в инновационных лекарственных средствах такой подход становится особенно востребованным.

Немаловажным аспектом исследований нейропсихотропных веществ является преодоление проблемы лекарственной устойчивости, которая становится все более актуальной в психиатрии и неврологии (Howes O.D. et al., 2022; Perucca E. et al., 2023). Известно, что у многих пациентов с психоневрологическими расстройствами со временем наблюдается снижение терапевтического отклика на стандартную терапию. Препараты с новыми механизмами действия, в частности, модуляторы нейропластичности (Lea H., 2022), регуляторы иммунной активности (Bennett F.C., 2019) или эпигенетические модификаторы (Panariello F. et al., 2022), могут помочь решить данную проблему.

Особое внимание в исследованиях уделяется поиску веществ, способных модулировать взаимодействие между нервной и иммунной системами. Растущее признание роли нейровоспаления в развитии психоневрологических расстройств открывает перспективы для

разработки препаратов, воздействующих на нейроиммунные механизмы, что может стать новым направлением в терапии таких состояний (Малашенкова И.К. и др., 2021; Guo B., 2023).

Изучение нейроактивных соединений также ведется в направлении создания препаратов с улучшенными фармакокинетическими свойствами. Разработка веществ с более продолжительным периодом действия позволяет сократить частоту приема лекарственных средств, что особенно важно для пациентов с хроническими заболеваниями, и может повысить терапевтическую комплаентность. Кроме того, разработка лекарственных форм, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер более свободно, позволит улучшить доставку действующих веществ в центральную нервную систему, а также снизить риск периферических побочных явлений (Han L., 2021; Teleanu R.I. et al., 2022).

Одной из приоритетных задач современной психофармакологии является создание препаратов с улучшенным профилем безопасности. Многие существующие психотропные средства обладают серьезными побочными эффектами, включая когнитивные нарушения (Bruijnen C.J.W.H. et al., 2019), увеличение массы тела (Alonso-Pedrero L. et al., 2019), нарушения метаболизма (Ventriglio A. et al., 2019) и кардиоваскулярные риски (Zivkovic S. et al., 2019), что может существенно снижать качество жизни пациентов и приводить к отказу от лечения (Dong M. et al., 2019). Поиск новых соединений с минимальным количеством нежелательных эффектов является важным направлением исследований, способным существенно изменить подход к терапии психоневрологических расстройств.

Таким образом, поиск и исследование новых веществ для лечения психоневрологических заболеваний представляют собой актуальную и сложную задачу, требующую междисциплинарного подхода и значительных ресурсов. Разработка новых терапевтических средств с улучшенным профилем безопасности, фармакокинетическими характеристиками и механизмами действия имеет потенциал значительно изменить подход к лечению различных психоневрологических расстройств, обеспечивая пациентам более эффективную и безопасную терапию.

1.3. Виртуальный скрининг

Виртуальный скрининг рассматривается как один из ключевых инструментов поиска и изучения нейропсихотропных средств, позволяющий выполнять анализ обширных баз данных химических соединений, что ускоряет и оптимизирует отбор потенциально активных веществ (Dorahy G. et al., 2023). Применение методов компьютерного моделирования и машинного обучения обеспечивает априорное прогнозирование взаимодействия малых молекул с конкретными биологическими мишенями (рецепторами, ферментами и др.), вовлеченными в патогенез психоневрологических заболеваний. Это сужает круг кандидатов для последующих

экспериментальных исследований и существенно снижает совокупные трудозатраты и издержки на разработку лекарственных средств.

В современной практике выделяются два базовых подхода к виртуальному скринингу: основанный на структуре белка (SBVS, Structure-Based Virtual Screening) и основанный на лиганде (LBVS, Ligand-Based Virtual Screening). В ряде работ дополнительно выделяются скрининг, основанный на фрагментах (FBVS, Fragment-Based Virtual Screening), и гибридные стратегии, которые учитывают структуры как белка, так и лиганда (Vázquez J. et al., 2020).

Подход SBVS (мишень-ориентированный виртуальный скрининг) направлен на предсказание оптимального пространственного взаиморасположения лиганда и биологической мишени с образованием стабильного комплекса. Методологическая основа SBVS включает анализ трехмерной структуры мишени и последующую оценку аффинности связывания лиганда с учетом характеристик межмолекулярных взаимодействий.

К числу основных методов SBVS относятся молекулярный докинг, моделирование фармакофоров на основе структуры мишени и молекулярная динамика. При сравнительной оценке методов SBVS существенное значение имеет способность корректно предсказывать белок-лигандные взаимодействия с учетом возможных конформационных изменений белка, индуцируемых связыванием. Классические программные пакеты для докинга (GOLD, Glide, DOCK, FlexX) имеют ограничения при моделировании таких лиганд-индуцированных конформационных перестроек белка (Maia E.H.B. et al., 2020). Во многих реализациях учитывается подвижность только лиганда при фиксированной конформации рецептора; такой подход сводится к автоматическому перебору конформационно-ориентационных состояний лиганда в сайте связывания с последующим скорингом (Kokh D.B. et al., 2011; Amaro R.E. et al., 2018). Наиболее перспективными являются методы, учитывающие конформационную вариабельность как лиганда, так и рецептора. К числу решений данного класса относится технология Induced Fit Docking (IFD, Schrödinger). Процедура IFD включает семплирование различных конформаций молекул с целью выявления оптимальной конфигурации, а оценка осуществляется посредством скоринговых функций с выбором наилучших поз (Miller E.B. et al., 2021). Далее под термином «гибкий докинг» в настоящей работе подразумевается метод IFD.

Подход LBVS опирается на анализ лигандов с установленной биологической активностью с целью идентификации в виртуальных библиотеках структурных аналогов, предположительно обладающих сходным фармакологическим профилем (Oliveira T.A.D. et al., 2023). В рамках LBVS применяются методы сопоставления структурного сходства (2D: графы, фрагменты и скаффолды, отпечатки; 3D: оценка формы и распределения электростатического потенциала). Кроме того, широко используются фармакофорное моделирование и QSAR-подходы (Rudrapal M., 2020). Анализ сходства реализуется через сравнение

молекулярных графов и скаффолдов либо посредством векторного представления молекул (дескрипторы, отпечатки, обучаемые эмбеддинги) с применением стандартных метрик (Gu Y. et al., 2023). Для визуализации и разведочного анализа химического пространства используют методы снижения размерности, такие как метод главных компонент, t-SNE и UMAP (Orlov A.A. et al., 2025).

В парадигме FBVS в качестве исходных элементов используются малые фрагменты (молекулярная масса ≤300 Да) (Wang L. et al., 2022), способные слабо, но специфически связываться с активными участками белка. По итогам первичного скрининга фрагменты-лидеры подвергаются целенаправленной оптимизации с наращиванием аффинности и селективности, после чего могут комбинироваться для конструирования полноразмерных соединений-кандидатов (Bon M. et al., 2022).

Гибридные подходы к виртуальному скринингу включают, в частности, хемогеномные методы с применением машинного обучения и протеохемометрическое моделирование. В рамках хемогеномного подхода для исследования взаимодействий «лиганд-мишень» используются методы сетевой инференции (network-based inference), графовые методы на основе сходства, алгоритмы случайного блуждания, которые учитывают топологию ассоциативных графов «соединение-белок». Протеохемометрическое моделирование представляет собой более гибкий подход, интегрирующий дескрипторы лигандов и белков с перекрестными дескрипторами взаимодействия, что в сочетании с методами машинного обучения обеспечивает возможность как интерполяции известных данных, так и экстраполяции при изучении новых классов лигандов и биологических мишеней (Moumbock A.F.A.et al., 2019).

Прогресс в области искусственного интеллекта и машинного обучения в настоящее время вносит значительный вклад в преодоление методологических и технологических ограничений разработки новых нейротропных лекарственных средств (Мелерзанов А.В., 2017; Mak K.K. et al., 2024). Интеллектуальные системы обеспечивают выявление скрытых закономерностей в биомедицинских данных, улучшают понимание молекулярных механизмов неврологических расстройств и ускоряют переход перспективных соединений в клиническую практику (Gautam V. et al., 2023). Одна из современных классификаций методов виртуального скрининга отдельно выделяет (Oliveira T.A.D. et al., 2023) методы машинного обучения, подразделяя их на подходы, основанные на признаках (feature-based), и подходы, не требующие предварительного извлечения признаков (feature-free). Среди алгоритмов машинного обучения методы глубокого обучения (DL) демонстрируют высокую эффективность при анализе многомерных биомедицинских данных, получаемых из открытых баз (ChEMBL, PubChem и др.). В зависимости от постановки задачи широко используются сверточные нейронные сети (CNN), рекуррентные нейронные сети (RNN), архитектуры с долговременной краткосрочной

памятью (LSTM) (Dorahy G. et al., 2023).

1.4. Анализ сигналов мозговой активности в фармакологических исследованиях

Биопотенциал-опосредованный подход к поиску и изучению новых нейропсихотропных соединений представляет собой метод фармакологического исследования, основанный на анализе изменений биоэлектрической активности мозга в ответ на введение психоактивных веществ. Исследования в области фармакоэлектроэнцефалографии (фармако-ЭЭГ), которая применяется для оценки терапевтического ответа, продемонстрировали, что отдельные классы психоактивных соединений вызывают специфические изменения в спектральных характеристиках ЭЭГ, что отражает характерное действие этих веществ на центральную нервную систему (Кан А.В. и др., 2021; Придворов Г.В. и др., 2021; Гришина А.Ю. и др., 2023). Этот феномен лег в основу биопотенциал-опосредованного подхода, который не ограничивается применением электроэнцефалографии и стандартными методами анализа биоэлектрических паттернов мозга.

Данный подход применим для анализа как спонтанной, так и вызванной нейронной активности. Спонтанная сетевая активность, формируемая в нейрональных культурах, может использоваться в качестве модельной системы и при этом не требует предварительной реконструкции сложных механизмов нейронного кодирования, лежащих в основе мозговых функций. При анализе вызванной активности специфичность выявления эффектов может быть повышена за счет контролируемого варьирования факторов (например, параметров сенсорной стимуляции, фармакологических модуляторов и условий культивирования), определяющих реакцию нейронов на исследуемые химические соединения.

Извлечение признаков из ЭЭГ-сигналов является ключевым этапом анализа биоэлектрической активности мозга. Цель данного процесса состоит в выделении информативных характеристик, которые позволяют классифицировать, количественно оценивать или интерпретировать нейрональную активность под влиянием различных факторов, включая фармакологические вмешательства. Одним из наиболее широко используемых методов является спектральный анализ, включающий быстрое преобразование Фурье (FFT) и вейвлет-анализ. FFT применяется для разложения сигнала на его частотные компоненты, что позволяет оценить мощность различных диапазонов (дельта, тета, альфа, бета и гамма). Этот метод особенно полезен для изучения влияния психотропных веществ, которые вызывают характерные изменения в спектральных характеристиках ЭЭГ (Каркищенко Н.Н., 2019). Вейвлет-анализ, в отличие от FFT, обладает высокой временно-частотной разрешающей способностью, что делает его эффективным для анализа динамических изменений, связанных с быстрыми и кратковременными событиями в ЭЭГ-сигнале (Yilmaz M., 2021).

Дополнительные методы извлечения признаков включают расчет параметров Хьорта, которые позволяют количественно оценить сложность и вариативность ЭЭГ-сигнала. Параметры Хьорта (мобильность, активность и сложность) служат индикаторами степени изменчивости сигнала и могут использоваться для классификации состояний мозга, например, при введении различных фармакологических средств (Dautov C.P. et al., 2021).

Когерентный анализ позволяет оценивать синхронизацию между разными участками мозга. Когерентность, измеряемая как функция частоты, отражает функциональные связи между областями мозга, что является ценным признаком для изучения влияния веществ на нейронную коннективность (Prieto-Alcántara M. et al., 2023).

Недавние разработки в области машинного обучения и глубоких нейронных сетей привели к использованию методов, позволяющих извлекать признаки непосредственно из необработанных ЭЭГ-сигналов без предварительной фильтрации или удаления артефактов. Например, конволюционные нейронные сети (CNN) способны автоматически выделять важные пространственно-временные паттерны в данных, что значительно повышает точность классификации и идентификации механизмов действия психоактивных веществ. Так, одно из исследований (Kumar P. et al., 2022) показало, что применение CNN позволяет достигнуть точности классификации электрофизиологических сигналов до 92% в зависимости от вводимого вещества. Другие исследователи (Panganiban E.B. et al., 2021) также пришли к выводу о высокой эффективности глубокого обучения, продемонстрировав точность бинарной классификации до 98,73% и 97,33% для пяти классов веществ. Это подтверждает высокий потенциал архитектуры CNN для извлечения признаков фармакологического действия.

Дополнительные исследования подтверждают перспективность использования нейросетевого анализа сигналов с мультиэлектродными матрицами для поиска и идентификации нейроактивных веществ (Bryson A. et al., 2022). Технология глубокого обучения рассматривается как способ повышения селективности неферментативных электрохимических биосенсоров, что особенно актуально в случаях работы со сложными мультианалитами (Zhou Z. et al., 2022). Ряд исследований (Zhao Y. et al., 2019; Wijeyesakere S.J. et al., 2020; Deng S. et al., 2023; Xu S. et al., 2023) подтвердил эффективность нейросетевого анализа данных, полученных с микроэлектродных матриц, при оценке фармакологических действий различных соединений.

Таким образом, интеграция электрофизиологических методов и современных алгоритмов глубокого обучения позволяет получить более эффективную и точную систему прогнозирования фармакологической активности соединений. Это дает возможность более глубокого понимания нейропсихотропного действия веществ и открывает новые перспективы в исследовании и разработке психотропных средств.

1.5. G-белок смещенные агонисты каппа-опиоидных рецепторов

Каппа-опиоидные рецепторы (KOP) представляют собой один из подтипов опиоидных рецепторов, относящихся к семейству GPCR (G-protein coupled receptors). Данная группа рецепторов традиционно рассматривается как мишень для фармакологических вмешательств, направленных на модуляцию болевой чувствительности, регуляцию эмоциональных состояний и ряда физиологических процессов, связанных с нейромедиаторными системами (Beck T.C. et al., 2019; Khan M.I.H. et al., 2022). Каппа-опиоидные рецепторы широко экспрессируются в центральной и периферической нервной системе, а также в некоторых периферических тканях, что объясняет их многофункциональность. Несмотря на то, что мю-опиоидные рецепторы остаются наиболее востребованной мишенью в клинической практике при лечении болевых синдромов (Herman T.F. et al., 2024), селективные агонисты KOP также представляют интерес для исследования, особенно в контексте разработки анальгетиков с меньшим потенциалом злоупотребления и более благоприятным профилем побочных эффектов (Manglik A. et al., 2016; Liu S.S. et al., 2019). Однако агонистическая KOP-активность часто ассоциируется с рядом негативных реакций, включая седативный эффект, дисфорию, психотомиметические явления и возможное влияние на когнитивные функции (Günther T. et al., 2018; Santino F., 2023). На протяжении последних десятилетий большое внимание уделяется разработке так называемых смещенных агонистов, способных избирательно активировать определенные пути внутриклеточной сигнализации (Seyedabadi M. et al., 2019; Nagase H., 2020). В частности, речь идет о G-белок смещенных агонистах каппа-опиоидных рецепторов, которые отличаются преимущественной активацией путей, связанных с G-белками, избегая при этом избыточной активации β-аррестин-зависимых каскадов (Ho J.H. et al., 2018; Faouzi A. et al., 2020). Подобный подход к селективному модулированию внутриклеточных сигналов позволяет снизить выраженность нежелательных эффектов и расширить терапевтическое окно применения KOP-агонистов.

С молекулярной точки зрения, каппа-опиоидные рецепторы характеризуются трансмембранной топологией, включающей семь α-спиральных доменов. Связывание с лигандом индуцирует конформационные перестройки в структуре рецептора. Данные изменения позволяют рецептору инициировать обмен гуаниновых нуклеотидов на ассоциированном с ним гетеротримерном G-белке, преимущественно относящемуся к ингибиторному подтипу Gαi/o. Диссоциация ГДФ от Gα-субъединицы с последующим связыванием ГТФ, в свою очередь, вызывает распад гетеротримера на активные компоненты: Gα-ГТФ и димер Gβγ (Dhaliwal A., 2023). Высвобожденные субъединицы модулируют активность ряда внутриклеточных эффекторных систем. Ключевыми последствиями G-белковой сигнализации KOP являются: ингибирование аденилатциклазы, приводящее к

снижению концентрации циклического АМФ; активация G-белок-связанных калиевых каналов внутреннего выпрямления, вызывающая гиперполяризацию мембраны и снижение возбудимости нейронов; а также подавление активности потенциал-зависимых кальциевых каналов, что ограничивает высвобождение нейромедиаторов из пресинаптических терминалей. Совокупность данных эффектов лежит в основе анальгетического потенциала KOP-агонистов. Параллельно с G-белковым путем, активированный GPCR рецептор рекрутирует цитозольные белки β-аррестины (Bruchas M.R. et al., 2006). Реализуемые посредством β-аррестинов функции многогранны и включают не только гомологичную десенситизацию рецептора и его последующую интернализацию через клатрин-опосредованный эндоцитоз, но и запуск независимых сигнальных каскадов. В частности, β-аррестин выступает в роли белка-адаптера (скаффолда) для компонентов митоген-активируемых протеинкиназных (MAPK) путей, таких как ERK1/2 и JNK (Perry N.A. et al., 2019; Smith J.S. et al., 2021; Kahsai A.W. et al., 2023). Именно активация данных β-аррестин-зависимых сигнальных путей рассматривается в качестве молекулярной основы для развития дисфории, седации и формирования толерантности (Valentino R.J., 2018).

Исследования в области селективного модулирования KOP получили дополнительный импульс благодаря прогрессу в понимании структурной биологии рецепторов GPCR (Manglik A. et al., 2020). Анализ кристаллических структур каппа-опиоидного рецептора показал, что различия в конфигурации связывающего кармана и взаимодействие лиганда с определенными аминокислотными остатками могут приводить к альтернативным конформационным состояниям рецептора, что, в свою очередь, отражается на степени рекрутирования G-белков или β-аррестина (Lešnik S. et al., 2021). Исходя из этого, может быть выполнена молекулярная оптимизация потенциальных агонистов для достижения предпочтительной конформации рецептора (Mores K.L. et al., 2019). Этот процесс усложняется тем, что в действительности сигнальная «смещенность» может зависеть не только от лиганда, но и от типа экспрессируемых G-белков и β-аррестинов в конкретных клеточных популяциях, а также от других условий, включая вид и тканеспецифические особенности. Тем не менее, общая стратегия построения G-белок смещенных агонистов KOP заключается в выявлении функциональных групп, способствующих преимущественной стабилизации G-белок-активирующей конформации рецептора, и одновременно ослабляющих β-аррестин-зависимые механизмы.

Традиционные агонисты KOP, такие как сальвинорин A и U-50488, проявляют выраженные анальгетические эффекты, однако их применение ограничено из-за развития тяжелых побочных реакций, включающих дисфорию, седацию и психотомиметические эффекты (French A.R., 2022), связанных с активацией β-аррестин-зависимого сигналинга. Кроме того, сообщается о потенциальных кардиоваскулярных осложнениях и быстром развитии

толерантности, что также препятствует их внедрению в клиническую практику (Ventura L. et al., 2018).

Одним из первых смещенных агонистов КОР, привлекших внимание исследователей, стал RB-64. Это соединение показало значительную анальгетическую активность в моделях на грызунах, а также вызывало меньшую седацию и дисфорию по сравнению с классическими агонистами (Mores K.L. et al., 2019).

Налфурафин (TRK-820) является первым клинически одобренным G-белок смещенным агонистом КОР, используемым в Японии для лечения рефрактерного зуда у пациентов с хронической болезнью почек (Zhou Y. et al., 2022). Его эффективность и безопасность обусловлены способностью предпочтительно активировать G-белковые пути, что приводит к достижению терапевтического эффекта без выраженных психотомиметических побочных реакций. Клинические испытания налфурафина подтвердили его потенциал как эффективного и безопасного средства при длительном применении.

Месилат сальвинорина B является производным сальвинорина, модифицирован путем введения метансульфонатной группы, что улучшает его фармакокинетические свойства, повышая стабильность и биодоступность. Исследования показали, что месилат сальвинорина B обладает выраженным анальгетическим действием в различных моделях боли у животных. Его применение сопровождалось меньшей выраженностью поведенческих изменений, таких как седация и дисфория, по сравнению с сальвинорином A (French A.R., 2022).

HS665 – синтетическое соединение, целенаправленно разработанное для смещения КОР-сигналинга в сторону G-белковых путей. HS665 продемонстрировало высокую эффективность в моделях хронической боли, подавляя ноцицептивные реакции без существенных побочных эффектов (Puls K., 2024).

6'-GNTI является производным налтриндола, модифицированным путем введения гуанидиновой группы в положение 6'. Данное соединение характеризуется высокой селективностью и аффинитетом к КОР, действуя как G-белок смещенный агонист. Исследования на животных моделях подтвердили выраженные анальгетические свойства 6'-GNTI в тестах острой и хронической боли, при этом наблюдалось ослабление побочных эффектов, характерных для несмещенных агонистов КОР (Rives M.L. et al., 2012). Кроме того, 6'-GNTI продемонстрировал потенциал в купировании зуда, что расширяет спектр его возможного терапевтического применения (Cowan A. et al., 2021).

Дифеликефалин (CR845) представляет собой пептидный агонист КОР, имеет ограниченную способность проникновения через гематоэнцефалический барьер благодаря высокой гидрофильности молекулы, что обеспечивает его преимущественно периферическое действие (Inan S., 2020). Дифеликефалин прошел клинические испытания и был одобрен

Управлением по контролю за продуктами и лекарствами в 2021 году для лечения умеренного и тяжелого зуда у взрослых пациентов с хронической болезнью почек, находящихся на гемодиализе (Deeks E.D., 2021; Wala K., 2022). В клинических исследованиях III фазы дифеликефалин продемонстрировал значительное снижение интенсивности зуда по сравнению с плацебо, что улучшало качество жизни пациентов. Побочные эффекты при его применении были минимальными и включали лишь незначительные желудочно-кишечные расстройства.

G-белок смещенные агонисты каппа-опиоидных рецепторов представляют значительный интерес не только как потенциальные анальгетики, но и как перспективные средства при различных психоневрологических состояниях, включая лечение депрессии, тревожных расстройств и зависимости от психоактивных веществ (Khan M.I., 2022). Хотя гиперактивация КОР может усиливать негативный аффект, при парциальном агонизме или смещенном сигналинге эти рецепторы способны эффективно регулировать процессы, важные для терапии аддиктивных состояний и посттравматических стрессовых реакций (Leconte C., 2022).

Для реализации потенциала G-белок-смещенных агонистов КОР необходимы дальнейшие исследования механизмов, лежащих в основе этого феномена. Несмотря на достигнутый прогресс в понимании структурных детерминант взаимодействия лиганд-рецептор, остаются вопросы относительно конформационной динамики КОР в физиологических условиях. Для углубленного изучения требуются сложные модельные системы, включая микродиализ, опто- и хемогенетические методы, а также передовые методы молекулярной визуализации для отслеживания распределения и активности рецепторов *in vivo*. В частности, для картирования клеток, подвергшихся воздействию агонистов КОР, применяются интегративные биосенсоры типа SPOTIT/SPOTall (Kroning K., 2023). Принцип их действия основан на рекрутировании нанотела Nb39 к активированному рецептору, что инициирует созревание флуорофора cpGFP и приводит к эмиссии устойчивого флуоресцентного сигнала. Параллельно развиваются вычислительные подходы, такие как молекулярный докинг (Ellis C.R. et al., 2018), молекулярная динамика (Saleh A.H. et al., 2021) и квантовохимические расчеты (Scott C.E. et al., 2022), которые помогают прогнозировать и оптимизировать смещенное взаимодействие на структурном уровне, выявляя ключевые точки для модификации соединений.

Хотя селективная активация G-белков потенциально снижает риск некоторых побочных эффектов, нельзя исключать другие нежелательные последствия, связанные с изменениями нейромедиаторной регуляции при длительном применении и накоплении метаболитов. Даже при смещении баланса в пользу G-белковых путей, чрезмерная активация КОР в определенных областях мозга (например, в миндалине или прилежащем ядре) может привести к нежелательным эффектам. В связи с этим разработка соединений с парциальной

агонистической активностью, обеспечивающих дозозависимую регуляцию активации, представляется важной стратегией.

Таким образом, исследования в области G-белок-смещенных агонистов КОР являются частью актуального направления в фармакологии, связанного с переходом от неселективной модуляции рецепторных систем к тонкой регуляции специфических внутриклеточных сигнальных каскадов. Дальнейшее развитие данной области предполагает реализацию комплекса междисциплинарных задач. Ключевое значение имеет углубление фундаментальных знаний о структурно-динамических основах функционирования КОР, что позволит осуществлять целенаправленное проектирование лигандов, стабилизирующих G-белок-активирующую конформацию рецептора.

1.6. Фармакологические мишени в лечении расстройств психотического спектра

Современное понимание патогенеза психотических расстройств строится на многокомпонентной модели, в которой центральное место занимают нейрохимические и нейрофизиологические изменения в ряде структур головного мозга (Ghallab Y.K., 2024). Фармакологические мишени, лежащие в основе лечения психотических расстройств, охватывают широкий спектр нейромедиаторных систем: дофаминергическую, серотонинергическую, глутаматергическую, ГАМК-ергическую и другие (Lieberman J.A., 2018). Хотя исторически основное внимание уделялось модуляции дофаминергической передачи, более современные исследования показывают, что далеко не все патофизиологические механизмы сводятся к гипер- или гипоактивности дофаминергических путей (Stahl S.M., 2018). Как следствие, развивается представление о многоуровневой дисрегуляции: взаимодействие генетических факторов, дисфункция синаптической пластичности, а также нарушения в системе нейромодуляции приводят к развитию полиморфной клинической картины, требующей комбинированных фармакологических стратегий.

Дофаминовая гипотеза исходит из представления о гиперактивности дофаминергической нейротрансмиссии в мезолимбическом пути и, напротив, о снижении ее активности в мезокортикальных областях, что коррелирует с развитием, соответственно, позитивной и негативной симптоматики при шизофрении (Seeman M.V., 2021). С активацией D_2-рецепторов связывают галлюцинации, бред и прочие формы проявления психоза. На фоне этого понимания были созданы традиционные (типичные) антипсихотики, блокирующие D_2-рецепторы в мезолимбическом тракте. Однако подобное вмешательство нередко сопровождается такими побочными эффектами, как экстрапирамидные расстройства и гиперпролактинемия, поскольку блокада D_2-рецепторов затрагивает также нигростриарный и тубероинфундибулярный пути (McCutcheon R.A. et al., 2019). Важно отметить, что мезокортикальный дофаминергический

тракт проецируется в префронтальную кору головного мозга, где осуществляется реализация высших психических функций, включая исполнительные процессы, планирование и регуляцию поведения. Избыточное ингибирование дофаминовых рецепторов в этой области может приводить к усилению когнитивных нарушений и негативной симптоматики (Conn K.A., 2020).

Впоследствии для снижения риска экстрапирамидной симптоматики и улучшения эффективности лечения были разработаны атипичные антипсихотики (Meltzer H.Y., 2021). Несмотря на то, что их действие по-прежнему связано с влиянием на D_2-рецепторы, эти препараты проявляют выраженную активность в отношении серотониновых рецепторов, в особенности 5-HT_{2A} (Grinchii D., 2020). Предполагается, что именно антагонизм к 5-HT_{2A}-рецепторам опосредует восстановление дофаминергической передачи в префронтальной коре и нигростриарном тракте. Более высокая аффинность к 5-HT_{2A}-рецепторам по сравнению с D_2-рецепторами (характерная для рисперидона (Chopko T.C., 2018), оланзапина (Meftah A.M., 2020), кветиапина (Riedel M. et al., 2007)) способствует снижению выраженности когнитивных и негативных симптомов, а также уменьшает вероятность экстрапирамидных побочных эффектов.

Дополнительная активность некоторых атипичных антипсихотиков в отношении 5-HT_{1A}-рецепторов (например, у зипрасидона (Girard T.D. et al., 2018)) обеспечивает благоприятное влияние на аффективную сферу, способствуя улучшению когнитивных функций и стабилизации настроения. В настоящее время активно ведутся исследования серотонинергических агентов, направленных на отдельные подтипы 5-НТ-рецепторов с целью уменьшения побочных эффектов и улучшения контроля психотических симптомов. К таким средствам относятся антагонисты и/или инверсные агонисты 5-HT_{2A} (в том числе пимавансерин), продемонстрировавшие эффективность при психозах, связанных с болезнью Паркинсона (Cummings, 2014). Кроме того, перспективными являются новые соединения, например, ролуперидон (MIN-101), блокирующий 5-HT_{2A}- и σ_2-рецепторы и исследуемый для терапии негативных симптомов при шизофрении (Davidson M. et al., 2017).

Отмечается, что у многих пациентов эффективность традиционных и даже атипичных антипсихотиков оказывается недостаточной, особенно в отношении негативной и когнитивной симптоматики (Faay M.D.M. et al., 2018; Haddad P.M., 2018). В связи с этим уделяется внимание глутаматергической гипотезе шизофрении (Uno Y., 2019), которая предполагает, что гипофункция NMDA-рецепторов может приводить к нарушениям в формировании и сохранении связей между нейронами, а также к избыточному высвобождению дофамина в мезолимбической системе. Экспериментальные вещества, нацеленные на усиление NMDA-зависимой передачи (например, частичные агонисты глицинового сайта или позитивные аллостерические модуляторы), пока не получили широкого распространения, однако результаты

ряда клинических испытаний демонстрируют возможность улучшения некоторых аспектов когнитивной функции и ослабления негативных симптомов (Pei J.C. et al., 2021).

Параллельно изучаются пути модуляции метаботропных глутаматных рецепторов (mGluRs), которые участвуют в регуляции выброса как глутамата, так и других нейротрансмиттеров (Stansley B.J., 2018). Агонисты или позитивные модуляторы отдельных подтипов mGluRs могут оказать нормализующее воздействие на дофаминергическую и серотонинергическую передачи, уменьшая выраженность психотической симптоматики. Так, предположительно, агонисты mGluR2/3 способны влиять на выброс глутамата, что может стабилизировать гиперактивные нейронные сети (Wolf D.H. et al., 2022). Несмотря на то, что эти направления еще не реализованы в клинической практике, сама по себе глутаматергическая гипотеза открыла новые горизонты в исследовании многофакторных патогенетических механизмов шизофрении и смежных психотических расстройств.

Немаловажной признана роль гамма-аминомасляной кислоты, которая является основным тормозным медиатором в центральной нервной системе (Xu M.Y. et al., 2018). При шизофрении нарушение деятельности ГАМК-ергических интернейронов в коре мозга может приводить к гиперактивации пирамидных нейронов, что вносит вклад в развитие когнитивного дефицита и психотических симптомов. Терапевтические подходы, нацеленные на модуляцию $ГАМК_А$- и $ГАМК_В$-рецепторов, рассматриваются как возможный способ коррекции подобных состояний. Хотя клинические данные о влиянии препаратов, повышающих ГАМК-ергическую активность (например, бензодиазепинов (Dubovsky S.L., 2022)), на психотические состояния противоречивы, их роль в снижении тревожности и возможном косвенном улучшении симптомов остается значимой, особенно в сочетании с нейролептиками.

Существенное внимание в фармакологических исследованиях уделяется холинергической системе, в частности, мускариновым и никотиновым рецепторам (Brannan S.K. et al., 2021). Известно, что никотиновая зависимость встречается у больных шизофренией с гораздо большей частотой, чем в общем населении, что указывает на возможную компенсаторную роль никотина в реализации познавательных функций и фильтрации сенсорной информации (Ding J.B., 2021). Разрабатываются препараты, нацеленные на модуляцию α_7-никотиновых рецепторов, которые могут облегчать когнитивные и негативные симптомы без риска развития зависимости (Tregellas J.R., 2019). Мускариновые рецепторы, в свою очередь, участвуют в регулировании внимания, памяти и эмоциональной сферы. Поэтому селективные агонисты отдельных подтипов мускариновых рецепторов (M_1, M_4) рассматриваются как потенциальные средства для коррекции дисфункций, ассоциированных с психотическими расстройствами, с более благоприятным профилем безопасности по сравнению с препаратами, имеющими неспецифическое антихолинергическое действие (Erskine D. et al., 2019).

Помимо нейрохимических мишеней, повышенный интерес вызывают нейротрофические факторы, которые регулируют процессы нейрогенеза, роста и пластичности нейронов (Di Carlo P. et al., 2019). Среди них особое место занимает нейротрофический фактор мозга (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), нарушение синтеза и секреции которого ассоциировано с рядом психических расстройств, включая депрессию и шизофрению. Предполагается, что у части пациентов с психозами снижена экспрессия BDNF и его рецепторов, что может приводить к нарушениям синаптической пластичности и, как следствие, к ухудшению когнитивных функций и росту негативной симптоматики. Предпринимаются попытки разработать препараты, повышающие уровень BDNF или модулирующие его сигнальные пути, однако прямое введение нейротрофических факторов пока не получило распространения, главным образом из-за проблем с доставкой молекул к мишеням и отсутствия достаточных клинических данных о безопасности (Han M., 2020).

В последнее десятилетие ряд работ сосредоточен на воспалительной гипотезе психозов, где центральное место отводится цитокинам и системным факторам воспаления (Trovão N. et al., 2019; Misiak B. et al., 2021). Выявлена ассоциация между повышенными уровнями провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNF-α) и тяжестью состояния при психозах (Dunleavy C. et al., 2022). Некоторые противовоспалительные агенты, в частности, ингибиторы циклооксигеназы (ибупрофен (Jeppesen R. et al., 2020), целекоксиб (Shalbafan M. et al., 2018)) и модуляторы иммунных процессов, успешно применялись в качестве дополнения к антипсихотической терапии. Тем не менее фармакологические мишени, связанные с иммуномодуляцией, остаются предметом дальнейших исследований, поскольку психотические расстройства крайне гетерогенны, и не у всех больных присутствуют явные признаки воспаления. Кроме того, потенциальный риск побочных эффектов на фоне иммуномодуляции ограничивает широту применения этих препаратов.

Говоря о многообразии рецепторных мишеней и путей регуляции, важно понимать, что универсального препарата, охватывающего все аспекты патогенеза психозов, не создано. Несмотря на сложность этой задачи наблюдается рост интереса к стратегии мультитаргетной терапии, подразумевающей создание лекарственных средств, способных модулировать сразу несколько рецепторных систем, либо комбинированное применение препаратов с взаимодополняющими механизмами действия. К таким относятся, к примеру, новые производные, сочетающие в себе антагонизм к D_2- и 5-HT_{2A}-рецепторам с частичной агонистической активностью в отношении 5-HT_{1A}-рецепторов, а также препараты, которые одновременно воздействуют на серотониновую, норадреналиновую и дофаминовую системы (Lobo M.C. et al., 2022). В дополнение к этому, ведутся исследования модуляторов рецепторов

нейропептидов (субстанции P, нейрокинина) (Rodríguez B. et al., 2020), каннабиноидных рецепторов (Davies C., 2019) и других мишеней.

Персонализированная медицина, опирающаяся на анализ биомаркеров, генетических данных и функциональной коннективности мозга, призвана сделать назначение терапии более точным и эффективным для каждого конкретного пациента (Abi-Dargham A. et al., 2023). Диагностика и выбор препаратов пока во многом базируются на клинической картине и эмпирическом подборе, но развитие методов нейровизуализации и биохимических технологий постепенно расширяет возможности стратификации пациентов, открывая путь к дифференциальному подходу. Например, при выявлении выраженной глутаматергической дисрегуляции можно рассматривать дополнительные препараты, направленные на коррекцию NMDA-рецепторной активности, а при признаках воспалительного компонента – дополнить терапию противовоспалительными средствами (Wu Q. et al., 2021; Çakici N. et al., 2019).

Следует отметить, что психофармакология не ограничивается прямым воздействием на рецепторные системы; все большую популярность набирает концепция эпигенетической регуляции. Известно, что ряд психотропных средств способен влиять на экспрессию генов путем модификации гистонов и метилирования ДНК (Marques D. et al., 2025), что, в свою очередь, приводит к изменениям метаболизма ключевых нейромедиаторов и параметров синаптической передачи. Исследуются препараты класса ингибиторов гистондеацетилаз, которые потенциально могут модулировать экспрессию генов и опосредованно влиять на функционирование нейрональных сетей, вовлеченных в психотические и когнитивные расстройства (Chakravarty S. et al., 2021). Однако этот подход требует более тщательного изучения вопроса безопасности, поскольку эпигенетическое вмешательство может затронуть множество генов, не связанных напрямую с патогенезом психоза, что сопряжено с риском развития нежелательных эффектов.

Отдельной темой для обсуждения является влияние гормональных факторов и эндокринных нарушений на психотические состояния (Pillinger T. et al., 2019). Гиперактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и сопутствующая ей избыточная секреция кортизола тесно ассоциированы с процессами в мозге, в частности с модуляцией синаптической пластичности и индукцией нейровоспалительных реакций (Sharan S., 2024). В исследованиях установлено, что у некоторых пациентов с психотическими расстройствами наблюдаются гиперкортицизм или нарушение ритма секреции кортизола, что усугубляет клиническую картину (Chen Y. et al., 2020). В качестве лечебных средств рассматривается использование ингибиторов стероидогенеза (например, кетоконазола) или антагонистов глюкокортикоидных рецепторов, которые могут смягчить выраженность психотических симптомов и улучшить когнитивные функции (Frau R., 2019).

Исследования гормональных аспектов затрагивают также дисбаланс в секреции тиреоидных гормонов, гормона роста и половых гормонов. Установлено, что колебания уровня эстрогенов могут влиять на течение психозов, а применение эстрогенсодержащих препаратов в ряде случаев снижает тяжесть психотической симптоматики у женщин в постменопаузе (Seeman M.V., 2021). Подобные наблюдения послужили толчком к исследованиям селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов как вспомогательных средств при терапии психозов (Kulkarni J. et al., 2019). Тем не менее такие подходы все еще находятся на периферии научного внимания, поскольку риски вмешательства в эндокринную систему относительно велики, а доказательная база ограничена отдельными пилотными исследованиями.

Внедрение новых лекарственных средств и расширение спектра фармакологических мишеней не решает полностью проблему побочных эффектов. Хотя атипичные антипсихотики более безопасны в отношении экстрапирамидных нарушений, они часто вызывают патологический рост массы тела, изменения уровня глюкозы и липидов в крови, что в долгосрочной перспективе повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний. При разработке новых препаратов ученые стремятся к более селективному воздействию на патологические механизмы с минимальным вовлечением систем, отвечающих за регуляцию метаболизма и моторных функций (Lobo M.C. et al., 2022).

Подводя итог, можно констатировать, что фармакологические мишени в лечении психотических расстройств вышли далеко за рамки воздействия на D_2-рецепторы, что лежало в основе фармакологии первых антипсихотиков. Сегодня рассматриваются не только дофаминовые и серотониновые рецепторы, но и глутаматергические, ГАМК-ергические, холинергические мишени, пути нейротрофических факторов и иммунная регуляция, а также различные гормональные оси. Каждая из этих систем открывает новые возможности и одновременно ставит перед исследователями задачи по обеспечению безопасности и повышению эффективности терапии. В ближайшие годы, по всей видимости, продолжится разработка препаратов, применяемых с учетом индивидуальных биологических особенностей пациента. Изучение соединений, влияющих на 5-HT_{2A}-рецепторы, вызывает особый интерес в контексте разработки более селективной и безопасной фармакотерапии психотических расстройств (Kantrowitz J.T., 2020). Воздействие на данную мишень может способствовать устранению не только позитивных, но и негативных симптомов, а также когнитивных нарушений, благодаря способности опосредованно модулировать дофаминергическую и ГАМК-ергическую нейротрансмиссию. Кроме того, мишень представляется перспективной с точки зрения снижения риска развития экстрапирамидных побочных эффектов, присущих типичным антипсихотикам.

1.7. Фармакологические мишени в лечении эпилепсии

Активность большинства современных антиэпилептических препаратов направлена на подавление чрезмерной нейрональной возбудимости, предотвращение распространения патологического возбуждения и стабилизацию нейрональных сетей (Kobayashi K. et al., 2020). К основным мишеням относятся ионные каналы, рецепторы нейромедиаторов, ферменты и межклеточные взаимодействия.

Ионные каналы являются наиболее хорошо изученными фармакологическими мишенями в терапии эпилепсии (Zhang S. et al., 2019). Функционирование различных типов ионных каналов лежит в основе поддержания мембранного потенциала покоя и генерации потенциалов действия. Совокупная деятельность каналов определяет порог возбудимости отдельного нейрона и, в конечном счете, обеспечивает баланс процессов возбуждения и торможения в нейрональных сетях. Быстрые потенциалзависимые натриевые каналы (Nav) обеспечивают инициирование и проведение потенциала действия; в норме они активируются и переходят в состояние инактивации с последующим восстановлением в миллисекундном диапазоне. Дисфункция Nav-каналов, обусловленная генетическими мутациями (каналопатиями) или иными факторами, приводит к нейрональной гипервозбудимости и формированию эпилептиформной активности. Блокаторы натриевых каналов (карбамазепин, фенитоин, ламотриджин) преимущественно стабилизируют инактивированное состояние канала, удлиняя рефрактерный период и подавляя патологически высокочастотную повторную генерацию потенциалов действия (Agbo J. et al., 2023). В клинической практике препараты данного класса эффективны главным образом при фокальных приступах и вторично-генерализованных тонико-клонических судорогах; при идиопатических генерализованных эпилепсиях с абсансами или миоклониями карбамазепин и фенитоин могут усугублять течение заболевания, тогда как ламотриджин может применяться при ряде генерализованных форм с учетом индивидуальной чувствительности (Тадтаева З.Г. и др., 2023).

Потенциалзависимые кальциевые каналы, прежде всего низкопороговые каналы Т-типа (Cav3.1–Cav3.3), рассматриваются как высоковалидная фармакологическая мишень при идиопатической генерализованной эпилепсии с абсансами (Sack A.S., 2022). Эти каналы формируют низкопороговый кальциевый ток в таламических релейных и ретикулярных нейронах; выход из инактивации при гиперполяризации и последующая активация при слабой деполяризации инициируют низкопороговый кальциевый потенциал, запускающий пачечную активность нейронов, что приводит к синхронизации нейрональной деятельности в таламокортикальной сети и формированию характерных для абсансов спайк-волновых разрядов (2,5–4 Гц). Гиперфункция Т-каналов в сочетании с дисбалансом возбуждающих и тормозных синаптических влияний в таламокортикальной системе является патофизиологической основой

абсансных приступов. Соответственно, фармакологическое ингибирование Т-тока препаратами (например, этосуксимидом и, в меньшей степени, вальпроатом натрия) эффективно подавляет данную патологическую активность (Hanrahan B., 2024; Leitch B., 2024).

Калиевые каналы являются важными регуляторами мембранного потенциала и возбудимости нейронов (Gao K. et al., 2022). Их активация вызывает эффлюкс ионов K^+, что приводит к гиперполяризации мембраны, снижению входного сопротивления и уменьшению вероятности инициирования потенциала действия. Особое значение для противоэпилептической терапии имеют потенциал-зависимые каналы семейства Kv7 (кодируемые KCNQ2-KCNQ5), формирующие М-ток в сомато-аксональных отделах нейронов. Положительные аллостерические модуляторы Kv7, в частности ретигабин (эзогабин), сдвигают кривую активации в область более отрицательных потенциалов и усиливают субпороговую K^+-проводимость, стабилизируя мембранный потенциал и подавляя высокочастотную повторную генерацию потенциалов действия. Клинически это сопровождается снижением склонности к формированию и распространению эпилептиформной активности, преимущественно при фокальных приступах (Zahra A. et al., 2023).

Помимо ионных каналов, значительную роль в патогенезе эпилепсии и терапевтических эффектах антиэпилептических средств играет система ГАМК-ергической нейротрансмиссии (Akyuz E. et al., 2021). ГАМК приводит к гиперполяризации нейрональной мембраны и снижению возбудимости клеток. Повышение активности ГАМК-ергической системы рассматривается как один из основных механизмов противосудорожного действия многих антиэпилептических препаратов. Бензодиазепины (например, диазепам, клоназепам) и барбитураты (фенобарбитал) являются модуляторами ГАМК-рецепторов (Brigo F., 2022; Johannessen S.I., 2022). Они связываются с аллостерическими участками рецепторов, усиливая действие эндогенной ГАМК и вызывая увеличение тока ионов хлора в клетки. Это приводит к усилению торможения и снижению вероятности возникновения патологической активности. Однако несмотря на их высокую эффективность в купировании острых приступов, продолжительное использование этих препаратов ограничено из-за риска развития толерантности и зависимости.

Ингибиторы ГАМК-трансаминазы, представителем которых является вигабатрин, вызывают необратимое подавление катаболизма гамма-аминомасляной кислоты, что приводит к повышению ее синаптической концентрации и усилению ГАМК-ергической тормозной нейротрансмиссии (Perucca E. et al., 2023). В клинической практике вигабатрин является препаратом первой линии при инфантильных спазмах, особенно на фоне туберозного склероза (Ramantani G. et al., 2022), а также применяется в качестве адъювантной терапии при фармакорезистентных фокальных приступах (Bresnahan R. et al., 2020).

Глутаматные рецепторы, в частности NMDA и AMPA, являются основными структурами, опосредующими возбуждающую нейротрансмиссию в мозге (Hanada T., 2020). При эпилепсии наблюдается чрезмерная активация глутаматных рецепторов, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов натрия и кальция и последующей активации каскадов, ведущих к развитию патологической гипервозбудимости. Антагонисты глутаматных рецепторов, такие как перампанел и топирамат, оказывают противосудорожное действие, блокируя влияние глутамата и ограничивая возбуждающую передачу (Bai Y.F. et al., 2022). Топирамат также обладает способностью модулировать активность натриевых каналов и усиливать ГАМК-ергическую передачу. Блокада глутаматных рецепторов считается перспективным направлением в лечении эпилепсии, однако применение таких препаратов ограничено из-за возможных побочных эффектов, связанных с подавлением нормальной когнитивной и двигательной функции.

Каппа-опиоидные рецепторы (КОР) представляют собой подтип опиоидных рецепторов, сопряженных с Gi/o-белками, которые широко экспрессируются в структурах центральной нервной системы, включая гиппокамп и другие отделы лимбической системы. Эти рецепторы вовлечены в регуляцию синаптической передачи и играют значимую роль в патогенезе эпилепсии, модулируя процессы нейрональной возбудимости и ограничивая распространение патологической активности. Эндогенная активация КОР динорфином подавляет пресинаптическое высвобождение глутамата, что снижает риск развития эксайтотоксического повреждения нейронов, сопровождающего эпилептические приступы (Loacker S. et al., 2007; Lankhuijzen L.M., 2024). Кроме того, активация КОР запускает внутриклеточные сигнальные каскады PI3K/Akt и Nrf2/HO-1, опосредующие антиоксидантную протекцию и предотвращение нейронального апоптоза в условиях патологической гипервозбудимости (Dai H. et al., 2019).

Экспериментальные исследования на различных моделях эпилепсии *in vitro* и *in vivo* подтверждают перспективность КОР как потенциальной терапевтической мишени. Стимуляция КОР значительно ослабляет судорожную активность (Zangrandi L. et al., 2016; Dai H. et al., 2019), снижает выраженность воспалительных и окислительных реакций, предотвращая гибель нейронов в гиппокампе и других уязвимых структурах мозга (Queenan B.N. et al., 2018; Liu L. et al., 2020). Данные механизмы, лежащие в основе противосудорожных и нейропротективных эффектов КОР, открывают возможности для разработки новых подходов к терапии эпилепсии, в особенности при фармакорезистентных формах.

Ферменты, участвующие в регуляции обмена нейромедиаторов и ионного гомеостаза, также представляют интерес как мишени антиэпилептических препаратов (Ciccone L et al.., 2021). Карбоангидраза, обеспечивающая сохранение кислотно-щелочного баланса в мозге, играет важную роль в модуляции электрической активности нейронов. Ингибиторы

карбоангидразы, такие как ацетазоламид, вызывают изменение pH в нейронах, что приводит к подавлению возбуждающей нейротрансмиссии (Shukralla A.A. et al., 2022). Хотя такие препараты используются относительно редко, они могут быть эффективны при определенных формах эпилепсии, например, катамениальной, которая связана с менструальным циклом (Voinescu P.E., 2019).

Современные исследования все чаще фокусируются на межклеточных взаимодействиях и сигнализации, включая нейровоспаление (Pracucci E. et al., 2021), глиальные клетки (Patel D.C. et al., 2019) и иммунные процессы (Mukhtar I., 2020). Показано, что воспалительные процессы в мозге могут способствовать развитию и хронизации эпилептической активности. Модуляция активности цитокинов, хемокинов и других медиаторов воспаления может представлять собой новый терапевтический подход в лечении фармакорезистентных форм эпилепсии. Кроме того, активность глиальных клеток, таких как астроциты и микроглия, может влиять на баланс между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией, что делает их потенциальной мишенью для медикаментозного воздействия.

Таким образом, фармакологические мишени в лечении эпилепсии включают сложный комплекс структур и процессов, связанных с ионными каналами, нейромедиаторами, ферментами и межклеточными взаимодействиями. Терапевтическая эффективность антиэпилептических препаратов обусловлена их способностью нормализовать биоэлектрическую активность мозга и стабилизировать функциональное состояние нейрональных сетей. Однако до сих пор около трети пациентов с эпилепсией остаются резистентными к медикаментозной терапии, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в этой области и разработки новых стратегий, включая персонализированную медицину, направленную на конкретные патофизиологические механизмы у отдельных пациентов.

1.8. Нейропсихотропные свойства производных бензимидазола

Выбор бензимидазола как базовой структуры для исследования обусловлен высокой биологической активностью производных данного класса, а также высокой лабильностью их свойств при относительно незначительных изменениях химической структуры (Мальцев Д.В. и др., 2023).

В клинической практике применяется множество препаратов из класса производных бензимидазола. Этилтиобензимидазол (2-этилтиобензимидазол) – синтетический актопротектор, обладающий ноотропной, регенеративной, антигипоксической активностью, разработанный в 1970-х кафедрой фармакологии Санкт-Петербургской государственной военно-медицинской академии под руководством профессора Владимира Виноградова

(Заварина Е.Ю. и др., 2023). В 2000-х годах в НИИ фармакологии РАМН им. В.В. Закусова разработан оригинальный селективный анксиолитический препарат афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид) (Воронин М.В. и др., 2021). Дроперидол (3-[1-[4-(4-фторфенил)-4-оксобутил]-3,6-дигидро-2Н-пиридин-4-ил]-1Н-бензимидазол-2-он) оказывает антипсихотическое и седативное фармакологическое действие, блокируя дофаминовые рецепторы (Кушакова К.А., 2022). Пимозид (3-[1-[4,4-бис(4-фторфенил)бутил]пиперидин-4-ил]-1Н-бензимидазол-2-он) является антагонистом дофаминовых, серотониновых и H_1-гистаминовых рецепторов, обладает антихолинергической и адренолитической активностью и применяется для лечения шизофрении, параноидного состояния, психотических и невротических состояний с параноидальными признаками, синдрома Жиля де ла Туретта (Teva Pharmaceuticals USA, 2008). Известен ряд опиоидных анальгетиков, таких как клонитазен (2-[2-[(4-хлорфенил)метил]-5-нитробензимидазол-1-ил]-N,N-диэтилэтанамин), метонитазен (N,N-диэтил-2-[2-[(4-метоксифенил)метил]-5-нитробензимидазол-1-ил]этанамин), изотонитазен (N,N-диэтил-2-[5-нитро-2-[(4-пропан-2-илоксифенил)метил]бензимидазол-1-ил]этанамин) (Mueller F. et al., 2021; Kozell L.B. et al., 2024).

Бензимидазолы проявляют аффинитет к широкому спектру мишеней центральной нервной системы: рецепторам, ферментам и белковым комплексам. Производные этого класса способны модулировать гистаминергическую, серотонинергическую, адренергическую, дофаминергическую и ГАМК-ергическую передачу, влиять на глутаматергические механизмы и обратный захват моноаминов, что определяет разнообразие их психоактивных эффектов (Черетаев И.В. и др., 2017).

Ведется разработка производных бензимидазола с противовоспалительным действием. Получены соединения, которые способны ингибировать циклооксигеназу, взаимодействуют с TRPC (семейство каналов с транзиторным рецепторным потенциалом), каннабиноидными рецепторами, брадикининовыми рецепторами, специфическими цитокинами и протеинами, активирующими 5-липоксигеназу, что характеризует их как соединения с потенциальным противовоспалительным и анальгетическим эффектом (Brishty S.R. et al., 2021; Veerasamy R. et al., 2021). Также у некоторых производных бензимидазола была обнаружена высокая аффинность к PPARγ (Goebel M. et al., 2010) и способность подавлять экспрессию фактора некроза опухоли-альфа (Chen G. et al., 2012).

Производные бензимидазола на протяжении многих лет исследовались на предмет антиоксидантной активности (Спасов А.А. и др., 2019). В ряду данных соединений обнаружены вещества, способные ингибировать продукцию пероксида водорода (Bellam M. et al., 2017;

Anastassova N. et al., 2020). Кроме того, при оценке антиоксидантных свойств в модели на гепатоцитах крыс с использованием трет-бутилгидропероксида было показано, что они проявляют статистически значимый антиоксидантный эффект, сравнимый по величине с кверцетином (Anastassova N.O. et al., 2018).

Имеются данные о перспективных производных бензимидазола, которые являются селективными ингибиторами фосфодиэстеразы I (Khan K.M. et al., 2012), а также проявляют антагонизм в отношении рецептора нейропептида Y (Tamura Y et al.., 2012). Эти мишени имеют высокий потенциал с точки зрения лечения различных нейродегенеративных заболеваний.

Синтезированы производные бензимидазола – ингибиторы N-концевых киназ c-Jun (JNK3), что может представлять интерес в лечении заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (Kim M.H. et al., 2013). У некоторых производных бензимидазола выявлена способность ингибировать ацетилхолинэстеразу, бутирилхолинэстеразу и аспартатную протеазу BACE1, наиболее известную своим участием в образовании бета-амилоида (Zhu J. et al., 2013).

1.8.1. ГАМК-рецепторы

В экспериментах *in vitro* (радиолигандный анализ) было показано, что анксиолитическое действие фабомотизола (5-этокси-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазола дигидрохлорид) реализуется через активацию сигма-1 рецепторов (Voronin M.V. et al., 2021). Это приводит к стабилизации активности $ГАМК_А$-рецепторного комплекса в условиях стресс-индуцированной дисфункции, подтверждая опосредованную ГАМК-ергическую природу анксиолитического действия данного бензимидазольного производного.

Были синтезированы новые производные 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-a]бензимидазола в качестве потенциальных анксиолитических и анальгетических агентов (Maltsev D.V. et al., 2021). В процессе фармакологического скрининга с использованием тестов «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле» было установлено, что соединение 3b, содержащее фторфенильный заместитель, проявляет наиболее выраженные анксиолитические свойства, статистически значимо превосходящие показатели контрольной группы и сопоставимые с эффектом референсного препарата диазепама. Анальгетическая активность исследуемых соединений оценивалась в экспериментальных моделях отдергивания хвоста и горячей пластины в сравнении с буторфанолом. Наибольшую анальгетическую активность продемонстрировали производные с (4-фторфенил)ацетамидным (2b) и 4-трет-бутилфенацильным (2d) заместителями. Результаты молекулярного докинга свидетельствуют о том, что высокая анксиолитическая активность соединения 3b обусловлена

его преимущественным связыванием с бензодиазепиновым сайтом гамма-аминомасляного рецептора типа А (энергия связывания −10,8 ккал/моль, константа связывания 13,4 нМ), что в 5,4 раза превышает аффинность диазепама (энергия связывания −9,8 ккал/моль, константа связывания 71,8 нМ), а также значительным взаимодействием со специфическим и аллостерическим сайтами 5-HT_{2A}-рецептора, сопоставимым с кетансерином.

В исследовании A.D. Jordan и соавторов была синтезирована серия производных пиридо[1,2-a]бензимидазола с замещением по атому азота в положении N5 (Jordan A.D. et al., 2002). Анксиолитическая активность соединений оценивалась путем определения их аффинности к бензодиазепиновому сайту $ГАМК_А$-рецепторов в радиолигандном тесте с использованием [³H]-флунитразепама в препаратах коры головного мозга крыс. Среди полученных производных наиболее активным оказалось этоксиметильное производное (соединение 24), продемонстрировавшее высокое сродство к бензодиазепиновому сайту $ГАМК_А$-рецептора (IC50 = 0,1 нМ). В предварительных испытаниях *in vivo* соединение 24 проявило выраженную анксиолитическую активность при пероральном введении животным в тесте подавления конфликтного поведения у крыс (MED = 0,4 мг/кг) и тесте предотвращения пентилентетразол-индуцированных судорог у мышей (ED50 = 0,04 мг/кг). Установлено, что механизм действия соединения заключается в положительной аллостерической модуляции $ГАМК_А$-рецепторов через бензодиазепиновый сайт. Благодаря высокому уровню активности и благоприятному профилю безопасности соединение 24 было рекомендовано для дальнейших клинических испытаний.

В работе Mahajan и соавторов был синтезирован ряд пиперазинсодержащих производных 1H-бенз[d]имидазола (Mahajan B.S. et al., 2024). Анксиолитическая активность полученных соединений оценивалась на мышах в тестах «норковая камера» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Исследуемые вещества вводились перорально в дозе 50 мг/кг, в качестве препарата сравнения использовали диазепам (4 мг/кг, внутрибрюшинно). Все синтезированные соединения продемонстрировали значимый анксиолитический эффект, при этом наиболее выраженную активность, превышающую таковую у препарата сравнения диазепама, проявили три соединения: 2-((4-(4-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)-1H-бенз[d]имидазол (5b), 2-((4-(3-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)-1H-бенз[d]имидазол (5c) и 2-(4-(3-фторфенил)пиперазин-1-ил)-1H-бенз[d]имидазол (5f). С целью изучения механизма действия было выполнено молекулярное докирование в бензодиазепиновый сайт $ГАМК_А$-рецептора (PDB ID: 6D6T). Расчетные энергии связывания для соединений-лидеров составили −9,5 ккал/моль (5b), −9,3 ккал/моль (5c) и −8,5 ккал/моль (5f), что сопоставимо с аффинностью референсного лиганда флумазенила (−9,4 ккал/моль). Анализ взаимодействий

показал, что высокое сродство к рецептору обусловлено образованием водородных связей с аминокислотными остатками, в частности с HIS D:102 и SER D:206, а также π-стекинг взаимодействиями с остатками тирозина.

Экспериментальные исследования противосудорожной активности серии производных бензимидазола проводили на грызунах, где в качестве референсных соединений использовали диазепам (1 мг/кг) и фенитоин (30 мг/кг) (Jain P. et al., 2010). Согласно полученным экспериментальным данным, в моделях коразол-индуцированных судорог и максимального электрошока, наивысшей эффективностью обладал 2-(4-хлорфенил)-5-нитро-1H-бензо[d]имидазол. Авторы предполагают, что механизм действия синтезированных нитробензимидазолов опосредован их взаимодействием с бензодиазепиновым сайтом $ГАМК_A$-рецептора. Примечательно, что среди проанализированных производных бензимидазола молекулы с наибольшей противосудорожной активностью характеризовались повышенной липофильностью.

Научной группой S. Partap и соавторов была проведена оценка 19 гибридных молекул, сочетающих бензимидазольный и пиридазиноновый фрагменты, на белых мышах с использованием тестов максимального электрошока и коразол-индуцированных судорог (Partap S. et al., 2017). Наиболее сбалансированный профиль антиконвульсивной активности в сравнении с фенитоином и этосуксимидом продемонстрировало соединение 2-((1H-бензо[d]имидазол-2-ил)метил)-6-(4-метоксифенил)-4,5-дигидропиридазин-3(2H)-он. Дополнительно установлено статистически значимое повышение уровня гамма-аминомасляной кислоты в ткани мозга под действием SS-4F как при однократном (в 1,5 раза), так и при курсовом применении (в 1,7 раза). Основываясь на полученных результатах, соединение SS-4F было выбрано в качестве лиганда для проведения молекулярного докинга с $ГАМК_A$-рецептором и Na^+-каналами. Компьютерное моделирование выявило образование четырех водородных связей между соединением SS-4F и ГАМК-рецептором с высоким значением оценочной функции (glide score), тогда как взаимодействие с натриевыми каналами характеризовалось формированием лишь двух водородных связей с более низкими энергетическими параметрами связывания.

В рамках исследования, направленного на поиск более эффективных и безопасных противоэпилептических препаратов, была синтезирована серия производных 5,6-дифтор-1H-бензо[d]имидазола (Raghu M.S. et al., 2023). Среди полученных соединений наиболее выраженную противосудорожную активность продемонстрировали N-(5,6-дифтор-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)-4-нитробензамид (соединение 4d) и N-(5,6-дифтор-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)-4-(трифторметил)бензамид (соединение 4e). В стандартных доклинических моделях максимального электрошока и подкожного введения коразола данные производные показали высокий протективный индекс, равный 17,27 и 21,02

соответственно, что значительно превосходит показатель референтного препарата карбамазепина (6,44). Исследование механизма действия посредством радиорецепторного анализа подтвердило высокое сродство соединений 4d и 4e к бензодиазепиновому сайту связывания $ГАМК_А$-рецептора (IC50 0,74 мкМ и 0,18 мкМ соответственно).

В работе J.L. Falcó и соавторов был представлен синтез и фармакологическая оценка ряда N-замещенных бензимидазолов (Falcó J.L. et al., 2006). Фармакологическая активность синтезированных производных изучалась на лабораторных мышах с использованием теста спонтанной двигательной активности. Наиболее активным соединением среди бензимидазолов оказалось производное 14d (N,N-диметил-2-[1-(5,6-диметил-1H-бензимидазол-1-ил)]ацетамид), которое снижало двигательную активность мышей на 86% по сравнению с контролем. В радиолигандных тестах *in vitro* это соединение проявило выраженное сродство к бензодиазепиновому сайту α_1-субъединицы $ГАМК_А$-рецептора, подавляя связывание меченого флумазенила на 90,6% при концентрации 10^{-5} М. Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм действия данного соединения связан с его способностью выступать в роли положительного аллостерического модулятора бензодиазепинового сайта $ГАМК_А$-рецептора.

В исследовании M. Marcinkowska и соавторов был предложен новый подход к терапии депрессии, ассоциированной с нейровоспалением, заключающийся в создании гибридных молекул, одновременно взаимодействующих с серотониновыми $5\text{-}HT_6$ и $ГАМК_А$-рецепторами (Marcinkowska M. et al., 2023). Среди исследованных соединений наиболее эффективной оказалась гибридная молекула 16, представляющая собой 1-(2-((4-аммониобутаноил)окси)этил)-4-(3-(бензилокси)-2-метилфенил)пиперазиний дихлорид. Данное соединение продемонстрировало высокое сродство к обоим типам рецепторов в радиолигандном исследовании *in vitro* (Ki = 16 нМ для $5\text{-}HT_6$ и Ki = 147 нМ для $ГАМК_А$-рецепторов). Функциональная активность соединения была оценена на клеточной линии HEK293, стабильно экспрессирующей человеческие $ГАМК_А$-рецепторы, где соединение 16 проявило частичную агонистическую активность, вызывая хлоридный ток, составляющий 24,7% от максимального ответа на 10 мкМ ГАМК. Методом молекулярного докинга было установлено, что соединение взаимодействует с ортостерическим сайтом $\alpha1\beta3\gamma2$ $ГАМК_А$-рецептора аналогично природному агонисту ГАМК, образуя водородные связи и ионные взаимодействия с ключевыми остатками рецептора. В поведенческих экспериментах на крысах (тест вынужденного плавания по Порсолту) острое (3 мг/кг) и подострое (в течение 14 дней) соединение 16 оказывало выраженный антидепрессивный эффект, статистически значимо уменьшая время иммобилизации на 31,9% и 22,9% соответственно, без влияния на спонтанную двигательную активность животных. Дополнительно был показан противовоспалительный эффект соединения 16 в тестах на микроглиальной клеточной линии BV-2, где вещество

снижало вызванное липополисахаридом выделение провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α, а также уровень оксидативного стресса (NO, ROS). Авторы предполагают, что сочетанная активация $ГАМК_A$-рецепторов и антагонизм 5-HT_6-рецепторов лежит в основе наблюдаемого антидепрессивного и противовоспалительного эффектов данного гибридного соединения.

1.8.2. Глутаматные рецепторы

В ходе исследований, направленных на разработку селективных модуляторов NMDA-рецепторов, была синтезирована серия производных 2-амино-(фосфоноалкил)-1Н-бензимидазол-2-алкановых кислот (соединения типа AP-6) (Baudy R.B. et al., 2001). Аффинность соединений к NMDA-рецепторам оценивалась с помощью радиолигандного анализа с использованием меченого лиганда [^{3}H]-CPP. Антагонистическая активность в отношении NMDA-рецепторного комплекса определялась *in vitro* по связыванию [^{3}H]-TCP в присутствии агонистов (глутамата/глицина) и подтверждалась в экспериментах *in vivo* на модели NMDA-индуцированных судорог у лабораторных животных.

Ряд соединений серии AP-6 продемонстрировал селективный конкурентный антагонизм в отношении NMDA-рецепторов как в экспериментах *in vitro*, так и на животных моделях *in vivo*. Наиболее выраженный эффект показало соединение 1 ([R(-)]-2-амино-3-(5-хлор-1-фосфонометил-1Н-бензимидазол-2-ил)-пропионовая кислота), для которого значение IC50 в тесте связывания [^{3}H]-CPP составило 7,1 нМ, а средняя эффективная доза в модели NMDA-индуцированных судорог у крыс составила 0,13 мг/кг при внутрибрюшинном введении. Кроме того, при однократном внутривенном введении в дозе 3 мг/кг после перманентной окклюзии средней мозговой артерии у крыс данное соединение снижало объем инфаркта мозговой ткани на 45%. Полученные данные указывают на значительный потенциал соединения 1 в качестве перспективного нейропротективного агента для терапии цереброваскулярных нарушений и судорожных состояний различного генеза.

Серия новых хинолинсодержащих производных бензимидазола, полученных реакцией конденсации замещенных 1-(1Н-бензимидазол-2-ил)метенамины с 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегидом и 2-тиоксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегидом, проявила выраженную противосудорожную активность, не уступающую по эффективности фенитоину и карбамазепину в модели судорог, вызванных подкожным введением коразола. Компьютерное моделирование методом молекулярного докинга подтвердило способность исследуемых соединений к взаимодействию с потенциал-зависимыми натриевыми каналами и NMDA-рецепторами (Shabana K. et al., 2023).

В результате синтеза и биологического скрининга производных бензимидазол-2-карбоксамида выявлена группа соединений, обладающих высокой селективностью и антагонистической активностью по отношению к NMDA-рецепторам подтипа NR2B (Borza I. et al., 2006). Аффинитет оценивали на мембранных препаратах переднего мозга крыс, с использованием меченного тритием Ro 25-6981, а также в функциональных исследованиях, основанных на флюориметрическом определении NMDA-индуцированных изменений концентрации внутриклеточного кальция. Наиболее активное соединение этого ряда 5(6)-гидроксибензимидазол-2-карбоксамид (соединение 6а) проявляло выраженную анальгетическую активность в формалиновом тесте при пероральном введении, при этом ED50 составила 1,6 мг/кг, что свидетельствует о перспективности соединений данного класса для лечения патологических состояний, обусловленных гиперактивацией NMDA-рецепторов.

В качестве потенциальных антипсихотических средств была синтезирована и исследована серия производных оксазолобензимидазола, действующих как положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) метаботропного глутаматного рецептора 2-го типа (mGluR2) (Garbaccio R.M. et al., 2010). Активность соединений оценивали *in vitro* в FLIPR-тесте на клеточной линии, экспрессирующей человеческий mGluR2 рецептор, а также *in vivo* на модели фенциклидин-индуцированной гиперлокомоции у крыс. В результате оптимизации были выделены два соединения-лидера: трет-бутилфенилоксиметил-циано-оксазолобензимидазол (соединение 20) и его трифторметильный аналог (соединение 21), которые продемонстрировали высокую *in vitro* активность с EC50 29 нМ и 33 нМ соответственно. В поведенческом тесте соединение 20 при пероральном введении в дозах 30 и 100 мг/кг показало статистически значимое и полное ингибирование гиперактивности, вызванной фенциклидином. Механизм действия был подтвержден в ходе *in vitro* исследований, которые показали, что соединения являются селективными ПАМ mGluR2 рецептора, значительно усиливая его ответ на глутамат, но не обладая активностью в отношении других подтипов mGluR или классических антипсихотических мишеней.

Для разработки новых анксиолитических средств была синтезирована серия бензимидазольных производных, являющихся антагонистами метаботропного глутаматного рецептора 5-го типа (Carcache D. et al., 2010). Активность соединений *in vitro* определяли в анализе мобилизации ионов кальция, а анксиолитическую активность *in vivo* оценивали в тесте на потенцированный страхом стартл-рефлекс у крыс. Направленная оптимизация, основанная на идентификации метаболитов исходного соединения-лидера 1 (N-(2-этилпиперидин-1-ил)-5-хлор-6-(6-метилпиридин-3-иламино)никотинамид), позволила получить 7-хлорбензимидазольное производное 15i. Это соединение продемонстрировало

высокую активность *in vitro* (IC50 = 24 нМ) и выраженный дозозависимый анксиолитический эффект *in vivo* с минимальной эффективной дозой 1 мг/кг (перорально), превосходя по этому показателю исходное соединение 1. Механизм действия подтвержден радиолигандным анализом вытеснения [^{3}H]-ABP688, показавшим высокое сродство (Ki = 2,4 нМ) и селективность 15i к человеческому рецептору mGlu5 по сравнению с другими подтипами глутаматных рецепторов.

1.8.3. Дофаминовые рецепторы

В исследовании были изучены производные бензимидазола, в частности 5-[3-(4-арилпиперазин-1-ил)пропил]-1Н-бензимидазолы и 5-[2-(4-арилпиперазин-1-ил)этокси]-1Н-бензимидазолы, проявляющие выраженное сродство к D_2-рецепторам и потенциально обладающие антипсихотическим действием (Sukalović V. et al., 2005). Сродство к рецепторам оценивали методом конкурентного радиолигандного связывания с использованием [^{3}H]SCH 23390 для D_1-рецепторов, [^{3}H]спиперона для D_2-рецепторов и [^{3}H]8-OH-DPAT для серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов на мембранах синаптосом из хвостатых ядер и гиппокампа крупного рогатого скота. Наиболее активным соединением среди изученных является
5-{2-[4-(2-метоксифенил)-пиперазин-1-ил]этокси}-1,3-дигидро-2Н-бензимидазол-2-тион (соединение 27), которое продемонстрировало высокое сродство к D_2-рецепторам (Ki = 0,19 нМ), что позволяет рассматривать его как перспективный антипсихотический агент. Молекулярное моделирование связывания данного соединения с рецептором D_2 показало формирование солевого мостика между атомом азота пиперазинового кольца и ASP86 рецептора, водородных связей бензимидазольного фрагмента с аминокислотами SER141, SER122 и HIS189, а также π–π-взаимодействий ароматического кольца арилпиперазина с остатками PHE178, TYR216 и TRP182.

Также перспективными соединениями для разработки атипичных антипсихотиков являются производные 4-галоген-6-[2-(4-арилпиперазин-1-ил)этил]-1Н-бензимидазола (Andrić D. et al., 2008). Их активность в отношении дофаминовых D_1-, D_2-подобных и серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов определяли методом радиолигандного связывания с использованием [^{3}H]SCH 23390, [^{3}H]спиперона и [^{3}H]8-OH-DPAT соответственно. В данной серии наиболее активным было соединение 4-бром-6-[2-(4-(2-метоксифенил)-пиперазин-1-ил)этил]-1Н-бензимидазол (соединение 16b), продемонстрировавшее высокое сродство как к D_2-подобному рецептору (Ki = 0,56 нМ), так и к серотониновому рецептору 5-HT_{1A} (Ki = 1,4 нМ), что делает его кандидатом для разработки нового атипичного антипсихотика. С помощью молекулярного моделирования было выявлено

наличие специфических стабилизирующих взаимодействий между атомом галогена бензимидазольного кольца и SER122 рецептора D_2, а также водородных связей и π–π-взаимодействий с другими ключевыми аминокислотными остатками связывающего кармана. Квантово-химические расчеты методом ab initio (MP2/6-31+G*) показали, что галогензамещенные производные обладают более высокой энергией стабилизации комплексов лиганд-рецептор: для хлорпроизводных −0,99 ккал/моль (D_2-рецептор) и −0,46 ккал/моль (5-HT_{1A} рецептор), для бромпроизводных −1,13 ккал/моль (D_2-рецептор) и −0,63 ккал/моль (5-HT_{1A} рецептор) по сравнению с незамещенными аналогами.

Производное бензимидазола PD 152255 ((E)-1,1′-(2-бутен-1,4-диил)бис[2-[4-[3-(1-пиперидинил)пропокси]фенил]-1H-бензимидазол]), проявило высокую селективность к D_3-подтипу дофаминовых рецепторов (Corbin A.E. et al., 1998). Сродство к рецепторам определяли методом конкурентного связывания с [^{3}H]спипероном на мембранах клеток CHO-K1, трансфицированных кДНК человеческих D_{2L}, D_3 и $D_{4.2}$ рецепторов. PD 152255 продемонстрировало высокую селективность к D_3-подтипу (Ki = 12,7 нМ) при отсутствии выраженного сродства к другим подтипам (D_{2L} и $D_{4.2}$). В исследованиях на животных PD 152255 дозозависимо подавляло гиперлокомоторную активность, индуцированную d-амфетамином, при внутрибрюшинном введении, при этом соединение не вызывало нежелательных антихолинергических эффектов и не влияло на базальный уровень синтеза нейромедиаторов в головном мозге, что подтверждает его потенциал в качестве безопасного антипсихотического средства.

1.8.4. Серотониновые рецепторы

Арилпиперазиновые производные бензимидазола исследованы как потенциальные атипичные нейролептики, проявляющие аффинность к дофаминовым D_2 и серотониновым 5-HT_{2A} рецепторам (Tomić M. et al., 2011). Структура данных соединений представлена 4-галоген-6-(2-{4-[арил]пиперазин-1-ил}этил)-1H-бензимидазолами, в которых в качестве арильного заместителя используются фенил, 2-метоксифенил, 2-хлорфенил, 3-трифторметилфенил и пиримидин-2-ил, галогенами в четвертом положении бензимидазольного ядра выступают хлор или бром. Аналоги, замещенные бромом, демонстрируют более высокую аффинность к рецепторам D_2, 5-HT_{2A} и α_1-адренорецепторам по сравнению с хлорированными аналогами. Соединение-лидер 4-хлор-6-(2-{4-[3-(трифторметил)фенил]пиперазин-1-ил}этил)-1H-бензимидазол характеризуется соотношением аффинностей pKi 5-HT_{2A}/D_2 = 1,14 с константами ингибирования Ki = 282 нМ (D_2) и Ki = 33,2 нМ (5-HT_{2A}). Данное соединение не вызывает каталепсии у крыс в дозах от 1,0 до 3,0 мг/кг и эффективно подавляет

амфетамин-индуцированную гиперлокомоцию, что свидетельствует о его антипсихотическом потенциале без выраженных экстрапирамидных побочных эффектов.

Также были синтезированы производные 5-[3-(4-арилпиперазин-1-ил)пропокси]-1,3-дигидро-2Н-бензимидазол-2-тиона и 6-[3-(4-арилпиперазин-1-ил)пропокси]-1Н-бензимидазола с различными арильными заместителями (Tomić M. et al., 2007). Замещение 2-метоксифенильной группой приводит к увеличению аффинности к D_2 и α_1-рецепторам, и снижению связывания с 5-HT_{2A} рецепторами. Соединения с фенилпиперазиновыми заместителями характеризуются наиболее высоким соотношением аффинностей pKi 5-HT_{2A}/D_2: 1,18 и 1,10 соответственно для бензимидазол-2-тионового и бензимидазольного производных. В дозах 1,0-10,0 мг/кг указанные соединения не вызывают каталепсии и эффективно снижают амфетамин-индуцированную гиперлокомоцию. При этом бензимидазольное производное обладает более выраженным эффектом в низких дозах.

Антидепрессивная активность была изучена у производных бензазола, представленных 2-((бензазол-2-ил)тио)-N'-(4-(4-алкилпиперазин-1-ил)бензилиден)ацетогидразидами, включающими бензимидазольные и бензтиазольные аналоги с алкильными заместителями (метил, этил, изопропил, циклопропил) в четвертом положении пиперазинового кольца (Tokgöz G. et al., 2018). Соединения с метильными и этильными заместителями в дозе 50 мг/кг перорально продемонстрировали выраженный антидепрессивный эффект в тестах «подвешивания за хвост» и «принудительного плавания», сопоставимый с действием флуоксетина (20 мг/кг). Механизм антидепрессивной активности реализуется с участием серотонинергических 5-HT_{1A}, 5-$HT_{2A}/_{2C}$ и 5-HT_3 рецепторов, что подтверждено ингибированием данного эффекта селективными антагонистами NAN-190, кетансерином и ондансетроном. Истощение эндогенных запасов серотонина парахлорфенилаланином также устраняет антидепрессивное действие указанных соединений.

Была синтезирована серия производных бензимидазол-арилпиперазина, характеризующихся смешанным профилем сродства к серотониновым рецепторам подтипов 5-HT_{1A} и 5-HT_3 (López-Rodríguez M.L. et al., 2004). Фармакологическая оценка соединений включала определение аффинности к рецепторам методом радиолигандного связывания, а также анализ функциональной активности с использованием [^{35}S]GTPγS-связывания и в тесте на изолированной подвздошной кишке морской свинки. В результате скрининга было идентифицировано соединение-лидер 3 ((±)-N-(1-азабицикло[2.2.2]окт-3-ил)-2-[[4-(о-этоксифенил)пиперазин-1-ил]метил]бензимидазол-4-карбоксамид). Данное соединение продемонстрировало высокое сродство к обоим целевым рецепторам (Ki = 18,0 нМ для 5-HT_{1A}; Ki = 27,2 нМ для 5-HT_3) при высокой селективности в

отношении D_2-дофаминовых и α_1-адренергических рецепторов. Углубленное исследование механизма действия показало, что соединение 3 является частичным агонистом 5-HT_{1A}-рецепторов и антагонистом 5-HT_3-рецепторов. В поведенческих экспериментах на модели пассивного избегания было установлено, что соединение 3 эффективно устраняет когнитивные нарушения, индуцированные блокадой мускариновых рецепторов

Селективные антагонисты серотониновых рецепторов подтипа 5-HT_6 представлены серией сульфонамидных производных бензимидазола (González-Vera J.A. et al., 2017). Сродство к 5-HT_6 рецепторам определяли методом конкурентного радиолигандного связывания с использованием [^{3}H]ЛСД в мембранах трансфицированных клеток HEK-293. Наивысшее сродство к 5-HT_6 рецепторам выявлено у соединений, содержащих 5-хлор-2-нафтильный (Ki = 9 нМ) и 5-хлор-3-метил-1-бензотиофен-2-ильный (Ki = 25 нМ) фрагменты. В тесте распознавания новых объектов у крыс соединение 7 (5-хлор-N-{1-[2-(диметиламино)этил]-1H-бензимидазол-6-ил}нафталин-2-сульфонамид) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно продемонстрировало выраженную прокогнитивную активность, сопоставимую с эффектом такрина (0,5 мг/кг перорально), что подтверждает терапевтический потенциал антагонистов 5-HT_6 рецепторов при лечении когнитивных нарушений.

1.8.5. Каппа-опиоидные рецепторы

Экспериментальные соединения 2-(4-хлорфенил)-9-[2-(морфолин-4-ил) этил]-9H-имидазо[1,2-a]-бензимидазол, 2-(4-фторфенил)-9-[2-(пиперидин-1-ил) этил]-9H-имидазо[1,2-a]-бензимидазол и 2-(4-фторфенил)-9-[2-(пирролидин-1-ил) этил]-9H-имидазо[1,2-a]-бензимидазол проявили значительный противосудорожный потенциал, сопоставимый с действием вальпроевой кислоты при подавлении коразол-индуцированных клонических приступов (Vasil'ev P.M. et al., 2017). Соединение РУ-1205 (9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-a]бензимидазол) (Васильев П.М.и др., 2016) проявило выраженную активность в моделях с введением коразола, бикукуллина и пикротоксина, а также в модели алкогольной абстиненции (Калитин К.Ю. и др., 2015; Гречко О.Ю. и др., 2016). Механизм действия включает активацию каппа-опиоидных рецепторов (Спасов А.А. и др., 2018), модуляцию $ГАМК_A$-рецепторного комплекса (Калитин К.Ю. и др., 2017) и ингибирование потенциал-зависимых натриевых и кальциевых ионных каналов (Калитин К.Ю. и др., 2017). По параметрам эффективности и безопасности соединение превосходит вальпроат натрия (Спасов А.А. и др., 2015) и, в отличие от диазепама, не вызывает развития толерантности и синдрома отмены (Гречко О.Ю. и др., 2016), что обуславливает его значительный терапевтический потенциал.

В результате фармакофорного моделирования и последующего компьютерного

скрининга была выявлена серия производных 2-аминобензимидазола с выраженной селективностью в отношении к-опиоидных рецепторов (Sasmal P.K. et al., 2015). Исходное активное соединение 6, содержащее бензимидазольное ядро и N-этилпирролидиновый заместитель, продемонстрировало высокую агонистическую активность в отношении к-опиоидных рецепторов (EC50 = 39 нМ) и значительную селективность относительно μ- и δ-опиоидных рецепторов (в 1000 и 200 раз соответственно). В ходе дальнейшей оптимизации было получено наиболее активное соединение 42 (производное тиометилпирролкарбоксамида) с EC50 = 1 нМ. Эксперименты *in vivo* на мышах подтвердили выраженный антиноцицептивный эффект для соединения 42 в модели корчей, индуцированных уксусной кислотой, где наблюдалось дозозависимое подавление болевых реакций при пероральном введении в дозах 1 и 10 мг/кг.

В рамках исследования 2-замещенных производных бензимидазола (3a–3d) была оценена их аффинность к к-опиоидному рецептору методом молекулярного докинга, с использованием лоперамида как референсного лиганда (Poddar S.K. et al., 2025). Наиболее высокую аффинность к KOP продемонстрировали производное ибупрофена (3c, 2-[α-метил-4-{2-метилпропил}бензил]бензимидазол) и производное напроксена (3d, 2-[1-(6-метокси-2-нафтил)этил]бензимидазол), энергии связывания составили −9,1 ккал/моль и −10,2 ккал/моль соответственно, что превосходит показатель для лоперамида (−8,4 ккал/моль). Соединение 3d показало наиболее выраженную анальгетическую активность в модели «уксусных корчей» в дозе 50 мг/кг, снизив число корчей на 62,37%. Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий подтвердил, что высокое сродство соединений-лидеров к KOP обусловлено преимущественно гидрофобными взаимодействиями.

1.8.6. Пуриновые рецепторы

В исследовании, проведенном путем скрининга библиотеки из 8364 соединений Корейского химического банка, были выявлены производные бензимидазол-4,7-диона в качестве новых антагонистов пуринового рецептора hP2X3 (Bae J. et al., 2022). Активность соединений оценивали в клеточной тест-системе, основанной на измерении флуоресценции красителя Fluo-4 при Ca^{2+}-индуцированном входе ионов под действием α,β-meATP в клетках HEK293, экспрессирующих рецепторы hP2X3 и hP2X2/3. Первоначально обнаруженное соединение-лидер KCB-77033 проявило выраженную антагонистическую активность (IC50 = 1030 нМ). Дальнейшая структурная оптимизация привела к созданию соединения 14h (6-хлор-5-((1-(3,4-дифторбензоил)пиперидин-4-иламино)-2-(трифторометил)-1H-бензо[d]имидазол-4,7-дион), которое продемонстрировало улучшенную активность (IC50 = 375 нМ), высокую селективность по отношению к hP2X3 рецептору (более чем в 23 раза выше, чем к hP2X2/3), а

также удовлетворительные показатели растворимости и метаболической стабильности. Однако низкая проницаемость через гематоэнцефалический барьер ограничивает применение соединения 14h. При внутривенном введении соединение 14h проявило выраженный антиаллодинический эффект в животных моделях нейропатической боли, значительно повышая порог болевой чувствительности и достигая максимального возможного эффекта 78% в модели периферической невропатии, вызванной химиотерапией и 54% в модели перевязки спинномозговых нервов.

1.8.7. Ангиотензиновые рецепторы 1-го типа. Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма (PPARγ).

Ввиду антиоксидантных и противовоспалительных эффектов агонисты PPARγ представляют большой интерес в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии нейродегенеративных и психических заболеваний (Titus C. et al., 2024).

Телмисартан (2-[4-[[4-метил-6-(1-метилбензимидазол-2-ил)-2-пропилбензимидазол-1-ил]метил]фенил]бензойная кислота), являющийся антагонистом AT_1-рецепторов с дополнительной агонистической активностью в отношении PPARγ, проявил нейропротективные эффекты в исследованиях на животных моделях болезни Альцгеймера. Так, в эксперименте на самцах мышей линии ddY, которым интрацеребровентрикулярно вводили амилоид-бета-пептид (Aβ 1–40), применение телмисартана в дозе 100 мг/кг в течение двух недель привело к улучшению когнитивных функций, оцениваемых в парадигме активного избегания. Этот эффект частично блокировался при совместном введении с антагонистом PPARγ GW9662, что подтверждает значительный вклад активации PPARγ в нейропротективные свойства препарата. В отличие от другого блокатора AT_1-рецепторов лозартана телмисартан также существенно снижал отложение амилоидных бляшек в головном мозге, что дополнительно свидетельствует об особой роли активации PPARγ в механизмах его действия (Mogi M. et al., 2008).

Телмисартан проявил выраженные противосудорожные эффекты в моделях эпилептической активности у мышей. В исследованиях с использованием моделей максимального электрошока и судорог, индуцированных коразолом, применение телмисартана в дозах 5 и 10 мг/кг приводило к достоверному сокращению длительности тонической фазы разгибания конечностей в МЭШ-тесте (на 44,3% относительно контрольной группы при дозе 10 мг/кг) и к удлинению латентного периода развития судорог, индуцированных коразолом (с 119 до 206,6 сек при дозе 10 мг/кг) (Pushpa V.H. et al., 2014). Сходные результаты были получены в другом исследовании, где телмисартан в дозе 8 мг/кг увеличивал латентный период

возникновения миоклонических и клонических коразол-индуцированных судорог, а также потенцировал противосудорожную активность этосуксимида (Moirangthem P.D., 2023).

1.9. Исследования кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ

Исследования фармакологических эффектов производных бензимидазола, проводимые в Волгоградском государственном медицинском университете, позволили выявить широкий ряд веществ, которые проявляют различные виды нейропсихотропной активности.

Установлено, что соединение РУ-476 (9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил) имидазо[1,2-а]бензимидазол) по уровню 5-HT_{2A}-антагонистической активности превосходит ципрогептадин и соответствует кетансерину, а по показателю LD50 относится к классу умеренно токсичных веществ. Соединение РУ-476 снижает серотонин-индуцированное падение скорости кровотока, повышает порог болевой чувствительности, а также изменяет эффекты пикротоксина, фенамина и 5-гидрокситриптофана (Yakovlev D.S. et al., 2014).

Для соединения РУ-31 (9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-α] бензимидазола дигидрохлорид) подтверждена 5-HT_{2A}-блокирующая активность, умеренная М-холиноблокирующая активность, ГАМК-миметическая активность, слабая H_1-гистамин-блокирующая активность и отсутствует H_2-гистаминблокирующая активность (Агацарская Я.В. и др., 2019). Соединение РУ-31 оказывает влияние на функциональную активность нейроцитов срезов гиппокампа, снижая амплитуду и частоту серотонин-индуцированных ГАМК-токов в гиппокампальной формации мозга крыс в равной степени с препаратом сравнения – ципрогептадином.

В ходе скрининга новых производных диазепинобензимидазола было найдено соединение-лидер ДАБ-21. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» для соединения ДАБ-21 (11-[4-трет-бутилбензил]-2,3,4,5-тетрагидро-[1,3]диазепино[1,2-а] бензимидазола гидробромид) отмечен антагонизм с флумазенилом, что характерно для диазепиновой структуры соединения и позволяет предположить ГАМК-ассоциированное действие изучаемого вещества, вероятно, опосредованное бензодиазепиновым сайтом связывания рецепторной макромолекулы (Мальцев Д.В. и др., 2021). Установлено взаимодействие с моноаминергической системой и глутаматными рецепторами. Доказана выраженная анксиолитическая активность данного вещества, превосходящая таковую препарата сравнения диазепама в ряде тестовых моделей.

Соединение ДАБ-19 (11-[4-трет-бутилбензил]-2,3,4,5-тетрагидро-[1,3] диазепино[1,2-а] бензимидазола гидробромид) по анксиолитической активности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт» превосходило препарат сравнения диазепам в 1,7 раза (Спасов А.А. и др., 2018). Транквилизирующий эффект подтвержден исследованием в установке

«темная/светлая камера». При коразоловой интоксикации субстанция ДАБ-19 (2,9 мг/кг) снижала летальность, превосходя по эффективности вальпроат натрия (90 мг/кг) в 2,2 раза (Таран А.С., 2017).

Выявлены вещества с селективной каппа-агонистической активностью, проявляющие обезболивающие свойства. Соединение РУ-1203 (2-фторфенил-9-пирролидино-этилимидазо[1,2-а] бензимидазол) в широком диапазоне доз 0,001–10 мг/кг проявляет дозозависимое налоксон-обратимое анальгетическое действие на различных моделях ноцицептивных реакций, в тестах соматической, висцеральной, тонической боли, вызванной механическими, электрическими, термическими, химическими стимулами. В большинстве тестов исследуемое вещество сопоставимо по эффективности с буторфанолом и превосходит эталонный препарат по продолжительности и широте терапевтического действия в 2–3,5 раза. Наиболее выраженная активность соединения РУ-1203 отмечается в условиях формалиновой гипералгезии, во II фазе ноцицептивного ответа, где тестируемое вещество в 6,5 раза превосходит по обезболивающему действию буторфанол. Кроме того, изучаемая субстанция проявляет анальгетические свойства при различных путях введения, в том числе и *per os*, в отличие от буторфанола (Гречко О.Ю., 2012).

Среди производных бензимидазола выявлены соединения с противосудорожной активностью. РУ-1205 (9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а] бензимидазола дигидрохлорид) проявляет широкий спектр антиконвульсивной активности на различных моделях эпилептогенеза. Его эффективность в острых моделях была подтверждена для судорог, вызванных коразолом (TID50 = 7,9 мг/кг внутривенно и превосходит по этому показателю референтный препарат вальпроат натрия в 15 раз), бикукуллином (в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно пролонгирует латентный период клонических и тонических судорог на 41% и 60% соответственно), пикротоксином (дозозависимо уменьшает продолжительность тремора, увеличивает латентный период до появления тремора и клонических судорог, снижает частоту судорог, максимально в дозе 20 мг/кг в/б в 3; 1,2; 1,4 и 1,6 раза соответственно) и NMDA (дозозависимо устраняет вращательное поведение животных, максимально на 38% по сравнению с контрольными значениями). В хронических моделях активность продемонстрирована в тесте коразолового киндлинга (в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно в 1,8 раза уменьшает тяжесть судорожных явлений и сокращает гибель животных на 40%), а также на модели судорог, вызванных отменой алкоголя (в дозе 10 мг/кг при в/б введении нивелирует судорожную активность с 4,2 балла в контроле до 0,2 балла по шкале НІС). Противосудорожное действие соединения РУ-1205 реализуется за счет каппа-опиоидных рецепторных механизмов (Калитин К.Ю. и др., 2018).

Установлена NHE-1 ингибирующая активность в ряду производных циклических

гуанидинов N9-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2–аминобензимидазола (Гурова Н.А. и др., 2019). В эффективной дозе (1,12 мг/кг) при однократном введении на модели фокальной 60-ти минутной ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией у крыс соединение РУ-1355 (2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид) ограничивало рост нейронспецифической энолазы в сыворотке крови, сокращало размеры зоны некроза и отека головного мозга, способствовало восстановлению неврологических нарушений. При хроническом введении соединение РУ-1355 на модели фокальной 60-ти минутной ишемии с последующей реперфузией на разных сроках постреперфузионного повреждения ограничивало рост нейронспецифической энолазы в сыворотке крови, уменьшало выраженность неврологических нарушений и восстанавливало поведенческие реакции (Спасов А.А. и др., 2016). По совокупности эффектов превосходило исследуемые препараты сравнения глицин, магния сульфат и зонипорид.

Было показано, что имидазо[1,2-а]бензимидазолы являются перспективным классом соединений в контексте поиска новых веществ, способных ингибировать процессы перекисного окисления липидов. Соединения проявляли противогипоксическую активность на моделях гипобарической, гистотоксической и гемической гипоксии. Наиболее выраженные антиоксидантные, церебропротективные и противогипоксические свойства продемонстрировало соединение РУ-185 (эноксифол – 2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазол) (Спасов А.А. и др., 2019; Kosolapov V.A. et al., 2019).

1.10. Заключение

Поиск и разработка новых нейропсихотропных лекарственных средств остаются одной из наиболее актуальных задач современной медицины и фармакологии. Высокая распространенность психоневрологических заболеваний, а также недостаточная эффективность и неблагоприятные профили безопасности существующих препаратов диктуют необходимость в создании инновационных терапевтических агентов. Современный подход к разработке таких средств смещается от эмпирического поиска к целенаправленному дизайну молекул, основанному на глубоком понимании патогенеза заболеваний. В качестве ключевых направлений выделяются создание препаратов с новыми механизмами действия, включая G-белок-смещенные агонисты, модуляторы серотонинергической, глутаматергической и ГАМК-ергической систем, а также агенты, воздействующие на нейровоспаление и процессы нейропластичности. Для ускорения и повышения эффективности этого процесса широко применяются передовые технологии, такие как виртуальный скрининг, методы машинного обучения и функциональный анализ биоэлектрической активности мозга, позволяющие с

высокой точностью прогнозировать и характеризовать фармакологические свойства новых соединений.

Литературные данные убедительно демонстрируют, что производные бензимидазола обладают широким спектром биологической активности. Среди них обнаружены соединения, взаимодействующие с ключевыми мишенями ЦНС. Структурная универсальность позволяет создавать на основе бензимидазольного ядра, признанного в медицинской химии «привилегированной структурой», лиганды с разнообразными фармакологическими профилями: антипсихотическим, анксиолитическим, антидепрессивным, противосудорожным, анальгетическим и нейропротективным. Многолетние исследования, в том числе проведенные на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, подтверждают высокий потенциал данного класса соединений.

Несмотря на обширные данные, многие аспекты взаимодействия производных бензимидазола с молекулярными мишенями и системного влияния на функции ЦНС остаются недостаточно изученными. Зачастую исследования носят фрагментарный характер, фокусируясь на одной конкретной мишени или виде активности, что не позволяет составить целостную картину фармакологического профиля соединений. Существует потребность в систематическом исследовании обширной библиотеки производных бензимидазола с использованием комплексного подхода, объединяющего новые методы вычислительного моделирования для прогнозирования взаимодействия с мишенью и электрофизиологические методы для функциональной оценки их нейротропного действия.

В связи с этим в основу настоящей диссертационной работы положены комплексный поиск и углубленное изучение нейропсихотропных свойств новых производных бензимидазола для выявления соединений-лидеров с потенциальной анальгетической, противосудорожной и антипсихотической активностью.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Соединения и реактивы

В исследовании использовали следующие реактивы: U-50488 («Sigma», США), буторфанол (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), норбиналторфимин («Sigma», США), налоксон (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), SB203580 («Sigma», США), липополисахарид («Sigma» L2755 из Escherichia coli, серотип 0128:B12), серотонина гидрохлорид («Sigma», США), пикротоксин («Sigma», США), диазепам (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), феназепам («Валента Фарм», Россия), прегабалин («Гедеон Рихтер», Венгрия), габапентин («ПИК-ФАРМА», Россия), карбамазепин («АЛСИ Фарма», Россия), топирамат («АЛСИ Фарма», Россия), коразол («Sigma», США), пилокарпина гидрохлорид («Sigma», США), хлорпромазин («Валента Фарм», Россия), галоперидол («Гедеон Рихтер», Венгрия), рисперидон («KRKA, d. d., Novo mesto», Словения), кветиапин («БЕЛУПО», Республика Хорватия), амитриптилин («Такеда Фарма А/С», Дания), флуоксетин («G. L. Pharma GmbH», Австрия), пароксетин («ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия), эсциталопрам («ПРАНАФАРМ»), кетансерин («Sigma», США), ципрогептадин («Sigma», США), гидроксизин («ЮСБ Фарма СА», Бельгия), суматриптан («Тева Фармасьютикал», Венгрия), ондансетрон («ГРОТЕКС», Россия), атропин («ДЕЛЬЗИФАРМ», Россия), супрастин («Эгис Фармацевтический завод», Венгрия), скополамин метилбромид («Sigma», США), L-ДОФА (Sigma, США), клонидин («Органика», Россия), апоморфин («ICN Biomedical», США), клозапин («Органика», Россия), иботеновая кислота («Sigma», США), кетамин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), хлоралгидрат («Panreac Química S.L.U.», Испания), кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), калий хлористый, магний хлористый 6-водный, магния сульфат, натрий фосфорнокислый однозамещенный, натрий двууглекислый («Эском», Россия), гидроокись калия («АГАТМЕД», Россия), D-глюконат калия («Sigma», США), HEPES («GERBU», Германия), EGTA («Sigma», США), Na2-АТФ («Sigma», США), Na-ГТФ («Sigma», США), реактив Грисса («Sigma», США), трипановый синий («Sigma», США), 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТФТ) («Sigma», США), физиологический раствор («ГРОТЕКС», Россия), фетальная бычья сыворотка (FBS) («BioClot», Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) («Fisher Scientific», США), DMEM («ПанЭко», Россия).

Исследование выполнено на базе Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Работы проводились в соответствии с лицензией, выданной университету на осуществление

деятельности по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров (№ ФС-34-03-000002-20 от 10.09.2020 г.).

В рамках исследования для выявления перспективных нейропсихотропных агентов был проведен скрининг 2443 конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, включенных в базу данных[1] кафедры фармакологии и биоинформатики.

2.1.2. Животные

В экспериментальных сериях использовали взрослых беспородных самцов мышей массой 20–28 г (n = 518), беспородных крыс обоего пола (n = 966) массой 200–360 г. Животные содержались в виварии НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в стандартных условиях в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» при температуре 22 ± 2 °C и цикле «день-ночь» 12/12 ч с постоянным доступом к пище и воде. Исследования проводились в соответствии с европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) (ГОСТ 33044-2014, 2021). Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (Регистрационный номер IRB00005839, IORG0004900, справка №2024/221 от 03.04.2024).

2.1.3. Оборудование и программное обеспечение

Лазерный анализатор размеров частиц «ЛАСКА-1К» (ТМК-Инжиниринг, Россия), электроэнцефалограф NVX-36 (МКС, Россия), микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), стереотаксический аппарат SR-5R-HT (Narishige Group, Япония), бормашина Marathon-3 (Champion/H35LSP, Корея), система для микроинъекций QSI (Stoelting, США), вибратом Campden 7000smz-2 (Campden Instruments, Великобритания), микроскоп Olympus BX51 (Olympus, Япония), пуллер пипеток P6-10 (Narishige, Япония), электрофизиологический усилитель HEKA EPC10 (HEKA Elektronik, Германия), Infinite M200 PRO (Tecan, Grödig, Австрия), микроскоп MF53 (MshOt, Китай), CMOS камера 50-2 (MshOt, Китай), электростимулятор (A-M Systems MODEL 4100), установка «Tail Flick» (Ugo Basile S.r.l., Varese, Италия), набор волосков фон Фрея (Ugo Basile S.r.l., Varese, Италия), установка для оценки вертикализации (Открытая Наука, Россия), установка «Открытое поле» для крыс (Открытая Наука, Россия), установка «Т-лабиринт» для мышей (Открытая Наука, Россия).

---

[1] Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023624590 Российская Федерация. Производные бензимидазола с нейротропным и психотропным действием : № 2023623995 : заявл. 18.11.2023 : опубл. 12.12.2023 / К. Ю. Калитин, А. А. Спасов, Г. В. Придворов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Для проведения исследований было использовано следующее программное обеспечение: PatchMaster (HEKA Elektronik, Германия), CellProfiler (Broad Institute, США), ChemOffice 22.0 (CambridgeSoft, США), Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes, США), DataWarrior (Idorsia, США), MarvinSketch 17.1.23 (ChemAxon, США), AutoDock Vina (The Scripps Research Institute, США), MOE (Chemical Computing Group, Канада), SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Швейцария), Gephi v0.10.1 (open-source), DeepSite (Acellera, Испания), Schrödinger v12.8 (Schrödinger, США), Image J v.1.54j (open-source), SLEAP v1.3.4 (open-source), Keypoint MoSeq 0.4.10 (open-source), MATLAB R2023a (MathWorks, США), EEGLAB 2024.0 (США), Spyder 5.5.1 (open-source), библиотеки NumPy 2.0.1 (open-source), Scikit-learn 1.5.1. (open-source), Matplotlib v3.9.2 (open-source), RDKit 2023.9.6 (open-source).

Статистическую обработку данных проводили в GraphPad Prism 10.3 (GraphPad Inc., США) и Microsoft Excel 2021 (Microsoft Office, США).

2.2. Биоинформационные методы

Для прогнозирования биологической активности и изучения механизмов действия конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола использовались биоинформационные подходы, включая сетевое моделирование, построение QSAR-моделей, фармакофорный анализ, молекулярный докинг и моделирование молекулярной динамики.

Сетевое моделирование

Сетевое моделирование применялось для анализа химического пространства производных бензимидазола и определения закономерностей в их структурных характеристиках. Для оценки сходства соединений использовался расчет коэффициента Танимото на основе молекулярных структур, подготовленных с помощью библиотеки RDKit. На основании полученных данных формировались графы, в которых узлы представляли отдельные соединения, а ребра указывали степень их структурного сходства.

Визуализация графов проводилась в программном обеспечении Gephi (v0.10.1). Для распределения узлов в графе применялся алгоритм Force Atlas 2, обеспечивающий равномерное размещение элементов и уменьшение их пересечений. Кластеризация соединений выполнялась с использованием алгоритма модульного анализа Блонделя, который позволял выделить группы соединений с высокой степенью структурного сходства. Узлы графа окрашивались в зависимости от принадлежности к определенному кластеру, а их размер отражал степень узла, то есть количество связей с другими соединениями.

Для уточнения и упрощения графа применялись фильтры, такие как K-Core (K = 30), исключающие слабо связанные узлы, и пороговые значения коэффициента Танимото (< 0,3), которые удаляли ребра с низкой степенью сходства. После обработки графы экспортировались в векторный формат для дальнейшего анализа и визуализации.

QSAR-моделирование

QSAR-моделирование каппа-агонистической активности

Для каппа-опиоидного рецептора QSAR-моделирование проводилось с учетом данных, полученных на этапе построения SAS-карт и ландшафта активности. SAS-карты применялись для оценки зависимости «структура–активность» среди 4876 соединений, импортированных из базы данных ChEMBL (идентификатор CHEMBL237, соответствующий каппа-опиоидному рецептору человека). На карте по оси X откладывалось структурное сходство соединений (коэффициент Танимото), а по оси Y – разница в биологической активности. В качестве меры активности использовался логарифм полуэффективной концентрации (EC50), а разница активности между парами соединений рассчитывалась по формуле:

$$\Delta act_{i,j} = |\log_{10}(EC50_i) - \log_{10}(EC50_j)|,$$

где $EC50_i$ и $EC50_j$ – значения активности для пары соединений.

Для расширения выборки добавлялись: AC50 (после нормализации единиц, трактовались как EC50); значения, выведенные из Ki (или Ke/KB) при наличии Emax, нормированного на максимальный ответ системы (0–1), по модели Блэка–Леффа: $\tau = Emax/(1 - Emax)$, $EC50 \approx KA/(1 + \tau)$, $KA \approx Ki$; значения, выведенные из кинетики k_off/k_on через KD = k_off/k_on и ту же формулу для EC50.

Для визуализации ландшафта активности соединений, действующих на каппа-опиоидный рецептор, было построено химическое пространство на основе молекулярных отпечатков ECFP4. Матрица попарного структурного сходства, рассчитанная с использованием коэффициента Танимото, была спроецирована в двумерное пространство методом многомерного шкалирования. Биологическая активность соединений (pEC50) была представлена в качестве третьей координаты (ось Z), а результирующая поверхность интерполирована с помощью регрессии на основе Гауссовских процессов.

С целью улучшения топологии ландшафта активности была применена процедура фильтрации данных для удаления 20% соединений с наибольшей локальной

несогласованностью SAR. Для каждого соединения i рассчитывался показатель несогласованности S_i как доля его структурных соседей (j), для которых разница в активности $\Delta act_{i,j}$ превышала 2 логарифмические единицы. Соединения, у которых значение S_i превышало 80-й перцентиль, исключались из анализа. Данный подход позволил элиминировать структурные выбросы и локальные «обрывы» SAR, формируя более репрезентативный ландшафт активности.

Для каждой молекулы рассчитывались 2D и 3D дескрипторы с использованием пакета MOE. Построение моделей проводилось с использованием метода случайного леса (Random Forest) в реализации библиотеки scikit-learn v.1.5.1. Подбор гиперпараметров (число деревьев, максимальная глубина, минимальное число объектов в листе) выполняли по схеме вложенной 5-кратной перекрестной проверки. На каждом шаге внешней проверки четыре фолда образовывали обучающую часть, внутри которой проводили внутреннюю перекрестную проверку для оптимизации гиперпараметров. Затем модель с оптимальными значениями гиперпараметров переобучали на всех четырех фолдах и тестировали на удержанном внешнем фолде. Качество полученных моделей оценивали по коэффициенту детерминации (R^2) и среднеквадратичной ошибке (RMSE), значения которых рассчитывались отдельно для каждого тестового фолда. Итоговая модель использовалась для прогнозирования каппа-опиоидной активности 10 выбранных соединений (валидационная выборка), которые дополнительно анализировались с использованием иерархической кластеризации методом Уорда в евклидовом пространстве непрерывных молекулярных дескрипторов (2D/3D MOE, предварительно стандартизованных). Дендрограммы кластеризации визуализировались с использованием библиотеки Matplotlib v.3.9.2.

QSAR-моделирование 5-HT_{2A}-антагонистической активности

Для QSAR-моделирования 5-HT_{2A}-антагонистической активности использовался набор данных из 2382 соединений, полученных из базы данных ChEMBL, с известными значениями IC50. Дескрипторы молекул рассчитывались с использованием программного обеспечения PaDEL-Descriptor и RDKit. Отбор дескрипторов осуществлялся путем предварительной фильтрации признаков с высокой парной корреляцией и последующего исключения переменных с выраженной мультиколлинеарностью на основе фактора инфляции дисперсии.

При построении моделей применялись алгоритмы машинного обучения, в частности множественная линейная регрессия, регрессия методом частных наименьших квадратов, метод опорных векторов, случайный лес, нейронная сеть (многослойный перцептрон), реализованные в библиотеке scikit-learn v1.5.1. Для валидации моделей проводилась 5-кратная перекрестная проверка, а выбор наилучшей модели осуществлялся на основе показателей R^2 и RMSE.

Итоговая модель применялась для прогнозирования активности соединений из тестового набора данных.

Анализ ADME-T

Для оценки фармакокинетических параметров выбранных соединений применялся сервис SwissADME, который позволил спрогнозировать биодоступность и лекарственные свойства соединений. Процедура многопараметрической фильтрации также включала оценку соответствия «правилу пяти» Липински, прогнозирование проницаемости через гематоэнцефалический барьер, а также вычисление интегрального индекса CNS MPO (Central Nervous System Multi-Parameter Optimization), учитывающего липофильность (cLogP/cLogD7.4), pKa, молекулярную массу, площадь топологической полярной поверхности и др.). Повторяющиеся дескрипторы были объединены и рассчитаны единожды.

Фармакофорный анализ

Фармакофорные модели строились с целью идентификации ключевых признаков, необходимых для высокоаффинного селективного взаимодействия соединений с мишенями. Применялся модуль Phase в составе программного обеспечения Maestro (Schrödinger v12.8). Использовались кристаллические структуры каппа-опиоидного рецептора (PDB ID: 6B73) и 5-HT_{2A}-рецептора (PDB ID: 6A94). Модели включали такие фармакофорные характеристики, как доноры и акцепторы водородных связей, гидрофобные группы, ароматические кольца и отрицательные ионы.

Поиск карманов связывания

Для определения потенциальных сайтов связывания в каппа-опиоидном рецепторе был использован алгоритм DeepSite (Jiménez J. et al., 2017), разработанный на основе трехмерных сверточных нейронных сетей (3D-CNN). Исходная кристаллическая структура рецептора (в формате PDB) предварительно загружалась в систему на GPU-сервере, после чего выполнялась вокселизация белковой области с шагом 1 Å. Для каждого вокселя вычислялись несколько атомно-фармакофорных каналов (гидрофобный, ароматический, донор и акцептор водородных связей, положительно и отрицательно заряженные области). Расчет осуществлялся с помощью пакета HTMD и Theano/Keras (для тензорных операций), при этом для каждого атома учитывался вклад в воксель в соответствии с его ван-дер-ваальсовым радиусом и

потенциальными типами взаимодействия. Нейросетевая модель DeepSite, обученная на базе scPDB (более 9000 сайтов связывания), в режиме предсказания формировала трехмерную тепловую карту вероятностей, отражающую степень тропности рецепторных областей к возможному лиганду. По данным тепловой карты для вокселей с высокой вероятностью (порог P = 0,4) применялся алгоритм кластеризации Mean-Shift, который группировал соседние воксели в предсказанные карманы. Полученные карманы оценивались на предмет близости к известным функциональным участкам рецептора и устойчивости сформированной полости.

Молекулярный докинг

Молекулярный докинг проводился для анализа взаимодействий производных бензимидазола с активными сайтами каппа-опиоидного рецептора (PDB ID: 6B73) и 5-HT_{2A}-рецептора (PDB ID: 6A94). Подготовка белков и лигандов являлась ключевым этапом исследования, обеспечивая точность предсказания взаимодействий.

Подготовка структур белков осуществлялась с использованием модуля Protein Preparation Wizard в программном обеспечении Maestro (Schrödinger v12.8). Этапы подготовки включали устранение несовершенств кристаллической структуры, таких как удаление молекул воды, достраивание недостающих боковых цепей аминокислот, добавление протонов в соответствии с pH 7,0 ± 2,0 и минимизацию энергии структуры с применением силового поля OPLS4. После подготовки структуры белков задавались области связывания, которые центрировались на сокристаллизованном лиганде (налфурафин для каппа-опиоидного рецептора и зотепин для 5-HT_{2A}-рецептора).

Подготовка структур лигандов выполнялась с использованием модуля LigPrep (Schrödinger v12.8). Структуры молекул предварительно загружались в формате SMILES, после чего проводилась ионизация соединений при физиологическом pH 7,0 ± 2,0, генерация таутомеров и стереоизомеров, а также минимизация энергии с использованием силового поля OPLS4. Подготовленные структуры лигандов использовались для последующего молекулярного докинга.

Докинг выполнялся с использованием модуля Induced Fit Docking (Schrödinger v12.8), который позволял учитывать гибкость как лиганда, так и белка. На первом этапе определялись предварительные положения лигандов в активных сайтах с помощью алгоритма Glide, после чего анализировалась гибкость остатков аминокислот, находящихся в радиусе 5 Å от лиганда. На втором этапе проводилась оптимизация положения лигандов в модифицированных белковых структурах для получения наиболее стабильных комплексов. При докинге использовались коэффициенты масштабирования взаимодействий Ван-дер-Ваальса для лиганда и белка,

которые составляли 0,5 и 0,7 соответственно. Энергетические окна для конфигураций лигандов были установлены на уровне 2,5 ккал/моль.

Результаты докинга анализировались по значениям энергии связывания (GlideScore), а также по взаимодействиям лиганда с ключевыми аминокислотными остатками активного сайта.

Моделирование молекулярной динамики

Молекулярная динамика (МД) проводилась для оценки стабильности белок-лигандных комплексов, полученных после молекулярного докинга. Исследования выполнялись для структур каппа-опиоидного рецептора (PDB ID: 6B73) и 5-HT_{2A}-рецептора (PDB ID: 6A94), связанных с наиболее перспективными лигандами. Подготовка белок-лигандных комплексов и среды симуляции проводилась с использованием модуля Desmond (Schrödinger v12.8).

На первом этапе была проведена минимизация энергии белок-лигандных комплексов с использованием силового поля OPLS4 с целью устранения остаточных напряжений. Затем комплексы размещались в прямоугольный симуляционный бокс, наполненный молекулами воды модели TIP3P. Размер бокса задавался таким образом, чтобы обеспечить расстояние не менее 10 Å между белком и границами бокса, что исключало влияние граничных эффектов. Для каппа-опиоидного рецептора и 5-HT_{2A}-рецептора структуры белков интегрировались в мембрану POPC (1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин), параметры которой соответствовали данным из базы OPM.

Для создания физиологических условий в систему добавлялись ионы Na^+ и Cl^- в концентрации 0,15 М. Подготовленная система проходила предварительную релаксацию с последовательными этапами минимизации энергии и короткой динамики с фиксацией атомов белка.

Симуляции молекулярной динамики проводились в условиях ансамбля NPT (с постоянным давлением и температурой). Давление поддерживалось на уровне 1,01325 бар с использованием баростата Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein, а температура стабилизировалась на уровне 300 К с помощью термостата Носе-Гувера. Радиус обрезки для короткодействующих кулоновских взаимодействий был установлен на 9 Å. Динамика систем моделировалась на протяжении 100 нс с временным шагом 2 фс.

Анализ траекторий молекулярной динамики включал расчет среднеквадратичных отклонений (RMSD) для оценки общей стабильности комплекса, среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) для изучения локальной подвижности остатков белка, а также количества водородных связей и межмолекулярных контактов между белком и лигандом.

2.3. Биопотенциал-опосредованный подход

Биопотенциал-опосредованный подход использовался для поиска веществ с антипсихотической и противосудорожной активностью среди производных бензимидазола. Суть метода заключается в количественном сравнении изменений биоэлектрической активности мозга, вызванных действием исследуемого вещества, с электрофизиологическими профилями, характерными для эталонных препаратов с известным механизмом действия (рисунок 2.1).

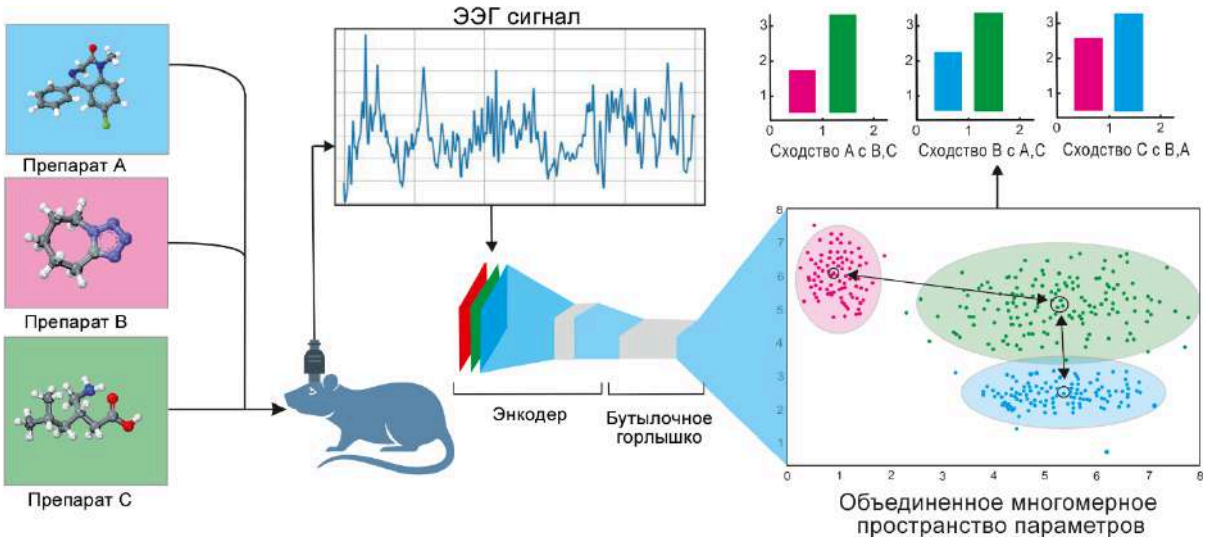


Рисунок 2.1 – Общий дизайн исследования. Внутричерепная электроэнцефалограмма регистрируется у животного после введения препарата и подается на вход в нейронную сеть. Выходные данные слоя «бутылочного горлышка» классифицируются/кластеризуются, а затем вычисляются расстояния между кластерами

Имплантация хронических электродов

Для записи биоэлектрической активности мозга имплантировались эпидуральные хлорсеребряные электроды, изготовленные из проводника диаметром 260 мкм и длиной 15 мм. Электроды покрывались двумя слоями биосовместимого полиолефина: первый слой обеспечивал изоляцию, а второй ограничивал глубину их введения. Электроды монтировались в 8-канальное гнездо (BLD-8, стеклонаполненный нейлон), которое фиксировалось стоматологическим цементом (Протакрил-М; Стома, Харьков, Украина) и защищалось пластиковым колпаком. Имплантация проводилась под общей анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б) с использованием стереотаксического аппарата (SR-5R-HT; Narishige Group, Токио, Япония). Трепанационные отверстия в черепе сверлились в соответствии со стереотаксическими координатами относительно брегмы: обонятельные луковицы (AP = 6,60 мм; ML = ±2,00 мм), первичная моторная кора (AP = 0,00 мм; ML = ±2,00 мм), первичная соматосенсорная кора (AP = −4,08 мм; ML = ±2,00 мм), вторичная зрительная кора (AP = −7,08 мм; ML = ±2,00 мм). Токосъемные части электродов погружались в трепанационные отверстия эпидурально и фиксировались стоматологическим цементом. Коннектор для подключения

электродов фиксировался к черепу винтами из нержавеющей стали и защищался пластиковым колпаком. После эксперимента подтверждали правильную установку электродов, в случае проникновения под твердую мозговую оболочку и повреждения коры под местом контакта данные исключали из анализа.

Экспериментальный протокол

После семидневного восстановительного периода животным вводили препараты и экспериментальные соединения с антиконвульсивной и проконвульсивной активностью, а также соединения с антипсихотическими свойствами, включая вещества с иными эффектами. Подробный список представленных веществ приведен в таблице 2.1 и таблице 2.2. Учитывая фармакологическую гетерогенность выборки веществ, эквивалентные дозы подбирались исходя из максимальной суточной дозы с коэффициентом пересчета с человека на крыс (Гуськова Т.А., 2009), либо использовались максимальные нетоксические дозы для экспериментальных веществ. После достижения пиковой концентрации (в зависимости от фармакокинетических свойств препарата) в условиях искусственного освещения под контролем оператора проводилась запись мозговой активности на протяжении 10 мин.

Таблица 2.1 – Список веществ, использованных для оценки проконвульсивной и антиконвульсивной активности

Вещество	**Доза (мг/кг)**	**Механизм**	**Эффект**
Диазепам Феназепам	6,0 1,0	ГАМК-миметики	Антиконвульсивный
Прегабалин Габапентин	60,0 360,0	Ингибиторы кальциевых каналов	
Карбамазепин Эсликарбазепин	200,0 160	Ингибиторы натриевых каналов	
Топирамат	40,0	Ингибитор натриевых и кальциевых каналов	
Коразол Пикротоксин	20,0 2,0	Антагонисты ГАМК	Проконвульсивный
Пилокарпин Ареколин	60,0 40,0	Холиномиметики	

Таблица 2.2 – Список веществ, использованных для оценки антипсихотической активности

Вещество	**Доза (мг/кг)**	**Механизм**	**Дополнительные мишени**
Хлорпромазин	35,0	Антагонист D_2 рецепторов	Антагонист D_3 и D_5 рецепторов
Галоперидол	3,0	Антагонист D_2 рецепторов	Антагонист H_1 и α_1-адренергических рецепторов
Клозапин	15,8	Антагонист 5-HT_{2A} и D_2 рецепторов	Антагонист α_1-адренергических и H_1 рецепторов
Рисперидон	1,35	Обратный агонист 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} рецепторов; Антагонист D_2 рецепторов	Антагонист α_1 и α_2-адренергических рецепторов; Обратный агонист H_1 рецепторов
Кветиапин	17,43	Частичный агонист 5-HT_{1A} рецепторов; Антагонист 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} рецепторов; Антагонист D_2 рецепторов	Антагонист 5-HT_6 рецепторов; Антагонист D_4, и D_5 рецепторов; Антагонист α_1-адренергических и H_1 рецепторов
Амитриптилин	18,9	Блокирует нейрональный захват серотонина (SERT) и норадреналина (NET)	Антагонист 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} рецепторов; Антагонист H_1 рецептора
Флуоксетин	6,7	Блокирует нейрональный захват серотонина (SERT)	Конкурентный и обратимый антагонист 5-HT_{2C} рецептора.
Пароксетин	4,2	Селективный ингибитор нейронального захвата серотонина (SERT)	–
Эсциталопрам	2,36	Селективный ингибитор нейронального захвата серотонина (SERT)	Антагонист 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{1A} рецепторов; Антагонист D_2 рецептора; Антагонист H_1 рецептора; Антагонист α_1 и α_2-адренергических рецепторов
Кетансерин	1,0	Специфический антагонист 5-HT_2 рецепторов	Антагонист H_1 рецептора
Ципрогептадин	2,7	Обратный агонист H_1 рецепторов	Антагонист M_1, M_2, M_3-холинорецепторов; Антагонист 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} рецепторов
Гидроксизин	25,3	Селективный обратный агонист H_1 рецепторов	Антагонист 5-HT_{2A}, D_2 и α_1-адренергических рецепторов

Суматриптан	8,3	Агонист 5-$HT_{1B/1D}$ рецепторов	Слабый агонист 5-HT_{1A}
Ондансетрон	2,7	Блокатор 5-HT_3 рецепторов	Снижает рилизинг дофамина
Атропин	0,25	Неселективный антагонист М-холинорецепторов	–
Супрастин	16,9	Антагонист H_1 рецепторов	–

Регистрация ЭКоГ и структура датасета

Регистрация ЭКоГ-сигналов проводилась с использованием лабораторного электроэнцефалографа NVX-36 (МКС, Россия) с частотой дискретизации 500 Гц и биполярным монтажом. Монтаж включал следующие пары отведений: обонятельные луковицы – земля, P3-A1, O1-A1, P4-A2, O2-A2. Каждый сигнал представлял 2-секундный интервал, включающий 4000 точек данных (по 1000 точек на каждое из четырех отведений). Общий размер датасета составил 16 500 семплов. Данные сохранялись без применения дополнительных фильтров.

Обработка данных

На вход сети подавались четыре сигнала из разных каналов ЭКоГ, которые преобразовывались в двумерное изображение размером 1000×4. Обучение сети проводилось методом Adam. Архитектура сети включала два последовательных сверточных слоя. Первый слой содержал 10 сверточных фильтров размером 50×4, второй – 10 фильтров размером 20×4. Пусть $y[n]$ представляет собой сигнал ЭКоГ, где $y[n] = (y_1[n], y_2[n], y_3[n], y_4[n])$ – сигналы из четырех каналов, а $n = 0…999$ – номер отсчета. Перед подачей на вход сверточного слоя сигнал $y[n]$ дополнялся L нулями, формируя сигнал $Y^{(0)}[n]$. На выходе первого сверточного слоя сигнал вычислялся как:

$$z_r^{(1)}[n] = ReLU\left(\sum_{l=0}^{L-1} w_r^{(1)}[l] Y^{(0)}[l + n] + b_r^{(1)}\right)$$

здесь L – длина сверточных фильтров, $r = 0, 1,…, R-1$, ($R = 10$ – количество сверточных фильтров), $w_r^{(1)}[l]$ – импульсная характеристика фильтров, $b_r^{(1)}$ – смещения нейронов.

Сигнал на входе второго сверточного слоя $Y_r^{(1)}[m]$ ($m = 0, 1,…, 999$) создается из $z_r^{(1)}[n]$ добавлением L нулей.

$$z_r^{(2)}[m] = ReLU\left(\sum_{l=0}^{L-1} \sum_{r'=0}^{R-1} w_{rr'}^{(2)}[l] Y_{r'}^{(1)}[l + m] + b_r^{(2)}\right)$$

где $w_{rr'}^{(2)}[l]$ – импульсные характеристики сверточных фильтров, $b_r^{(2)}$ – смещения нейронов. После второго сверточного слоя применяется операция *maxpooling*, которая уменьшает размер сигнала $z_r^{(2)}[m]$, отбрасывая наименьшие значения. В данном случае сигнал уменьшается в 16 раз. Затем полученный сигнал преобразуется в одномерный массив $Y^{(2)}[q]$. Этот массив, в свою очередь, сжимается полносвязным слоем-кодировщиком в набор параметров $x[k]$:

$$x[k] = -\ b^{(code)}[k] - \sum_{q=0}^{Q-1} w_q^{(code)}[k] Y^{(2)}[q]$$

$w_q^{(code)}$, $b^{(code)}$ – веса и смещения слоя кодировщика. Причем $k = 0 \ldots K-1$, где K – количество параметров необходимых для описания сигнала.

Сигнал $x[k]$ далее используется слоем-декодировщиком для восстановления исходного сигнала $y[n]$ путем минимизации ошибки:

$$E_{autoencoder} = \sqrt{\sum_{n=0}^{N} \left(y'[n] - y[n] \right)^2}$$

где $y'[n]$ это выход слоя-декодировщика:

$$y'[n] = \tanh tanh \left(- b^{(decode)}[n] - \sum_{k=0}^{K-1} w_k^{(decode)}[n] x[k] \right)$$

Кроме того, этот же сигнал $x[k]$ используется слоем классификатора для определения препарата. Каждый из используемых при обучении препаратов имеет свой номер в формате *one-hot*. Выход слоя классификации обозначим как $p[c]$, где c=0…P – 1, P – количество препаратов:

$$p[c] = softmax \left(- b^{(clas)}[c] - \sum_{k=0}^{K-1} w_k^{(clas)}[c] x[k] \right)$$

При этом ошибка классификации при обучении определяется как кросс-энтропия между полученными сетью значениями $p[c]$ и реальными номерами классов $p^{true}[c]$, которым соответствует сигнал $y[n]$:

$$E_{classifier} = H\left(p[c], p^{true}[c]\right)$$

Когда сеть обучается на множестве сигналов, полученных на фоне действия разных препаратов, фактически она кластеризует сигналы в пространстве выбранных параметров $x[k]$. Линейная функция активации слоя кодировщика позволяет использовать для анализа геометрии многомерной системы кластеров евклидову метрику.

Определим центр кластера, соответствующего произвольному препарату A:

$$x^A[k] = \frac{1}{M}\sum_{i=0}^{M} x^i[k]$$

Здесь M – количество сигналов одного препарата в датасете.

Тогда расстояние между кластерами, т.е. сходство двух произвольных препаратов A и B будет определяться формулой:

$$s_{AB} = \sum_{k=1}^{K}\left(x^A[k] - x^B[k]\right)^2$$

Чем ближе кластеры, тем более похожи друг на друга сигналы ЭКоГ для препаратов в выбранном пространстве параметров.

Цикл обучения сети состоит из последовательного обучения автоэнкодера и затем классификатора.

Для определения минимального числа параметров, необходимых для описания и классификации сигнала ЭКоГ, применялся метод избирательной редукции нейронов в бутылочном горлышке сети (truncation). Данный метод основывается на последовательном отключении нейронов с конца слоя. Количество отключаемых нейронов в каждом цикле обучения определялось случайным образом из равномерного распределения в пределах от 0 до N, где N – общее число нейронов. Вероятность отключения нейрона n рассчитывалась по формуле:

$$p = 1 - \frac{n}{N}$$

Этот подход позволял оценивать вклад каждого нейрона в точность классификации и восстановления сигнала, а также определять зависимость точности модели от числа параметров в бутылочном горлышке. Такой метод обеспечивает оптимизацию модели, минимизируя количество параметров при сохранении высокой точности классификации.

Снижение размерности и визуализация параметров бутылочного горлышка выполнялись методом UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) с параметрами: n_neighbors = 15, min_dist = 0.1, n_components = 2, metric = euclidean.

Оценка производительности

Производительность модели оценивалась с использованием 5-кратной кросс-валидации. Весь набор данных делился на пять частей: четыре использовались для обучения, а одна – для тестирования. Результаты усреднялись по всем пяти запускам. Статистический анализ включал проверку данных на нормальность с помощью теста Шапиро-Уилка и дисперсионный анализ для определения статистической значимости различий.

2.4. Электрофизиологические методы

Регистрация и анализ LFP-сигнала

Имплантация электродов

Имплантация монополярных электродов из нержавеющей стали (ø 0,1 мм) проводилась под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг, в/б). После исчезновения роговичного рефлекса животных фиксировали в стереотаксическом аппарате. Стоматологическим буром в черепе проделывались отверстия (0,5 мм в диаметре), в соответствии со стереотаксическими координатами корковые электроды размещали на твердой мозговой оболочке, а глубокие электроды погружали в мозг до исследуемой структуры (рисунок 2.2–2.6). Для верификации положения электродов по завершении экспериментов проводили гистологический контроль.

Корковые электроды:

- *F* (координаты: AP = 0,00 мм, ML = 2,00 мм)
- *P* (координаты: AP = −4,08 мм, ML = 2,00 мм)
- *O* (координаты: AP = −7,08 мм, ML = 2,00 мм)

Примечание: F – frontal; P – parietal; O – occipital.

Глубокие электроды:

- *Медиальная префронтальная кора (mPFC)* – координаты: AP = +2,7–3,2 мм, ML = 0,6–0,8 мм, DV = 3,0–3,8 мм.

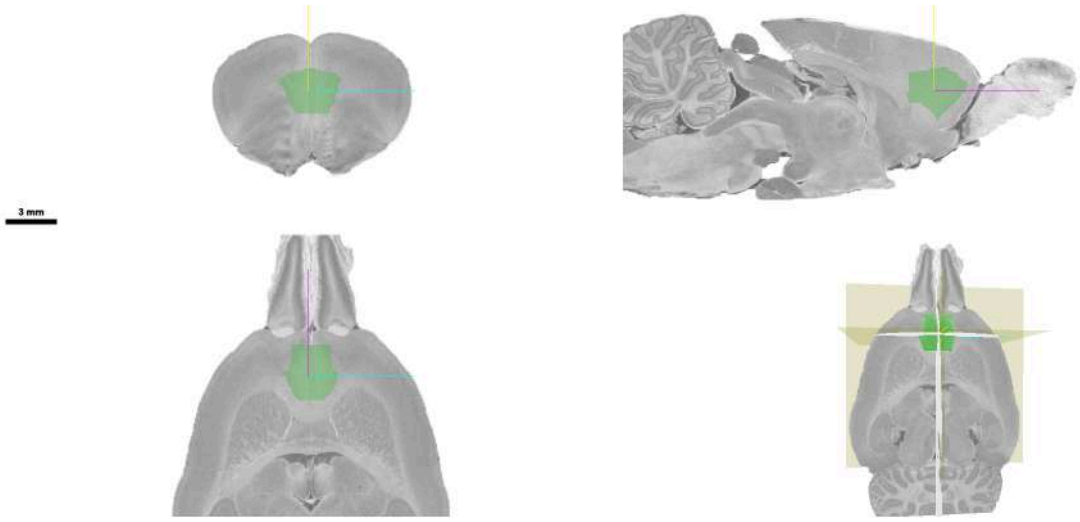


Рисунок 2.2 – Анатомическая визуализация медиальной префронтальной коры мозга крысы в корональной, сагиттальной и аксиальной плоскостях

- *Базолатеральный комплекс амигдалы (BLA)* – координаты: AP = −2,2–3,6 мм, ML = 5–5,3 мм, DV = 8,8 мм.

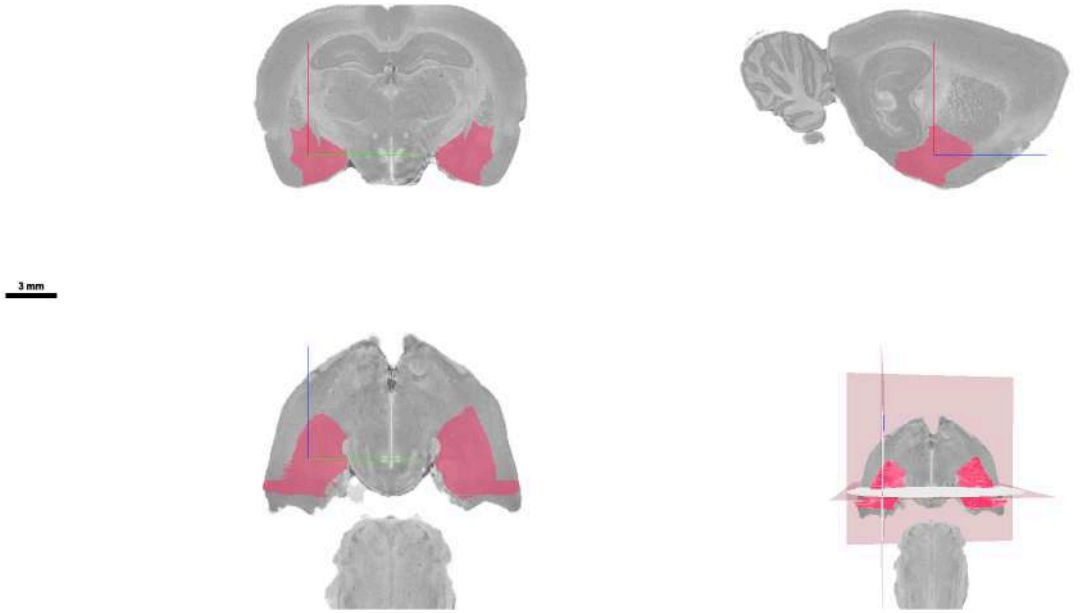


Рисунок 2.3 – Анатомическая визуализация базолатерального комплекса амигдалы мозга крысы в корональной, сагиттальной и аксиальной плоскостях

- *Гиппокамп (Hipp)* – координаты: AP = −4,9 мм, ML = 4,8 мм, DV = 6,0 мм.

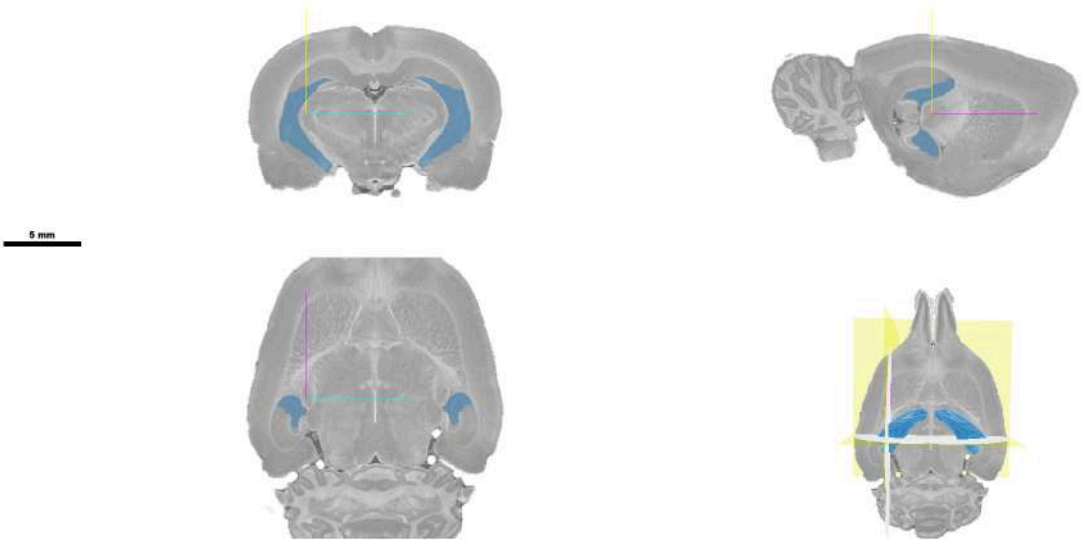


Рисунок 2.4 – Анатомическая визуализация гиппокампа мозга крысы в корональной, сагиттальной и аксиальной плоскостях

- *Вентральная область покрышки (VTA)* – координаты: AP = −5,2 мм, ML = 1,0 мм, DV = 8,4–8,8 мм.

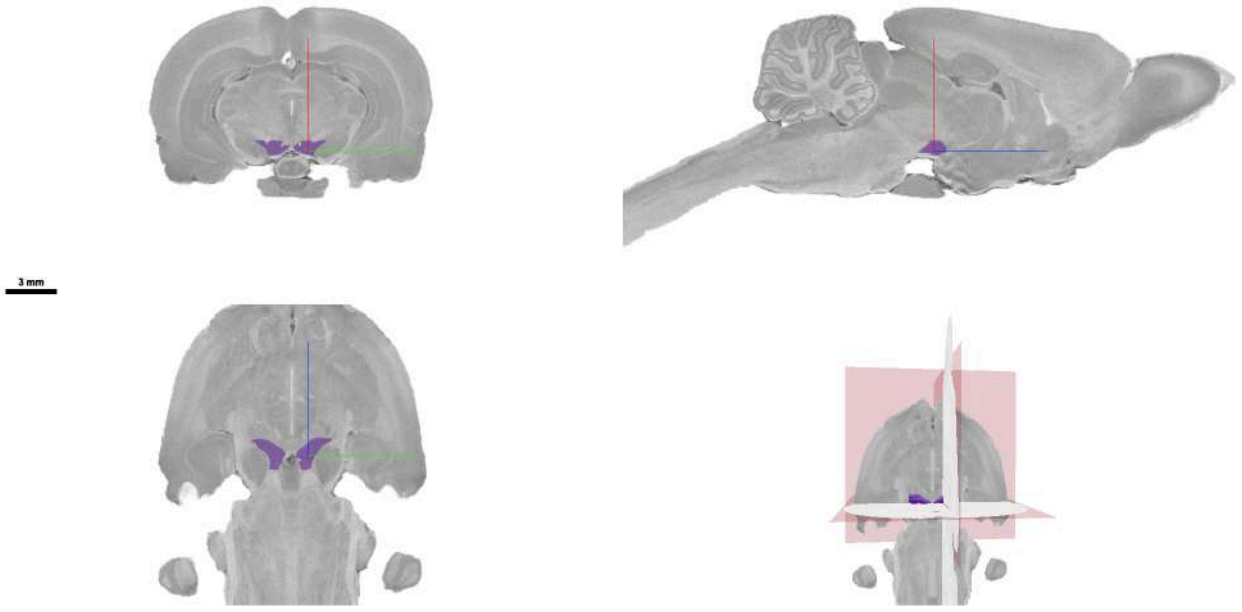


Рисунок 2.5 – Анатомическая визуализация вентральной области покрышки мозга крысы в корональной, сагиттальной и аксиальной плоскостях

- *Прилежащее ядро (NAc)* – координаты: AP = +1,8 мм, ML = 1,6 мм, DV = 7,3 мм.

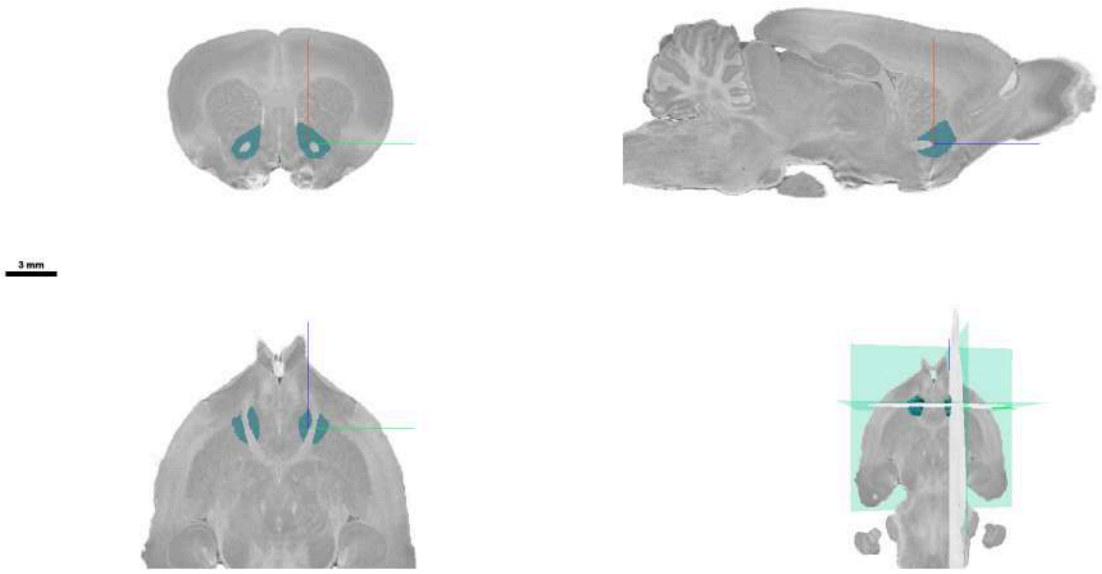


Рисунок 2.6 – Анатомическая визуализация прилежащего ядра мозга крысы в корональной, сагиттальной и аксиальной плоскостях

Для выполнения интравентрикулярных инъекций проводилась имплантация направляющей канюли из нержавеющей стали 21 калибра в боковой желудочек головного мозга по следующим стереотаксическим координатам относительно брегмы: AP = −0,6 мм, ML = 1,6 мм, DV = 4,0 мм. Электроды и канюля фиксировались на черепе самотвердеющей пластмассой (Протакрил-М, Украина) и двумя винтами из нержавеющей стали.

После операции животные содержались в индивидуальных клетках, восстановительный период составлял 7 дней. На протяжении 2 дней послеоперационного периода животным проводилась антибактериальная терапия ципрофлоксацином 50 мг/кг в/б.

Запись проводилась на NVX-36 (МКС), поток данных передавался в реальном времени через Lab Streaming Layer (LSL) из NeoRec (версия 1.6, Windows 10) в течение 10 минут. Частота дискретизации составляла 500 Гц и считывалась из метаданных LSL.

Спектральный анализ сигнала

PSD оценивалась методом Уэлча с окном Хэнна длиной 2 с, перекрытием 50 %, n_{perseg}=1000, n_{fft}=1000, шаг по частоте 0,5 Гц. Для графиков спектра использовался диапазон 0,5–50 Гц; значения выводились в dB(μV²/Hz) по формуле $10\log_{10}(PSD/1\ \mu V^2/Hz)$. Для суммарных полос использовались диапазоны: дельта 0,5–4 Гц; тета 4–8 Гц; альфа 8–12 Гц; бета 12–30 Гц; гамма 30–50 Гц. Мощность по полосам вычислялась интегрированием линейной PSD в соответствующих диапазонах.

Когерентный анализ сигнала

Межканальная когерентность оценивалась на скользящем 8-секундном фрагменте с использованием *scipy.signal.coherence*: сегменты по 1 с (окно Хэнна), перекрытие 50 %,

$n_{fft}=2^{\lceil \log2(nperseg) \rceil}$. Спектры когерентности усреднялись по тем же полосам. Анализ ограничивался тета-диапазоном (4–8 Гц), поскольку предварительные исследования показали наиболее выраженные изменения именно в этом частотном диапазоне. Для нормализации данных и проведения параметрических статистических тестов к значениям когерентности применялось логит-преобразование, для представления в диапазоне [−1;1] значения дополнительно линейно масштабировались по формуле $m=2c-1$.

wPLI анализ сигнала

Фазовая связанность оценивалась метрикой wPLI (debiased, wPLI2) из MNE-Connectivity при *mode="fourier"*. Использовались эпохи по 2 с (частотное разрешение 0,5 Гц), не менее 20 эпох (40 с данных). Для построения спектральных кривых wPLI задавались узкие полосы шириной 0,5 Гц: $f_{min}=\{0.5,1.0,2.0,\ldots\}$, $f_{max}=f_{min}+0.5$ с *faverage=True*, что давало значения в точках 0.5–50 Гц. Для суммарных полос (дельта–гамма) использовались усреднения по тем же диапазонам, что и в PSD.

Обработка и анализ данных состояли из трех основных этапов: а) вычисление коннективности между всеми возможными парами электродов отдельно для каждого частотного диапазона, в результате чего каждый сигнал был преобразован в трехмерный тензор, включающий в себя 140 параметров wPLI; б) снижение размерности пространства методом главных компонент (PCA); в) построение модели ML-классификатора с оптимальной конфигурацией и последующей 5-кратной кросс-валидацией (рисунок 2.7).

Рисунок 2.7 – Схема с последовательностью математического анализа электрофизиологических данных. После расчета взвешенного индекса фазовой задержки (wPLI), отражающего коннективность между отделами головного мозга, включая кору, гиппокамп, миндалину, вентральную область покрышки, прелимбическую кору и прилежащее ядро (8×8 электродов ×5 ритмов). Данные обрабатывали методом главных компонент и затем подавали на вход классификатора («Gaussian Process Classifier», scikit-learn)

С целью изучения особенностей системной реорганизации функционального взаимодействия разных отделов головного мозга на фоне введения исследуемых соединений были построены корреляционные матрицы, где значения соответствуют абсолютной величине wPLI от 0 до 1.

С учетом наличия мультиколлинеарности между признаками, дальнейший анализ выполнялся методом главных компонент с целью сокращения числа переменных путем их объединения в интегративные характеристики коннективности на основании структуры взаимосвязей между ними.

Построение ML-модели классификатора

При построении моделей машинного обучения использовали открытую библиотеку Python scikit-learn v.1.5.1. Реализовали метод классификации на основе гауссовских процессов, в результате чего были построены две модели: GPC-BO-v.02.10-5.2308 (GaussianProcessClassifier с параметрами 10.0 * RBF(5.0), optimizer = None) и GPC-BO-v.02.10-10.2308 (GaussianProcessClassifier с параметрами 10.0 * RBF(10.0), optimizer = None). После обучения моделей строили матрицы несоответствий и проводили 5-кратную кросс-валидацию.

Прогноз аверсивной активности с помощью регрессионной модели на основе параметров LFP

Сбор электрофизиологических данных проводился с помощью электродов, имплантированных в различные области мозга крыс: миндалевидное тело, медиальную префронтальную кору (AP = +2,7–3,2, ML = 0,6–0,8, DV = 3,0–3,8.), прилежащее ядро (AP = +1,8 мм ML = 1,6 мм DV = 7,3 мм), вентральную область покрышки (AP = −5,2 мм, ML = 1,0 мм, DV = 8,4–8,8 мм) и гиппокамп (AP = −4,9 мм, ML = 4,8 мм, DV = 6,0 мм). После интрацеребравентрикулярного введения вещества с аверсивной активностью (U-50488) и проведения теста условно-рефлекторного избегания места (УРИМ) были записаны LFP-сигналы, а затем рассчитана мощность в пяти частотных диапазонах (дельта, тета, альфа, бета и гамма) для каждой области мозга, а также когерентность между всеми парами отведений.

В качестве зависимой переменной использовался показатель аверсии, который вычисляли как разницу во времени, проведенном в каждой из зон установки. Независимыми переменными служили мощность LFP-сигналов и коннективность между областями мозга. Для построения модели использовался метод пошаговой множественной линейной регрессии с обратным отбором переменных, что позволило уменьшить количество предикторов и выявить наиболее значимые корреляты аверсии.

Для проверки модели использовалась процедура 5-кратной перекрестной валидации, которая выполнялась в 100 итераций. Оценка производительности модели основывалась на среднем значении абсолютной ошибки (MAE) и коэффициенте детерминации (R^2). Чтобы оценить статистическую значимость результатов и исключить возможность случайных корреляций, был проведен пермутационный тест. Для этого 100 раз случайным образом

перемешивались значения аверсии, после чего процедура кросс-валидации повторялась для каждого случайного набора данных. Пермутационное p-значение рассчитывалось как отношение количества раз, когда MAE для случайных данных был выше, чем для истинных данных, к числу итераций (100).

В рамках текущего этапа исследования проверяли экстраполяционную способность модели на данных группы контроля, которая получала в качестве лечения физиологический раствор, затем модель была использована для тестирования аверсивных свойств новых соединений. В ходе эксперимента крысам вводили вещества интрацереброventрикулярно в дозе 350 мкг. Регистрацию LFP-сигналов проводили с тех же областей мозга, что и в первичном эксперименте. Полученные данные проанализированы с использованием разработанной модели для предсказания степени аверсии на основе электрической активности мозга.

Регистрация мембранных токов методом patch clamp

Локальная фиксация тока клетки

Эксперименты проводили на корональных срезах мозга крыс (8–12 недель) толщиной 500 мкм, содержащих базолатеральный комплекс миндалины (2,5–3,5 мм каудальнее брегмы), которые получали с использованием вибратома (Campden 7000smz-2, Великобритания). Срезы немедленно переносили в регистрационную камеру, где их непрерывно перфузировали аэрированной карбогеном (95% O_2/5% CO_2) искусственной спинномозговой жидкостью (ACSF) при температуре 31±1 °C и скорости потока 2 мл/мин (состав ACSF в мМ: 117 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 NaH_2PO_4, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, 25 $NaHCO_3$, 11 глюкозы; pH 7,4). Электрофизиологическую регистрацию спонтанной активности нейронов проводили методом фиксации потенциала на целой клетке («whole-cell patch-clamp») с помощью микроскопа Olympus BX51. Пирамидные нейроны идентифицировали по наличию аккомодации в ответ на инъекцию деполяризующего тока (200 пА, 500 мс). Микропипетки (сопротивление наконечника 3–5 МОм), изготовленные из боросиликатного стекла, заполняли внутриклеточным раствором, содержащим: 122 мМ K-глюконата, 5 мМ NaCl, 0,3 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, 5 мМ Na_2-ATP и 0,4 мМ Na_2-GTP, pH регулировался в пределах 7,2–7,3. Сбор данных и анализ сигналов осуществляли с помощью усилителя HEKA Patch Clamp EPC10 USB (HEKA Elektronik, Германия), ПК Asus microXperts (ASUS, Тайвань), ПО PatchMaster (HEKA Elektronik, Германия). Для построения кривых «концентрация-эффект» формировали следующие группы (n = 8): (1) U-50488, 0,001-10 мкМ; (2) U-50488 (0,001-10 мкМ)+РУ-1205 10 мкМ; (3) U-50488 (0,01-10 мкМ)+РУ-1205 100 мкМ (4) U-50488 (0,001-10 мкМ)+SB203580 1 мкМ (5) U-50488 (0,001-10 мкМ)+SB203580 5 мкМ.

Локальная фиксация потенциала клетки

Корональные срезы мозга (400 мкм, −2,34–0,74 мм от брегмы) самцов крыс (8–12 недель; n = 32) были приготовлены с использованием вибратома (Campden 7000smz-2, Великобритания) при температуре 4°C в насыщенной кислородом искусственной спинномозговой жидкости, содержащей 254 мМ сахарозы, 10 мМ D-глюкозы, 24 мМ $NaHCO_3$, 2 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgSO_4$, 3 мМ KCl и 1,25 мМ NaH_2PO_4 (pH 7,4). Затем срезы поддерживали в насыщенной кислородом ACSF (128 мМ NaCl, 10 мМ D-глюкозы, 26 мМ $NaHCO_3$, 2 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgSO_4$, 3 мМ KCl, 1,25 мМ NaH_2PO_4; pH 7,4) при температуре 30°C в течение как минимум 2 часов перед экспериментами.

Восстановленные срезы были перенесены в перфузионную камеру, установленную на столике микроскопа BX51 (Olympus, Токио, Япония). ACSF, аэрированная смесью 95% O_2 и 5% CO_2 при комнатной температуре, перфузировалась со скоростью 2–3 мл/мин. Пирамидные нейроны слоя 6 (L6) идентифицировали на основании морфологических характеристик и электрофизиологических свойств. Электрод для записи (2–4 МОм), заполненный раствором, содержащим 120 мМ калий глюконата, 5 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 4 мМ K_2-АТФ, 0,4 мМ Na-ГТФ, 10 мМ Na_2-фосфокреатина и 10 мМ HEPES буфер (pH 7,3, отрегулированный KOH), использовали для записи потенциала пирамидных нейронов L6. Биоэлектрическая активность нейронов усиливалась и регистрировалась с помощью усилителя EPC10 (HEKA Elektronik, Германия) с коррекцией на диффузионный потенциал (14 мВ). Данные собирались с частотой 20 кГц и фильтровались по низким частотам на 3 кГц с использованием программного обеспечения PatchMaster (HEKA Elektronik, Германия).

Для оценки влияния серотонина (5-HT) и антипсихотических препаратов на пирамидные нейроны L6 проводили запись ионных токов в конфигурации «whole-cell» в режиме фиксации напряжения при –75 мВ. Реакцию на 5-HT исследовали путем добавления серотонина гидрохлорида (10 мкМ; 20 с) в ванночку с ACSF. Вещества (галоперидол, 15 мкМ; клозапин, 15 мкМ; РУ-31, 10 мкМ) вводили через перфузионную систему в течение 10 минут. Анализ данных проводился с использованием библиотеки NumPy версии 2.0.1.

2.5. Методы *in vitro*

Изучение каппа-опиоидной агонистической активности

Определение уровня каппа-опиоидной активности проводилось *in vitro* на модели активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния в солевой среде (Сакаев М.Р., 2000). Исследование проводили на тромбоцитах кролика (буферный раствор трис-HCl, pH 7,4) с использованием лазерного анализатора размеров частиц «ЛАСКА-1К» (ТМК-Инжиниринг,

Россия) при концентрации тестируемых солей 1×10^{-4} М (Деркачев Э.Ф., 1998). Препаратом сравнения служил селективный каппа-агонист U-50488 (Sigma, США). О выраженности каппа-агонистической активности исследуемых веществ судили по изменению величины сигнала светопропускания в сравнении с контролем (Δ%). Специфичность каппа-опиоидного характера действия исследуемых веществ изучали в условиях 2-минутной преинкубации с селективным каппа-антагонистом норбинолторфимином (norBNI) в конечной концентрации 1×10^{-4} М (Sigma, США).

Изучение влияния на выработку оксида азота (II) и цитотоксических свойств

Противовоспалительная активность оценивалась на модели перитонеальных макрофагов (ПМ), выделенных из перитонеального экссудата лабораторных мышей (Ray A., 2010). Для получения макрофагов мышам внутрибрюшинно вводили 1 мл 3% раствора пептона, после чего через 72 часа осуществляли эвтаназию методом цервикальной дислокации. Перитонеальные клетки собирали путем промывания брюшной полости фосфатно-солевым буфером.

Накопление нитрит-аниона (NO^{2-}), являющегося стабильным продуктом метаболизма оксида азота, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой (iNOS), оценивалось методом Грисса. Для этого 50 мкл супернатанта, отобранного через 22 часа после инкубации ПМ с тестируемыми и контрольными соединениями, смешивали с 50 мкл 1% раствора сульфаниламида в 2,5% фосфорной кислоте и 50 мкл 0,1% раствора N-(1-нафтил)этилендиамина в 2,5% фосфорной кислоте. После 10-минутной инкубации при 23 °С в орбитальном шейкере регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 550 нм с использованием микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Grödig, Австрия). Оптическую плотность (A_{550}) переводили в концентрацию NO (мкМ) по калибровочной кривой, построенной на стандартах $NaNO_2$ 0–100 мкМ, приготовленных в среде DMEM.

Жизнеспособность клеток оценивали по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клеточном супернатанте. Через 24 часа после инкубации перитонеальных макрофагов с тестируемыми соединениями супернатанты смешивали с 250 мкл 0,194 нМ раствора НАДН в 54 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,5), затем добавляли 25 мкл 6,48 мМ раствора пирувата. Изменение оптической плотности регистрировали при длине волны 340 нм в течение 20 минут с использованием микропланшетного ридера Infinite M200 (Tecan, Швейцария). Жизнеспособность клеток рассчитывали в процентах, нормализуя данные по контрольным значениям. Жизнеспособность клеток, инкубированных с ДМСО, принимали за 100%, а клеток,

обработанных 0,01% тритоном X-100 за 0%. Исследуемые соединения BIF-70 и BIF-72 добавляли в конечных концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкМ.

2.6. Поведенческие методы исследования

Модель дискриминации стимулов

В эксперименте с изучением дискриминативных стимульных свойств соединения РУ-1205 интактным крысам (n = 25) имплантировали стимулирующий электрод из нержавеющей стали (0,1 мм) в вентральную область покрышки в соответствии со стереотаксическими координатами относительно брегмы: AP = −5,2 мм, ML = +1,0 мм, DV = −8,6 мм.

На этапе предварительной подготовки животных помещали в камеру с одним доступным рычагом: правым или левым. За 10 минут до начала обучения животным вводили либо исследуемое вещество: 1) РУ-1205 в дозе 350 мкг/5 мкл и.ц.в. (n = 9); 2) комбинацию РУ-1205 350 мкг и налоксона 200 мкг в 5 мкл ACSF и.ц.в. (n = 8); 3) комбинацию SB203580 1 мкг и налоксона 200 мкг в 5 мкл ACSF и.ц.в. (n = 8); либо контрольный раствор ACSF (5 мкл)/налоксон (200 мкг). Налоксон был использован при обучении третьей группы (SB203580 + налоксон) с целью подтверждения того, что данный препарат не оказывает влияния на способность дискриминации MAPK p38-ингибирующей активности. Также при введении соединения РУ-1205 группе, обученной распознавать SB203580, есть вероятность получения ложнонегативного результата за счет каппа-опиоидного компонента действия, который может оказывать влияние на точность дискриминации.

У половины животных из группы нажатие на левый рычаг подкреплялось, если был введен контрольный раствор, а на правый при введении исследуемого соединения, у второй половины, наоборот, нажатие на правый рычаг подкреплялось при введении исследуемого вещества, а на левый при введении контрольного раствора.

В случае нажатия на рычаг животным подавался электрический стимул (24 двухфазных импульса 60 Гц, продолжительностью 2 мс с фиксированным соотношением оперантных действий к стимулам 1:1) в зону подкрепления при помощи изолированного стимулятора (A-M Systems MODEL 4100, США). Силу тока подбирали индивидуально в пределах 80–150 мкА, ниже уровня, который вызывал непроизвольные движения, поведение избегания или голосовые реакции. Далее на протяжении 3–4 дней фиксированное соотношение постепенно доводилось до 10.

На этапе обучения дискриминации, как и на подготовительном этапе, начинали с фиксированного соотношения 1 и доводили до 10. Каждый сеанс длился 20 минут, животным

были доступны правый и левый рычаг одновременно, при этом в случае нажатия неверного рычага счетчик обнулялся, и животным было необходимо заново совершить 10 оперантных действий для получения подкрепления. Введение ACSF / налоксона или исследуемых веществ были случайным образом разбиты на три недельных сессии (таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Схема введения ACSF (5 мкл), налоксона (200 мкг) и исследуемых соединений на этапе обучения дискриминации

Группа		**Первая неделя**	**Вторая неделя**	**Третья неделя**
1	РУ-1205 (350 мкг и.ц.в., n = 9)	Р-А-Р-Р-Р-А-А	А-Р-Р-А-Р-А-А	А-Р-Р-Р-А-А-Р
2	РУ-1205 + налоксон (350 мкг/200 мкг и.ц.в., n = 8)	Рн-Н-Рн-Н-Н-Рн-Рн	Н-Рн-Рн-Н-Н-Рн-Рн	Рн-Н-Н-Рн-Рн-Рн-Н
3	SB203580 + налоксон (1 мкг/200 мкг и.ц.в., n = 8)	Sн-Н-Sн-Sн-Н-Н-Sн	Н-Sн-Н-Sн-Sн-Н-Sн	Sн-Н-Sн-Н-Sн-Н-Н

Примечание: А – ACSF; Н – налоксон; Р – РУ-1205; Рн – РУ-1205 + налоксон; Sн – SB203580 + налоксон.

Когда эффективность распознавания составляла 80% или выше (по крайней мере в восьми из десяти последовательных тренировок), животное допускалось до этапа тестирования (Lee J.Y. et al., 2016).

На этапе тестирования проводились тесты на замещение в возрастающих дозах, поскольку дискриминативные стимульные свойства соединений изменяются в зависимости от концентрации и невозможно подобрать эквивалентные по субъективно-воспринимаемому эффекту дозы различных веществ. Первой группе животных вводили соединение РУ-1205 в дозах 3,5 мкг, 35 мкг или 350 мкг интрацеребровентрикулярно за 10 минут до начала эксперимента. Затем с этими животными были проведены тесты на замещение с использованием селективного каппа опиоидного агониста – соединения U-50488 (1 мкг, 10 мкг, 100 мкг и.ц.в.) и ингибитора MAPK p38 – соединения SB203580 (0,01 мкг, 0,1 мкг, 1 мкг и.ц.в.), чтобы оценить генерализацию эффекта (то есть, отождествление эффектов нового вещества и вещества, которое вводилось при тренировке).

Третьей группе на этапе тестирования за 15 минут до начала вводили налоксон (200 мкг и.ц.в.), а за 10 минут соединение SB203580 (0,01 мкг, 0,1 мкг, 1 мкг и.ц.в.). После этим животным были проведены тесты на замещение комбинацией РУ-1205 + налоксон (3,5 мкг, 35 мкг и 350 мкг/200 мкг и.ц.в.). Тестирование проводилось два раза в неделю. Между испытаниями животные проходили контрольные тестирования с ACSF/налоксоном или

тренировочной дозой исследуемого соединения. Для каждой тренировочной дозы соединения рассчитывали среднее количество сеансов обучения (±SD), а также строилась кривая «доза-эффект», отражающая процент нажатия на рычаг, ассоциированный с веществом (за 100% принимались нажатия на оба рычага).

Поведенческая оценка анальгетических эффектов при введении в структуры мозга

Процедура выполнения внутримозговых микроинъекций

Животные вводились в состояние наркоза посредством ингаляционной анестезии изофлюраном. После достижения полного обездвиживания крыс фиксировали в стереотаксическом аппарате. Область головы обрабатывалась антисептическим раствором, и на средней линии черепа выполнялся продольный разрез кожи. Введение раствора выполнялось через отверстия в черепе (диаметром 1 мм), которые высверливали стоматологическим буром. Координаты целевых зон определяли по атласу мозга крыс Paxinos и Watson (Paxinos G., Watson C., 2007). Скорость введения контролировалась с помощью автоматического насоса, чтобы минимизировать возможное повреждение ткани мозга. Растворы каппа-опиоидных агонистов U-50488 (1,6 мкг, n = 8) и соединения РУ-1205 (5,6 мкг, n = 8) вводились билатерально медленно, со скоростью 0,1 мкл/мин, чтобы предотвратить чрезмерное локальное давление и обеспечить равномерное распределение вещества в целевой области. Общий объем вводимого раствора составлял 0,2–0,5 мкл. Контрольная группа животных (n = 8) получала микроинъекции ACSF в те же области мозга. После введения раствора иглу оставляли в тканях мозга на 2–3 минуты, чтобы предотвратить обратное вытекание раствора по каналу инъекции. По истечении этого времени иглу медленно извлекали для минимизации риска повреждения ткани. После извлечения иглы операционная область была очищена от остатков крови и обработана антисептиком. Кожу над разрезом закрывали хирургическими швами. На месте разреза дополнительно наносился антибактериальный гель для предотвращения развития инфекции. Животных переводили в индивидуальные клетки и оставляли для восстановления под постоянным наблюдением до полного выхода из анестезии. После завершения эксперимента проводили гистологическую верификацию инъекционного канала.

Тестирование анальгезии

Для оценки анальгетического эффекта использовались несколько поведенческих тестов на болевую чувствительность в соответствии с рекомендациями, изложенными в главе 12 «Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств» (Воронина Т.А., Гузеватых Л.С., 2012) «Руководство по проведению доклинических

исследований лекарственных средств» по ред. А.Н. Миронова (2012). Основные используемые тесты включали:

Тест отдергивания хвоста: кончик хвоста крысы подвергали воздействию фокусированного источника теплового излучения, и измеряли время до рефлекторного отдергивания в установке «Tail Flick» (Ugo Basile S.r.l., Varese, Италия). Этот тест также использовался для оценки термической болевой чувствительности.

Формалиновый тест: в подушечку лапы вводили 50 мкл 2,5% раствора формалина, и регистрировали болевую реакцию (облизывание или кусание лапы) в течение 5 минут. Тест позволял оценить острую болевую реакцию, вызванную химическим раздражением.

Оценку механической ноцицептивной чувствительности проводили с помощью теста фон Фрея. Для индукции гипералгезии животным предварительно вводили полный адъювант Фрейнда. Использовали набор калиброванных нейлоновых монофиламентов с силой изгиба в диапазоне 0,4–26 г. Монофиламенты последовательно прикладывали к плантарной поверхности лапы с возрастающей силой до выявления рефлекса отдергивания. Регистрировали минимальную силу, вызывающую реакцию, которую принимали за порог болевой чувствительности.

Тест взаимодействия с галоперидолом

Методика оценки влияния вещества РУ-31 на каталептогенный эффект галоперидола, который блокирует D_2-рецепторы, что характерно для типичных нейролептиков и проявляется в угнетении двигательной активности, ориентировочных реакций и развитии каталепсии (Erzin-Waters C. et al., 1976; Higazy I.M., 2020).

Эксперимент проводился на крысах, которые были разделены на две группы: контрольную и опытную, по 8 животных в каждой. Вещество РУ-31 вводили крысам опытной группы интрацеребровентрикулярно (и.ц.в.) через предварительно имплантированные канюли в количестве 130 мкг, контрольная группа получала 5 мкл искусственной спинномозговой жидкости. Внутрижелудочковое введение позволяет доставить вещество непосредственно в мозг, минуя гематоэнцефалический барьер. Это может помочь выяснить, как вещество действует на центральную нервную систему без влияния системных факторов и метаболизма в организме. Спустя 15 минут после введения соединения РУ-31 выполняли инъекцию галоперидола в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно.

Оценку каталепсии у крыс проводили по следующей методике. Животное помещали на стол и наблюдали за его движениями. Если крыса двигалась самостоятельно, присваивали 0 баллов. При движении крысы только в ответ на прикосновение или толкание, оценка составляла

0,5 балла (этап 1). Далее передние лапы крысы поочередно помещали на брусок высотой 3 см. Если животное сохраняло приданную ему позу в течение 15 с, к баллу, полученному на этапе 1, добавляли по 0,5 балла за каждую лапу (этап 2). На заключительном этапе передние лапы крысы поочередно помещали на брусок высотой 9 см. В случае отсутствия движения, присваивали 1 балл за каждую лапу (этап 3). Таким образом, для каждого животного максимально возможная сумма баллов составляла 3,5 (пороговое значение). Оценку проводили через 30, 60, 90, 120, 150 и 180 минут после начала эксперимента.

Изменение выраженности каталептогенной реакции в опытной группе по сравнению с контрольной служило индикатором потенциального дофаминергического действия соединения РУ-31.

Тест взаимодействия с пикротоксином

Исследование влияния вещества РУ-31 на ГАМК-ергическую систему мозга проводилось с использованием теста пикротоксиновых судорог (Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2012). Эксперимент основан на способности пикротоксина, антагониста $ГАМК_А$-рецепторов, вызывать центральное возбуждающее действие, проявляющееся развитием тремора и клонических судорог.

Для проведения исследования использовались мыши самцы, разделенные на контрольную и опытные группы по 8 животных в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 вводилось как описано ранее (25 мкг и.ц.в., n = 8). Контрольная группа животных (n = 8) получала 3 мкл ACSF.

Непосредственно перед началом эксперимента регистрировались исходные показатели. Затем производилось моделирование судорог путем внутрибрюшинного введения пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг. После инъекции пикротоксина в течение 1 часа велось наблюдение за животными. Регистрировались следующие показатели: латентное время развития тремора (в секундах), латентное время развития судорог (в секундах) и количество судорожных припадков.

Эффективность РУ-31 оценивалась путем сравнения регистрируемых показателей в опытных группах с показателями контрольной группы животных. Изменение этих параметров позволяло судить о влиянии изучаемого соединения на ГАМК-ергическую систему мозга и его потенциальном противосудорожном действии.

Тест взаимодействия с клонидином

Для изучения фармакологических свойств соединения РУ-31 применялись эксперименты на крысах с использованием теста клонидиновой гипотермии (Livingston A. et al., 1984).

Данный тест позволяет оценить влияние экспериментальных веществ на адренергическую систему. Клонидин, являясь симпатолитическим средством, оказывает депримирующее действие на центральную нервную систему экспериментальных животных, что проявляется развитием гипотермии, угнетением процессов формирования условных рефлексов и снижением локомоторной активности.

Эксперименты проводились на крысах-самцах, разделенных на интактную группу (получали дистиллированную воду, n = 8), контрольную группу, получавшую только клонидин (0,1 мг/кг, внутрибрюшинно, n = 8), и опытную группу, которым вводилось соединение РУ-31 (130 мкг и.ц.в., n = 8) за 15 минут до введения клонидина.

Измерение ректальной температуры крыс проводили с помощью электронного термометра «OMRON» (Германия), погружая датчик на глубину 1,5–1,8 см. Температуру измеряли каждые 30 минут в течение двух часов после введения клонидина. О действии исследуемых веществ судили по изменению наблюдаемых реакций в опытной группе по сравнению с показателями контрольной группы.

Тест взаимодействия с 5-ГТФ

Исследование влияния РУ-31 на серотонинергическую систему мозга проводилось с использованием теста 5-ГТФ-индуцированного гиперкинеза (Tanaka Y. et al., 1998). Метод основан на способности 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ), метаболического предшественника серотонина, вызывать у грызунов характерное гиперкинетическое расстройство, проявляющееся в форме резких встряхиваний головой. Этот эффект связан с усилением серотонинергической нейропередачи в мозге, в частности, за счет стимуляции 5-HT_2-серотониновых рецепторов.

За 15 минут до начала эксперимента животным опытной группы (n = 8) вводили вещество РУ-31 (25 мкг, и.ц.в.), в то время как контрольные животные (n = 8) получали эквивалентный объем растворителя (ACSF). Непосредственно перед началом эксперимента регистрировали исходные показатели.

Затем всем животным выполняли внутрибрюшинную инъекцию 5-ГТФ в дозе 300 мг/кг для моделирования гиперкинеза. После этого в течение 1 часа с интервалом 10 минут у каждого животного подсчитывалось количество «твитчингов» (резких встряхиваний головой) за 1 минуту.

Влияние РУ-31 на выраженность гиперкинеза оценивали путем сравнения количества встряхиваний головой в опытных группах и контрольной. Снижение числа «твитчингов» под

действием исследуемого вещества свидетельствует о его влиянии на серотонинергическую систему.

Тест взаимодействия с ареколином

Для исследования влияния вещества РУ-31 на холинергическую систему мозга использовали тест ареколинового тремора (Patterson T.A., 1994). Методика основана на способности ареколина, являющегося центральным М-холиномиметиком, вызывать у животных ряд характерных эффектов, включая тремор.

Эксперимент проводится на крысах самцах, разделенных на группы: контрольную и опытную. Животным опытной группы вводили вещество РУ-31 (130 мкг и.ц.в., n = 8). Контрольная группа получала растворитель (эквивалентный объем ACSF, n = 8).

Спустя 15 минут после инъекции вещества РУ-31 или ACSF (контрольная группа) всем животным внутрибрюшинно вводили ареколин в дозе 15 мг/кг. Сразу после применения ареколина у животных регистрировали два основных показателя: латентный период развития тремора (время от момента введения ареколина до появления тремора) и длительность тремора.

Наличие у РУ-31 центрального М-холиноблокирующего действия оценивали по увеличению латентного периода развития тремора и/или уменьшению его длительности у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой. И наоборот, сокращение латентного периода и/или увеличение длительности тремора может свидетельствовать о возможном М-холиномиметическом действии РУ-31.

Тест взаимодействия с L-ДОФА

Метод изучения МАО-ингибирующего действия вещества РУ-31 основан на способности L-ДОФА в низких дозах вызывать стереотипное поведение у животных в присутствии ингибиторов МАО (Трегубова И.А. и др., 2015).

Эксперимент выполнялся на мышах самцах, которые распределялись на 3 группы по 8 особей в каждой: две контрольные и одна опытная группы. Животным опытной группы вводили исследуемое вещество РУ-31 (25 мкг и.ц.в., n = 8), контрольные группы получали эквивалентный объем растворителя (ACSF, n = 8).

Через 15 минут после введения вещества РУ-31 или растворителя, животным вводили L-ДОФА внутрибрюшинно в следующих дозах: первой контрольной – 500 мг/кг, второй контрольной и опытной группам – 100 мг/кг.

Оценка двигательной стереотипии, вызванной L-ДОФА, проводилась через 30, 60 и 90 минут после его введения. Каждое животное наблюдалось в течение 1 минуты, во время которой оценивается уровень проявляемой стереотипии по 4-балльной шкале:

- 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.

Присутствие ингибирующего воздействия на моноаминооксидазу у вещества подтверждалось при наличии значимых отличий в поведении животных опытной группы относительно второй контрольной группы, получавшей низкую дозу L-ДОФА (100 мг/кг).

Оценка взаимодействия с апоморфином

Влияние на феномен «вертикализации», вызванной введением апоморфина у мышей

Мыши были распределены на четыре группы по 8 особей (Островская Р.У. и др., 2012). Экспериментальные группы получали внутрибрюшинные инъекции галоперидола, клозапина, соединение РУ-31 в возрастающих дозах (0,1–15 мг/кг) или физиологический раствор (10 мл/кг, контрольная группа). Вещества вводили за 20 минут до подкожной инъекции апоморфина (5 мг/кг). Через 10 минут после введения апоморфина животных помещали в цилиндрические камеры (высота 14, диаметр 12 см, изготовленные из проволочного прутка толщиной 2 мм, расстояние между прутьями 1 см) для наблюдения за стереотипным поведением. Оценивали интенсивность вертикализации по четырехбальной системе: 0 баллов – ни одна лапа животного не находится на сетке; 1 балл – одна лапа животного находится на сетке; 2 балла – две лапы животного находятся на сетке; 3 балла – три лапы животного находятся на сетке; 4 балла – четыре лапы животного находятся на сетке. Оценка проводилась каждые 2 минуты на протяжении 10 секунд в течение одного часа. По окончании эксперимента для каждого животного подсчитывали суммарный балл.

Построены кривые «доза-эффект», на основе которых интерполировались значения ED80 для каждого соединения. Анализ проводили методом нелинейной регрессии с использованием модели переменного наклона Хилла и расчетом коэффициентов детерминации (R^2). Полученные ED80 использовались в дальнейших экспериментах.

Апоморфиновая гиперактивность крыс в открытом поле

За 30 минут до применения апоморфина животным внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения: 1 (n = 8) - физиологический раствор (10 мл/кг), 2 (n = 8) – галоперидол (1 мг/кг), 3 (n = 8) – клозапин (7,5 мг/кг), 4 (n = 8) – соединение РУ-31 (10 мг/кг) соответственно (Островская Р.У. и др., 2012). Апоморфин инъецировали подкожно в дозе 5 мг/кг за 3 минуты до начала тестирования. Оценку горизонтальной двигательной активности проводили в установке «Открытое поле» в течение 5 минут после введения апоморфина.

Влияние на стереотипное поведение, вызванное введением апоморфина у крыс

Животные были распределены на 4 группы по 8 особей в каждой (Островская Р.У. и др., 2012). За 30 минут до инъекции апоморфина животным внутрибрюшинно вводили следующие вещества: контрольной группе – физиологический раствор (10 мл/кг), экспериментальным группам – галоперидол (1 мг/кг), клозапин (7,5 мг/кг) или соединение РУ-31 (10 мг/кг) соответственно.

Апоморфин вводили подкожно в дозе 1 мг/кг, после чего оценивали стереотипное поведение животных каждые 15 минут в течение 2 часов. Стереотипные реакции (принюхивание, грызение, лизание) оценивали по трехбалльной шкале: 1 балл – слабая, 2 балла – умеренная, 3 балла – интенсивная стереотипия.

Влияние на эффекты малых (пресинаптических) доз апоморфина

При оценке изменений эффектов малых (пресинаптических) доз апоморфина животных распределили по четырем группам по 10 особей (Островская Р.У. и др., 2012). За 30 минут до получения апоморфина крысам внутрибрюшинно вводили: 1 – физиологический раствор (10 мл/кг); 2 – галоперидол (1 мг/кг); 3 – клозапин (7,5 мг/кг); 4 – соединение РУ-31 (10 мг/кг).

Апоморфин вводили подкожно в дозе 0,1 мг/кг. После инъекции апоморфина в течение 60 минут регистрировали количество зевательных движений у каждого животного.

Влияние веществ на агрессивное поведение

В течение всего исследования использовались одни и те же пары животных, которые всегда выбирались из соседних клеток и подвергались одному и тому же типу фармакологического воздействия.

Для индукции агрессивного поведения крысам вводили апоморфин (1 мг/кг, п/к) ежедневно в течение 15 дней. Оценка агрессивного поведения проводилась на 1, 3, 6, 9 и 12 дни эксперимента. Наблюдали за [1] временем латентного периода (время до первой атаки или первой агрессивной позы) и [2] интенсивностью агрессивного поведения с использованием

четырехбалльной шкалы: 0 – отсутствие агрессии; 1 – слабая агрессия без вокализации; 2 – интенсивная агрессия с вокализацией, но без укусов; 3 – непрерывные атаки или попытки укусить. Тест прекращался при достижении максимального уровня агрессии во избежание травм. Животные, не проявляющие агрессивного поведения к 15 дню, исключались из дальнейшего исследования (Skrebuhhova-Malmros T. et al., 2000).

На 15 день начиналось исследование влияния тестируемых соединений на апоморфин-индуцированную агрессию. Галоперидол (1 мг/кг, n = 8), клозапин (7,5 мг/кг, n = 8), соединение РУ-31 (10 мг/кг, n = 8) или эквивалентный объем физиологического раствора (группа контроля, n = 8) вводили внутрибрюшинно за 30 минут до инъекции апоморфина (1 мг/кг, п/к). Сразу после введения апоморфина пары крыс помещали в тестовую клетку и регистрировали агрессивное поведение в течение 15 минут.

Изучение влияния на медиальную префронтальную область коры при локальном введении

Крысам под изофлюрановым наркозом проводили локальные микроинъекции соединения РУ-31 (15 мкг, n = 8), галоперидола (5 мкг, n = 8), клозапина (10 мкг, n=8) или растворитель (ACSF, n = 8) непосредственно в медиальную префронтальную кору. Для микроинъекций использовались стереотаксические координаты: AP = +3,2 мм, ML = ±0,6 мм, DV = 3,0 мм от брегмы. Объем инъекций составлял 0,5 мкл на каждую сторону, скорость инъекции – 0,1 мкл/мин. После выполнения микроинъекции игла оставалась на месте в течение дополнительных 2 минут для предотвращения обратного вытекания раствора (León L.A. et al., 2017).

Спустя 10 минут после введения исследуемых веществ для моделирования когнитивных нарушений животным проводили внутрибрюшинную инъекцию кетамина (10 мг/кг).

Через 5 минут после введения кетамина животные проходили 10-минутный период адаптации, в течение которого они находились в камере, где постоянно присутствовал белый шум на уровне 65 дБ. Далее проводили тестирование стартл-реакции и препульсового ингибирования (PPI). Сначала крысы подвергались воздействию 40-мс звукового стимула с интенсивностью 120 дБ и фиксировалась стартл-реакция. Затем измеряли PPI с использованием стандартной процедуры: животным предъявляли акустический препульс (75 дБ, 20 мс) за 100 мс до подачи основного звукового стимула (120 дБ, 40 мс). Степень подавления стартл-рефлекса препульсом (PPI) рассчитывали как долю, на которую препульс снижал амплитуду ответа, выраженную в процентах от амплитуды реакции на стимул без препульса. С каждым животным проводили 10 последовательных чередующихся измерений и брали средние значения.

Влияние на мышечный тонус и координацию

Влияние соединения BIF-72 и топирамата на мышечный тонус оценивали в тестах вращающегося стержня и перевернутой сетчатой платформы.

В тесте вращающегося стержня за день до начала эксперимента проводилось предварительное приучение мышей к установке. На следующий день во время тестирования животных помещали на вращающийся стержень (10 об/мин) и фиксировали латентный период (ЛП) – время до первого падения животного с вращающегося стержня (Deacon R.M., 2013).

В тесте перевернутой сетчатой платформы после введения соединений животное помещали на горизонтальную перевернутую сетчатую платформу и определяли время удерживания (Aartsma-Rus A., 2014).

Тест условнорефлекторного избегания места

Для оценки аверсивных свойств исследуемых соединений использовали методику условнорефлекторной реакции избегания места (УРИМ) (Delavari F. et al., 2016). На первом этапе, в ходе оценки исходных предпочтений (1-й день), крыс помещали в установку и предоставляли им свободный доступ к обеим камерам, различающимся по визуальным и тактильным стимулам, в течение 15 минут, регистрируя время, проведенное в каждой из них. На этапе выработки условной реакции (2–4-й дни) процедуру проводили дважды в день с интервалом в четыре часа. Крысам опытных групп (n = 8) в одну из сессий интрацеребровентрикулярно вводили соединение BIF-70 (350 мкг) или BIF-72 (350 мкг) с последующим помещением в один из отсеков на 30 минут, а в другую сессию того же дня им вводили ACSF с помещением в противоположный отсек на 30 минут. Крысам контрольной группы (n = 8) по аналогичной схеме в обеих сессиях вводили ACSF, ассоциируя каждую инъекцию с разными отсеками. Для сохранения нейтрального баланса предпочтений половину животных каждой группы после введения раствора размещали в изначально более предпочитаемом отсеке, а другую половину в менее предпочитаемом. На 5-й день проводили финальное тестирование, в ходе которого крысам вновь предоставляли свободный доступ ко всем отсекам установки на 15 минут и регистрировали время пребывания в каждой камере. Формирование аверсивной реакции оценивали по разнице во времени, проведенном в ассоциированном с веществом отсеке, в день финального тестирования и в день оценки исходных предпочтений.

Изучение поведения крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»

Данный эксперимент был направлен на анализ поведения крыс при введении различных веществ. Для этого использовалась трехэтапная схема: 2D-видеорегистрация поведения в открытом поле (20 минут, 1080p, 30 к/с), трекинг поз с помощью SLEAP (ключевые точки на теле крысы), и последующая квантификация поведенческой активности с помощью Keypoint MoSeq.

На видеозаписях автоматически отслеживали положение частей тела (уши, нос, позвоночник, основание хвоста) с помощью SLEAP. Предварительно вручную аннотировали 1000 кадров и обучали модель (UNet) в режиме активного обучения для получения высокой точности предсказаний поз. После достижения удовлетворительного качества трекинга данные экспортировались для дальнейшего анализа.

Для анализа поведения применялся метод Keypoint MoSeq, основанный на иерархической SLDS-модели (расширение AR-HMM), в которой сложные поведенческие паттерны («слоги») определялись через дискретные состояния. Дискретный компонент, реализуемый на основе скрытой марковской модели (HMM), определяет вероятностную динамику переходов между поведенческими слогами. Непрерывный компонент представлен набором авторегрессионных (AR) процессов, каждый из которых моделирует характерную для соответствующего слога динамику в латентном пространстве поз. Связь латентного представления с наблюдаемыми данными устанавливается посредством модели наблюдений, которая осуществляет проекцию латентных траекторий в пространство координат ключевых точек с учетом аддитивного шума и параметров, описывающих глобальное положение и ориентацию объекта.

В конфигурационном файле задавались ключевые точки для анализа и производилась калибровка качества распознавания. С помощью PCA проецировали данные в латентное пространство, затем инициализировали AR-HMM. В ходе итеративного обучения модели корректировались траектории и оптимизировались параметры слогов. Итоговые результаты сохранялись для последующей визуализации, где оценивали медианные траектории поз по слогам, оценивали сходства между слогами, визуально интерпретировали и количественно анализировали частоту их встречаемости в разных группах.

Для оценки влияния веществ на поведение сравнивали частоту встречаемости отдельных слогов. Слоги, статистически не зависящие от типа введенного препарата, считались неинформативными. Таким образом, методика позволила выявлять специфические паттерны поведения под воздействием разных лекарственных средств.

Влияние на рабочую память

Для оценки пространственной рабочей памяти у грызунов использовали Т-образный лабиринт (Queensland Brain Institute, 2025). Задача основывается на естественном желании мышей исследовать новые рукава, а не уже знакомые, что лежит в основе спонтанного чередования выбора боковых рукавов на повторных испытаниях.

Первое испытание проводили следующим образом: мышь помещали в стартовый рукав лабиринта. Животное отпускали и давали возможность свободно выбрать один из двух рукавов (левый или правый). Как только животное входило в один из рукавов всеми четырьмя лапами и хвостом, дверь выбранного рукава закрывали, фиксируя результат. Животное задерживали в выбранном рукаве на 30 секунд, после чего переносили обратно в стартовый рукав.

После этого начинали 5-минутный этап тестирования. Регистрировали последовательность входов в каждый рукав и вычисляли процент спонтанного чередования (% СЧ) по формуле:

$$\% \text{ СЧ} = \text{количество чередований} / (\text{общее количество входов} - 2) \times 100.$$

2.7. Моделирование патологических состояний

Оценка противозудных свойств

Серотонин-индуцированный зуд

Предварительный отбор животных осуществлялся на основе их реакции на внутрикожное введение серотонина. Крысы, демонстрировавшие в среднем более 10 эпизодов чесания за две предварительные сессии, включались в исследование. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы: 1 (n = 8) – контроль (физиологический раствор, 10 мл/кг, внутрибрюшинно); 2 (n = 11) – РУ-1205 (5 мг/кг, внутрибрюшинно); 3 (n = 10) – U-50488 (5 мг/кг, внутрибрюшинно). Исследуемые вещества вводили за 30 минут до назначения серотонина.

После введения исследуемых веществ животным инъецировали серотонин (0,5 мг в 50 мкл) внутрикожно в область спины между лопатками по линии, соединяющей нижние углы каждой лопатки. Шерсть в зоне инъекции предварительно выстригали за 2 суток до введения серотонина. Затем, через 20 минут крыс помещали в тестовую камеру на 40 минут для наблюдения за числом эпизодов чесания (Thomsen J.S. et al., 2001).

Регистрировалось количество эпизодов зуда. Чесание определялось как поднятие задней конечности и хотя бы одно движение почесывания в области между лопатками. Окончание

эпизода фиксировалось при возвращении конечности на пол камеры и прекращении чесания на период не менее 1 секунды.

Модель «сухой кожи»

За 3 дня до начала эксперимента в области затылка мышам предварительно сбривали шерсть. На ограниченный участок кожи (приблизительно 15 × 15 мм по средней линии затылка) дважды в день в течение 8 дней наносили смесь ацетона / эфира (1:1) на 15 секунд, после чего поверхность обрабатывали дистиллированной водой в течение 30 секунд. На 8-й день эксперимента, через 16-20 часов после второй обработки, животные были распределены на три экспериментальные группы: 1 (n = 10) – контрольная группа (физиологический раствор, 10 мл/кг, внутрибрюшинно); 2 (n = 10) – РУ-1205 (5 мг/кг, внутрибрюшинно); 3 (n = 10) – U-50488 (5 мг/кг, внутрибрюшинно) (Akiyama T. et al., 2015).

Через 30 минут после введения исследуемых веществ мышам наносили три отдельных механических стимула с использованием филамента фон Фрея с изгибающим усилием 0,7 мН. Стимулы применялись в случайно выбранных точках, расположенных радиально на расстоянии 7 мм от обработанной области. Филамент с данной силой изгиба был выбран, так как он не вызывал эпизодов чесания у интактных мышей, но представлял минимальную силу, достаточную для вызова эпизодов чесания при воздействии на кожу в условиях сухости или после инъекции гистамина.

Для каждого стимула фиксировали наличие или отсутствие положительной реакции, выражающейся в движении задней лапы к месту механического воздействия. Уровень аллокнезиса определялся как общее количество положительных реакций на три последовательных стимула и мог принимать значения 0, 1, 2 или 3 балла. Показатель фиксировался в течение 30 минут с интервалом в 5 минут. После завершения теста проводилась регистрация спонтанного поведения животных в течение дополнительных 60 минут для определения количества эпизодов зуда.

Неонатальное разрушение вентрального гиппокампа (NVHL)

На 7-й день постнатального развития крысы были разделены на две группы: (1) оперированным животным в область вентрального гиппокампа вводили 0,3 мкл иботеновой кислоты (10 мкг/мкл); (2) ложнооперированным животным вводили эквивалентный объем искусственной спинномозговой жидкости (ACSF). Анестезия проводилась методом гипотермии (помещение на лед на 15–20 минут до исчезновения самопроизвольных движений). После фиксации животных в стереотаксическом аппарате (SR-5R-HT; Narishige Group, Токио, Япония)

выполняли разрез кожи длиной 1 см вдоль средней линии головы. Координаты для введения определялись относительно брегмы: AP = −3,0 мм, ML = ±3,5 мм, DV = 5,0 мм. Введение раствора иботеновой кислоты (ИК) проводилось с использованием системы для микроинъекций QSI (Stoelting, США) со скоростью 0,15 мкл/мин. После завершения процедуры животным закрывали рану, наносили маркировку и помещали на согревающий коврик до полного восстановления (Chambers R.A., 2011).

На 21–23 постнатальный день (ПД) развития создавали условия материнской депривации. Начиная с 35 дня проводилось ежедневное внутрибрюшинное введение соединения РУ-31 (10 мг/кг, n = 8), физиологического раствора (10 мл/кг, n = 9) или клозапина (7,5 мг/кг, n = 8) в течение 21 дня. С 56-го дня приступали к серии поведенческих тестов, направленных на исследование позитивной, негативной и когнитивной симптоматики. В ходе изучения локомоторной активности животное помещали в центр установки «Открытое поле», где в течение 10 минут регистрировали общее количество пересечений линий. Социальное взаимодействие оценивали, помещая в тестовую арену на 10 минут пару крыс из одной экспериментальной группы, ранее не контактировавших друг с другом. В качестве основного показателя анализировали суммарную продолжительность активных социальных контактов, включающих обнюхивание, социальный груминг, следование и перелезание. Оценку когнитивных функций осуществляли в тесте распознавания нового объекта. После 6-минутной фазы ознакомления с двумя идентичными объектами тестовые сессии проводили спустя 2 часа и 24 часа. В ходе каждой 6-минутной тестовой сессии один из объектов заменяли на новый. По результатам каждого временного интервала рассчитывали индекс дискриминации (ИД) по формуле: ИД = Тн / (Тн + Тз), где Тн и Тз – время исследования нового и знакомого объектов соответственно.

Кетамин-индуцированная модель психоза

Для моделирования психоза мышам на протяжении 14 дней внутрибрюшинно вводили кетамин в дозе 30 мг/кг (Hauser M.J., 2017). С 8 по 14 день животных делили на три группы и внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (10 мл/кг, n = 10), клозапин (7,5 мг/кг, n = 10), либо соединения РУ-31 (10 мг/кг, n = 10). На следующий день после окончания введения соединений проводили тестирование животных для оценки позитивной симптоматики (локомоторная активность в открытом поле), негативной симптоматики (социальное взаимодействие) и когнитивных нарушений (распознавание нового объекта).

Модель материнской иммунной активации

Исследование проводилось с использованием белых беспородных крыс-самок, выведенных в условиях вивария НЦИЛС ВолгГМУ. На 15 день гестации беременным крысам однократно вводили внутрибрюшинно 50 мкг/кг липополисахарид (Sigma L2755 из *Escherichia coli*, серотип O128:B12). Животным контрольной группы вводили физраствор в объеме 10 мл/кг (Wischhof L. et al., 2015).

После рождения потомство оставалось с самками до ПД21, после чего их подвергали материнской депривации. Начиная с 35-го дня постнатального развития животным из потомства от самок, подвергавшихся воздействию ЛПС, вводили исследуемое соединение РУ-31 (10 мг/кг, n = 10), физиологический раствор (10 мл/кг, n = 10) или клозапин (7,5 мг/кг, n=10). Введение продолжалось 21 день. В исследование включали только самцов. С ПД56 проводили поведенческие тесты для оценки позитивной, негативной и когнитивной симптоматики. Тесты включали исследование локомоторной активности в открытом поле, социальное взаимодействие, распознавание нового объекта.

Антиконвульсивная активность в тесте максимального электрошока

Судорожную активность индуцировали путем транскорнеальной электростимуляции (50 Гц, 50 мА, длительность импульса 0,2 с) (Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2012). Критерием оценки противосудорожного действия служило наличие тонической экстензии задних конечностей. Регистрировали латентный период наступления события, его продолжительность и показатель летальности.

Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно за 60 минут до электростимуляции в дозе 20 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали карбамазепин в эквивалентной дозе. Контрольной группе животных вводили растворитель (дистиллированную воду) в объеме 0,2 мл.

Антиконвульсивная активность на модели судорог, вызванных коразолом

Для индукции судорог использовали подкожное введение коразола в дозе 75 мг/кг в область шейного отдела спины (Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2012). В течение 30 минут наблюдались и регистрировались следующие проявления судорожной активности: миоклонические подергивания туловища и клонические судороги конечностей (передних и/или

задних). Животные, у которых отсутствовали повторяющиеся клонические судороги конечностей продолжительностью более 5 секунд, считались защищенными.

Перед введением коразола мышам назначали внутрибрюшинно одно из веществ: растворитель (дистиллированная вода, 0,2 мл), диазепам в дозе 1 мг/кг или тестируемые соединения BIF-70 и BIF-72 в аналогичной дозе 20 мг/кг. Через 60 минут после введения исследуемых веществ осуществлялась инъекция коразола, после чего фиксировались показатели судорожной активности.

Антиконвульсивная активность в модели фокальных судорог, вызванных пенициллином

Модель фокальных судорог выполнялась путем искусственного создания локального эпилептического очага в сенсомоторной коре крыс (Yehorenko O. et al., 2022). Для оценки противосудорожной активности исследуемых веществ крысы были разделены на три экспериментальные группы (по 8 животных в каждой): контрольную, где использовали физиологический раствор в количестве 10 мл/кг; группу препарата сравнения, где вводили карбамазепин в дозе 10 мг/кг; и группу, получавшую исследуемое соединение BIF-72 в дозе 20 мг/кг. За сутки до эксперимента под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутрибрюшинно) и местной анестезией (новокаин) проводили трепанацию черепа над сенсомоторной корой левого полушария. На поверхности коры устанавливали монополярный хлорсеребряный электрод, а референсный электрод имплантировали в область обонятельных луковиц. Электроды фиксировались стоматологической пластмассой, а трепанационное отверстие закрывалось полиэтиленовой пленкой, после заполнения физиологическим раствором. На следующий день, за 30 минут до индукции фокальных судорог, крысам вводили исследуемые вещества или физиологический раствор внутрибрюшинно, затем на обнаженную кору апплицировали фильтровальную бумагу, смоченную раствором натриевой соли бензилпенициллина (30 000 МЕ/мл) для создания эпилептического очага. Электрокортикограмму регистрировали у бодрствующих животных, анализируя латентный период первых интериктальных и иктальных разрядов, среднюю длительность и общее количество иктальных разрядов, а также время существования эпилептического очага.

Антиконвульсивная активность в хронической модели спонтанных рецидивирующих судорог, вызванных пилокарпином

Для моделирования хронической эпилепсии с развитием спонтанных рецидивирующих судорог (СРС) у крыс применяли пилокарпина гидрохлорид (Tetz L.M. et al., 2006). За 30 минут

до индукции судорог всем животным внутрибрюшинно вводили скополамина метилбромид (1 мг/кг) для минимизации периферических холинергических эффектов, после чего инъецировали пилокарпин (320 мг/кг, в/б). Тяжесть судорог оценивали по 5-стадийной шкале Racine и констатировали эпилептический статус (ЭС) при переходе судорожной активности в непрерывные генерализованные приступы, включающие клонус передних конечностей с поднятием на задние лапы и/или потерю постурального контроля (стадии 4–5), длительностью не менее 30 минут. Через 90 минут от начала ЭС его купировали внутримышечным введением диазепама (5 мг/кг). После периода восстановления животных, перенесших ЭС, распределяли на четыре группы (n = 8) для проведения недельного курса терапии. Начиная со следующего дня после ЭС, животным дважды в сутки внутрибрюшинно вводили: физиологический раствор (10 мл/кг, контрольная группа), диазепам (2 мг/кг), топирамат (30 мг/кг) или соединение BIF-72 (20 мг/кг). На протяжении последующих четырех недель для регистрации СРС проводили ежедневный 5-часовой видеомониторинг. Для оценки прогрессирования эпилепсии фиксировали частоту и продолжительность СРС, а также латентный период до первого приступа.

Антиконвульсивная активность в тесте киндлинга с коразолом

Экспериментальная модель фармакологического киндлинга была воспроизведена посредством систематических инъекций коразола в субконвульсивной дозировке 35 мг/кг внутрибрюшинно с интервалом 48 часов (Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2012). Данная доза на начальных этапах не провоцировала судорожную активность. Все манипуляции проводились в первой половине дня между 9:00 и 12:00 часами.

Экспериментальные животные были распределены на три группы по 15 особей. Первая группа получала соединение BIF-72 (20 мг/кг, в/б), вторая - препарат сравнения топирамат (30 мг/кг, в/б), третья являлась контрольной и получала эквивалентный объем растворителя (0,2 мл дистиллированной воды, в/б). Введение веществ осуществлялось ежедневно за 30 минут до инъекции коразола или в фиксированное время (9:00).

Интенсивность судорожной активности оценивалась по 6-балльной шкале:

- 0 баллов – отсутствие изменений;
- 1 балл – оживленное поведение, активное обнюхивание, неподвижное положение;
- 2 балла – единичные миоклонические подергивания головы или отдельных мышц тела;
- 3 балла – серийные подергивания всего тела, симптом Штраубе;
- 4 балла – «барабанный бой», «дикий бег»;

- 5 баллов – генерализованные клонико-тонические судороги с падением набок (утратой рефлекса переворачивания). Тонические судороги.

В течение 30 минут после введения коразола проводили видеорегистрацию поведения животных с последующим подсчетом суммарного балла судорожной активности для каждой особи.

Изучение нейропротективных свойств на модели нейровоспаления, вызванного ЛПС, на живых срезах мозга

После декапитации животных мозг извлекали в асептических условиях. Корональные срезы толщиной 300 мкм, содержащие дорсальный гиппокамп, были получены с помощью вибратома. Срезы переносились в лунки планшетов, каждая из которых содержала 0,3 мл раствора DMEM с 10% FBS, среду барботировали газовой смесью, содержащей 95% O_2 и 5% CO_2. После 120-минутного периода DMEM удаляли и заменяли на базальный раствор или растворы, содержащие исследуемые соединения, после чего инкубировали при 30°C на нагревательной пластине. Срезы инкубировали в стандартной среде для клеточных культур (DMEM с 10% FBS) с одним из следующих условий: (1) без обработки (интактные), (2) ЛПС (10 мкг/мл), (3) ЛПС (10 мкг/мл) и U-50488 (10 мкМ), или (4) ЛПС (10 мкг/мл) и BIF-72 (10 мкМ) (Vizuete A.F.K. et al., 2022). После обработки срезы инкубировали с 0,4% раствором трипанового синего (ТС) в течение 15 минут при комнатной температуре, затем дважды промывали в 0,1 М PBS (pH 7,4) в течение 2 минут. Трипановый синий избирательно окрашивает мертвые клетки в синий цвет, оставляя живые клетки неокрашенными.

Срезы исследовали с помощью микроскопа (MshOt MF53, Китай), оснащенного цифровой камерой (MshOt 50-2, Китай) и объективом с увеличением 10x. Изображения слоя клеток CA1 были сделаны на вершине верхней пирамидальной лопасти (suprapyramidal blade) зубчатой извилины. Фиксировалось количество нейронов, окрашенных трипановым синим. Уровни нейропротекции были определены после нормализации данных относительно интактной группы (0%) и группы с ЛПС (100%).

Изучение нейропротективных свойств на модели окклюзии средней мозговой артерии

Нейропротекторные свойства изучали на модели ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга (Themistoklis K.M. et al., 2022) на крысах-самцах массой 230–250 г, распределяя животных на четыре группы: 1 – интактные (n = 8), которым не проводили оперативное вмешательство; 2 – контроль ишемия/реперфузия (ИР) (n = 8), где при

эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии (ЛСМА) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в дозе 10 мл/кг; 3 – ИР + U-50488 (n = 8), животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутрибрюшинно вводили соединение U-50488 (10 мг/кг); 4 – ИР + BIF-72 (n = 8), где животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутрибрюшинно вводили BIF-72 (10 мг/кг). Вещества вводили однократно за 30 минут до ишемии-реперфузии.

Обратимую фокальную ишемию воспроизводили с помощью эндоваскулярной окклюзии ЛСМА, вводя нейлоновый филамент (4/0) на 22 мм в наружную сонную артерию с перекрыванием устья ЛСМА.

Постреперфузионное повреждение мозга оценивали по неврологическим нарушениям и выраженности отека. Неврологический дефицит до операции и через 24 часа оценивали по шкале Гарсия и дополнительным тестам, применяя систему (таблица 2.4), отражающую разницу показателей на стороне повреждения и контралатерально.

Морфологические изменения определяли с помощью окраски 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТФТ). Для этого головной мозг разрезали на поперечные срезы толщиной 2 мм (используя специальную матрицу), инкубировали их при 22–24 °С в 1%-м растворе ТФТ в течение 10 минут, фотографировали переднюю и заднюю поверхность срезов и измеряли площадь зоны некроза с помощью программы Image J v.1.54j. Процент зоны повреждения вычисляли по отношению площади всего среза к площади инфаркта. Для коррекции на отек применяли формулу: скорректированная площадь инфаркта = площадь правого полушария – (площадь левого полушария − площадь инфаркта). Сопоставление полученных данных по неврологическим нарушениям и размеру инфаркта позволяло определять выраженность ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга и судить о наличии нейропротекторного действия исследуемых веществ.

Таблица 2.4 – Тесты для оценки неврологического дефицита у крыс после ишемии и реперфузии головного мозга (Bederson J.B. et al., 1986; Garcia J.H. et al., 1995; Chen J. et al., 2001)

Категория	**Тест**	**3 балла (норма)**	**2 балла (незначительное нарушение)**	**1 балл (выраженное нарушение)**	**0 баллов (отсутствие реакции)**
Рефлексы	Реакция на звук	Животное вздрагивает или отпрыгивает при резком звуке; реакция быстрая и скоординированная.	–	–	Отсутствие вздрагивания или изменения поведения при звуке; животное не реагирует, не меняет позу.
	Роговичный рефлекс	При легком прикосновении к роговице возникает мгновенное смыкание век.	–	–	Нет мигания при прикосновении к роговице.
	Реакция на свет (зрачковый рефлекс)	Быстрое и отчетливое сужение зрачка при освещении.	–	–	Полное отсутствие изменения зрачка при освещении (зрачок не реагирует).
	Хватательный рефлекс	При касании ладонной поверхности передней лапы животное симметрично захватывает объект двумя лапами.	Наблюдается асимметричный захват предмета, замедление со стороны поражения.	–	Отсутствие какой-либо хватательной реакции со стороны поражения.

Двигательная активность	Спонтанная двигательная активность	Животное активно перемещается по клетке, исследует окружающую обстановку, подходит минимум к трем стенкам, может вставать на задние лапы и осматривать верхний край клетки.	Движения сохранены, но снижена подвижность и инициативность, животное не обходит все стенки; может подойти лишь к одной-двум сторонам, однако иногда пытается подняться к верхнему краю клетки.	Животное почти не двигается, не встает на задние лапы, вяло и редко перемещается по дну клетки, чаще сидит или лежит.	Полная неподвижность; крыса не делает попыток переместиться, не реагирует на окружающую обстановку.
	Симметричность движения конечностей	При подвешивании за хвост все четыре конечности вытягиваются (движутся) симметрично; не наблюдается асимметрии или заметного волочения лап.	Пораженная сторона отстает: конечности вытягиваются слабее или медленнее, но движение все же есть; возможна небольшая асимметрия или замедление.	На стороне повреждения конечности почти не двигаются, наблюдается лишь минимальное подергивание; асимметрия движений хорошо заметна.	Отсутствует движение передней конечности на поврежденной стороне; лапа(ы) висят пассивно, не вытягиваются при подвешивании.
	Симметричность вытягивания передних лап	При осторожном перемещении крысы к краю стола (держась за хвост, чтобы задние лапы были в воздухе) обе передние лапы активно вытягиваются вперед, животное пытается шагать ими по поверхности, сохраняя симметрию движений.	Передняя лапа с пораженной стороны вытягивается слабее или с запозданием; наблюдается нарушение координации, хотя общая способность «шагать» сохранена.	Передняя лапа с поврежденной стороны двигается минимально; крыса не может полноценно «шагать» и опираться на передние лапы, ярко выражена асимметрия.	Отсутствие движения передней лапы на поврежденной стороне; крыса не опирается и не пытается вытянуть ее вперед.

Мышечный тонус	Способность забираться по стенке проволочной клетки	Животное без труда взбирается по стенке проволочной клетки, крепко цепляется всеми четырьмя лапами. При попытке снять крысу за хвост сопротивляется, демонстрируя сильный хват.	Наблюдается ослабление с пораженной половины тела, захват лапами этой стороны менее прочен; однако крыса все же способна подниматься вверх, хотя и медленнее, и иногда срывается.	Животное не в состоянии полноценно взбираться, может только частично подняться и тут же соскальзывает или вместо подъема делает круговые движения (пытается боком «крутиться», не цепляясь уверенно). При снятии за хвост хват лап слабый.	Отсутствуют попытки залезть на стенку или удержаться; крыса либо вообще не цепляется, либо сразу падает.
	Отдергивание передних лап	Симметричное отдергивание обеих передних лап.	Несимметричное отдергивание, замедленно со стороны поражения.	–	Отсутствие ответа со стороны поражения.
	Удержание на сетке	–	Животное удерживается 7–10 секунд.	Животное удерживается 3–6 секунд.	Животное удерживается 0–2 секунды.
Чувствительность	Реакция на прикосновение к вибриссам	При легком прикосновении к вибриссам с обеих сторон животное реагирует поворотом головы или вздрагиванием, симметрично или примерно одинаково интенсивно на оба стимула.	Замедленная реакция на стимуляцию вибрисс со стороны повреждения; животное начинает поворачивать голову или вздрагивать с некоторой задержкой, но все же реагирует.	При прикосновении к вибриссам поврежденной стороны практически нет заметной реакции; животное реагирует только на здоровую сторону (или с большой задержкой и очень слабо).	Полное отсутствие ответа на прикосновение к вибриссам с поврежденной стороны; не наблюдается ни вздрагивания, ни поворота головы, ни иного признака чувствительности.

2.8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку и визуализацию полученных данных осуществляли в программной среде GraphPad Prism v.10.3 (GraphPad Inc., США) и с использованием пакета Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corp., США). Вычислительные процедуры, связанные с построением моделей машинного обучения, обработкой электрофизиологических сигналов и анализом данных молекулярного моделирования, были реализованы с использованием языка программирования Python v.3.9 (с библиотеками scikit-learn v.1.5.1, NumPy v.2.0.1, Matplotlib v.3.9.2) и в среде MATLAB R2023a (MathWorks, США).

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В зависимости от типа распределения, данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (M ± SEM), среднего значения и стандартного отклонения (M ± SD) или медианы с интерквартильным размахом (Me[Q1;Q3]).

Выбор статистического критерия основывался на предварительной проверке выборок на соответствие нормальному распределению с помощью теста Шапиро-Уилка. Для сравнения нескольких независимых групп с нормальным распределением (например, при анализе данных тестов с коразолом, пенициллином, модели окклюзии средней мозговой артерии) применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими апостериорными тестами Даннетта или Тьюки для множественных сравнений. В случае распределения данных, отличного от нормального, что наблюдалось в большинстве поведенческих тестов (локальные микроинъекции, оценка противозудных свойств, апоморфиновая агрессия, тесты на моделях психоза), использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Для сравнения двух независимых непараметрических выборок, в частности при анализе данных теста с пикротоксином, применяли U-критерий Манна-Уитни. Анализ данных в модели коразолового киндлинга проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA). Для анализа категориальных данных, в частности показателей выживаемости в тесте максимального электрошока и в модели киндлинга, использовали точный тест Фишера или критерий хи-квадрат (χ^2).

Для анализа данных с повторными измерениями, таких как динамика спектральных характеристик LFP и показателя wPLI в модели психоза, применяли однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений.

Для оценки зависимости «доза-эффект» и расчета ED80, в тесте на вертикализацию применяли метод нелинейной регрессии с использованием модели переменного наклона Хилла. Построение предиктивных моделей (QSAR, регрессионная модель для прогноза аверсии)

осуществлялось с использованием алгоритмов множественной линейной регрессии, случайного леса (Random Forest) и регрессии на основе Гауссовских процессов.

Производительность моделей машинного обучения (классификаторов и регрессоров) оценивали с помощью процедуры 5-кратной перекрестной проверки (кросс-валидации). Качество моделей характеризовалось такими метриками, как коэффициент детерминации (R^2), средняя абсолютная ошибка (MAE) и среднеквадратичная ошибка (RMSE). Для проверки статистической значимости результатов предиктивных моделей применялся пермутационный тест. Для снижения размерности и визуализации многомерных данных применяли метод главных компонент и алгоритм стохастического вложения соседей с t-распределением. При анализе данных когерентности для нормализации распределения коэффициентов корреляции использовали z-преобразование Фишера.

ГЛАВА 3. АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА С КАППА-ОПИОИДНОЙ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

3.1. Исследование молекулярных особенностей взаимодействия конденсированных производных бензимидазолов с каппа-опиоидным рецептором

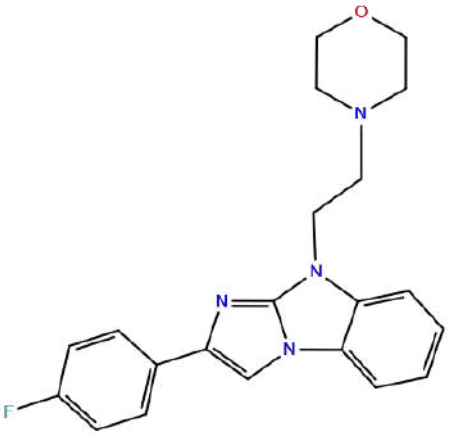
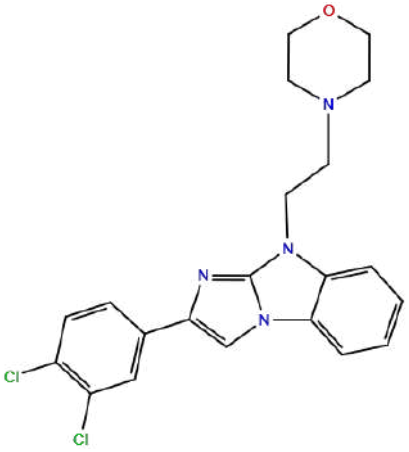
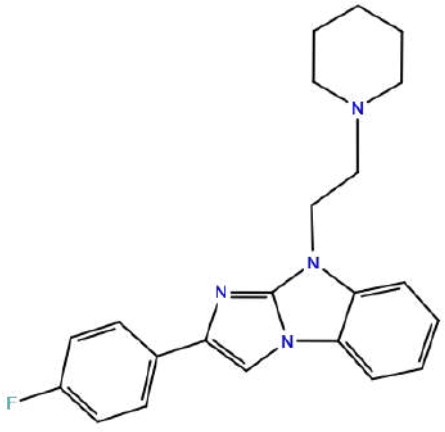
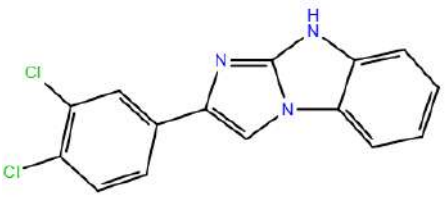
В настоящее время поиск и разработка новых молекул с избирательной активностью в отношении каппа-опиоидного рецептора приобретают особую значимость ввиду высокой востребованности эффективных и безопасных анальгетиков. Традиционные опиоиды нередко вызывают тяжелые побочные эффекты, включая высокий потенциал злоупотребления, что стимулирует поиск альтернативных средств с новыми механизмами действия. В данной главе представлены этапы комплексного исследования, направленного на выяснение молекулярных особенностей взаимодействия производных бензимидазола с КОР и последующую идентификацию перспективных соединений с оптимальными фармакологическими свойствами. Подход включает построение сетевой модели химического пространства, отбор соединений с помощью фармакофорного анализа и молекулярного докинга, а также проведение молекулярной динамики для оценки устойчивости лиганд-рецепторных комплексов. Такой дизайн исследования позволяет выявить как структурные, так и функциональные характеристики потенциальных агонистов КОР, закладывая научную основу для дальнейшей доклинической проверки найденных соединений.

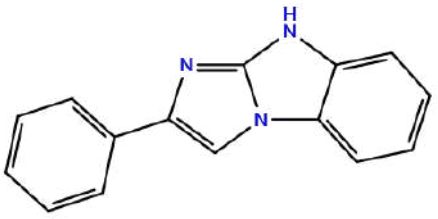
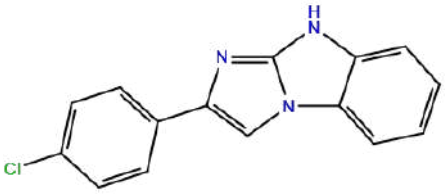
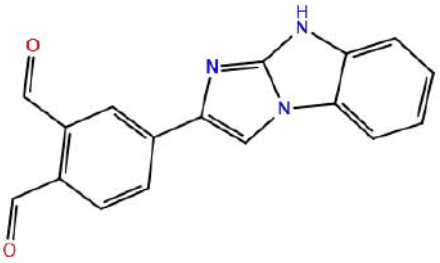
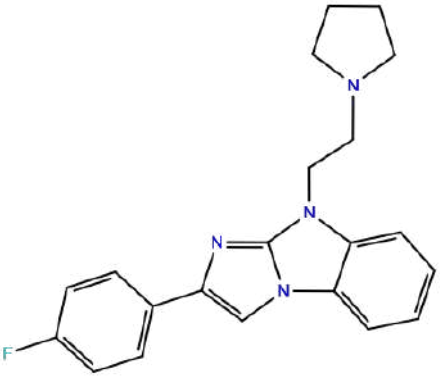
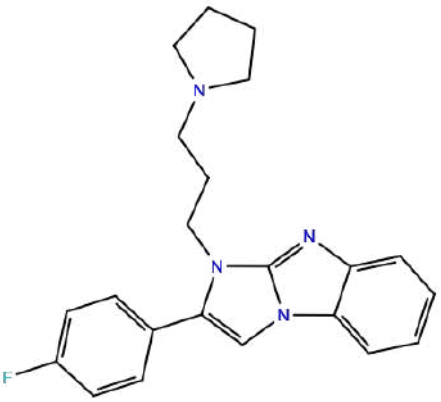
3.1.1. Сетевое моделирование химического пространства производных бензимидазола для оценки перспективности соединений

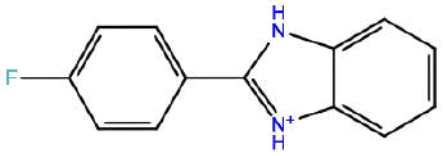
Предварительный отбор производных бензимидазола проводился на основе нескольких критериев, которые позволили сузить выборку веществ перед выполнением фармакофорного анализа и молекулярного докинга.

Критерием включения являлась высокая каппа-агонистическая активность, установленная *in vitro* (таблица 3.1). Критерием исключения служила потенциальная токсичность соединений, предсказанная на основе доступных токсикологических данных и анализа структурных признаков («structural alerts»), которые могли указывать на нежелательные побочные эффекты. Также учитывались нарушение правил Липински и неудовлетворительный прогноз проницаемости через гематоэнцефалический барьер, что позволило исключить соединения с потенциально неблагоприятной биодоступностью. Для дальнейших исследований были выбраны 10 веществ.

Таблица 3.1 – Шифры отобранных производных бензимидазола с каппа-опиоидной активностью и их химические структуры

Шифр	Структурная формула	ИЮПАК
РУ-1205		4-(2-(2-(4-fluorophenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-9-yl)ethyl)morpholine
РУ-1197		4-(2-(2-(3,4-dichlorophenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-9-yl)ethyl)morpholine
РУ-1204		2-(4-fluorophenyl)-9-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole
РУ-1196		2-(3,4-dichlorophenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole

РУ-13		2-phenyl-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole
РУ-273		2-(4-chlorophenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole
РУ-1190		4-(9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-2-yl)phthalaldehyde
РУ-1203		2-(4-fluorophenyl)-9-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole
РУ-1275		2-(4-fluorophenyl)-1-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazole

АЖ-26		2-(4-fluorophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium

Сетевая модель химического пространства, построенная на основе коэффициента Танимото, помогла выявить структурные кластеры и оценить соединения в контексте молекулярного разнообразия веществ со сходными характеристиками (рисунок 3.1).

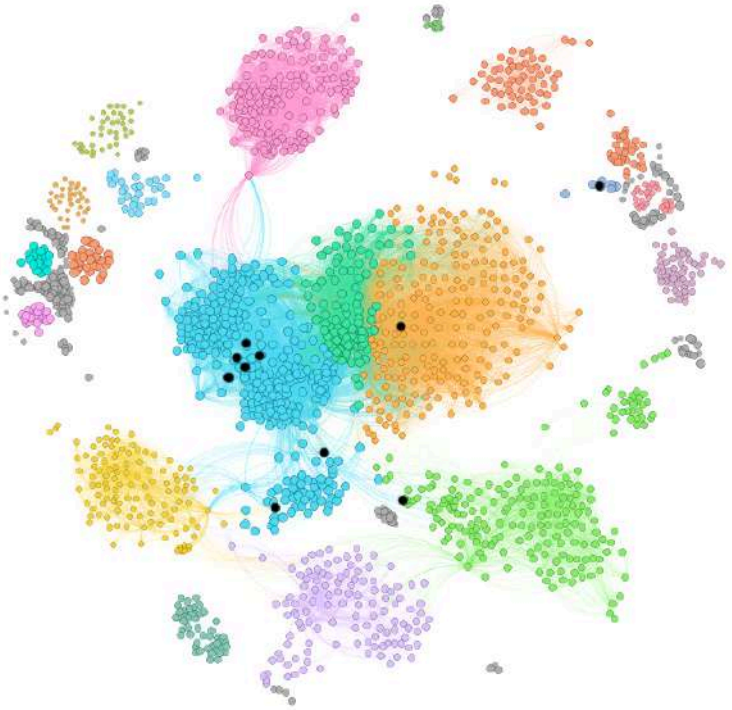


Рисунок 3.1 – Сетевая модель химического пространства конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола[2], построенная на основе силовых полей (алгоритм Force Atlas 2). Черным цветом отмечены молекулы, включенные в выборку для дальнейшего изучения.

3.1.2. Фармакофорный анализ наиболее перспективных соединений

В результате проведенного фармакофорного моделирования была построена шестифункциональная (ADHHRR) фармакофорная модель (рисунок 3.2), основанная на белок-лигандном комплексе каппа-опиоидного рецептора с налфурафином (PDB ID: 6B73). Для

[2] Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023624590 Российская Федерация. Производные бензимидазола с нейротропным и психотропным действием : № 2023623995 : заявл. 18.11.2023 : опубл. 12.12.2023 / К. Ю. Калитин, А. А. Спасов, Г. В. Придворов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

группы производных бензимидазола с подтвержденной каппа-опиоидной активностью был осуществлен анализ на соответствие данной фармакофорной гипотезе с целью выявления наиболее перспективного соединения для дальнейших доклинических исследований.

Фармакофорный скрининг показал, что соединение РУ-1205 обладает наивысшей степенью соответствия фармакофорной модели, о чем свидетельствует максимальный показатель Fitness Score (1,585) и наличие четырех совпадающих участков лиганда. Высокая степень комплементарности РУ-1205 к фармакофорной гипотезе также может указывать на сходные фармакологические свойства с функциональным агонистом каппа-опиоидных рецепторов – налфурафином.

Соединения РУ-1204, РУ-1197 и РУ-1196, имеющие по три совпадающих участка лиганда, продемонстрировали более низкие показатели Fitness Score: 1,349, 1,453 и 1,342 соответственно. Несмотря на это, они сохраняют потенциал для дальнейших исследований, хотя и уступают РУ-1205 по уровню соответствия фармакофорной модели.

Остальные исследованные соединения продемонстрировали значительно более низкие значения Fitness Score. Результаты фармакофорного анализа согласуются с ранее полученными экспериментальными данными (таблица 3.2).

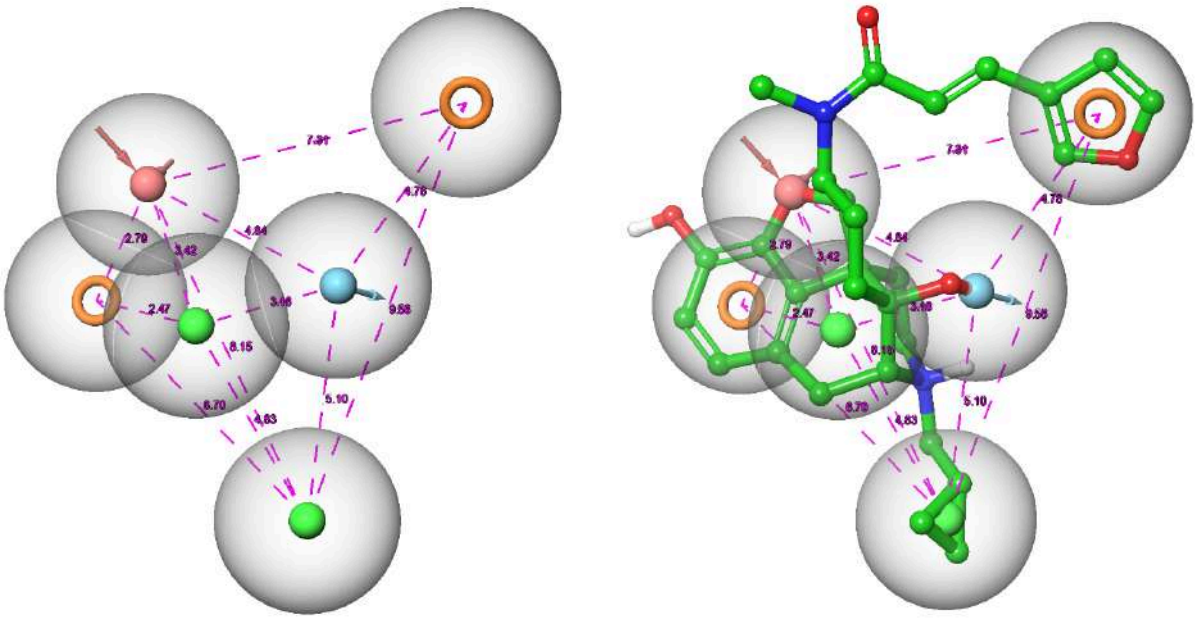


Рисунок 3.2 – Фармакофорная модель комплекса КОР и налфурафина, основанная на структуре комплекса рецептор-лиганд, с шестью признаками: один акцептор водородной связи (красная сфера), один донор водородной связи (синяя сфера), два гидрофобных участка (зеленые сферы), два ароматических кольца (оранжевые кольца)

Таблица 3.2 – Результаты виртуального скрининга производных бензимидазола и препаратов сравнения путем оценки соответствия фармакофорной гипотезе

Шифр	**Matched ligand sites**	**Align Score**	**Fitness Score**	**Vector Score**	**Volume Score**	**Актив-ность in vivo, Δ% (Гречко О.Ю., 2012)**
РУ-1205	4	1,132	1,585	0,998	0,550	85,4
РУ-1197	3	0,655	1,453	0,851	0,408	17,0
РУ-1204	3	1,383	1,349	0,991	0,437	80,4
РУ-1196	3	1,403	1,342	0,992	0,438	28,4
РУ-13	3	1,117	1,200	0,780	0,386	9,8
РУ-273	3	1,118	1,199	0,780	0,386	20,2
РУ-1190	3	1,114	1,192	0,781	0,376	12,0
РУ-1203	3	1,519	0,908	0,616	0,432	87,6
РУ-1275	2	0,043	0,183	0,000	0,000	13,9
АЖ-26	2	0,056	0,183	0,000	0,000	6,1
Налфурафин	6	1,212	1,342	0,839	0,545	–
Промедол	3	1,112	1,424	0,735	0,435	–
Морфин	3	1,136	1,345	0,756	0,416	–

3.1.3. Поиск карманов связывания в каппа-опиоидном рецепторе

Для анализа молекулярного взаимодействия изучаемых соединений с каппа-опиоидным рецептором проведен поиск карманов связывания с последующим докированием (рисунок 3.3). В результате было выявлено несколько потенциальных карманов (отмечены оранжевой сеткой), среди которых центральный оказался наиболее энергетически предпочтительным. Центр масс модельных лигандов располагался в точке, обозначенной красной сферой (координаты [2,2, −2,9, 9,6]), а область докирования охватывала радиус около 24 Å, что позволило учесть важные взаимодействия как внутри выбранного кармана, так и с ближайшими аминокислотными остатками рецептора.

Рисунок 3.3 – Потенциальные сайты связывания каппа-опиоидного рецептора, выявленные с помощью алгоритма DeepSite (обозначены оранжевой сеткой) в двух проекциях

3.1.4. Гибкий молекулярный докинг соединений

Согласно результатам молекулярного докинга (таблица 3.3), соединение РУ-1205 формирует обширную сеть взаимодействий в сайте связывания каппа-опиоидного рецептора. Ключевым является образование солевого мостика с консервативным аминокислотным остатком ASP138. Кроме того, две аминогруппы имидазо[1,2-a]-бензимидазольного ядра РУ-1205 участвуют в формировании водородных связей с ASP138 и GLY115. Стабилизация комплекса также достигается за счет π-стэкинга с TYR139 и взаимодействия с SER211 второй экстрацеллюлярной петли (ECL2).

Для соединений РУ-1197 и РУ-1204 характерен более ограниченный профиль межмолекулярных взаимодействий. Несмотря на сохранение контактов с ASP138, лиганд РУ-1197 дополнительно образует водородную связь с ARG202, галогеновую связь с HIS291 и π-π-стэкинг с TYR139. Взаимодействия РУ-1204 ограничиваются солевым мостиком и водородной связью с ASP138. Отсутствие у соединений РУ-13, РУ-273 и РУ-1190 контактов с ASP138 свидетельствует об их низкой способности к стабилизации в активном центре рецептора. Таким образом, взаимодействие с данным консервативным остатком можно рассматривать как критический детерминант аффинности исследуемых лигандов к КОР.

Количественная оценка энергии связывания (docking score), представленная в таблице 3.4, подтверждает данные выводы. Соединение РУ-1205 характеризуется минимальным значением энергии (−12,006), что указывает на наиболее термодинамически выгодное связывание. Показатели для РУ-1197 (−9,026) и РУ-1204 (−7,036) существенно выше, что предполагает меньшую стабильность их комплексов с рецептором. Наихудшие энергетические показатели (от −4,880 до −4,822) зафиксированы для лигандов РУ-13, РУ-273 и РУ-1190. Полученные результаты коррелируют с отсутствием у данных соединений значимых

межмолекулярных взаимодействий, в частности с ключевым остатком ASP138, подтверждая его решающую роль в обеспечении аффинности.

Таблица 3.3 – Молекулярное взаимодействие тестируемых соединений с КОР, рассчитанное с помощью метода Induced Fit Docking (energy window: 2,5 kcal/mol; Van der Waals scaling 0,5; residues refining distance: 5 Å)

Шифр	**H-bond**	**Salt bridge**	**Halogen bond**	**π-stacking**	**π-π stacking**
РУ-1205	GLN115, ASP138, SER211	ASP138	–	TYR139	–
РУ-1197	ARG202	ASP138	HIS291	–	TYR139
РУ-1204	ASP138	ASP138	-	–	–
РУ-1196	ASP138	–	LEU212, LYS227	–	–
РУ-13	–	–	–	–	TYR139
РУ-273	TYR312	–	–	–	–
РУ-1190	LYS227	–	–	–	–
РУ-1203	ASP138	ASP138	–	–	–
РУ-1275	–	ASP138	–	–	TYR139
АЖ-26	ASP138	–	–	–	TYR320
Налфурафин	SER211	ASP138	–	TYR139	–
Промедол	ASP138	–	LEU212	–	–
Морфин	ASP138	ASP138	LYS227	–	–

Таблица 3.4 – Энергетические параметры связывания тестируемых соединений с КОР, рассчитанные с помощью метода Induced Fit Docking (energy window: 2,5 kcal/mol; Van der Waals scaling 0,5; residues refining distance: 5 Å)

Шифр	**Docking score**	**Glide score**	**Glide emodel**
РУ-1205	−12,006	−12,006	−105,961
РУ-1197	−9,026	−9,026	−99,860
РУ-1204	−7,036	−7,036	−85,901
РУ-1196	−6,662	−6,662	−83,757
РУ-13	−4,880	−4,880	−69,547

РУ-273	−4,983	−4,983	−73,061
РУ-1190	−4,822	−4,822	−65,404
РУ-1203	−6,751	−6,751	−84,244
РУ-1275	−5,562	−5,562	−58,102
АЖ-26	−6,148	−6,249	−66,126
Налфурафин	−11,994	−11,994	−106,267
Промедол	−10,334	−10,334	−101,351
Морфин	−10,455	−10,455	−103,641

В результате проведенного исследования были установлены характерные конформационные изменения каппа-опиоидного рецептора, свойственные агонистам и антагонистам (рисунки 3.4–3.7)

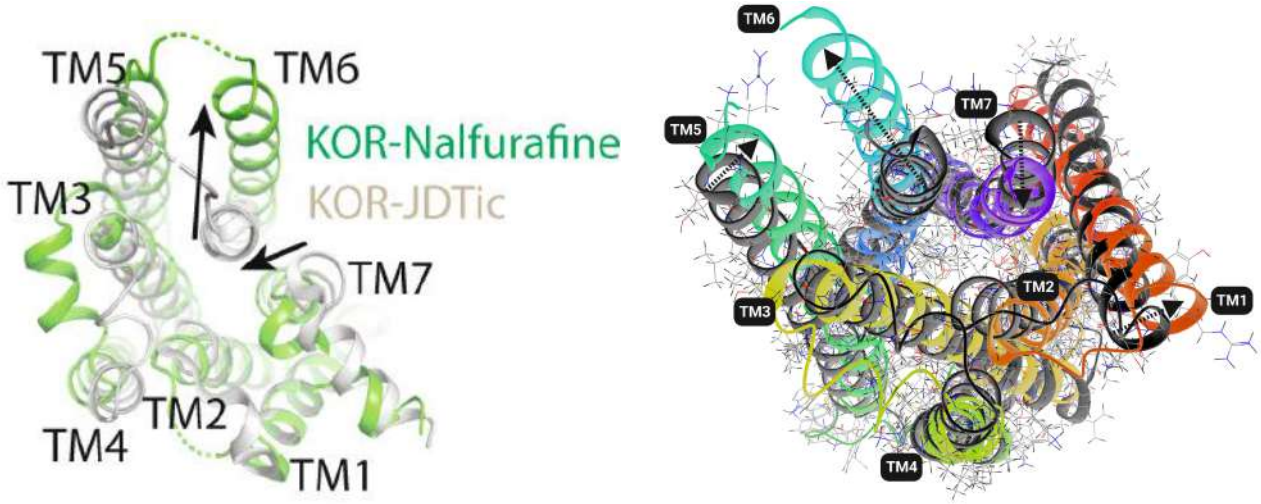


Рисунок 3.4 – Конформационные изменения каппа-опиоидного рецептора при взаимодействии с лигандами. Слева: смещение TM5 (~2,5 Å) и TM6 (~14,5 Å) доменов для комплекса KOP + налфурафин (в сравнении с антагонистом KOP JDTic) по литературным данным (Daibani A.E. et al., 2023). Справа: аналогичное по дистанции и направлениям смещение TM5 и TM6 доменов для комплекса KOP + РУ-1205 (в сравнении с антагонистом KOP JDTic), наблюдаемое в ходе исследования

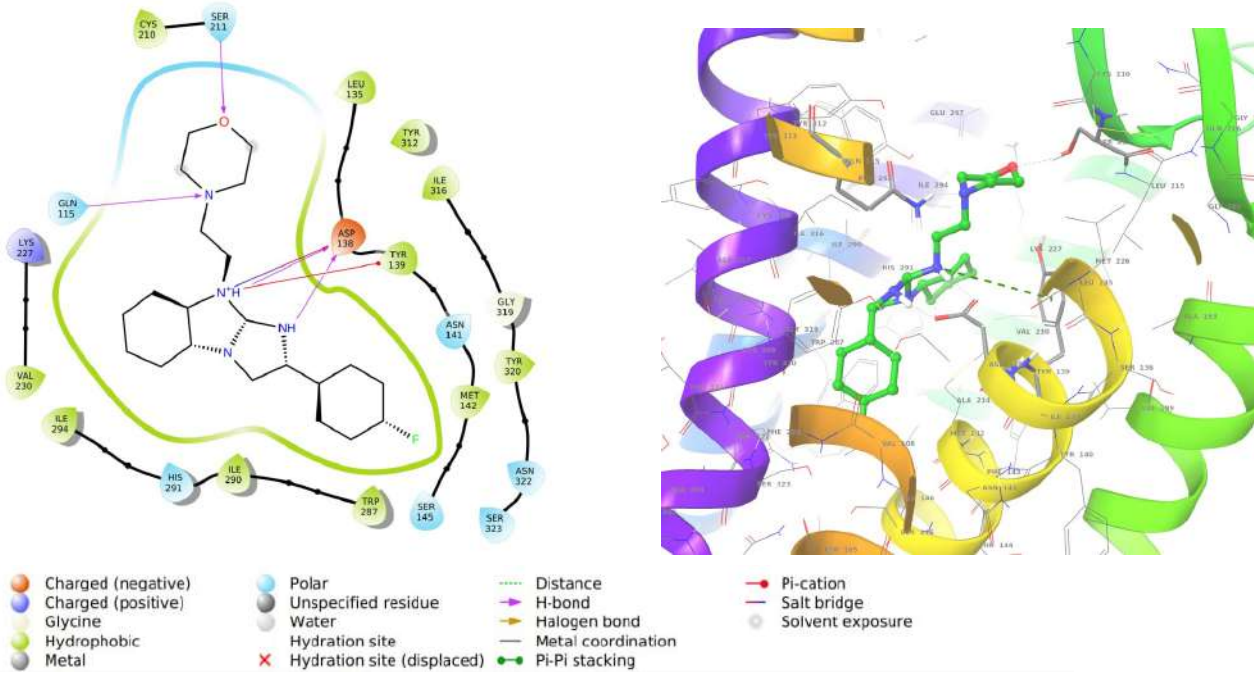


Рисунок 3.5 – Гибкий докинг соединения РУ-1205 в каппа-опиоидный рецептор (Induced Fit Docking, energy window: 2,5 kcal/mol; Van der Waals scaling 0,5; residues refining distance: 5 Å). Установлено взаимодействие с TM5–ECL2, характерное для смещенных агонистов

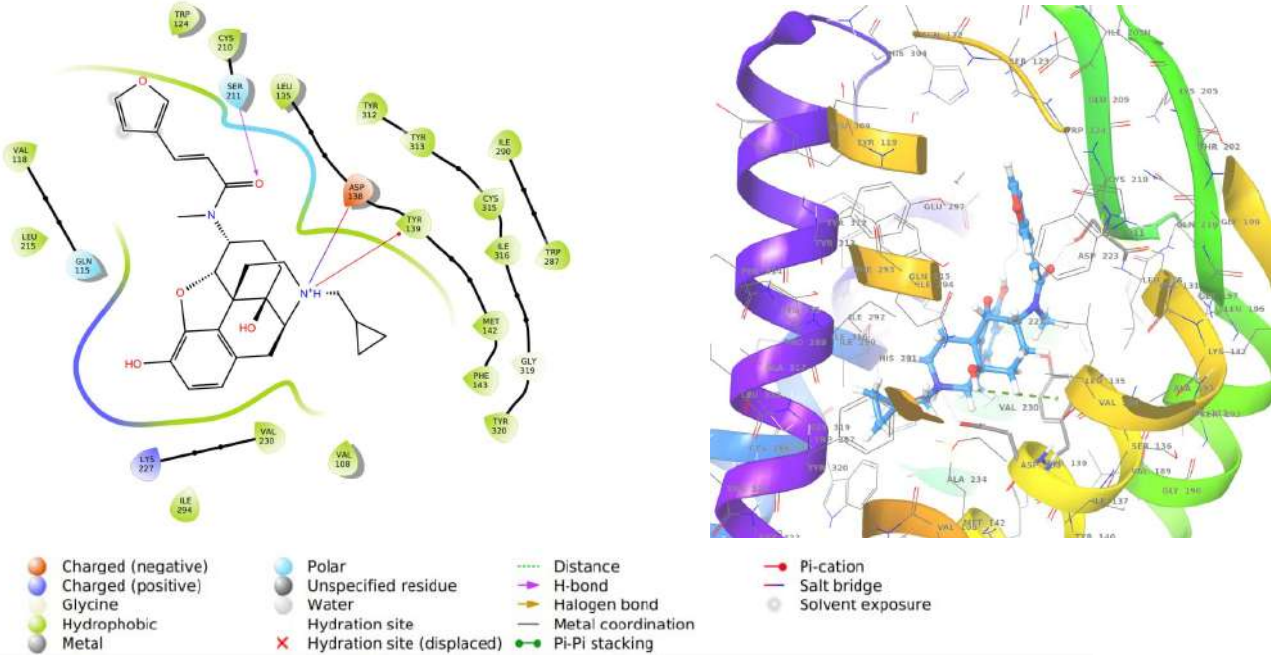


Рисунок 3.6 – Гибкий докинг функционального агониста налфурафина в каппа-опиоидный рецептор (Induced Fit Docking, energy window: 2,5 kcal/mol; Van der Waals scaling 0,5; residues refining distance: 5 Å). Установлено взаимодействие с TM5–ECL2, характерное для смещенных агонистов

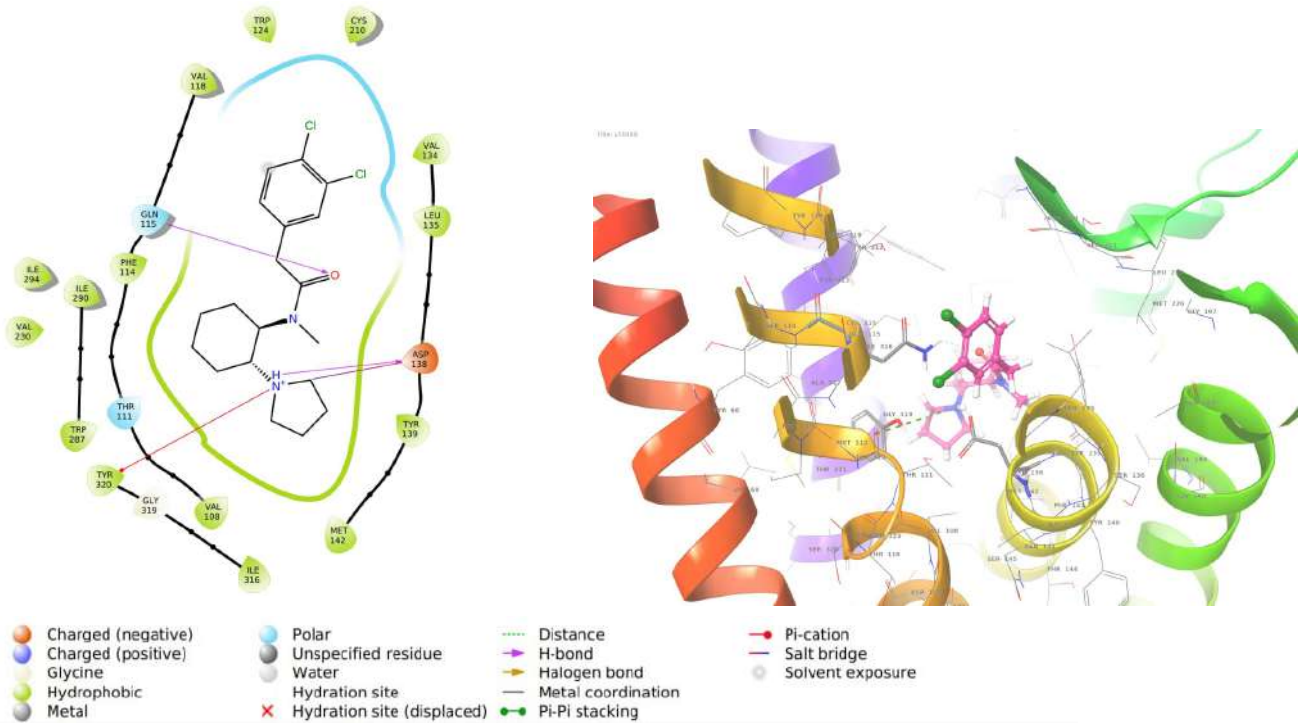


Рисунок 3.7 – Гибкий докинг сбалансированного агониста U-50488 в каппа-опиоидный рецептор (Induced Fit Docking, energy window: 2,5 kcal/mol; Van der Waals scaling 0,5; residues refining distance: 5 Å). Установлено взаимодействие с TM2–TM3, характерное для сбалансированных агонистов

Таким образом, РУ-1205 представляет собой наиболее перспективное соединение среди исследуемых производных бензимидазола. Оно демонстрирует оптимальное сочетание водородных связей, солевого мостика с ASP138 и взаимодействия типа π-стэкинг с TYR139, что обеспечивает высокую аффинность и стабильность комплекса с каппа-опиоидным рецептором. Результаты позволяют выделить РУ-1205 в качестве ведущего кандидата для дальнейших исследований биологической активности.

3.1.5. Молекулярная динамика взаимодействия соединений с рецептором

Данные молекулярной динамики комплексов лигандов с каппа-опиоидным рецептором хорошо согласуются и подтверждают результаты, полученные на предыдущем этапе. На рисунке 3.8 представлена динамическая характеристика отдельных аминокислот каппа-опиоидного рецептора в комплексе с различными лигандами. Выявлены 3 участка рецептора, которые по динамическим параметрам значительно отличаются у комплексов KOP + РУ-1205 и KOP + налфурафин по сравнению со сбалансированным агонистом U-50488.

Особое внимание привлекают участки 2 и 3, расположенные на интрацеллюлярной части рецептора, которая вступает в непосредственное взаимодействие с бета-аррестином (рисунок 3.9), что служит дополнительным основанием для выдвижения гипотезы о наличии смещенной активности у соединения РУ-1205.

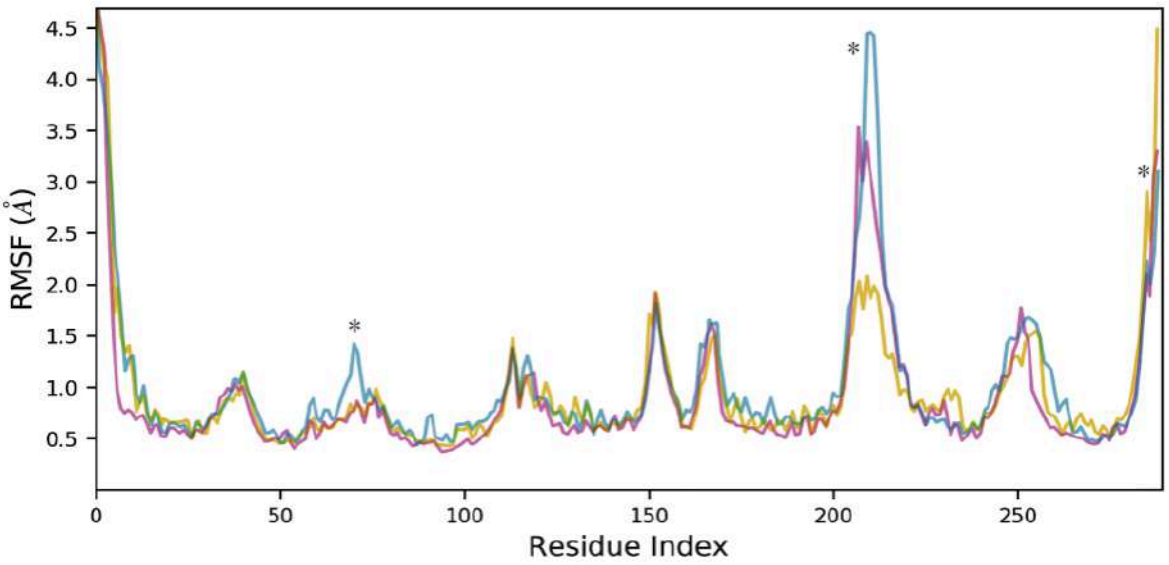


Рисунок 3.8 – Root Mean Square Fluctuation (RMSF): характеристика локальной подвижности комплекса каппа-опиоидного рецептора и лигандов (РУ-1205 – голубым цветом, налфурафин – желтым цветом и U-50488 – розовым цветом) в течение 300 нс
Примечание: * - максимальные различия по сравнению с U-50488.

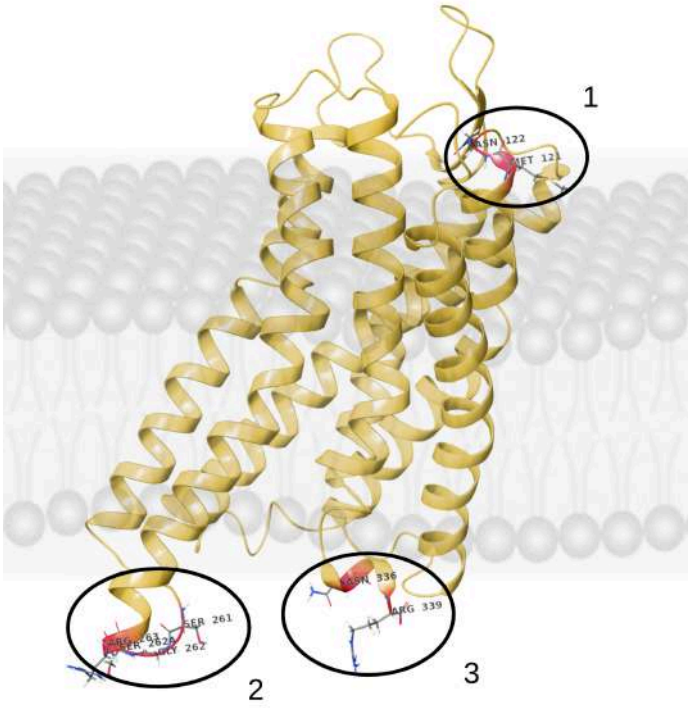


Рисунок 3.9 – Схематичное представление каппа-опиоидного рецептора в билипидной мембране. Красным цветом (в кружках) отмечены участки КОР, динамические характеристики которых максимально отличаются у комплекса с РУ-1205 по сравнению с U-50488

3.2. Биопотенциал-опосредованный подход к изучению механизма действия

Для изучения механизмов действия перспективного фармакологического соединения РУ-1205 на центральную нервную систему использовались различные подходы к анализу биоэлектрической активности мозга. Целесообразность подобных исследований обусловлена необходимостью более глубокого понимания нейробиологических основ анальгезии,

возможных седативных и психотропных эффектов соединения, а также побочных явлений (таких как дисфория и депрессия), связанных с активацией или блокированием отдельных пострецепторных сигнальных путей. Сочетание электрофизиологических (спектральный анализ, когерентность, фазовая задержка) и математических (многомерный анализ, машинное обучение) методов позволяет не только выявить характерные паттерны изменения мозговой активности, но и проанализировать их пространственно-временную организацию, указывая на важные мишени фармакологического воздействия. Кроме того, интеграция классических нейрофизиологических и современных вычислительных подходов открывает возможность создавать точные предиктивные модели, способные с высокой достоверностью классифицировать исследуемые соединения по их фармакодинамическому профилю, тем самым формируя прочную основу для дальнейшей доклинической оценки новых лекарственных средств.

3.2.1. Спектральный анализ сигналов мозговой активности

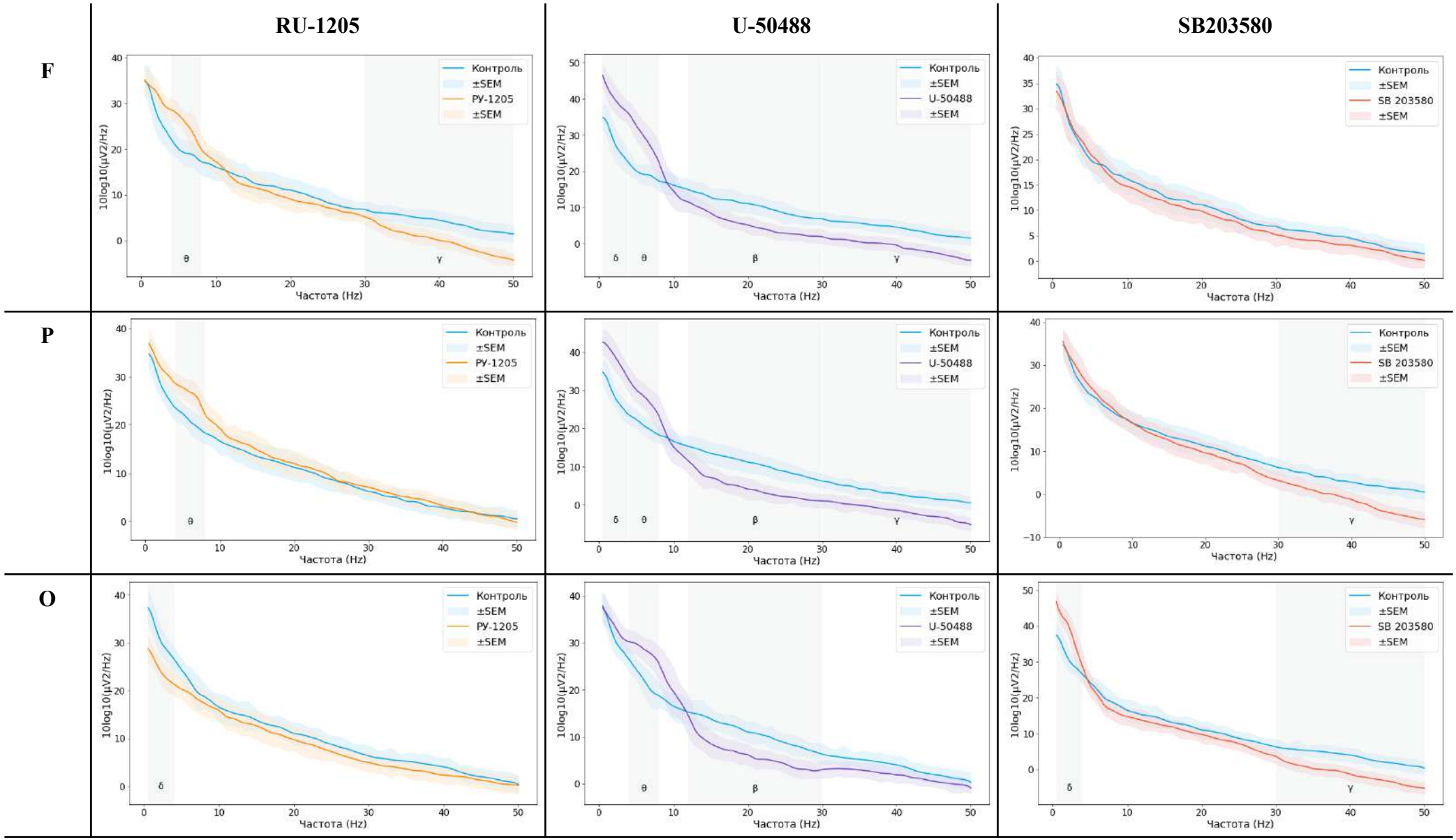
В ранее проведенных исследованиях было установлено, что соединение РУ-1205 является селективным каппа-опиоидным агонистом, при этом не проявляет дисфорических и аддиктивных свойств, характерных для этой группы веществ (Spasov A.A. et al., 2020). Подобный профиль активности может быть связан с функциональным агонизмом (избирательной активацией пострецепторных каскадов), либо с двойным механизмом действия, который включает в себя активацию каппа-опиоидного рецептора и блокирование MAPK p38-связанного пути, обуславливающего развитие многих побочных эффектов, каппа-опиоидных агонистов. Для проверки этих гипотез было проведено исследование влияния соединения РУ-1205 (350 мкг, и.ц.в.) на биоэлектрическую активность мозга в сравнении со сбалансированным каппа-агонистом U-50488 (100 мкг, и.ц.в.) и блокатором MAPK p38 – соединением SB203580 (1 мкг, и.ц.в.). Использование глубоких электродов позволило существенно расширить представления о пространственной реорганизации электрической активности мозга на фоне действия веществ (рисунок 3.10).

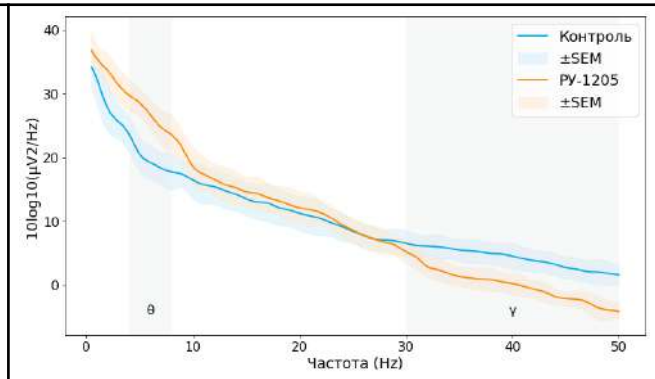
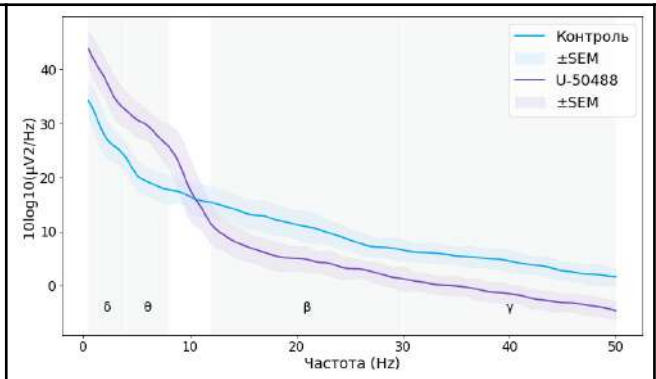
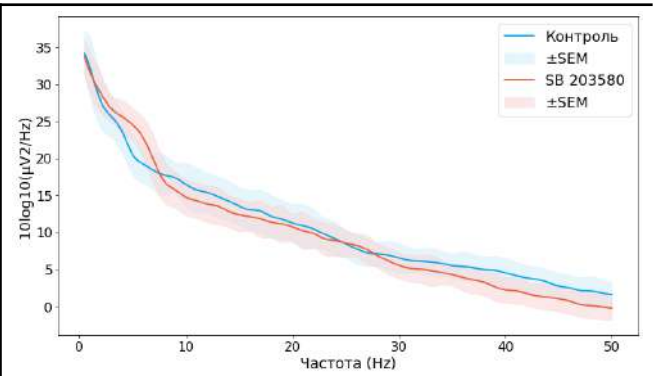
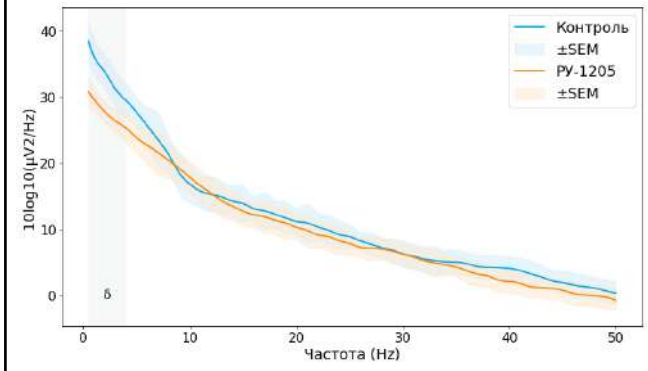
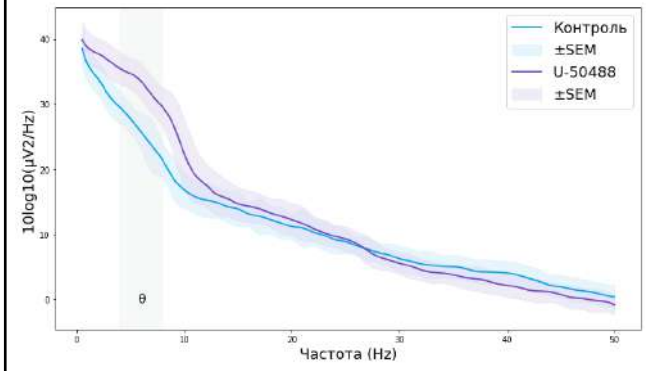
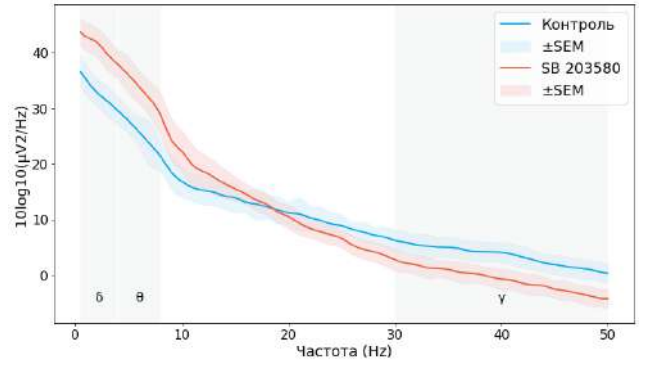
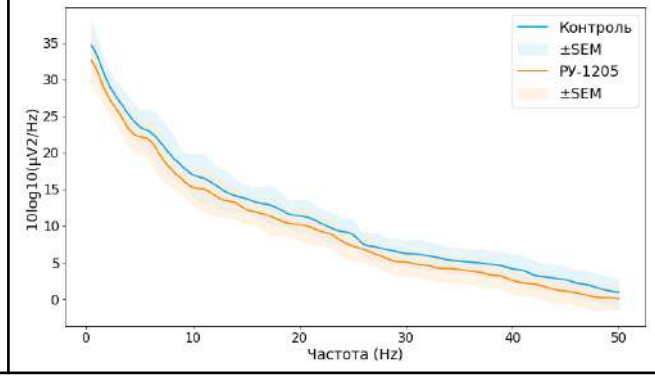
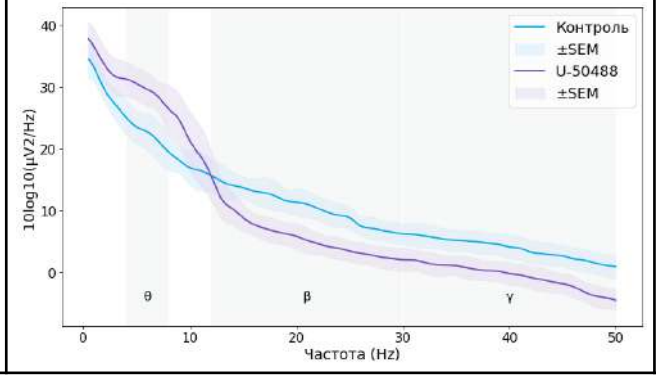
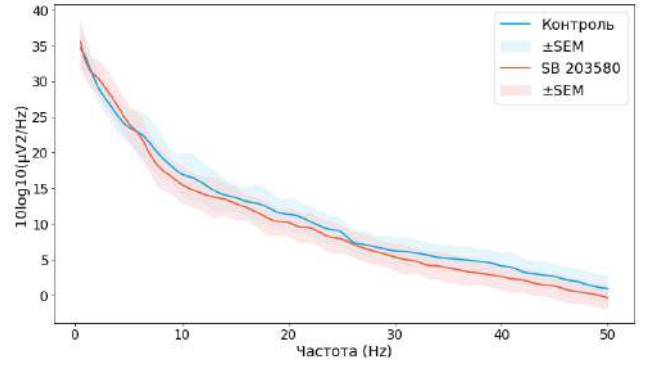
В ходе исследования были выявлены существенные различия в характере их действия. Селективный каппа-агонист U-50488 вызывал наиболее выраженные изменения электрической активности мозга. Во фронтальной, париетальной и медиальной префронтальной коре наблюдалось значительное усиление активности в дельта- и тета-диапазонах при одновременном снижении бета- и гамма-активности. В окципитальной области, гиппокампе, прилежащем ядре и вентральной тегментальной области было отмечено повышение тета-активности, при этом в прилежащем ядре также наблюдалось снижение бета- и гамма-активности. В миндалине регистрировалось увеличение тета- и гамма-активности.

Соединение РУ-1205 демонстрировало более избирательное действие на биоэлектрическую активность мозга. Во фронтальной, париетальной и медиальной префронтальной коре наблюдалось усиление тета-активности, при этом во фронтальной и медиальной префронтальной коре отмечалось снижение гамма-активности. В окципитальной области и гиппокампе было зарегистрировано снижение дельта-активности. В остальных исследуемых структурах (прилежащее ядро, вентральная тегментальная область и миндалина) значимых изменений не наблюдалось.

Блокатор MAPK p38 SB203580 оказывал наименее выраженное влияние на электрическую активность мозга. Значимые изменения включали повышение дельта-активности в окципитальной области и гиппокампе, усиление тета-активности в гиппокампе, а также снижение гамма-активности в париетальной, окципитальной областях, гиппокампе и миндалине.

Сравнительный анализ полученных данных позволяет предположить, что влияние соединения РУ-1205 на биоэлектрическую активность мозга частично отличается от эффектов классического каппа-опиоидного агониста U-50488. Усиление тета-ритма в ряде областей указывает на потенциальное вовлечение схожих нейрональных механизмов, но отсутствие широкого спектра изменений, особенно в отношении бета- и гамма-активности, характерных для U-50488, может свидетельствовать об ограниченной активации пострецепторных реакций, что характерно для функциональных агонистов. В то же время, профиль изменений, вызванных РУ-1205, полностью не совпадает с эффектами SB203580. Это может указывать на то, что ингибирование MAPK p38 не является одним из компонентов механизма действия РУ-1205, определяющим его специфический фармакологический профиль.


RU-1205
U-50488
SB203580
F
P
O
Контроль
±SEM
РУ-1205
U-50488
SB 203580
10log10(μV2/Hz)
Частота (Hz)
δ
θ
β
γ

mPFC			
Hipp			
NAc			

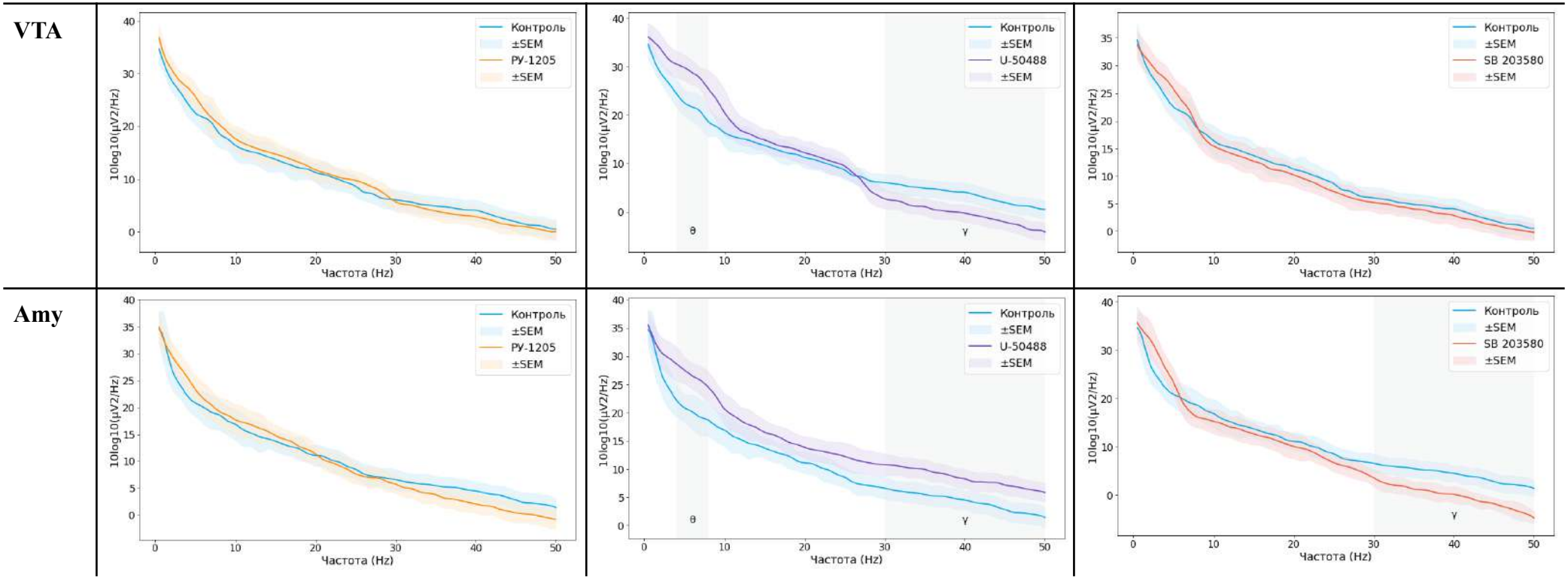


Рисунок 3.10 – Спектральная плотность мощности LFP-сигналов мозга крыс после введения соединения РУ-1205 (350 мкг, и.ц.в.), U-50488 (100 мкг, и.ц.в.) или SB203580 (1 мкг, и.ц.в.). Сравнение величин спектральной плотности мощности между исследуемыми группами веществ и группой контроля в различных отведениях выполнено во всех частотных диапазонах.

3.2.2. Когерентный анализ сигналов мозговой активности

Когерентный анализ был использован для изучения функциональной связности между различными областями мозга. Это позволяет более детально исследовать взаимодействия между различными частотными компонентами сигнала и выявлять сложные зависимости, которые могут быть упущены на этапе спектрального анализа.

С учетом данных, полученных на предыдущем этапе, а также на основании ранее проведенных исследований, оценка изменений когерентности под воздействием вещества РУ-1205 проводилась в тета-диапазоне частот в сравнении со сбалансированным агонистом U-50488 и блокатором MAPK p38 – SB203580 (рисунок 3.11).

Наиболее выраженные изменения функциональной коннективности наблюдались у животных, которые получали соединение U-50488. Обнаружено снижение когерентности между корковыми электродами, а также между префронтальной корой, гиппокампом, прилежащим ядром и вентральной областью покрышки (подобные эффекты выявляются при депрессии и когнитивных нарушениях, наблюдаются при использовании опиоидных анальгетиков), при этом отмечен рост коннективности с областью миндалевидного тела (характерный признак аверсивного действия и проявления реакции на стресс).

Соединение SB203580 не оказывало значительного влияния на когерентность, за исключением снижения связности между гиппокампом и миндалевидным телом.

Ранее было установлено, что аверсивный эффект каппа-опиоидных агонистов тесно связан с миндалевидным телом. Локальная микроинъекция SB203580 в миндалевидное тело приводила к устранению аверсивного действия соединения U-50488 (Zan G.Y. et al., 2016). Полученные нами результаты подтверждают усиление коннективности различных отделов мозга с миндалевидным телом на фоне введения U-50488, а также ослабление связи гиппокампа с миндалевидным телом после введения SB203580, и тем самым указывают на антагонистические отношения между данными соединениями в аспекте развития аверсивной реакции.

Соединение РУ-1205 не вызывало эффекта, подобного SB203580, при этом проявляло некоторые особенности изменения коннективности, характерные для анальгетического эффекта и когнитивных нарушений (снижение пространственной рабочей памяти (Xia M. et al., 2019)).

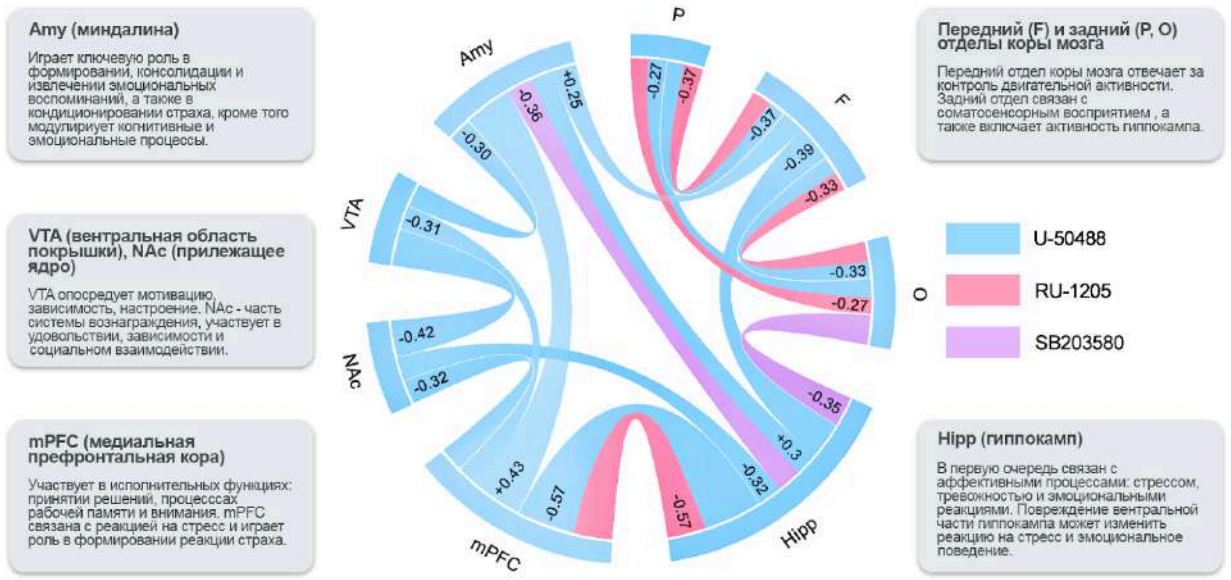


Рисунок 3.11 – Когерентность LFP-сигналов в тета-диапазоне, зарегистрированных на фоне действия соединения РУ-1205 (350 мкг), U-50488 (100 мкг) и SB203580 (1 мкг). На диаграмме отмечены связи (значения от −1 до +1) между отделами мозга, которые статистически значимо изменились после введения исследуемых веществ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$ при $\delta_m \geqslant 0,25$)

Таким образом, изучение функциональной коннективности позволяет дополнить данные спектрального анализа и существенно расширить представление о фармакологическом профиле исследуемых веществ, однако использованный классический подход обладает рядом недостатков и ограничений, которые были преодолены на следующем этапе работы.

3.2.3. Взвешенный индекс фазовой задержки с обработкой методом главных компонент и построением классификатора сигналов на основе гауссовских процессов

Для более точной и глубокой дифференциальной оценки воздействия исследуемых веществ на функции ЦНС была построена комбинированная модель на основе алгоритмов машинного обучения. После обработки данных взвешенного индекса фазовой задержки (wPLI) методом главных компонент было выделено 2 первые наиболее значимые компоненты, которые объясняют 58,32% вариативности (собственные значения >1).

В результате было показано усиление связей миндалевидного тела с различными областями мозга после введения U-50488 (ΔwPLI > 0,3 по сравнению с контролем). Подобных изменений коннективности миндалевидного тела не наблюдалось при сочетании SB203580 с U-50488, что подтверждает антагонистическое взаимодействие между этими препаратами. Учитывая, что параметры wPLI, связанные с миндалевидным телом, имели высокие коэффициенты нагрузки (>0,7) на 1 компоненту, можно предполагать сохранение признаков сигнала, связанных влиянием на MAPK p38.

Следующим шагом для оценки вероятности принадлежности соединения РУ-1205 к классам «ингибитор» и «не ингибитор» построены модели классификатора (рисунок 3.12). С целью повышения стабильности, прогностической надежности и робастности была выбрана модель с ядерной функцией на основе гауссовских процессов (Gaussian Process Classifier).

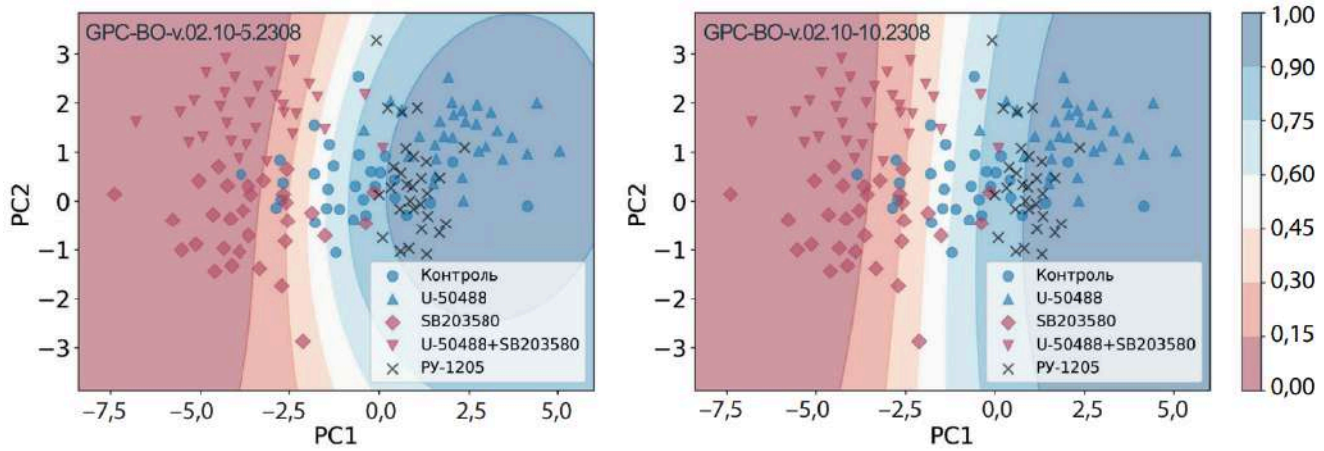


Рисунок 3.12 – Карты принятия решений, построенные на основе «Gaussian Process Classifier» (scikit-learn). Красным цветом отмечены «ингибиторы» MAPK p38 – группы «SB203580» и «SB203580 + U-50488»; синим цветом отмечены «не ингибиторы» MAPK p38 – группа «контроля», группа «U-50488»; черным цветом отмечены прогнозные координаты для сигналов группы «РУ-1205». Средняя вероятность принадлежности сигналов после введения РУ-1205 к классу «не ингибиторы»: 0,922584 и 0,894469 для моделей «GPC-BO-v.02.10-5.2308» (слева) и «GPC-BO-v.02.10-10.2308» (справа)

Согласно полученным прогнозным оценкам, соединение РУ-1205 не проявляет MAPK p38-ингибирующей активности в центральной нервной системе с уровнем вероятности не ниже 89,44% по результатам прогноза наиболее робастной модели.

Для подтверждения валидности полученных моделей представлена матрица несоответствий и результаты 5-кратной кросс-валидации (рисунки 3.13, 3.14).

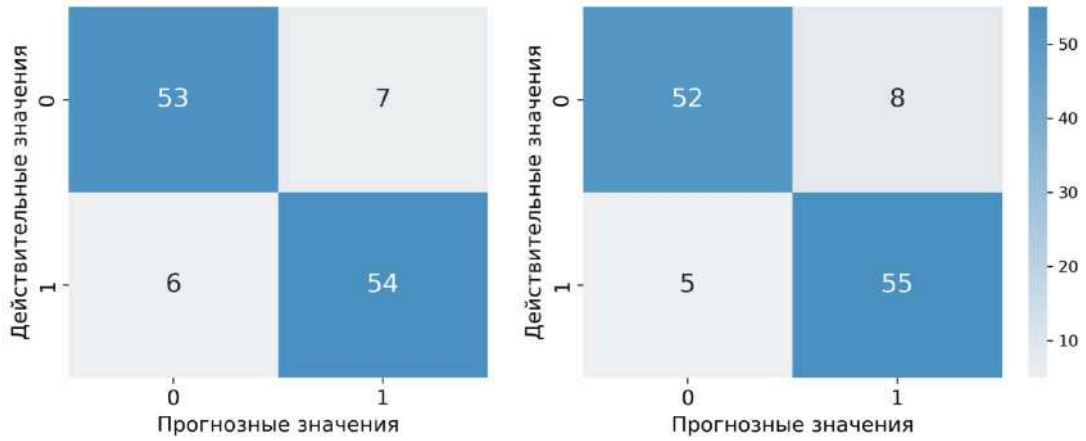


Рисунок 3.13 – Матрицы несоответствий для модели «GPC-BO-v.02.10-5.2308» (слева) и «GPC-BO-v.02.10-10.2308» (справа). Примечание: класс 0 – «ингибиторы» MAPK p38; класс 1 – «неингибиторы» MAPK p38

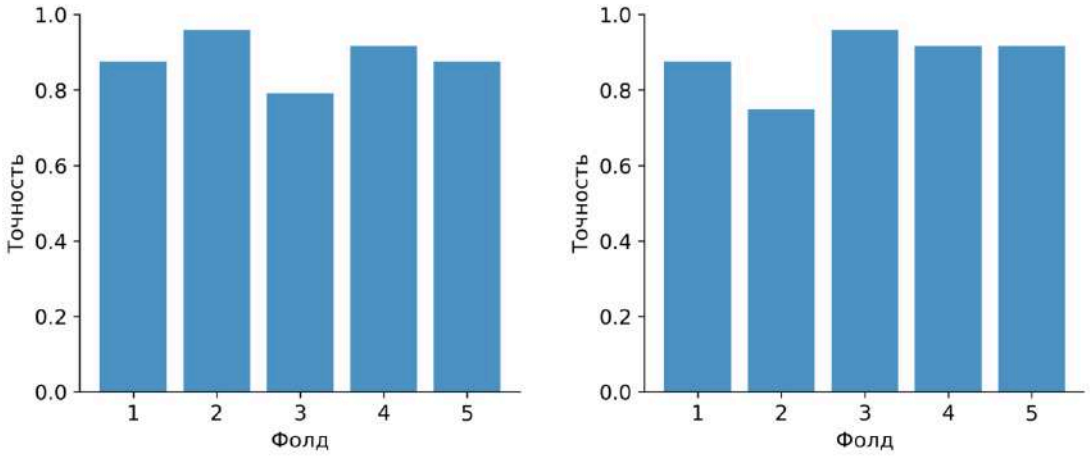


Рисунок 3.14 – Результаты 5-кратной кросс-валидации модели «GPC-BO-v.02.10-5.2308» (слева) и «GPC-BO-v.02.10-10.2308» (справа)

3.3. Изучение влияния соединения РУ-1205 на спайковую активность пирамидных нейронов миндалины на установке patch clamp

Проблема объемной проводимости влияет на точность интерпретации и анализа LFP-сигналов. Поскольку электрические сигналы, генерируемые нейронами, способны распространяться по ткани мозга, это может привести к искажению и смешиванию сигналов от разных источников. Кроме того, существует мнение, что LFP-активность в большей степени отражает импульсы входящих аксонов, нежели локальную генерацию потенциалов (Courtin J. et al., 2014). В связи с этим следующим этапом работы стало изучение MAPK p38-ингибирующей активности на клеточном уровне с применением технологии patch clamp.

Эксперимент построен на основе ранее проведенных исследований, где было установлено, что блокирование KOP в миндалине приводит к снижению спайковой активности пирамидных нейронов (Yakhnitsa V. et al., 2022). Аналогичный эффект наблюдается при блокировании CRF1-рецепторов, которые (так же, как KOP) реализуют свой эффект через бета-аррестиновый путь и активацию MAPK p38 (Dermitzaki E. et al., 2002). Также было достоверно показано полное устранение аверсивного эффекта при введении вещества SB203580 в миндалину (Zan G.Y. et al., 2016). Описанный внутриклеточный каскад представлен на рисунке 3.15.

Нейроны базолатерального ядра миндалины, как *in vivo*, так и *in vitro*, проявляют чрезвычайно низкий уровень спонтанной активности. В зависимости от реакции на инъекцию тока, нейроны латеральной миндалины были разделены на два типа (рисунок 3.16). Первый тип (пирамидные нейроны миндалины), включающий примерно 95% всех клеток, характеризуется продолжительным потенциалом действия (полуширина ~1,2 мс при 28–30 °C) и различной степенью адаптации частоты спайков в ответ на длительную инъекцию деполяризующего тока. Последовательности потенциалов действия сопровождаются продолжительной (1–5 с)

постгиперполяризацией.

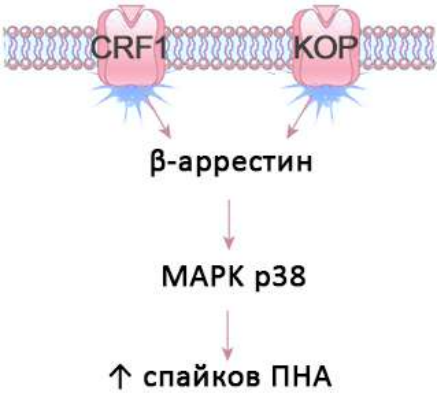


Рисунок 3.15 – Общий путь активации бета-аррестинового пути для каппа-опиоидного рецептора и CRF1 (Bruchas M.R. et al., 2006; Grammatopoulos D.K., 2012)

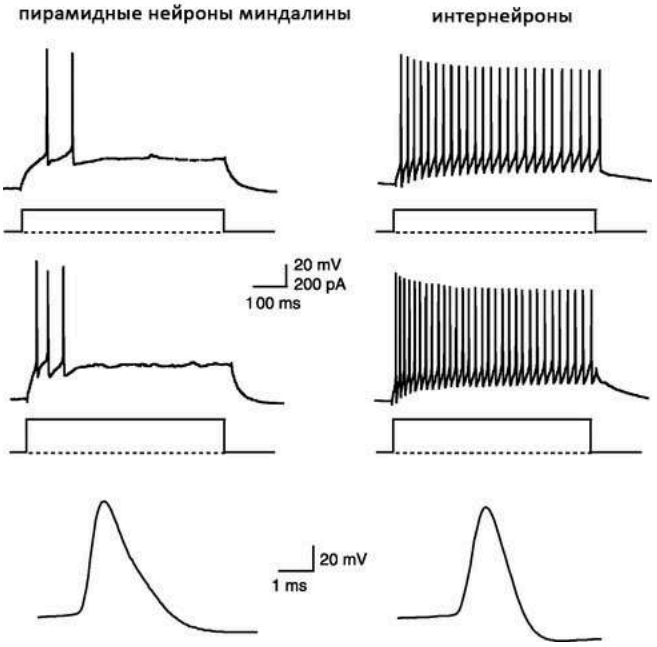


Рисунок 3.16 – Электрофизиологическая характеристика пирамидных нейронов миндалины (слева) и интернейронов (справа) по данным источника (Sah P. et al., 2003)

После установления контакта с целевым нейроном (в конфигурации “whole-cell”) измерялась исходная спайковая активность в ответ на инъекцию тока (200 pA, 500 мс). Затем методом локальной инфузии аппликировался раствор соединения U-50488 в возрастающих концентрациях (0,01–10 мкМ) (рисунок 3.17).

Для определения эффекта соединения SB203580 (в концентрации 1 и 5 мкМ) и РУ-1205 (в концентрации 10 и 100 мкМ) на U-50488-индуцированную спайковую активность пирамидных нейронов миндалины исследуемые вещества аппликировались в комбинации с возрастающими концентрациями U-50488 (рисунок 3.18).

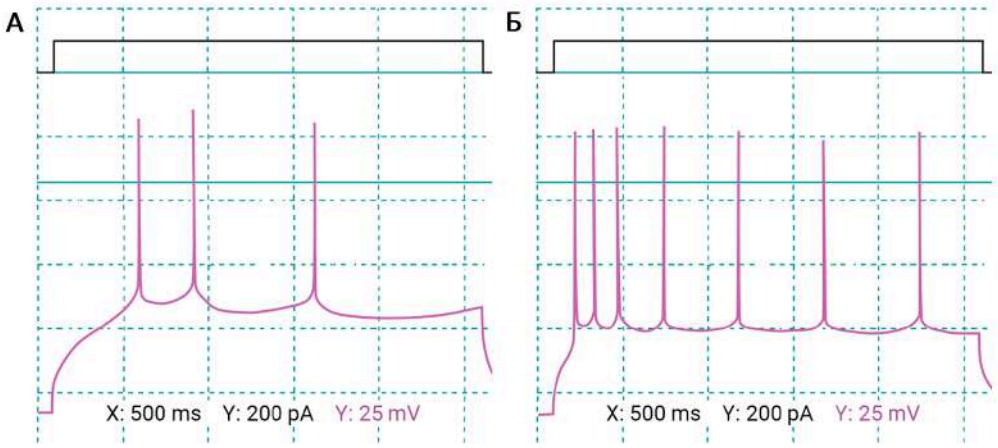
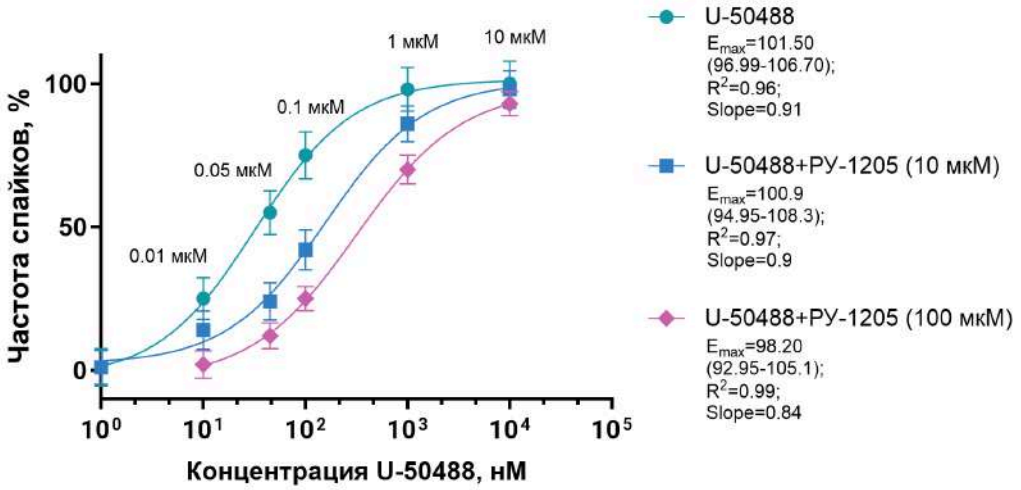


Рисунок 3.17 – Серии спонтанных спайков пирамидных нейронов миндалины, вызванные стимуляцией током (200 pA, 500 мс). А - контроль. Б - после аппликации U-50488 1 мкМ

Эффект U-50488 + РУ-1205



Эффект U-50488 + SB203580

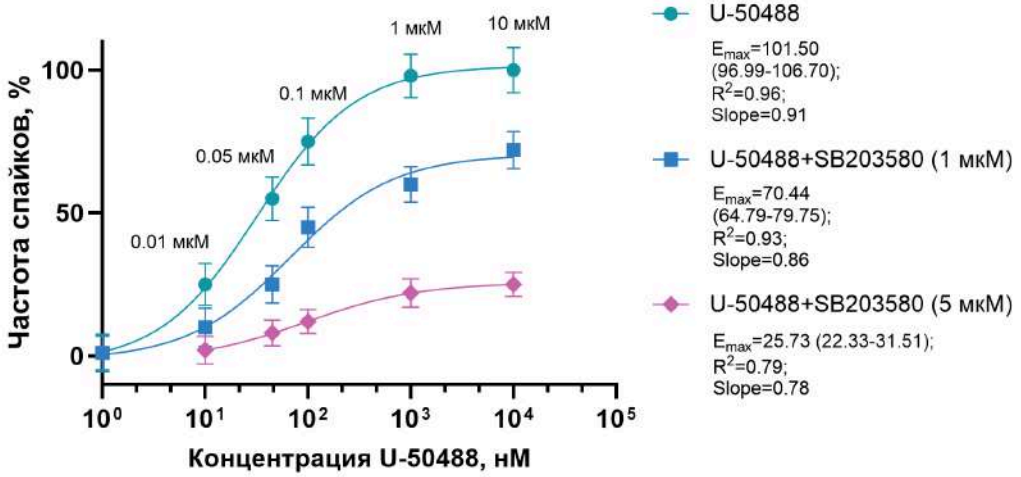


Рисунок 3.18 – Дозозависимые эффекты соединения U-50488 на спайковую активность пирамидных нейронов миндалины в комбинации с соединением РУ-1205 (верхний график, концентрация РУ-1205: 0, 10, 100 мкМ) и веществом SB203580 (нижний график, концентрация SB203580: 0, 1, 5 мкМ). *Примечание*: данные представлены как M ± SEM.

Полученные дозозависимые кривые позволяют заключить, что при комбинировании вещества U-50488 и РУ-1205 вступают в конкурентный антагонизм, о чем свидетельствует смещение кривой вправо (без значимого изменения наклона кривой) и сохранение величины максимального эффекта (плато). При комбинировании соединения U-50488 и SB203580 наблюдали проявления неконкурентного антагонизма, который выражался в изменении наклона кривой (slope) и сокращении величины максимального эффекта U-50488. Полученные результаты позволяют заключить, что соединение РУ-1205 не проявляет внерецепторной активности, подобной SB203580, а конкурирует за общий сайт связывания с соединением U-50488, устраняя его аверсивный эффект, косвенным признаком (коррелятом) которого в рамках данной модели является усиление спайковой активности нейронов базолатерального комплекса миндалины. Подобный феномен является характерным признаком конкурентной функциональной активности, в частности, такой же эффект выявлен у функционального агониста 6′-GNTI, который также ослабляет аррестин-опосредованные эффекты дисфории и тревожности, усиливая G-белок-опосредованные изменения (Rives M.L. et al., 2012).

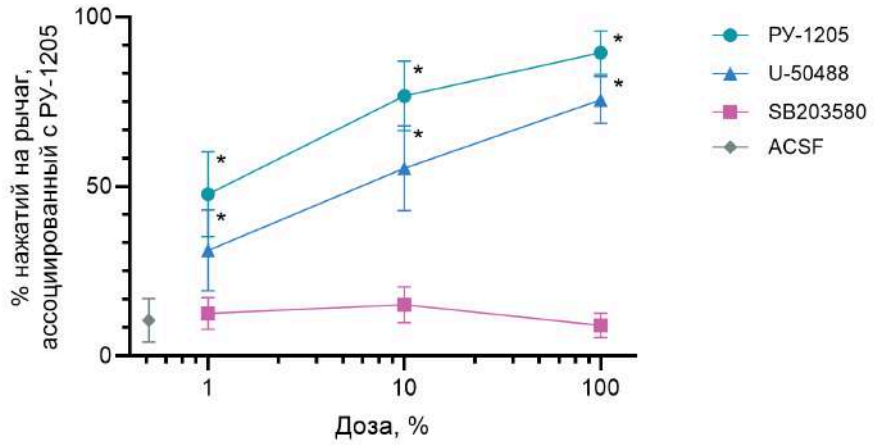
3.4. Оценка эффектов соединения РУ-1205 в модели дискриминации стимулов

Все крысы из первой группы обучились процедуре дискриминации за 18 ± 3,0 сеансов. В процессе анализа дискриминативных свойств соединения РУ-1205 на этапе тестирования был достигнут дискриминирующий эффект 89,44% (±6,45, SD), введение РУ-1205 дозозависимо увеличивало процент нажатий на активную педаль ($F_{2.060,16.48}$ = 208,1, p < 0,0001). Соединение U-50488 частично замещало РУ-1205, крысы успешно распознавали соединение U-50488 с уровнем генерализации до 75,56% (±6,95, SD) в дозе 100 мкг, 55,34% (±12,52, SD) при дозе 10 мкг и 31,11% (±11,89, SD) для дозы 1 мкг ($F_{2.221,17.77}$ = 201,7, p < 0,0001) (рисунок 3.19А).

Вторая группа животных за время обучения не достигла уровня дискриминации, превышающего порог.

Третья группа обучилась отличать соединение SB203580 в присутствии налоксона за 17,5 ± 3,29 дней. Достигнутый уровень дискриминации превысил 80% порог ($F_{2.105,14.74}$ = 245,7, p < 0,0001), однако эффект минимальной дозы (0,01 мкг) статистически значимо не отличался от контроля. В тесте на замещение соединение РУ-1205 в присутствии налоксона статистически значимо не изменяло процент нажатий на рычаг, ассоциированный с SB203580 + налоксон, что говорит об отсутствии у соединения РУ-1205 дополнительной МАРК p38-ингибирующей активности (рисунок 3.19Б).

А



Б

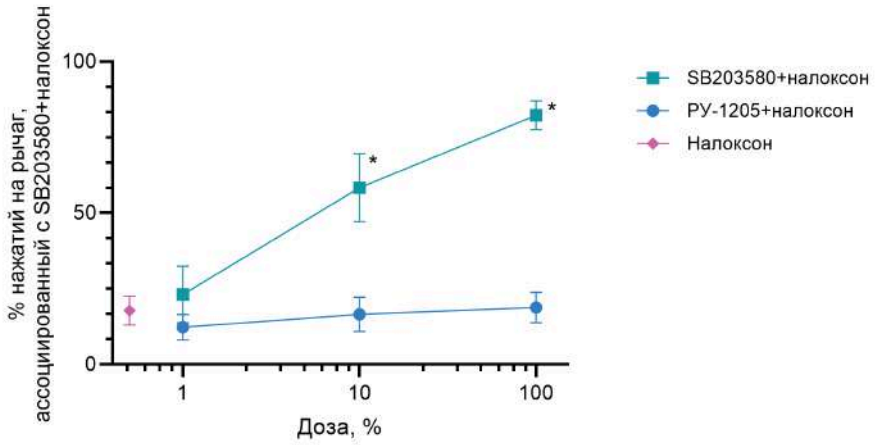


Рисунок 3.19 – Влияние исследуемых соединений на процент нажатий на верный рычаг в парадигме дискриминации стимула

Примечание: А – реакция крыс на соединения РУ-1205, U-50488 и SB203580 после обучения различать РУ-1205 в дозе 350 мкг и.ц.в.; Б – реакция крыс на комбинации SB203580 + налоксон и РУ-1205 + налоксон, после обучения различать SB203580 + налоксон (1 мкг/200 мкг и.ц.в.). Максимальные дозы каждого из тестовых веществ были взяты за 100%. Примечание: данные представлены в виде M ± SD, * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольным раствором.

3.5. Оценка локальных эффектов соединения РУ-1205 на структуры головного мозга

Для изучения вклада различных структур головного мозга в развитие анальгетического эффекта каппа-опиоидного агониста РУ-1205 выполняли микроинъекции в различные области мозга, которые играют важную роль в модуляции болевых ощущений. Поведенческие тесты термической, механической и химически-индуцированной боли использовались для оценки уровня анальгезии.

3.5.1. Околоводопроводное серое вещество

В исследовании было обнаружено, что введение соединений U-50488 и РУ-1205 в околоводопроводное серое вещество (PAG) вызывало значимый анальгетический эффект во всех использованных поведенческих методах оценки болевой чувствительности.

В тесте отдергивания хвоста было обнаружено, что как вещество U-50488, так и РУ-1205 вызывали достоверное увеличение латентного периода реакции отдергивания хвоста под воздействием термического стимула по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$; рисунок 3.20А).

При оценке химически-индуцированной боли в формалиновом тесте наблюдалось значительное уменьшение продолжительности острой болевой реакции после введения обоих соединений в PAG по сравнению с контролем ($p < 0,05$; рисунок 3.20Б).

В тесте механической аллодинии с использованием волосков фон Фрея микроинъекции U-50488 и РУ-1205 в структуру приводили к достоверному повышению порога болевой чувствительности к механическому воздействию ($p < 0,05$; рисунок 3.20В).

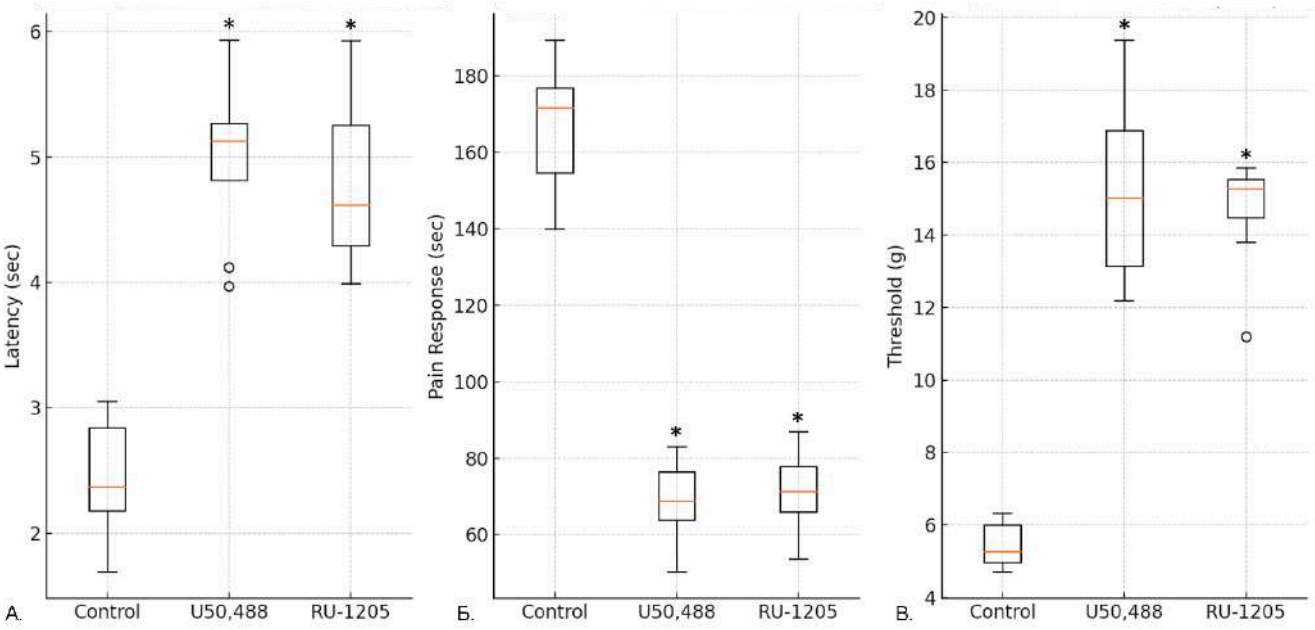


Рисунок 3.20 – Анальгетические эффекты соединения РУ-1205 (5,6 мкг) и U-50488 (1,6 мкг) при локальном введении в структуры околоводопроводного серого вещества (PAG). А. Латентный период отдергивания хвоста в тесте термической боли; Б. Тест болевой чувствительности с формалином; В. Порог боли при механическом раздражении в тесте с волосками фон Фрея
Примечание: данные представлены как Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 8$).

3.5.2. Большое ядро шва

На следующем этапе был оценен анальгетический эффект соединений U-50488 и РУ-1205 при введении в большое ядро шва (NRM). Анализ результатов показал, что оба

соединения оказывали значимое влияние на снижение болевой чувствительности, хотя их эффективность была несколько ниже по сравнению с эффектом, наблюдаемым при введении в околоводопроводное серое вещество (PAG).

Латентный период отдергивания хвоста у крыс, получавших микроинъекции U-50488 и РУ-1205 в NRM, был значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Средние значения латентного периода для U-50488 и РУ-1205 были близки друг к другу (рисунок 3.21А).

В ходе формалинового теста также отмечалось значительное снижение болевого ответа (времени облизывания или кусания лапы) у животных, получавших U-50488 и РУ-1205, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, рисунок 3.21Б).

Результаты теста с волосками фон Фрея показали, что у крыс, получавших соединения U-50488 и РУ-1205, наблюдалось незначительное повышение болевого порога по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$) с относительно более высоким показателем для первого вещества (рисунок 3.21В).

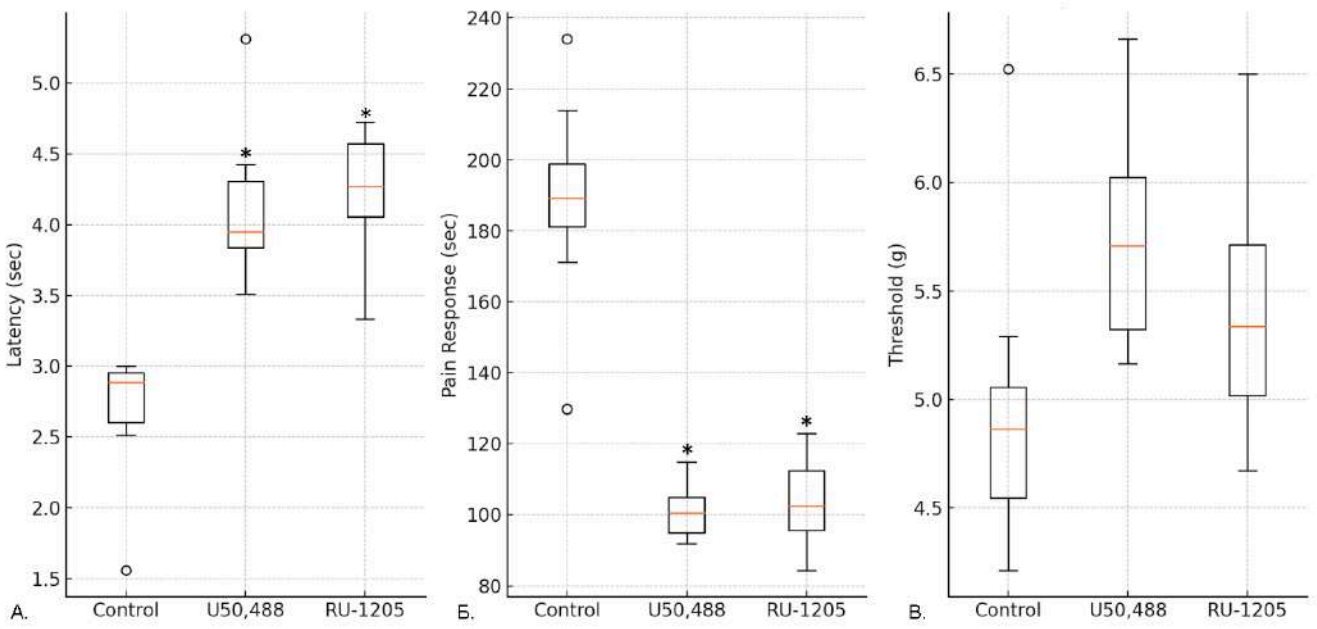


Рисунок 3.21 – Эффекты соединений U-50488 (1,6 мкг) и РУ-1205 (5,6 мкг) при их введении в большое ядро шва (NRM) в сравнении с контрольной группой. А. Латентный период отдергивания хвоста в тесте термической боли; Б. Тест болевой чувствительности с формалином; В. Порог боли при механическом раздражении в тесте с волосками фон Фрея
Примечание: данные представлены как Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 8$).

3.5.3. Миндалевидное тело

При введении соединений U-50488 и РУ-1205 в миндалевидное тело (Amy) в тесте отдергивания хвоста латентный период рефлекторного реагирования не отличался от

контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии значимого анальгетического эффекта у данных соединений при термической стимуляции (рисунок 3.22А).

Аналогично, в тесте с волосками фон Фрея порог болевой чувствительности в группах с введением U-50488 и РУ-1205 был сопоставим с показателями контрольной группы. Отсутствие значимых различий указывает на то, что оба соединения не оказывали существенного влияния на механическую болевую чувствительность при введении в миндалевидное тело (рисунок 3.22В).

В формалиновом тесте соединения U-50488 и РУ-1205 статистически значимо снижали болевую реакцию по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). Полученные результаты отражают избирательное анальгетическое действие каппа-опиоидных агонистов на компонент болевой чувствительности, который воспроизводится только в формалиновом тесте (рисунок 3.22Б).

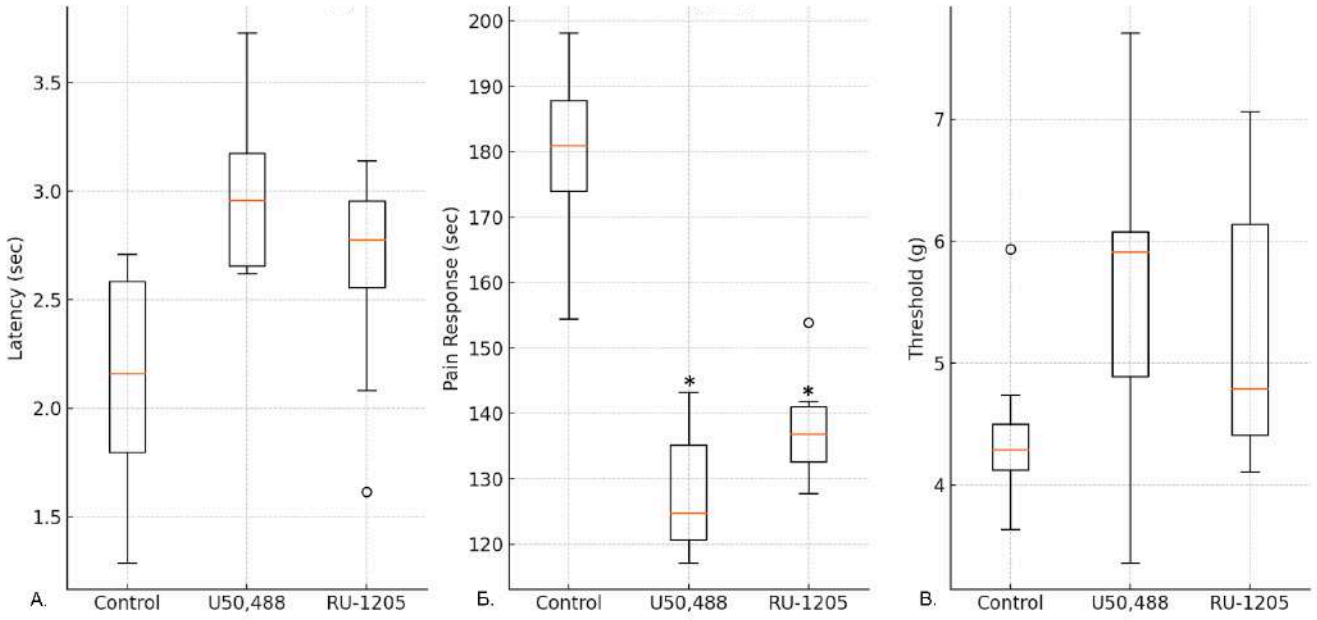


Рисунок 3.22 – Влияние каппа-опиоидных агонистов U-50488 (1,6 мкг) и РУ-1205 (5,6 мкг), инъецируемых в миндалевидное тело (Amy), на показатели болевой чувствительности у крыс. А. Латентный период отдергивания хвоста в тесте термической боли; Б. Тест болевой чувствительности с формалином; В. Порог боли при механическом раздражении в тесте с волосками фон Фрея

Примечание: данные представлены как Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 8$).

3.5.4. Гиппокамп

При исследовании анальгетических эффектов соединений U-50488 и РУ-1205 в гиппокампе (Hipp) было выявлено, что данные соединения не оказывали значимого влияния на болевую чувствительность в сравнении с контрольной группой.

В тесте отдергивания хвоста латентный период при введении U-50488 и РУ-1205 был практически идентичен показателям контрольной группы, что указывает на отсутствие существенного влияния на термическую болевую чувствительность (рисунок 3.23А).

В формалиновом тесте не наблюдалось значимого уменьшения болевого ответа у животных, получивших инъекции данных соединений, в сравнении с контрольной группой (рисунок 3.23Б).

В тесте с волосками фон Фрея порог механической чувствительности также оставался неизменным и соответствовал показателям контрольной группы (рисунок 3.23В).

Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что гиппокамп не является значимой областью для анальгетического действия каппа-опиоидных агонистов U-50488 и РУ-1205.

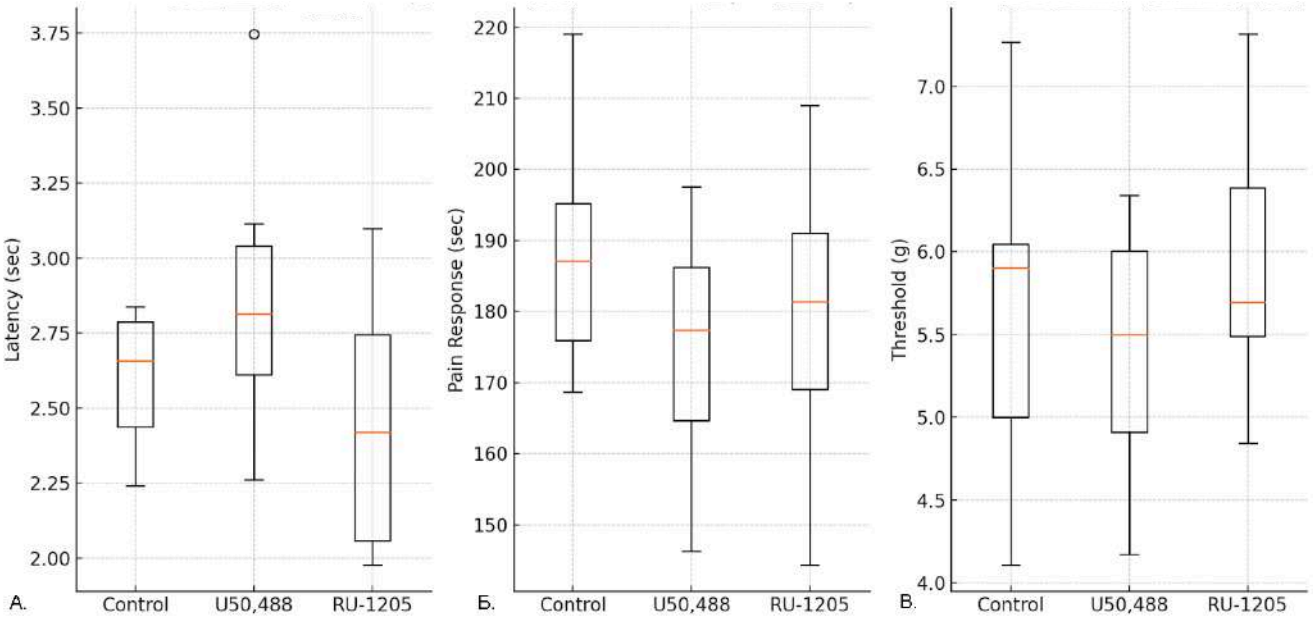


Рисунок 3.23 – Анальгетические эффекты соединений U-50488 (1,6 мкг) и РУ-1205 (5,6 мкг) при введении в гиппокамп (Hipp) в сравнении с контрольной группой. А. Латентный период отдергивания хвоста при термическом раздражении. Б. Болевой отклик в формалиновом тесте. В. Порог механической чувствительности, определяемый тестом с волосками фон Фрея
Примечание: данные представлены как Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 8$).

3.5.5. Прилежащее ядро

В ходе исследования были изучены анальгетические эффекты соединений U-50488 и РУ-1205 при введении в прилежащее ядро (NAc).

В тесте отдергивания хвоста латентный период рефлекторной реакции в группах, получавших U-50488 и РУ-1205, был сопоставим с контрольной группой, что указывает на отсутствие значимого анальгетического эффекта при термической стимуляции (рисунок 3.24А).

В формалиновом тесте, характеризующем болевую реакцию на химическое раздражение, у животных, которым выполняли микроинъекции U-50488 и РУ-1205, не наблюдалось существенных изменений в длительности болевой реакции в сравнении с контрольной группой (рисунок 3.24Б).

В тесте с волосками фон Фрея, отражающем механическую болевую чувствительность, также не было выявлено значимых различий между исследуемыми соединениями и контрольной группой (рисунок 3.24В).

Отсутствие значимых изменений болевой чувствительности к стимулам различной модальности при введении U-50488 и РУ-1205 в прилежащее ядро указывает на то, что каппа-опиоидная система на уровне данной структуры, вероятно, не вносит существенного вклада в модуляцию ноцицептивных реакций.

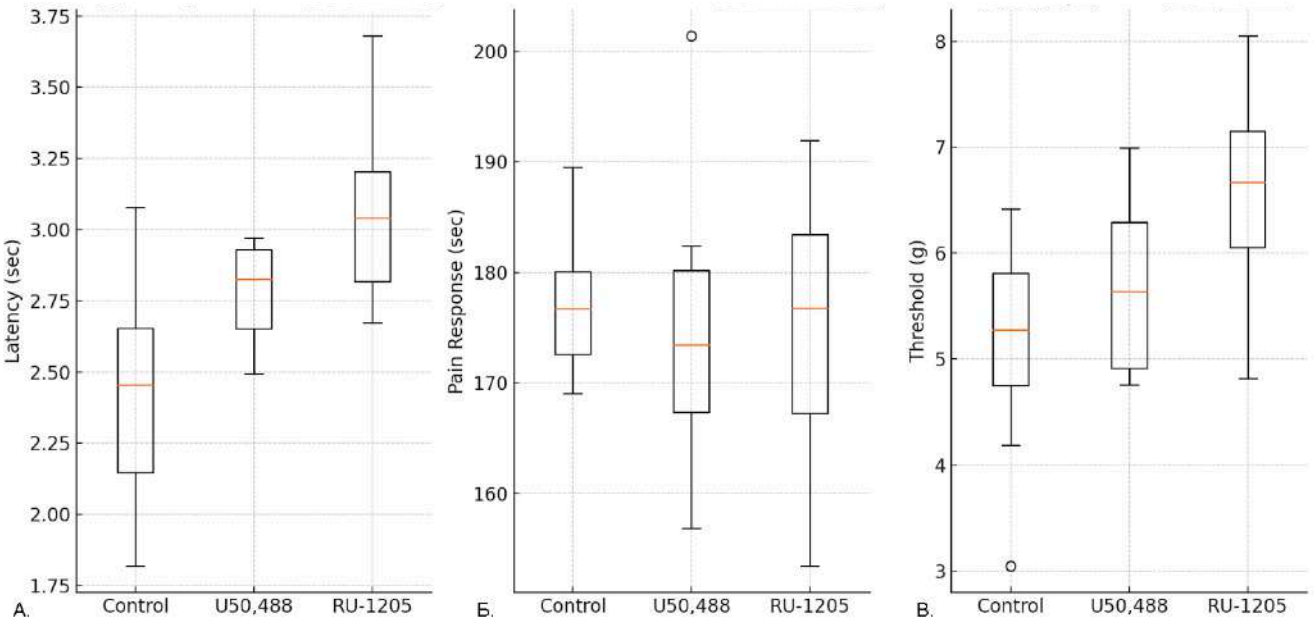


Рисунок 3.24 – Анальгетические эффекты соединений U-50488 (1,6 мкг) и РУ-1205 (5,6 мкг) при введении в прилежащее ядро (NAc). А. Латентный период отдергивания хвоста; Б. Формалиновый тест болевой чувствительности В. Болевой порог в тесте с волосками фон Фрея
Примечание: данные представлены как Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 8$).

Полученные результаты позволяют заключить, что в реализации анальгетического эффекта соединения РУ-1205 ключевую роль играет скопление околоводопроводного серого вещества, большое ядро шва, а также в меньшей степени миндалевидное тело, при этом структуры, вовлеченные в развитие анальгетического эффекта, полностью совпадают с референсным веществом U-50488, которое относится к сбалансированным агонистам каппа-опиоидных рецепторов.

3.6. Изучение противозудных свойств соединения РУ-1205

3.6.1. Модель острого нейрогенного зуда, вызванного серотонином

При анализе данных, полученных на модели серотонин-индуцированного зуда у крыс (рисунок 3.25), установлено, что в контрольной группе медиана количества приступов зуда составила 28,5 эпизода, а интерквартильный размах был равен 26,25[10,75;37,00]. Введение агониста каппа-опиоидных рецепторов РУ-1205 в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно за 30 минут до индукции зуда привело к снижению медианы частоты приступов зуда на 21,5 эпизода (Me = 7,0, $Q_1;Q_3$[3,0;22,0]; $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Применение соединения U-50488 в той же дозе также достоверно уменьшало медианное количество приступов зуда на 19,5 эпизода (Me = 9,0, $Q_1;Q_3$[4,75;17,50]; $p < 0,05$) относительно контрольной группы.

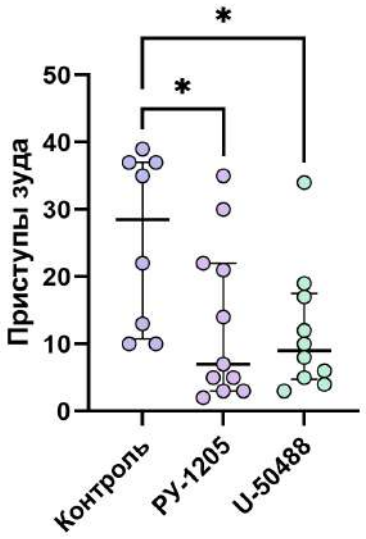


Рисунок 3.25 – Влияние соединения РУ-1205 (5 мг/кг) и U-50488 (5 мг/кг) на частоту эпизодов зуда у крыс, вызванных внутрикожным введением серотонина (0,5 мг в 50 мкл)
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна (n = 8).

3.6.2. Индукция хронического зуда в модели «сухой кожи»

Каппа опиоидные агонисты, соединения РУ-1205 (Me = 41,0, $Q_1;Q_3$[12,75;59,00]) и U-50488 (Me = 24,5, $Q_1;Q_3$[19,50;55,75]), на 8 день развития патологии статистически значимо снижали частоту приступов зуда относительно контрольных животных ($p < 0,05$). Однако исследуемые соединения не оказывали влияния на результаты при оценке аллокнезиса (рисунок 3.26).

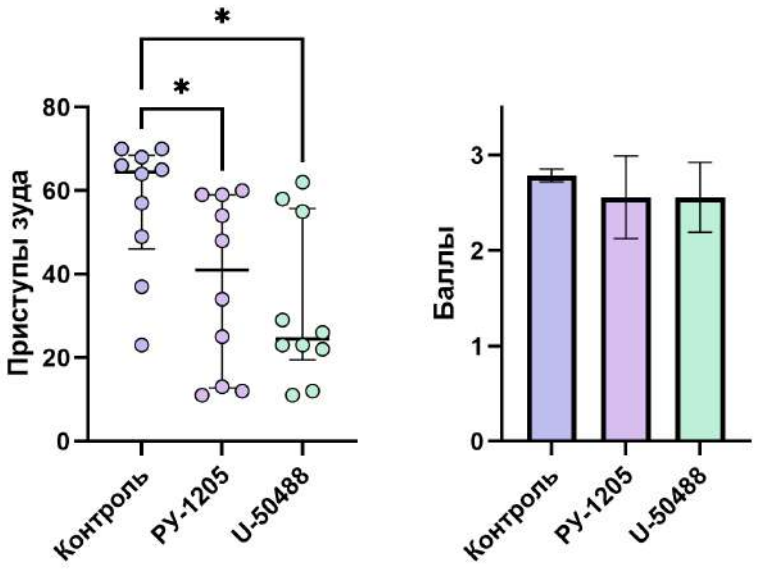


Рисунок 3.26 – Влияние соединения РУ-1205 (5 мг/кг) и U-50488 (5 мг/кг) на частоту эпизодов зуда (слева) и аллокнезис (справа) у мышей в модели «сухой кожи»
Примечание: данные, отражающие частоту эпизодов зуда, представлены в виде Me(IQR), данные, отражающие аллокнезис, представлены в виде M ± SEM. Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 10$).

3.7. Оценка влияния соединения РУ-1205 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»

В исследовании было автоматически выделено десять независимых элементарных поведенческих параметров, отражающих различные аспекты двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс. Каждый параметр ассоциируется со специфическими формами поведения (рисунок 3.27).

У животных, которым вводили буторфанол в дозе 2,5 мг/кг, достоверно снижались показатели быстрого поступательного движения (параметр 1; $p < 0,05$), некоторые элементы ориентировочно-исследовательского поведения (параметр 7; $p < 0,001$) и неспецифические двигательные реакции (параметр 10; $p < 0,05$). Наряду с этим усиливалась груминг-активность (параметр 4; $p < 0,0001$) и возрастала выраженность стереотипных форм поведения, в том числе круговых перемещений (параметр 8; $p < 0,01$) и повторяющегося обнюхивания (параметр 9; $p < 0,01$). Параметры, связанные с ориентировочными подъемами (2), вертикальными стойками (3), а также некоторые неспецифические формы моторики (5 и 6), в низкой дозе существенно не менялись ($p > 0,05$).

Увеличение дозы буторфанола до 5 мг/кг приводило к более выраженной депрессии большинства двигательных паттернов. Так, снижались быстрые поступательные перемещения (параметр 1; $p < 0,0001$), ориентировочные подъемы (параметр 2; $p < 0,01$), вертикальные стойки (параметр 3; $p < 0,0001$), а также параметры 5, 6, 7 и 10 (все $p < 0,01$ или $p < 0,0001$),

характеризующие степень неспецифической и исследовательской активности. При этом сохранялось усиление груминга (параметр 4; $p < 0,0001$) и нарастали проявления стереотипного поведения (параметры 8 и 9; $p < 0,0001$). Таким образом, типичное для каппа-опиоидных агонистов действие буторфанола выражалось в комбинированном седативном и частично дисфорическом эффекте: снижение исследовательско-ориентировочной активности сочеталось с ростом стереотипных, однообразных форм поведения.

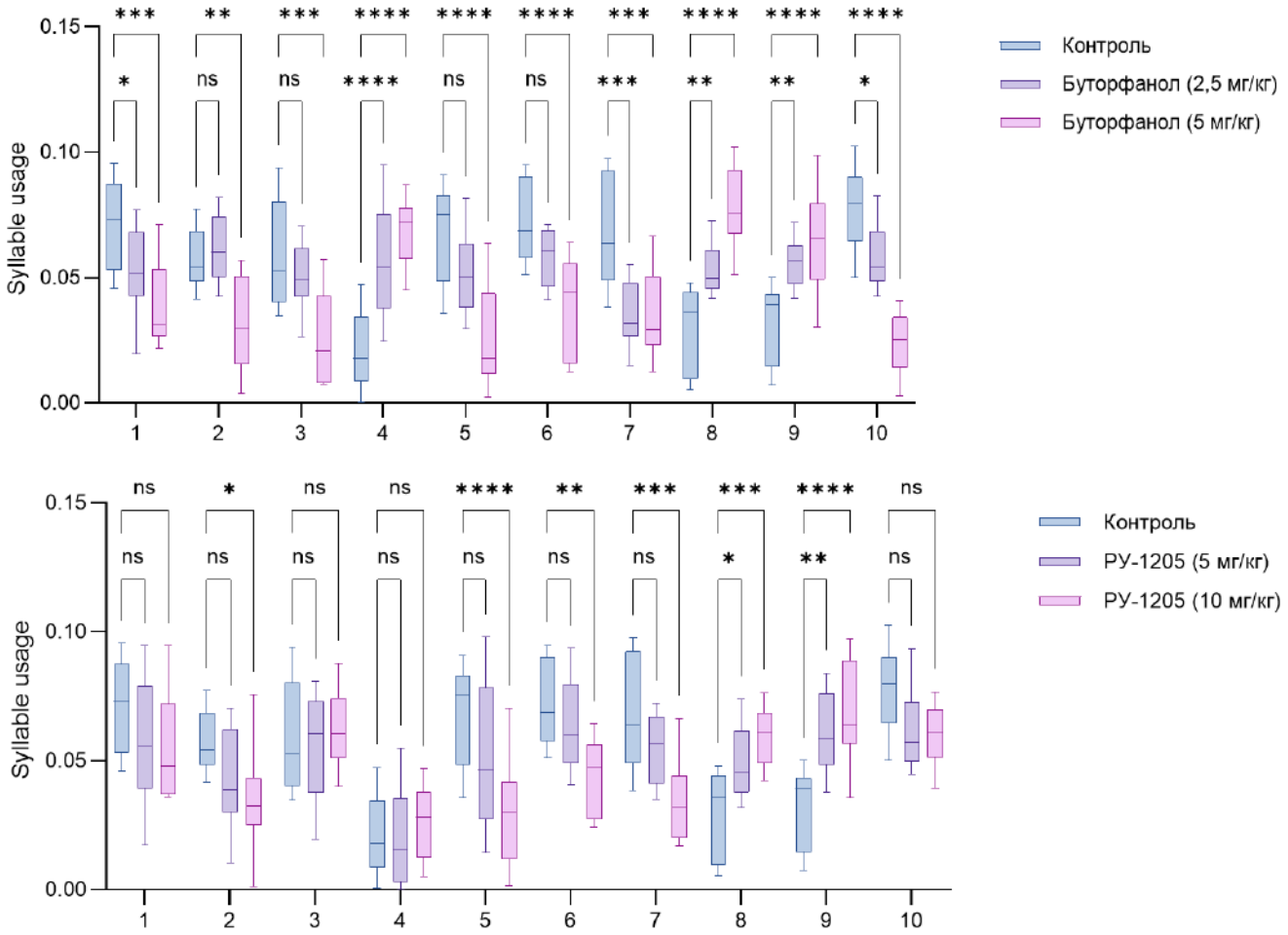


Рисунок 3.27 – Диаграммы частот встречаемости десяти элементарных поведенческих действий у здоровых крыс, получавших анальгетический препарат буторфанол (2,5 или 5 мг/кг) или экспериментальное вещество РУ-1205 (5 или 10 мг/кг)
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0$ 0001, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 9$).

В отличие от буторфанола, соединение РУ-1205 оказывало более умеренное и селективное действие. При дозе 5 мг/кг не выявлено статистически значимого влияния на параметры 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 ($p > 0,05$). Отмечалось лишь повышение показателя стереотипных круговых перемещений (параметр 8; $p < 0,05$) и повторяющегося обнюхивания (параметр 9; $p < 0,05$), что свидетельствует о небольшой тенденции к возрастанию однообразной двигательной активности без выраженной депрессии или возрастания груминга и дисфорических проявлений.

Повышение дозы РУ-1205 до 10 мг/кг приводило к более отчетливым изменениям. Так, выявлялось достоверное снижение ориентировочных подъемов (параметр 2; $p < 0,05$), а также нескольких параметров неспецифической и исследовательской активности (параметры 5, 6, 7; $p < 0,01$ или $p < 0,001$), тогда как вертикальные стойки (параметр 3) и груминг (параметр 4) оставались без статистически значимых изменений. При этом стереотипные круговые перемещения (параметр 8) и повторяющегося обнюхивания (параметр 9) также продолжали возрастать ($p < 0,001$), отражая небольшое смещение баланса в сторону однообразных форм активности. Изменения параметров 1 и 10 не достигали уровня статистической значимости.

Анализ полученных для буторфанола и соединения РУ-1205 данных показал, что оба вещества модифицируют двигательные паттерны. Буторфанол, обладая выраженной активностью на каппа-опиоидные рецепторы, вызывал характерный сдвиг поведенческого паттерна в сторону седации и увеличения стереотипных форм активности (круговые перемещения, повторяющееся обнюхивание, груминг), а также существенное снижение ориентировочно-исследовательских реакций. Это согласуется с типичным для каппа-агонистов спектром эффектов.

Соединение РУ-1205, напротив, проявляло менее выраженное воздействие, не вызывая заметной депрессии ключевых форм поведения при меньших дозах. При увеличении дозы часть двигательных и ориентировочных компонентов угнеталась. Отмеченный рост двух показателей связан лишь с частичным сдвигом в сторону стереотипных форм активности. Отсутствие глубокой дезорганизации поведения при введении соединения РУ-1205 указывает на более благоприятный профиль действия по сравнению с буторфанолом.

3.8. Оценка влияния соединения РУ-1205 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием

В ходе эксперимента была исследована способность соединения РУ-1205 влиять на рабочую память и спонтанное чередование, тестируемые в Т-образном лабиринте в сравнении с буторфанолом. Для оценки работоспособности кратковременной памяти использовался тест спонтанного чередования, отражающий склонность животных выбирать противоположный рукав лабиринта после предшествующего захода. Уменьшение процента спонтанных чередований свидетельствует о снижении когнитивных функций, в частности, рабочей памяти.

В группе, получавшей РУ-1205 в обеих исследованных дозах, наблюдалась тенденция к некоторому снижению показателей спонтанного чередования по сравнению с контролем, однако при статистическом анализе значимых отличий выявлено не было. Полученные данные указывают на отсутствие существенного влияния соединения РУ-1205 на рабочую память в дозах 10 и 20 мг/кг (таблица 3.5).

Буторфанол оказывал более выраженное действие на когнитивную сферу: снижение показателей спонтанного чередования отмечалось у животных, получавших обе дозы данного вещества, при этом в максимальной дозе снижение достигло статистической значимости ($p < 0,005$). Этот результат согласуется с известными опиоидными свойствами буторфанола, который может оказывать седативное влияние и вызывать дезориентацию, что в совокупности может приводить к угнетению функции рабочей памяти (Lascelles B.D.X., 2004; Douet J.Y. et al., 2018).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что РУ-1205 в исследованных дозах не вызывает выраженных когнитивных нарушений в условиях данной экспериментальной модели, тогда как буторфанол существенно снижает показатели рабочей памяти у крыс.

Таблица 3.5 – Влияние вещества РУ-1205 (10 и 20 мг/кг, внутрибрюшинно) и буторфанола (2,5 и 5 мг/кг, внутрибрюшинно) на рабочую память в тесте спонтанного чередования в Т-образном лабиринте

Группа (n = 10)	**Доза, мг/кг**	**%СЧ, Me [Q_1;Q_3]**
Контроль (растворитель)	–	71,65 [62,40;76,18]
РУ-1205	10	64,35 [51,15;73,83]
РУ-1205	20	61,55 [48,30;66,28]
Буторфанол	2,5	56,20 [51,10;62,30]
Буторфанол	5	50,15 [43,23;56,45]*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

3.9. Заключение

В ходе проведенного комплексного исследования были охарактеризованы молекулярно-структурные особенности взаимодействия конденсированных производных бензимидазола с каппа-опиоидным рецептором и изучено их анальгетическое действие, а также потенциальная причастность к другим фармакологическим эффектам. На основании виртуального скрининга, фармакофорного анализа, молекулярного докинга и расчета энергии взаимодействия лиганд-рецептор определено, что наиболее перспективным соединением является РУ-1205. Оно формирует стабильные комплексы с КОР за счет ключевых взаимодействий (водородные связи, солевой мостик с ASP138, π-стэкинг с TYR139) и демонстрирует наиболее низкий показатель «docking score» среди исследованных аналогов. Результаты молекулярной динамики подтвердили высокую устойчивость его комплекса с

рецептором и указали на возможный «смещенный» характер агонизма, что может объяснять специфичность его действия.

Дальнейшие электрофизиологические и поведенческие эксперименты позволили уточнить механизм анальгетического действия соединения РУ-1205 и оценить его поведенческий профиль. Установлено, что влияние соединения на биоэлектрическую активность мозга частично перекрывается с эффектами классических каппа-агонистов (в частности, U-50488), однако РУ-1205 вызывает менее выраженные изменения спектральной мощности и когерентности. Применение методов машинного обучения подтвердило, что исследуемое соединение не обладает MAPK p38-ингибирующей активностью, а уменьшение аверсивных реакций достигается за счет конкурентного взаимодействия с рецептором и ослабления аррестин-опосредованных эффектов. Исследование на клеточном уровне (patch clamp) показало, что соединение РУ-1205 конкурирует с U-50488 за общий сайт связывания и устраняет усиление спайковой активности пирамидных нейронов миндалины, характерное для аверсивного действия сбалансированных каппа-агонистов. В модели дискриминации стимула РУ-1205 проявляло сходство с каппа-агонистом U-50488 и не воспроизводило действие блокатора MAPK p38 SB203580.

При изучении локальных эффектов в различных структурах головного мозга (PAG, NRM, миндалина, гиппокамп, прилежащее ядро) установлено, что ключевыми звеньями реализации анальгезии являются околоводопроводное серое вещество и большое ядро шва. В модели острого и хронического зуда исследуемое соединение проявило противозудную активность, сравнимую с U-50488, не влияя при этом на аллокнезис. В ходе поведенческих исследований, выполненных с применением алгоритмов компьютерного зрения, было установлено, что вещество РУ-1205 в меньшей степени индуцирует седацию и стереотипную активность по сравнению с референсным каппа-агонистом буторфанолом. По результатам оценки когнитивных функций не было зафиксировано существенного негативного воздействия на рабочую память. Таким образом, соединение РУ-1205 характеризуется сочетанием анальгетической и противозудной активности с благоприятным профилем безопасности в отношении ЦНС, что открывает широкие перспективы для дальнейших исследований.

ГЛАВА 4. АТИПИЧНАЯ АНТИПСИХОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 5-HT_{2A}-АНТАГОНИСТОВ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

4.1. Исследование 5-HT_{2A}-антагонистической активности *in silico*

В разделе описаны результаты применяемого подхода к изучению антагонистической активности производных бензимидазола в отношении 5-HT_{2A} рецептора с использованием современных вычислительных методов *in silico*. Значимость исследований определяется ключевой ролью 5-HT_{2A} рецептора в регуляции различных нейрофизиологических процессов, что открывает перспективы для разработки новых фармакологических средств лечения широкого спектра нервных и психических расстройств. Цель этапа состоит в получении надежных прогностических моделей, выявлении ключевых структурных особенностей лигандов, определении механизмов связывания с мишенью и анализе энергетических параметров взаимодействия. Для достижения этой цели последовательно применяются методы QSAR-моделирования, фармакофорного анализа, гибкого молекулярного докинга и молекулярной динамики. Такой многоэтапный подход обеспечивает всестороннюю оценку возможной активности соединений еще до проведения *in vitro* и *in vivo* экспериментов, что существенно повышает эффективность исследований.

4.1.1. QSAR-моделирование 5-HT_{2A}-антагонистической активности с поиском перспективных соединений среди производных бензимидазола

Для QSAR-моделирования 5-HT_{2A}-антагонистической активности использовался обучающий набор данных из 2382 соединений, полученных из баз данных ChEMBL и RU2023624590, с известными значениями IC50. Модели строились с использованием алгоритмов машинного обучения, включая метод случайного леса, метод опорных векторов, множественную линейную регрессию и нейронные сети. Итоговая модель применялась для прогнозирования активности соединений тестового набора данных, состоящего из 391 молекулы, отфильтрованного из библиотеки конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола кафедры фармакологии и биоинформатики.

В таблице 4.1 представлены результаты оценки производительности различных моделей машинного обучения на тестовом и валидационном наборе данных в прогнозировании 5-HT_{2A}-блокирующей активности. Для каждой модели рассчитаны значения средней абсолютной ошибки (MAE), коэффициента детерминации (R^2) и p-значения, отражающего статистическую значимость показателей по сравнению с нулевой моделью. Все рассмотренные модели показали статистически значимые результаты ($p < 0,05$).

Среди всех моделей нейронная сеть (NN) продемонстрировала наилучшие показатели как на тестовом, так и на валидационном наборах данных. Она обеспечила наименьшую среднюю абсолютную ошибку (MAE) равную 1,405 и 1,920 соответственно, а также относительно высокий коэффициент детерминации (R^2), который составил 0,92 и 0,85. Это указывает на способность нейронной сети наиболее точно распознавать сложные нелинейные зависимости в данных.

Модели случайного леса (RF) и метод опорных векторов (SVM) показали сопоставимые результаты, незначительно уступая нейронной сети.

Методы частичных наименьших квадратов (PLSR) и множественной линейной регрессии (MLR) продемонстрировали наименее точные результаты среди рассмотренных моделей.

Стоит отметить, что все модели показали незначительное снижение производительности на валидационном наборе по сравнению с тестовым, что указывает на отсутствие выраженного переобучения.

В целом, результаты свидетельствуют о преимуществе более сложных нелинейных моделей, таких как нейронные сети и ансамблевые методы, для решения данной задачи прогнозирования.

Таблица 4.1 – Оценка производительности предиктивных моделей на тестовом и валидационном наборе данных (2382 соединений с установленной 5-HT_{2A}-серотонинергической активностью, полученных из баз данных ChEMBL и RU2023624590)

Модель		**MAE**	**R^2**	**p-значение**
MLR	Тестовая	1,645	0,87	<0,05
	Валидационная	2,323	0,76	<0,05
PLSR	Тестовая	1,593	0,89	<0,05
	Валидационная	2,188	0,80	<0,05
SVM	Тестовая	1,471	0,91	<0,05
	Валидационная	1,974	0,83	<0,05
RF	Тестовая	1,453	0,91	<0,05
	Валидационная	1,961	0,84	<0,05
NN	Тестовая	1,405	0,92	<0,05
	Валидационная	1,920	0,85	<0,05

Примечание: p-значение отражает статистическую значимость показателей модели по сравнению с нулевой моделью.

По результатам анализа внешней выборки в таблице 4.2 отражены прогнозные значения активности (IC50) для трех наиболее перспективных соединений (РУ-31, РУ-30 и РУ-204; таблица 4.3), полученные с использованием построенных моделей машинного обучения (MLR, PLSR, SVM, RF и NN), а также приведены экспериментальные значения IC50 с целью валидации расчетных данных.

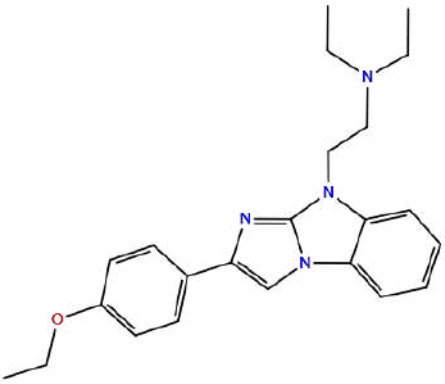
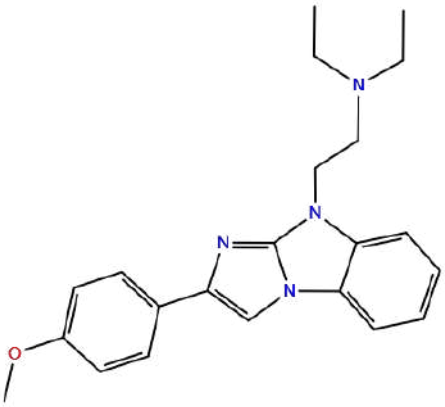
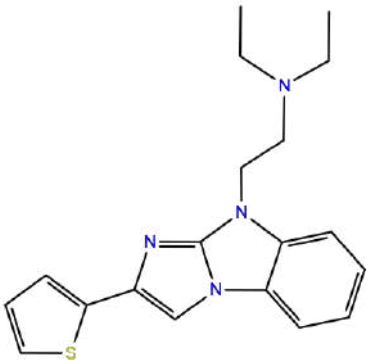
Анализ прогнозных значений IC50 показал, что оценки, полученные с помощью различных моделей, характеризуются высокой степенью согласованности. Для соединения РУ-31 прогнозные значения варьируются в диапазоне 0,062–0,067 мкМ, для РУ-30 в диапазоне 0,074–0,081 мкМ, а для РУ-204 в диапазоне 0,164–0,167 мкМ. Вместе с тем, следует отметить, что наблюдается незначительное завышение прогнозных показателей IC50 для всех трех соединений. Наибольшее отклонение фиксируется для соединения РУ-31, где прогнозные значения превышают экспериментальное на величину 0,018–0,023 мкМ, в то время как для соединений РУ-30 и РУ-204 разница между прогнозными и экспериментальными значениями является менее выраженной и составляет 0,005–0,012 мкМ и 0,014–0,017 мкМ соответственно.

Ключевым результатом является способность разработанных моделей корректно ранжировать соединения по уровню их биологической активности. Данный факт свидетельствует о высокой предсказательной силе моделей в отношении относительной, а не только абсолютной активности, что является ключевым требованием для их эффективного использования в задачах виртуального скрининга и приоритизации наиболее перспективных кандидатов для последующих этапов исследования.

Таблица 4.2 – Прогноз активности для трех соединений из тестового набора данных, включающего 391 вещество из библиотеки конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ

Модель	**IC50 РУ-31 (мкМ)**	**IC50 РУ-30 (мкМ)**	**IC50 РУ-204 (мкМ)**
MLR	0,066	0,074	0,167
PLSR	0,067	0,081	0,165
SVM	0,064	0,079	0,164
RF	0,062	0,076	0,167
NN	0,063	0,074	0,164
Эксперимент (Яковлев Д.С., 2016)	0,044	0,069	0,15

Таблица 4.3 – Шифры наиболее перспективных производных бензимидазола с 5-HT_{2A}-ергической активностью и их химические структуры

Шифр	Структурная формула	ИЮПАК
РУ-30		N,N-diethyl-2-(2-(4-ethoxyphenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-9-yl)ethan-1-amine
РУ-31		N,N-diethyl-2-(2-(4-methoxyphenyl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-9-yl)ethan-1-amine
РУ-204		N,N-diethyl-2-(2-(thiophen-2-yl)-9H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-9-yl)ethan-1-amine

4.1.2. Построение фармакофора на основе белок-лигандного комплекса с поиском перспективных соединений среди производных бензимидазола

Пятифункциональная (DHHRR) фармакофорная модель, полученная с использованием белок-лигандного комплекса рецептора серотонина 2A и зотепина (PDB ID: 6A94) представлена на рисунке 4.1. В таблице 4.4 отражены результаты скрининга производных бензимидазола на основании фармакофорного анализа. Лиганды были отобраны по совпадающим участкам и

расчетным показателям соответствия. Соединение РУ-31 продемонстрировало наилучшую оценку "Fitness Score" со значением 1,013 и тремя совпадающими участками лиганда. Аналогично, соединение РУ-30 имело три совпадающих участка лиганда и показатель "Fitness Score" 0,989. Из трех представленных веществ соединение РУ-204 показало наименьшую степень соответствия, характеризующуюся двумя совпадающими участками лиганда и значительно меньшим значением "Fitness Score" 0,208. Полученные результаты подтверждают, что соединение РУ-31 обладает наиболее высоким фармакологическим потенциалом по сравнению с веществами РУ-204 и РУ-30. На рисунке 4.2 представлено наложение фармакофорной модели на исследуемые соединения.

А **Б**

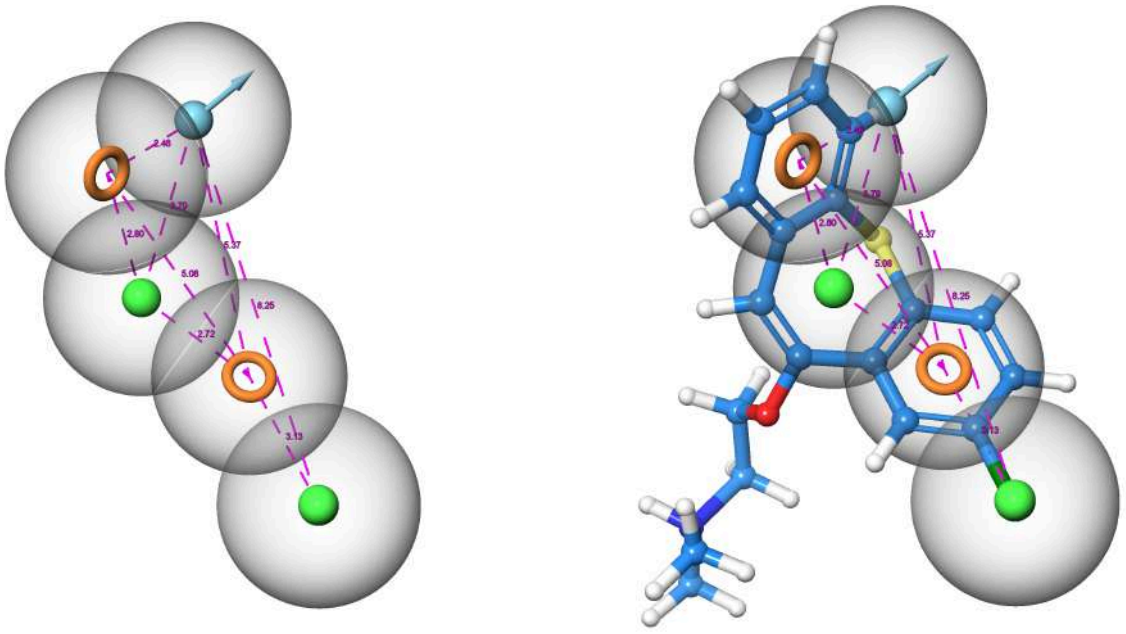


Рисунок 4.1 – А. Фармакофорная модель антагонистического взаимодействия с 5-HT_{2A} рецептором, основанная на структуре комплекса рецептор-лиганд, с пятью признаками: один донор водородной связи (синяя сфера), два гидрофобных участка (зеленые сферы) и два ароматических кольца (оранжевые кольца). Расстояние между фармакофорными признаками зотепина в ангстремах. Б. Фармакофорная модель с наложенным зотепином

Таблица 4.4 – Результаты скрининга производных бензимидазола на соответствие фармакофорной гипотезе

Шифр	**Matched ligand sites**	**Align Score**	**Vector Score**	**Volume Score**	**Fitness Score**
РУ-31	3	0,795	0,828	0,231	1,013
РУ-30	3	0,879	0,838	0,225	0,989
РУ-204	2	0,313	0	0	0,208

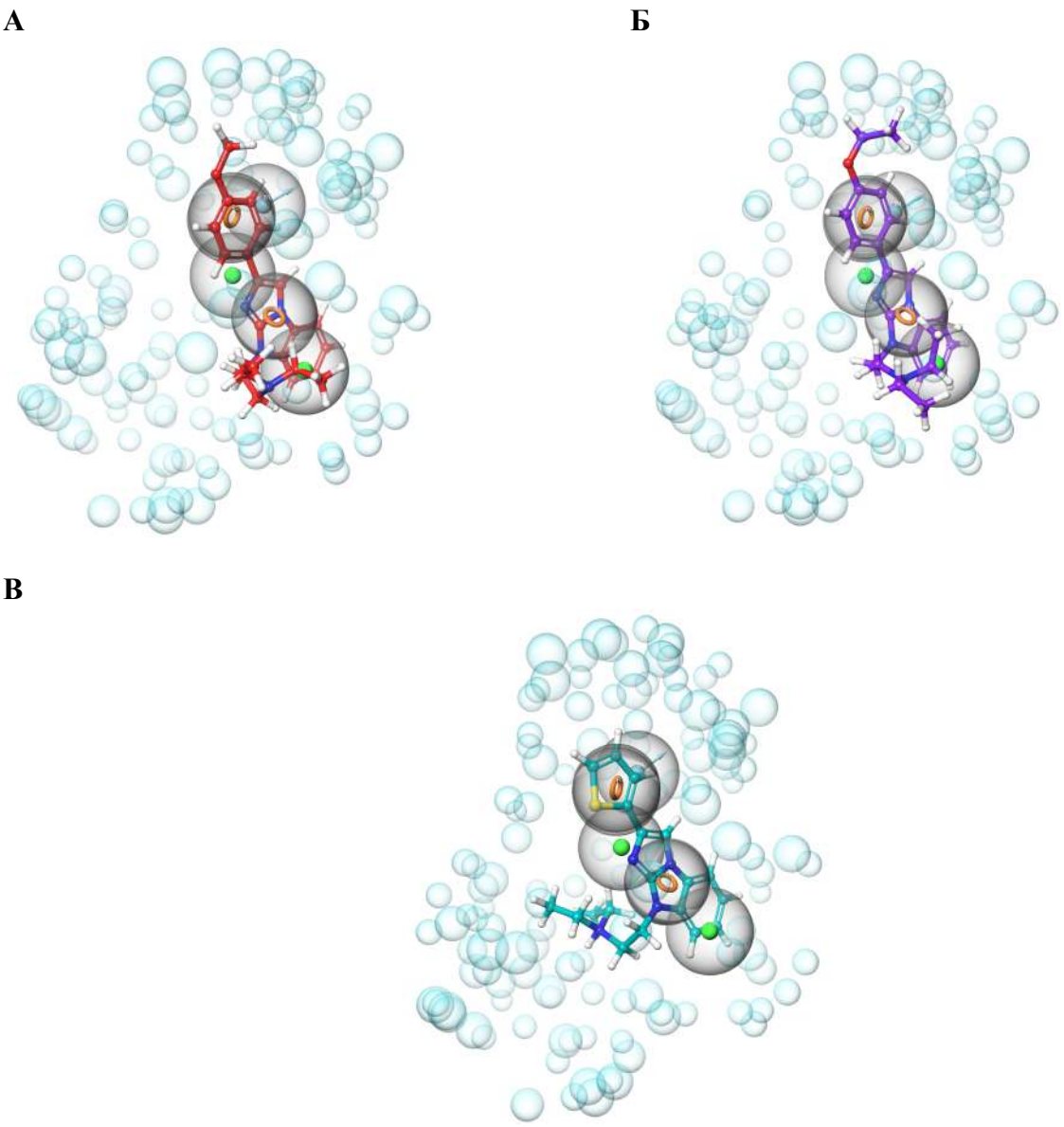


Рисунок 4.2 – Суперимпозиция фармакофорной гипотезы DHHRR на производные бензимидазола РУ-31 (А), РУ-30 (Б) и РУ-204 (В)

4.1.3. Гибкий молекулярный докинг

С целью прогнозирования характера взаимодействия с 5-HT_{2A} рецептором и оценки аффинности производных бензимидазола (РУ-30, РУ-31 и РУ-204) был применен метод молекулярного докинга.

Соединения занимают нижнюю часть лиганд-связывающего кармана (рисунок 4.3А). Радикалы 4-этоксифенил, 4-метоксифенил, тиофен-2-ил соединений РУ-30, РУ-31 и РУ-204 соответственно располагаются между трансмембранными спиралями TM4 и TM5 рецептора (рисунок 4.3Б). Третичный азот диэтиламиноэтильного радикала каждого вещества образует солевой мостик с остатком ASP155 рецептора (рисунок 4.4). Солевой мостик является строго консервативным в структурах аминергических рецепторов, таких как 5-HT_{2A} (Kimura K.T. et al., 2019). Кроме того, соединение РУ-30 также формирует водородную связь с ASP155 (рисунок

4.4А). Бензимидазольное кольцо лигандов располагается в нижней гидрофобной щели. Бензольный фрагмент лигандов формирует π-π-стэкинг взаимодействия с TRP336 и PHE340. У соединений РУ-31 и РУ-204 имидазольное кольцо также формирует π-π-стэкинг взаимодействие с PHE340 (рисунок 4.4Б, В). Ключевые аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействиях между исследуемыми лигандами и серотониновым рецептором 2А типа, представлены в таблице 4.5. Наибольшая энергия связывания наблюдается у соединения РУ-30 (−11,203 ккал/моль). Для соединения РУ-31 энергия связывания составила −11,087 ккал/моль, а для РУ-204 −10,569 ккал/моль. Эти данные указывают на потенциально высокую аффинность данных соединений к рецептору 5-HT_{2A}. Энергетические параметры связывания представлены в таблице 4.6.

А **Б**

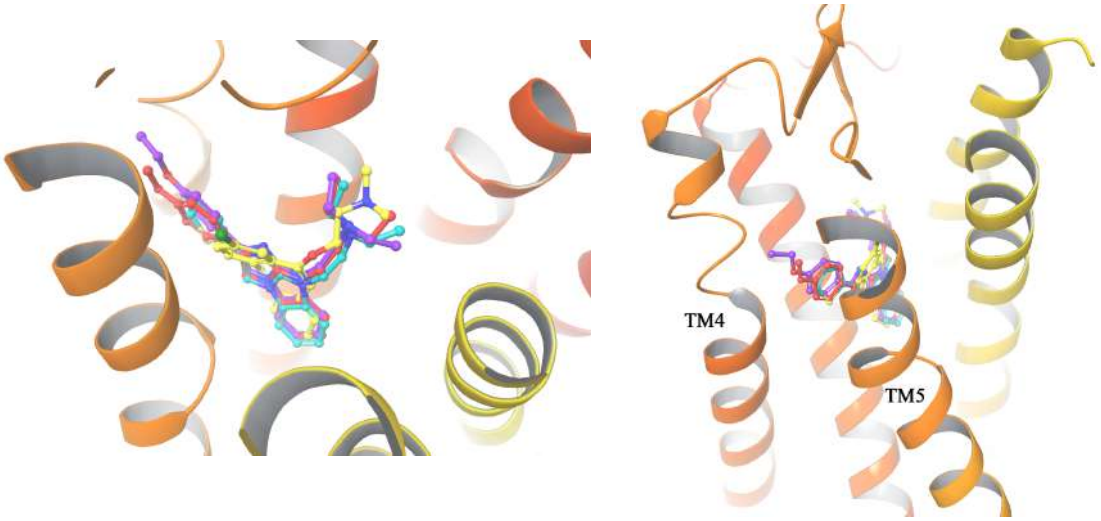
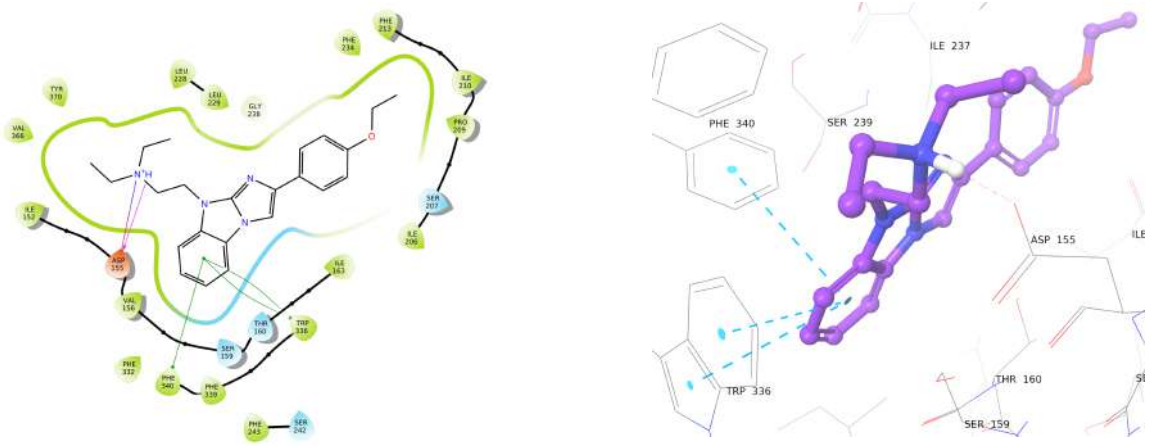
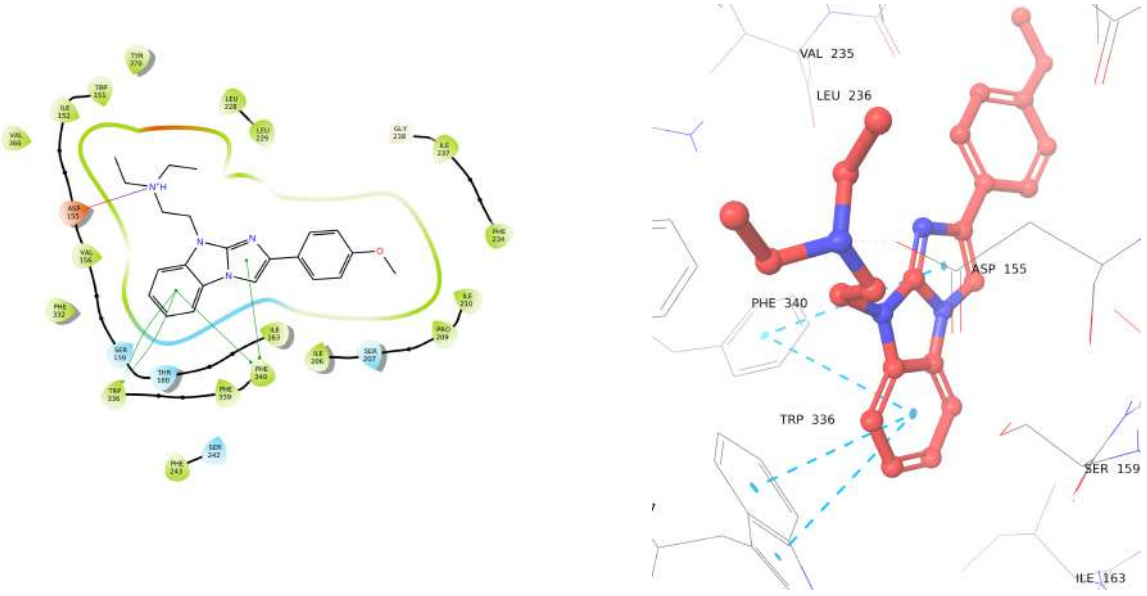


Рисунок 4.3 – Наложение антагониста 5-HT_{2A} рецептора зотепина (желтый) с исследуемыми веществами РУ-30 (фиолетовый), РУ-31 (красный) и РУ-204 (бирюзовый) в лиганд-связывающем кармане рецептора (А). Пространственное расположение радикалов лигандов между трансмембранными спиралями TM4 и TM5 рецептора 5-HT_{2A} (Б)

А



Б



В

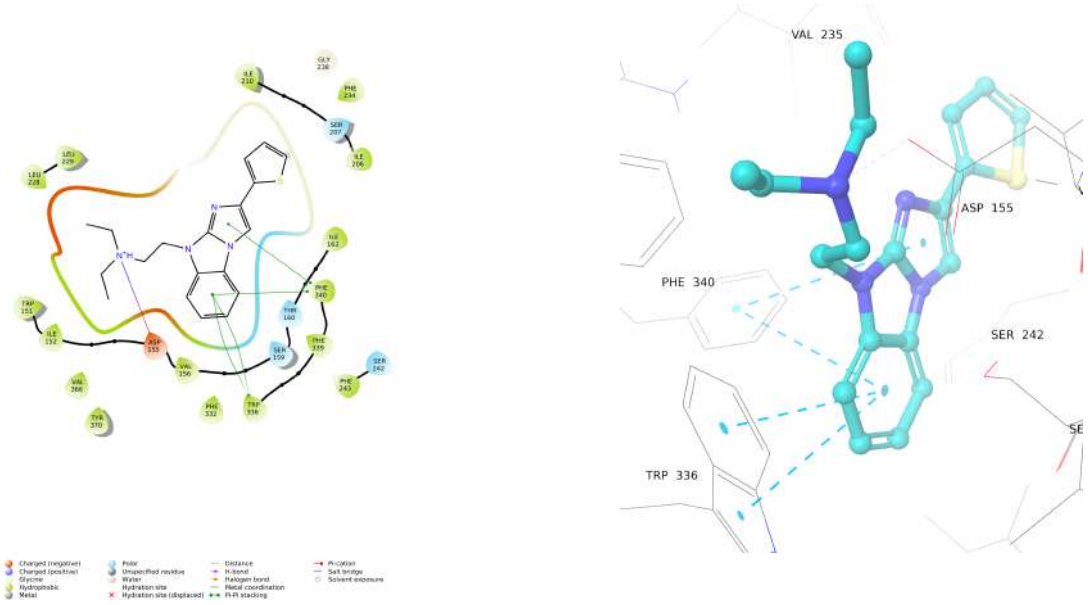


Рисунок 4.4 – 2D и 3D диаграммы взаимодействия между исследуемыми соединениями и 5-HT_{2A} рецептором. (А) 5-HT_{2A}R/РУ-30; (Б) 5-HT_{2A}R/РУ-31; (В) 5-HT_{2A}R/РУ-204

Таблица 4.5 – Молекулярные взаимодействия тестируемых соединений с 5-HT_{2A} рецептором по результатам гибкого докинга (конформация колец с окном 2,5 ккал/моль, VdW 0,5 / 0 7, положения остатков в радиусе 5 Å, редокинг < 30 ккал/моль)

Шифр	**H-bond**	**Salt bridge**	**π-π stacking**
РУ-30	ASP155	ASP155	TRP336, PHE340
РУ-31	–	ASP155	TRP336, PHE340
РУ-204	–	ASP155	TRP336, PHE340

Таблица 4.6 – Энергетические параметры связывания тестируемых соединений с 5-HT_{2A} рецептором по результатам гибкого докинга (конформация колец с окном 2,5 ккал/моль, VdW 0,5 / 0,7, положения остатков в радиусе 5 Å, редокинг < 30 ккал/моль)

Шифр	**Docking score**	**Glide score**	**Glide emodel**
РУ-30	−11,203	−11,203	−105,961
РУ-31	−11,087	−11,087	−93,524
РУ-204	−10,569	−10,580	−89,154

4.1.4. Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое моделирование для комплексов 5-HT_{2A} рецептора с лигандами РУ-30, РУ-31 и РУ-204 было проведено в течение 100 нс для оценки стабильности связывания и конформационной динамики. Для характеристики структурных изменений и стабильности комплексов проводился анализ среднеквадратичного отклонения (RMSD) атомов основной цепи белка и RMSD лигандов относительно белка.

Комплекс 5-HT_{2A} рецептора с соединением РУ-30 продемонстрировал высокую стабильность на протяжении всей симуляции. RMSD белка колебался в пределах 2,4–3,0 Å, что указывает на минимальные конформационные изменения рецептора. RMSD лиганда РУ-30 относительно белка оставалось стабильным на уровне 1,25 Å с 10 нс симуляции (рисунок 4.5А).

Комплексу с соединением РУ-31 потребовалось 20 нс до достижения равновесия на уровне 2,5 Å. Однако после начальной стабилизации RMSD белка отмечается подъем в интервале 40–52 нс с максимальным значением 4,16. Это может указывать на временные конформационные перестройки рецептора. После белок снова стабилизируется на уровне около 2,5 Å, что предполагает возвращение к равновесной конформации. RMSD лиганда РУ-31 относительно белка сохранялось в интервале 0,9–1,5 Å с максимальным показателем RMSD 1,6 Å (рисунок 4.5Б).

RMSD основной цепи белка комплекса 5-HT_{2A}R/РУ-204 демонстрировал наибольшую изменчивость с выраженными пиками на 40, 45 и 63 нс, достигающими 4,5 Å. Эти флуктуации

свидетельствуют о значительных конформационных изменениях рецептора. Однако RMSD лиганда РУ-204 оставалось относительно низким (в среднем 1,1–1,3 Å) и не превышало ~1,5 Å в периоды максимальных колебаний белка, что свидетельствует о стабильном связывании данного соединения с 5-HT2AR (рисунок 4.5В).

Анализ RMSD показывает, что все три комплекса 5-HT_{2A}R с лигандами РУ-30, РУ-31 и РУ-204 можно охарактеризовать как стабильные на протяжении 100 нс молекулярно-динамической симуляции. Несмотря на некоторые флуктуации в RMSD белка, особенно заметные для комплексов с РУ-31 и РУ-204, RMSD лигандов относительно белка оставалось низким и стабильным для всех трех комплексов. Это указывает на устойчивое связывание лигандов в активном центре рецептора 5-HT_{2A}R на протяжении всего периода симуляции.

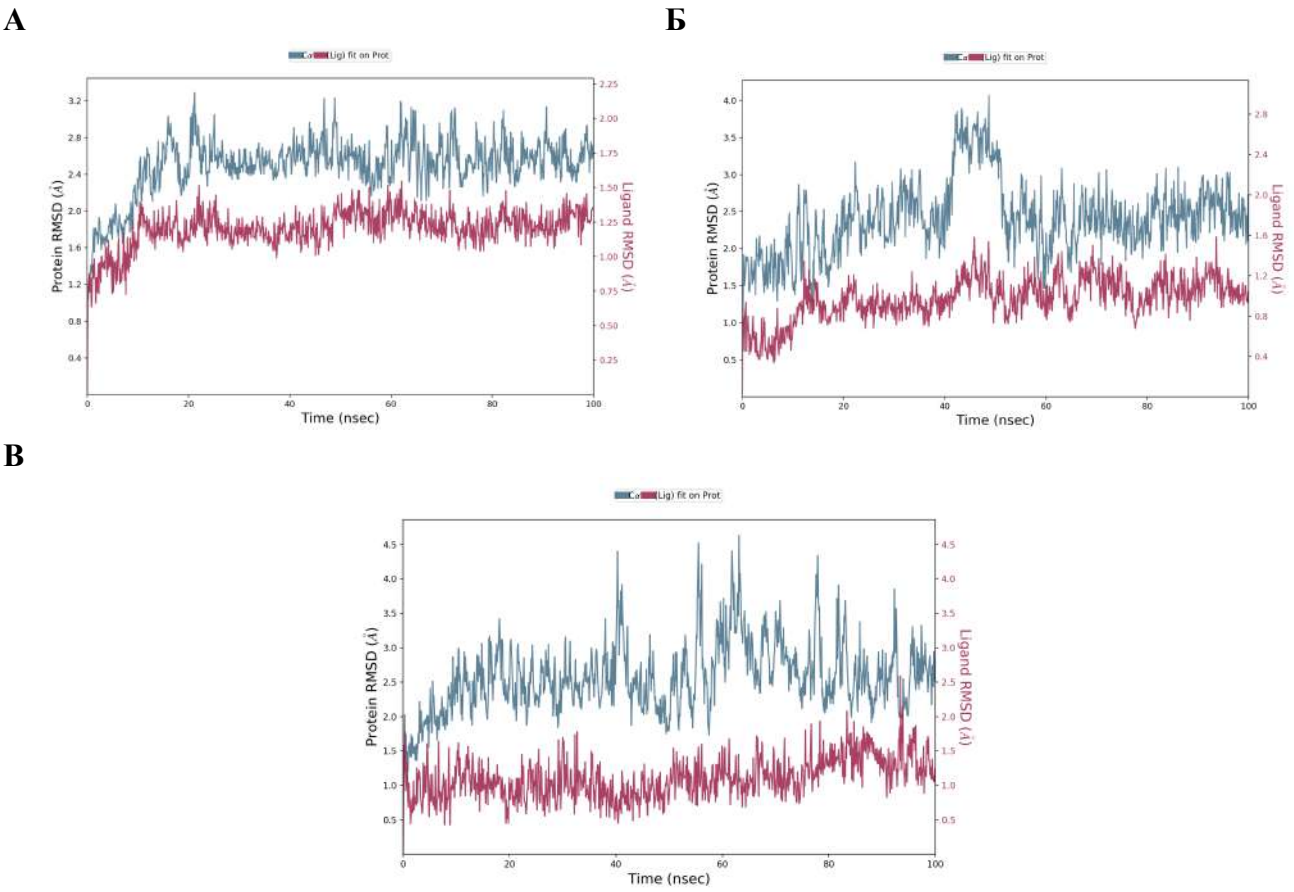
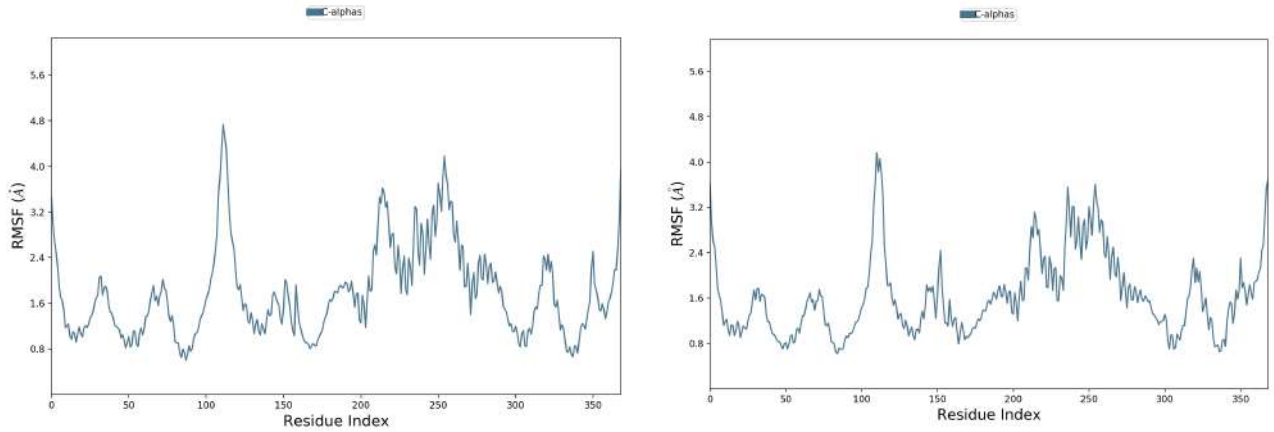


Рисунок 4.5 – Значения RMSD для комплексов (А) 5-HT_{2A}R / РУ-30; (Б) 5-HT_{2A}R / РУ-31; (В) 5-HT_{2A}R / РУ-204 после 100 нс молекулярной динамики. Колебания основной цепи (Cα) белка показаны синим цветом, колебания лиганда относительно белка – розовым

Анализ среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) остатков рецептора 5-HT_{2A}R в комплексах с лигандами РУ-30, РУ-31 и РУ-204 позволяет оценить конформационную динамику и стабильность взаимодействия лигандов с рецептором (рисунок 4.6). В частности, комплекс 5-HT_{2A}R/РУ-30 характеризуется умеренными флуктуациями в большинстве доменов, с

наибольшей подвижностью в областях 100–123 и 200–250. Комплекс 5-HT_{2A}R/РУ-31 показывает сопоставимые значения RMSF, подтверждая аналогичный характер связывания. Петлевые области рецептора, особенно в районе остатков 102–122 и 200–250, проявляют высокие пики флуктуаций, что характерно для более подвижных участков белковой молекулы. Профили RMSF для комплексов с РУ-30 и РУ-31 демонстрируют высокую степень сходства связывания в активном кармане (индексы остатков 75–175 и 200–250), что указывает на аналогичные механизмы связывания этих лигандов и схожие области взаимодействия в рецепторе.

А **Б**



В

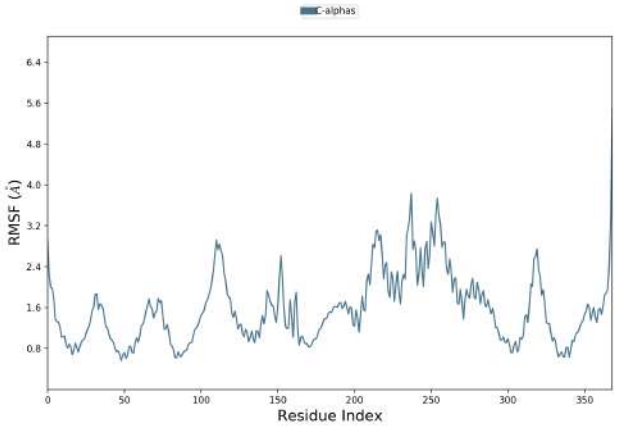


Рисунок 4.6 – Значения RMSF для комплексов (А) 5-HT_{2A}R/РУ-30; (Б) 5-HT_{2A}R/РУ-31; (В) 5-HT_{2A}R/РУ-204 по результатам 100 нс молекулярной динамики

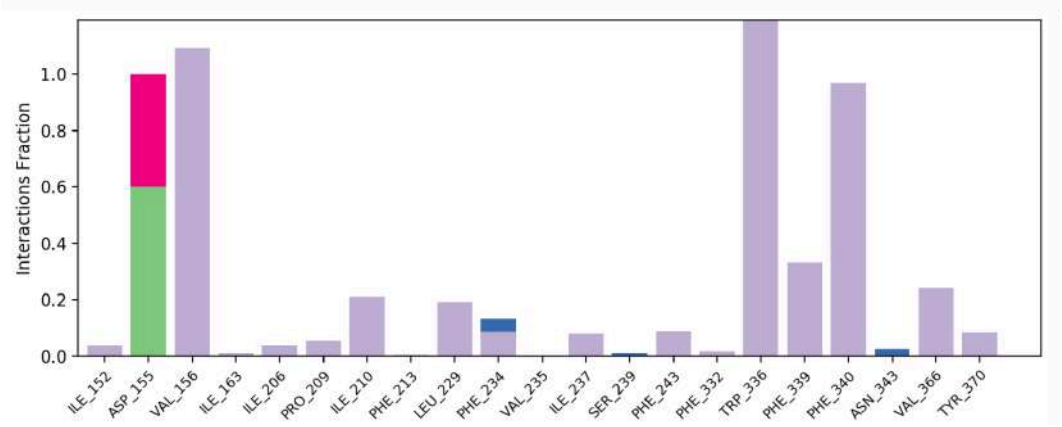
В отличие от двух других комплексов, 5-HT_{2A}R/РУ-204 демонстрирует меньшие значения RMSF и сравнительно более низкую подвижность основной цепи рецептора. Это может указывать на более стабильную конформацию белка.

Анализ RMSF показал, что все три комплекса (5-HT_{2A}R с лигандами РУ-30, РУ-31 и РУ-204) являются стабильными на протяжении молекулярно-динамических симуляций. Комплексы с РУ-30 и РУ-31 имеют схожие профили флуктуаций, в то время как комплекс с РУ-204 характеризуется незначительно меньшей подвижностью. Несмотря на эти различия, все

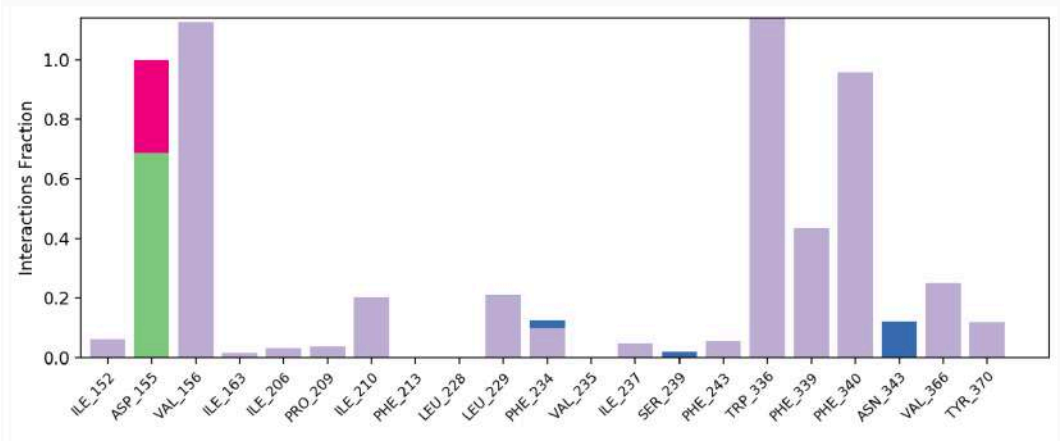
три лиганда эффективно стабилизируют структуру рецептора 5-HT_{2A}, что может быть ключевым фактором их потенциального антагонистического действия.

В ходе анализа белок-лигандных взаимодействий в комплексах 5-HT_{2A}R с лигандами РУ-30, РУ-31 и РУ-204 оценивались четыре типа взаимодействий: водородные связи, гидрофобные контакты, ионные взаимодействия и водные мостики. Наиболее стабильные взаимодействия и связи для каждого комплекса представлены на рисунках 4.7 и 4.8.

А



Б



В

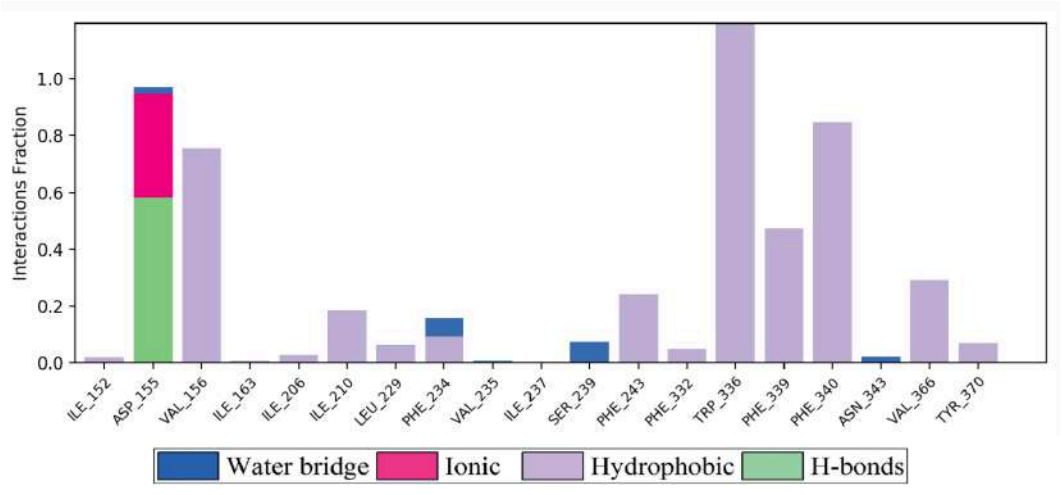
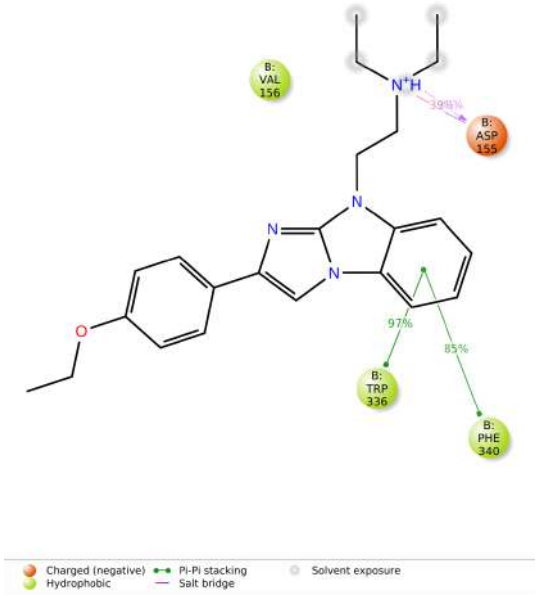


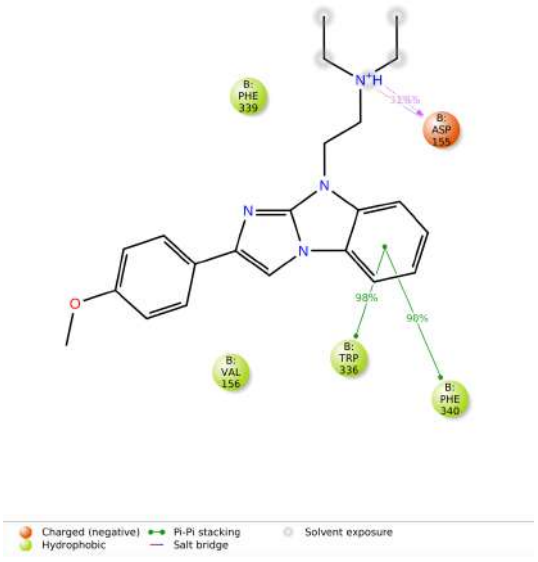
Рисунок 4.7 – Нормализованные составные гистограммы взаимодействий и контактов на протяжении траектории моделирования молекулярной динамики для комплексов (А) 5-HT_{2A}R/РУ-30; (Б) 5-HT_{2A}R/РУ-31; (В) 5-HT_{2A}R/РУ-204

Во всех трех комплексах остаток ASP155 играет ключевую роль, с которым формируются как водородные связи, так и солевые мостики с лигандами. Это согласуется с ранее опубликованными данными анализа сокристаллических структур 5-HT_{2A}R с различными лигандами (Kimura K.T. et al., 2019; Geng X. et al., 2021; Wang Y. et al., 2021).

А



Б



В

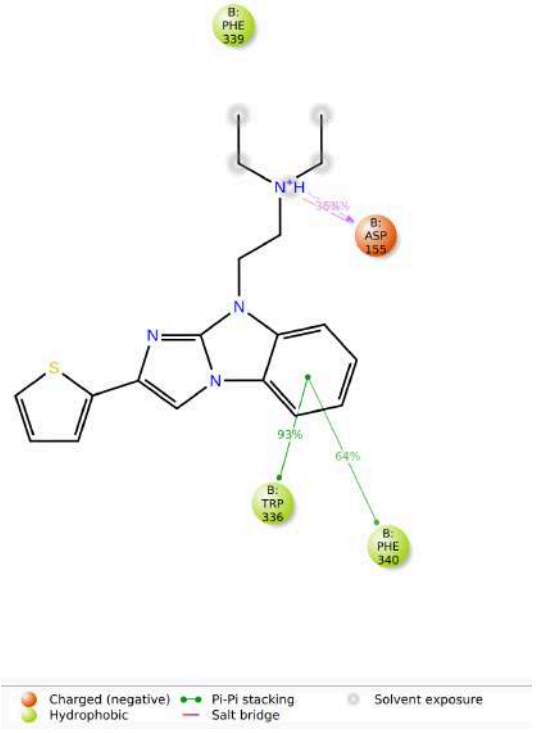


Рисунок 4.8 – Белок-лигандные взаимодействия, которые наблюдаются более 30% времени молекулярной динамики (100 нс) для комплексов (А) 5-HT_{2A}R/РУ-30; (Б) 5-HT_{2A}R/РУ-31; (В) 5-HT_{2A}R/РУ-204

В комплексе 5-HT_{2A}R/РУ-30 ASP155 формирует водородную связь 60% времени симуляции, а солевой мостик 39% времени симуляции. Кроме того, π-π-стэкинг взаимодействия с TRP336 и PHE340 наблюдались в течение 97% и 85% времени симуляции соответственно. В комплексе с соединением РУ-31 водородная связь и солевой мостик с ASP155 наблюдались 68% и 31% времени, в то время как TRP336 и PHE340 также участвовали в π-π-стэкинг взаимодействиях на протяжении 98% и 90% молекулярно-динамической траектории. Лиганд последнего комплекса (5-HT_{2A}R/РУ-204) формирует водородные связи с ASP155 в течение 58% времени симуляции и солевой мостик в течение 36%, в то время 93% и 64% времени наблюдались π-π-стэкинг взаимодействия с TRP336 и PHE340. Дополнительную стабилизацию всех трех комплексов обеспечивают гидрофобные взаимодействия с VAL156, TRP336 и PHE340.

Таким образом, в ходе анализа было показано, что во всех трех комплексах ключевую роль играет остаток ASP155, участвующий в водородных и ионных взаимодействиях. Гидрофобные взаимодействия с остатками VAL156, TRP336 и PHE340, а также π-π-стэкинг с TRP336 и PHE340 также вносят существенный вклад в стабильность комплексов.

4.2. Биопотенциал-опосредованная оценка нейропсихотропных эффектов

Исследования, базирующиеся на анализе биопотенциалов – электрокортикографических (ЭКоГ), локальных полевых потенциалов (LFP), а также мембранных токов отдельных нейронов, представляют собой одну из важнейших экспериментальных стратегий в настоящей работе. Такие методы позволяют выявлять характерные функциональные изменения в деятельности головного мозга при введении различных препаратов, определять общие и уникальные паттерны активности мозга, лежащие в основе их фармакологического действия. Применение методов многомерной статистики и машинного обучения открывает дополнительные возможности для системного анализа больших объемов данных и углубленного изучения нейрональных взаимодействий в биологических системах.

4.2.1. Кластеризация и классификация сигналов, полученных на здоровых крысах

Кластеризация и классификация ЭКоГ-сигналов на фоне действия различных психотропных веществ позволяют выявить закономерности в их влиянии на центральную нервную систему и оценить сходство фармакологических эффектов тестируемых веществ. После регистрации ЭКоГ в течение 10 минут каждый сигнал разбивался на 2-с эпохи (размер датасета составил 16 500 семплов). Далее проводилось обучение автоэнкодера с фиксацией 80-мерных параметров бутылочного горлышка для каждого препарата.

В ходе проведенного анализа с использованием алгоритма UMAP достигнуто разделение параметров ЭКоГ-сигналов на отдельные кластеры, что свидетельствует о наличии

специфического влияния каждого из тестируемых психотропных веществ на электроэнцефалографические показатели (рисунок 4.9).

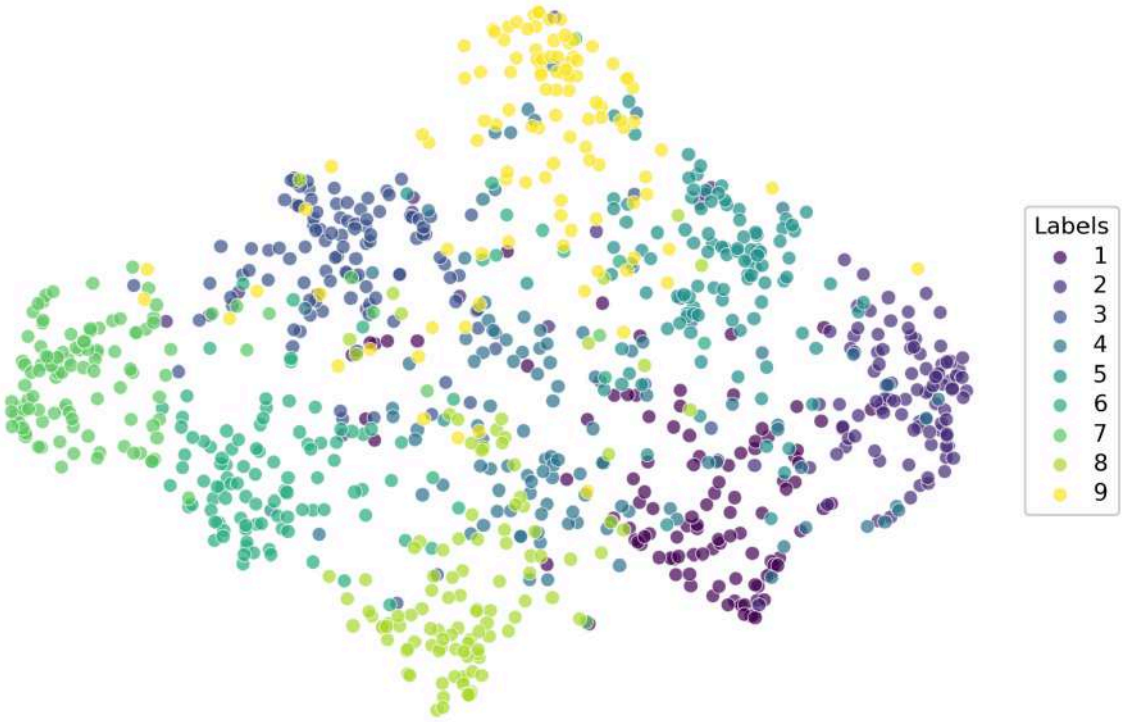


Рисунок 4.9 – UMAP-карта распределения параметров ЭКоГ-сигналов (репрезентативная выборка точек, n = 983), полученных на фоне действия 9 различных психотропных веществ и спроецированных в двумерное пространство. Параметры модели: n_neighbors = 15; min_dist = 0,1; n_components = 2; metric = euclidean. Обозначения: 1 - Клозапин; 2 - Галоперидол; 3 - Суматриптан; 4 - Ципрогептадин; 5 - Кетансерин; 6 - Амитриптилин; 7 - Флуоксетин; 8 - Гидроксизин; 9 - Ондансетрон

Следует учитывать, что UMAP-карта представлена в 2 размерностях, то есть со значительными потерями информации. Оси графика не имеют явной интерпретируемой размерности, поскольку они представляют абстрактные измерения, используемые для визуализации структуры данных.

При этом расчетные показатели сходства эффектов (рисунок 4.10) более точны, поскольку получены на основе 80 параметров ЭКоГ-сигналов, извлеченных из бутылочного горлышка автоэнкодера, реализованного с использованием сверточных нейронных сетей. Высокие коэффициенты, выделенные синим цветом, указывают на пары препаратов с наиболее близкими эффектами на центральную нервную систему. Например, хлорпромазин и галоперидол имеют коэффициент 0,837, что указывает на значительное сходство в их антипсихотическом действии. Оба препарата являются типичными нейролептиками, механизм действия которых преимущественно связан с антагонизмом к D_2-дофаминовым рецепторам (Seeman P., 2001; Dold M. et al., 2015).

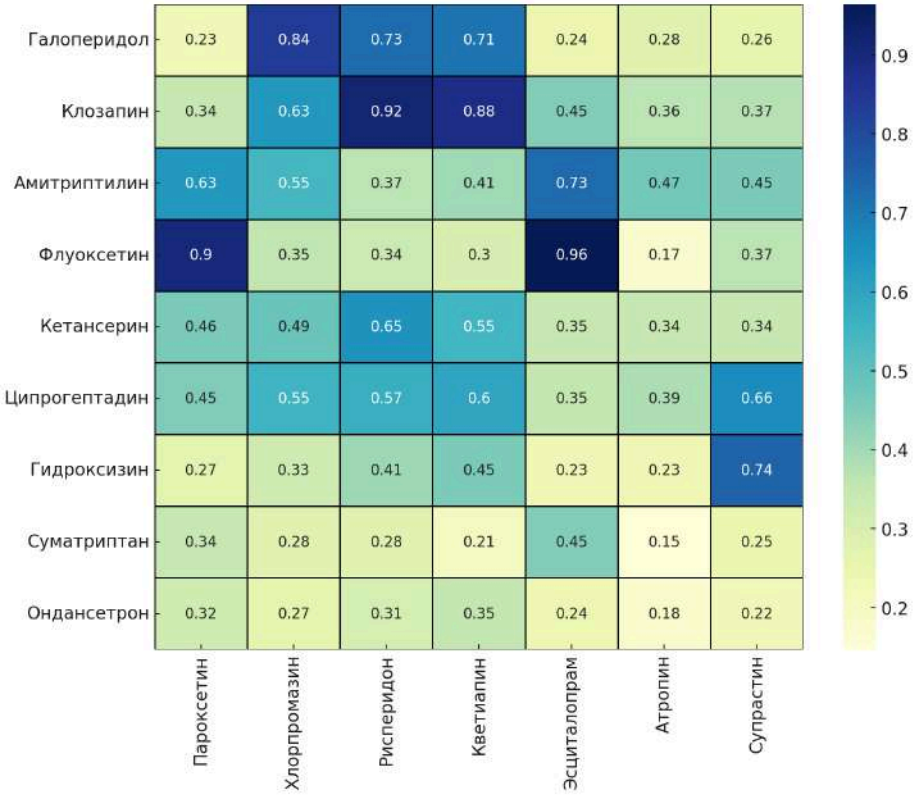


Рисунок 4.10 – Относительная близость кластеров ЭКоГ-сигналов в параметрическом пространстве. Коэффициенты сходства безразмерны, относительны и вычисляются как расстояния (*1 – нормированная дистанция*) между кластерами в 80-мерном пространстве бутылочного горлышка автоэнкодера. По вертикали отмечены препараты обучающей выборки, по горизонтали – валидационные препараты

Клозапин, характеризующийся широким рецепторным профилем с выраженным антагонизмом к дофаминовым и серотониновым рецепторам, имеет близкие эффекты с рисперидоном (0,915) и кветиапином (0,884), которые также воздействуют на дофаминовую и серотониновую системы (Trifu S., 2020). Это согласуется с их схожим терапевтическим действием при лечении шизофрении и биполярного расстройства (Wagner E. et al., 2021).

Амитриптилин и эсциталопрам имеют коэффициент сходства 0,731, что особенно примечательно, учитывая их принадлежность к разным классам антидепрессантов. Препараты сходны по своему влиянию на серотонинергическую систему, так как оба повышают уровень серотонина в синаптической щели, что приводит к улучшению настроения и снижению тревоги. Однако амитриптилин дополнительно угнетает обратный захват норадреналина и взаимодействует с другими рецепторами, что приводит к более широкому спектру эффектов, включая седативное действие, тогда как эсциталопрам действует более избирательно (Edinoff A.N. et al., 2021).

Флуоксетин и эсциталопрам проявили почти полное совпадение эффектов с коэффициентом 0,964, что также ожидаемо, учитывая, что оба препарата являются СИОЗС и оказывают действие путем ингибирования обратного захвата серотонина, увеличивая его

концентрацию в синаптической щели. Препараты проявляют высокую эффективность в лечении депрессии и тревожных расстройств (Bandelow B. et al., 2017).

Ципрогептадин и гидроксизин имеют коэффициент сходства 0,663 и 0,745 соответственно при сравнении с супрастином, что, вероятно, связано с преобладанием у них антигистаминных свойств. Оба препарата являются антагонистами H_1-гистаминовых рецепторов, что обусловливает применение ципрогептадина в лечении аллергических реакций (Dougherty T.S., 2013), а гидроксизин обладает выраженными седативными эффектами и используется в качестве транквилизатора (Guaiana G. et al., 2010).

При анализе данных, полученных после введения производных бензимидазола под лабораторными шифрами РУ-31, РУ-30, РУ-204, выявлены значения сходства, отраженные на рисунке 4.11. По результатам проведенного анализа отмечается наиболее высокое сходство с атипичным нейролептиком клозапином, а также блокаторами 5-HT_{2A} рецепторов кетансерином и ципрогептадином.

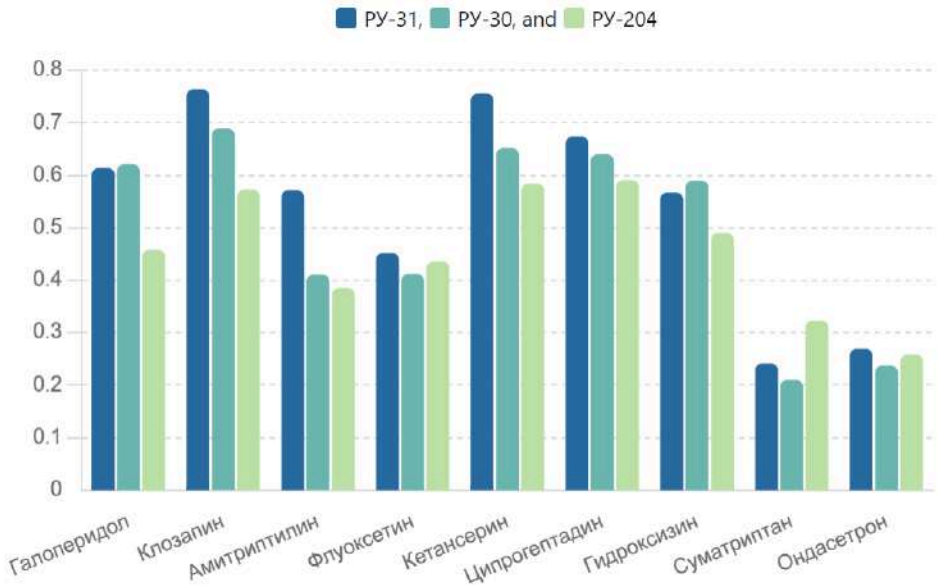


Рисунок 4.11 ─ Оценка сходства изменений биоэлектрической активности мозга на фоне действия соединения РУ-31, РУ-30, РУ-204 и различных психотропных средств. Коэффициенты сходства безразмерны, относительны и вычисляются как расстояния (*1 – нормированная дистанция*) между кластерами в 80-мерном пространстве бутылочного горлышка автоэнкодера

4.2.2. Анализ LFP-сигналов, зарегистрированных у животных с индуцированным психотическим расстройством

Эффекты атипичного антипсихотического препарата клозапина и антагониста 5-HT_{2A} рецепторов РУ-31 были исследованы для понимания их роли в модуляции биоэлектрических изменений, вызванных кетамином – препаратом, моделирующим психотическое расстройство.

Введение кетамина (рисунок 4.12) значительно изменяет нейрональную активность в медиальной префронтальной коре (mPFC) и гиппокампе (Hipp). Кетамин приводил к росту

мощности в различных частотных диапазонах, включая дельта-, тета-, альфа- и гамма- в mPFC, а также к снижению мощности альфа- и бета-диапазонов в Hipp ($p < 0,05$).

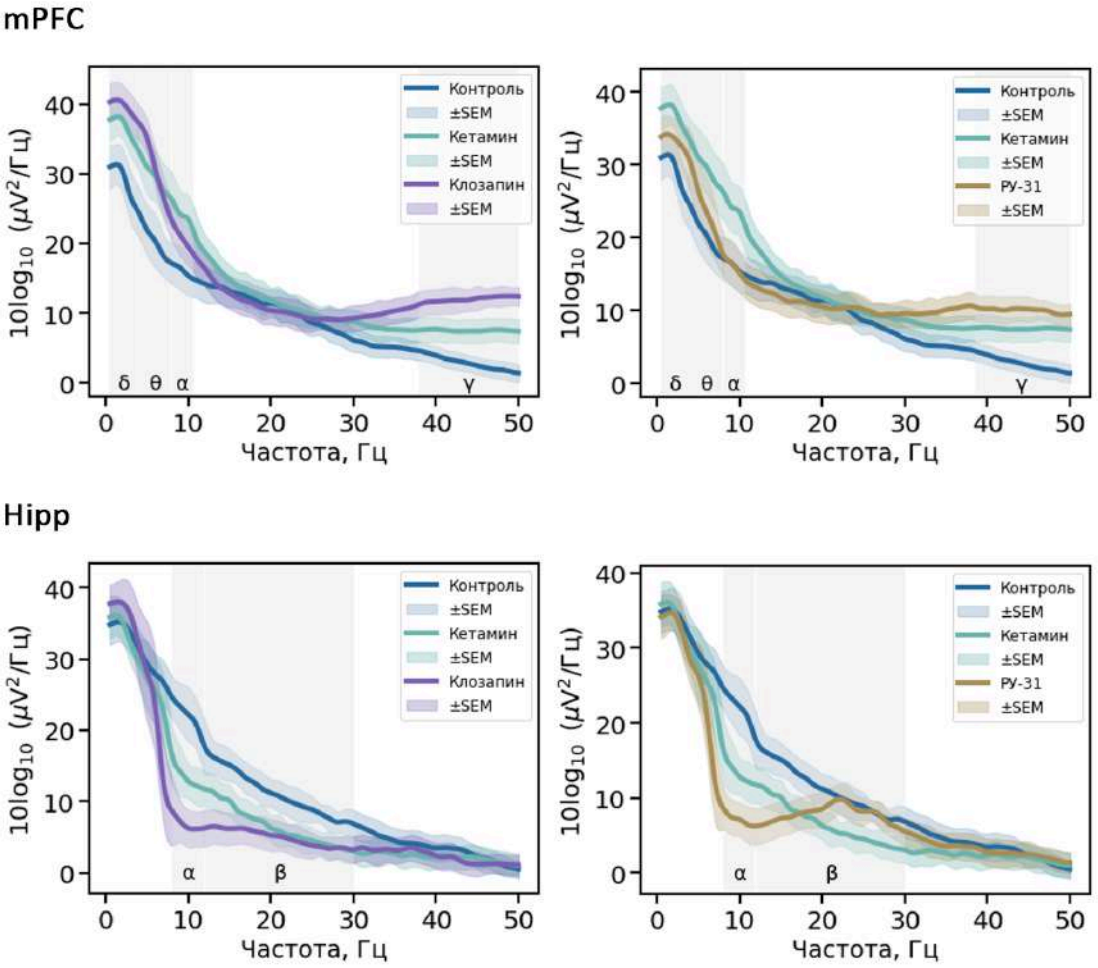


Рисунок 4.12 – Спектральная плотность мощности сигнала в медиальной префронтальной коре (mPFC) и гиппокампе (Hipp). Фоновая активность (первые 10 минут записи) показана линией синего цвета. Спектральная плотность мощности сигналов под действием кетамина (20 мг/кг) отражена зеленой линией. Фиолетовым и желто-коричневым цветами показана спектральная плотность мощности сигнала после введения атипичного нейролептика клозапина (7,5 мг/кг, в/б) и соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б). Серым фоном обозначены частотные диапазоны с максимальными различиями по сравнению с контролем.

Показано, что клозапин незначительно повышал мощность в диапазонах дельта и тета, а также статистически значимо увеличивал мощность гамма-частот, зарегистрированных в префронтальной коре. В гиппокампе клозапин снижал мощность альфа-частотного ($p < 0,05$) диапазона по сравнению с сигналами, полученными после введения кетамина.

Селективный антагонист 5-HT_{2A} рецепторов РУ-31 незначительно снижал вызванное кетамином увеличение мощности в mPFC в нескольких частотных диапазонах (дельта $p > 0,05$, тета $p > 0,05$ и альфа $p < 0,05$) и подобно клозапину повышал мощность гамма-частот относительно контроля ($p < 0,05$). В гиппокампе соединение РУ-31 вызывало дополнительное снижение мощности альфа-частот ($p < 0,05$) и значимое повышение мощности в бета диапазоне ($p < 0,05$).

Исследование коннективности (рисунок 4.13) показало, что в контрольной группе наблюдался наиболее выраженный пик wPLI на частоте около 10 Гц с последующим монотонным снижением показателя по мере увеличения частоты до пика меньшей величины на 32 Гц. Под действием кетамина происходило уменьшение wPLI по сравнению с контролем, особенно заметное на частотах выше 10 Гц. Введение клозапина и соединения РУ-31 вызывало дополнительное снижение wPLI в диапазоне 8–15 Гц. При этом соединение РУ-31 приводило к частичному восстановлению коннективности на частотах выше 30 Гц. В целом, данные указывают на значительное влияние кетамина и экспериментальных соединений на фазовую задержку между префронтальной корой и гиппокампом, что может иметь важное значение для понимания их нейрофизиологических эффектов.

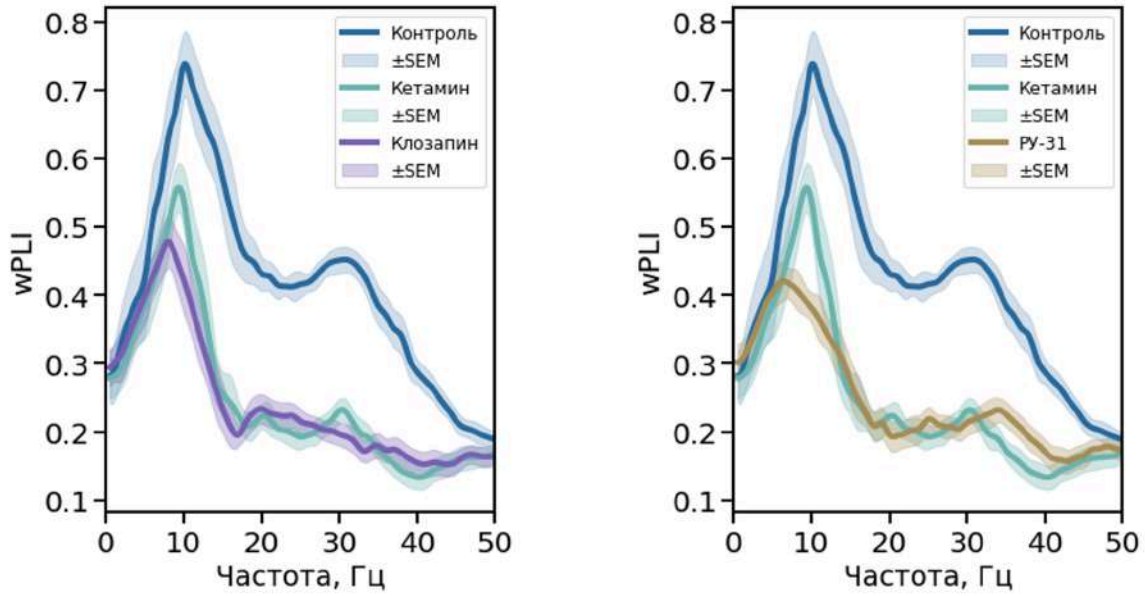


Рисунок 4.13 – Нормализованные спектры (z-оценки) с изменениями взвешенного индекса фазовой задержки (wPLI) между медиальной префронтальной корой и гиппокампом под действием кетамина 20 мг/кг (зеленый), после введения клозапина 7,5 мг/кг (фиолетовый) и соединения РУ-31 10 мг/кг (желто-коричневый)

4.2.3. Влияние соединения РУ-31 на мембранные токи пирамидных нейронов префронтальной коры

В рамках проведенного экспериментального исследования были детально изучены электрофизиологические эффекты серотонина (5-НТ) на мембранные токи пирамидных нейронов, локализованных в шестом слое (L6) медиальной префронтальной коры головного мозга крыс. Статистическая обработка данных с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) выявила значимые различия между экспериментальными группами ($F_{(3,28)}$ = 4,088, p = 0,0159). Тесты с фиксацией потенциала показали наличие хорошо воспроизводимых исходящих токов (50,23 ± 7,21 пА, n = 8; рисунок 4.14А) в ответ на аппликацию 5-НТ (10 мкМ, 20 с).

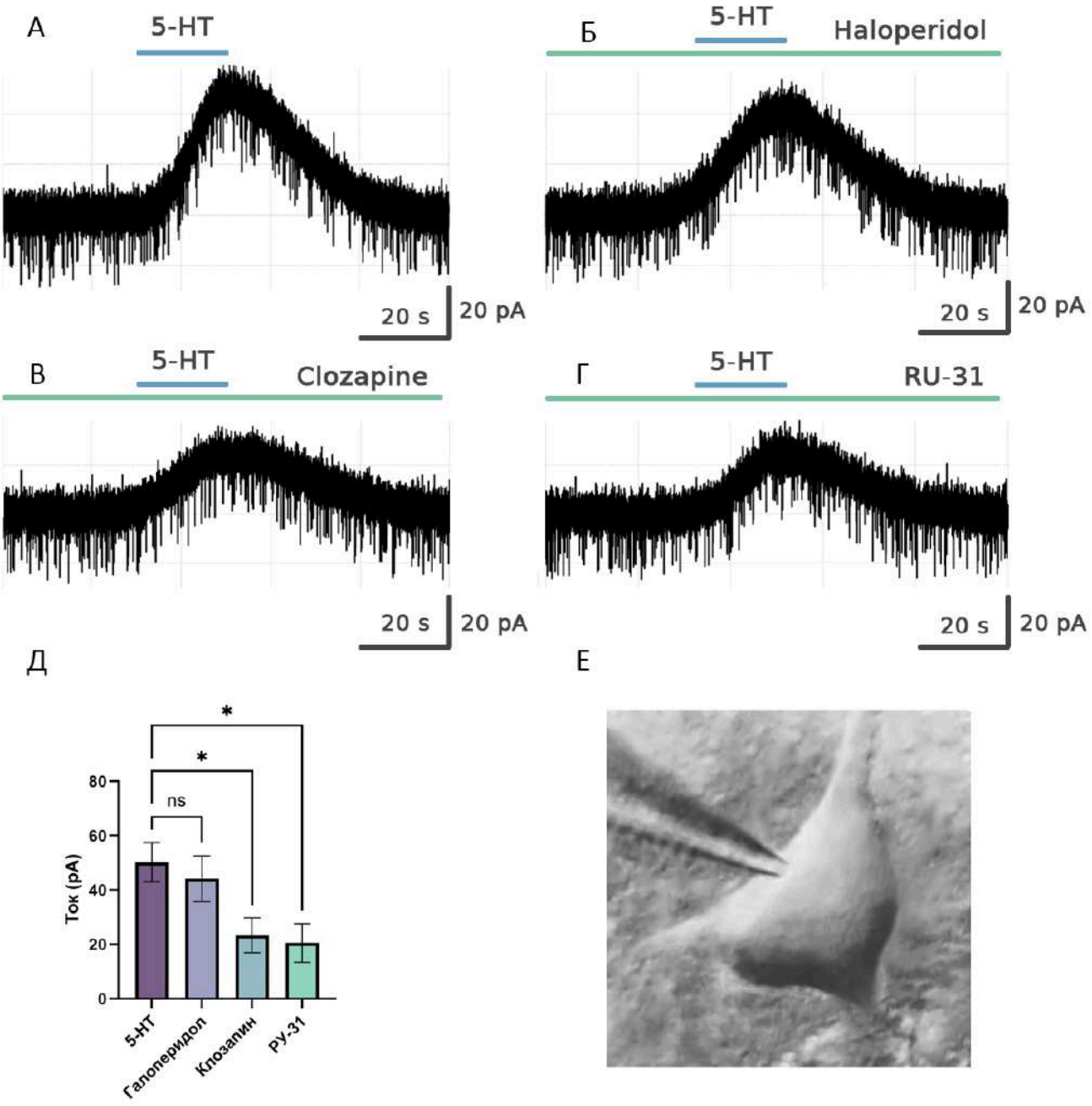


Рисунок 4.14 – Влияние веществ с антипсихотической активностью на гиперполяризацию, индуцированную серотонином в L6 нейронах медиальной префронтальной коры. А - репрезентативный сигнал группы контроля (5-HT, 10 мкМ); Б - репрезентативный сигнал после аппликации 5-HT + галоперидола (15 мкМ); В - репрезентативный сигнал после аппликации 5-HT + клозапина (15 мкМ); Г - репрезентативный сигнал после аппликации соединения 5-HT + РУ-31 (10 мкМ); Д - диаграмма со средними значениями тока для 5-HT, а также при комбинированном воздействии с галоперидолом, клозапином и соединением РУ-31; Е - пирамидный нейрон L6 слоя медиальной префронтальной коры крысы
Примечание: * – $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета.

Типичный антипсихотический препарат галоперидол не вызывал значимых изменений токов после введения 5-HT (рисунок 4.14Б). Было установлено, что специфический антагонист 5-HT_{2A} рецепторов РУ-31 (10 мкМ, 10 мин) значительно снижал опосредованный 5-HT исходящий ток в пирамидных нейронах L6 (сокращение на 59,11% до 20,54 ± 7,12 пА, $p <$

0,0211, n = 8; рис. 4.14Г). Сопоставимый эффект был достигнут после введения атипичного антипсихотического средства клозапина (23,37 ± 6,41, p < 0,0395, n = 8; рисунок 4.14В).

4.3. Нейрофармакологический анализ

4.3.1. Взаимодействие с галоперидолом

В текущем исследовании проведена оценка влияния соединения РУ-31 на каталепсию, вызванную галоперидолом. Установлено, что введение галоперидола (3 мг/кг, внутрибрюшинно) животным контрольной группы сопровождалось развитием устойчивого каталептического состояния (рисунок 4.15). Соединение РУ-31 на фоне действия галоперидола не приводило к статистически значимому изменению степени выраженности каталепсии по сравнению с контрольными показателями в течение двухчасового периода наблюдения. Таким образом, в условиях данного эксперимента не было выявлено способности исследуемого соединения РУ-31 оказывать влияние на дофаминергическую нейротрансмиссию.

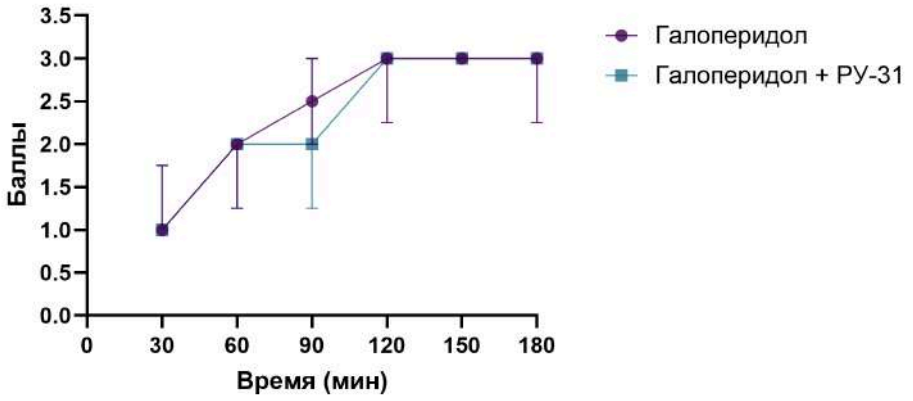


Рисунок 4.15 – Влияние соединения РУ-31 (130 мкг и.ц.в.) на каталепсию, вызванную галоперидолом (3 мг/кг, в/б), Me(IQR), n = 8

4.3.2. Взаимодействие с пикротоксином

В ходе эксперимента было установлено, что введение пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг индуцирует развитие судорожного синдрома у мышей. У животных контрольной группы латентный период (ЛП) развития тремора составил 4,5 мин., а первого приступа клонических судорог – 9,6 мин. Среднее количество судорожных приступов за период наблюдения (1 час) достигало 4,9. Предварительное интрацеребровентрикулярное введение соединения РУ-31 в дозе 25 мкг приводило к статистически значимому увеличению ЛП развития тремора (в 1,8 раза) и первого судорожного приступа (более чем в 1,5 раза) по сравнению с контрольной группой. Наряду с этим у животных опытной группы было зафиксировано снижение среднего числа судорожных припадков в 1,96 раза.

Совокупность полученных данных (рисунок 4.16) свидетельствует о том, что соединение РУ-31 в исследованной дозе обладает противосудорожным действием. Предполагается, что механизм реализации противосудорожного эффекта может быть опосредован серотонинергической системой, поскольку ранее была продемонстрирована способность антагонистов 5-HT_{2A}-рецепторов модулировать ГАМК-ергические нейроны и таким образом нивелировать действие пикротоксина (Wang H. et al., 2016).

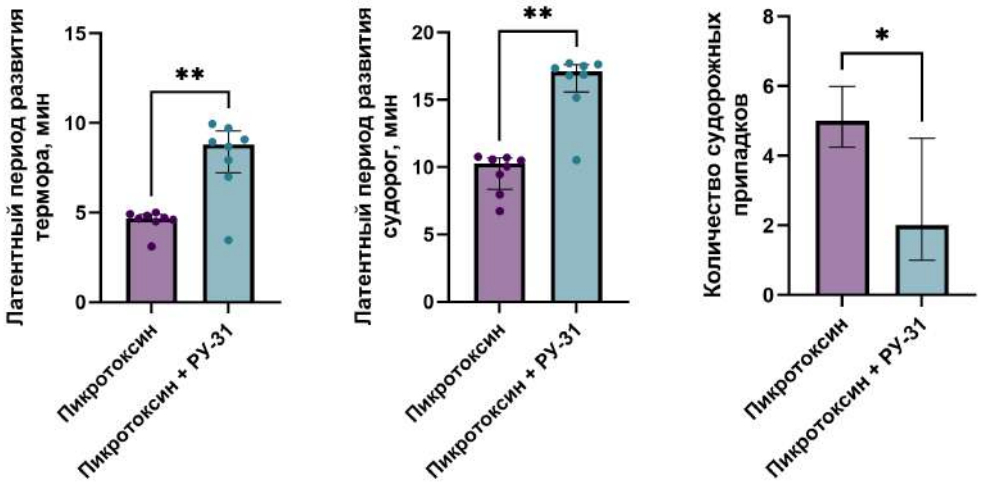


Рисунок 4.16 – Влияние соединения РУ-31 (25 мкг и.ц.в.) на судороги, вызванные пикротоксином (2,5 мг/кг), Me(IQR), n = 8
Примечание: * – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни); ** – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,005$, U-критерий Манна-Уитни).

4.3.3. Взаимодействие с клонидином

Оценка адренергической активности соединения РУ-31 была проведена с использованием модели клонидин-индуцированной гипотермии. Клонидин действует путем стимуляции пресинаптических α_2-адренорецепторов, тем самым уменьшая высвобождение норадреналина как из центральных, так и из периферических симпатических нервных окончаний (Jamadarkhana S., 2010; Romantsik O. et al., 2017).

У интактных животных средний показатель ректальной температуры составил 37,66°C. Было показано, что клонидин (0,1 мг/кг) приводил к статистически значимому снижению ректальной температуры у крыс (с 37,66°C до 36,5°C). Соединение РУ-31 не влияло на гипотермический эффект, следовательно, агонистические или антагонистические эффекты при взаимодействии с клонидином для соединения РУ-31 не характерны (рисунок 4.17).

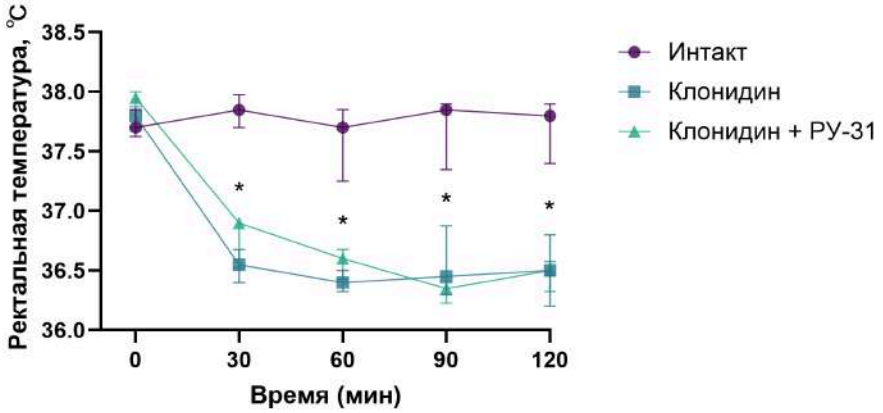


Рисунок 4.17 – Влияние соединения РУ-31 (130 мкг и.ц.в.) на гипотермический эффект клонидина (0,1 мг/кг, в/б), Me(IQR), n = 8
Примечание: * - различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

4.3.4. Влияние на 5-гидрокситриптофановый гиперкинез

У экспериментальных животных после внутрибрюшинной инъекции 5-гидрокситриптофана развивалась гиперкинезия, достигавшая максимальной выраженности на 20-й минуте. Было установлено, что у мышей, получавших соединение РУ-31 (130 мкг и.ц.в.), начиная с 10-й минуты наблюдения, статистически значимо подавлялись эффекты 5-гидрокситриптофана на всех временных промежутках до 50-й минуты включительно ($p < 0,05$; рисунок 4.18). Полученные результаты подтверждают наличие у изучаемого соединения антисеротонинового действия *in vivo*. А учитывая ранее показанный (Canal C.E., 2012; Halberstadt A.L., 2013) основной 5-$HT_{2/2A}$-зависимый механизм развития указанного гиперкинеза, а также характерное 5-HT_{2A}-антагонистическое действие для соединения РУ-31, выявленный эффект можно считать закономерным и отражающим основной механизм действия изучаемого вещества в условиях целостного организма.

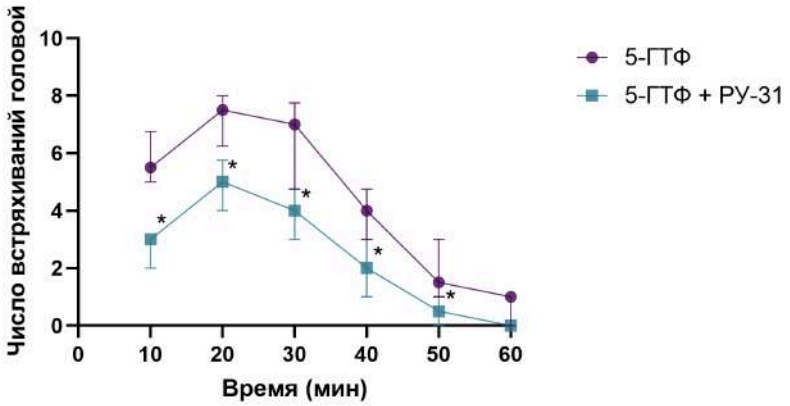


Рисунок 4.18 – Влияние соединения РУ-31 (25 мкг и.ц.в.) на выраженность эффектов 5-гидрокситриптофана (300 мг/кг, в/б), Me(IQR), n = 8
Примечание: * - различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

4.3.5. Влияние на ареколиновый тремор

В ходе изучения взаимодействия М-холиномиметика ареколина в дозе 15 мг/кг с экспериментальным соединением РУ-31 латентное время возникновения тремора составило 47,7 и 51,2 секунды для контрольной и опытной группы соответственно. Длительность тремора в группе контроля, получавшей ареколин, в среднем составляла 1096,4 секунды, а в группе животных, получавших соединение РУ-31 1022,9 секунды. Таким образом, по длительности латентного периода и продолжительности тремора не было зафиксировано значительных различий между опытной и контрольной группами (рисунок 4.19).

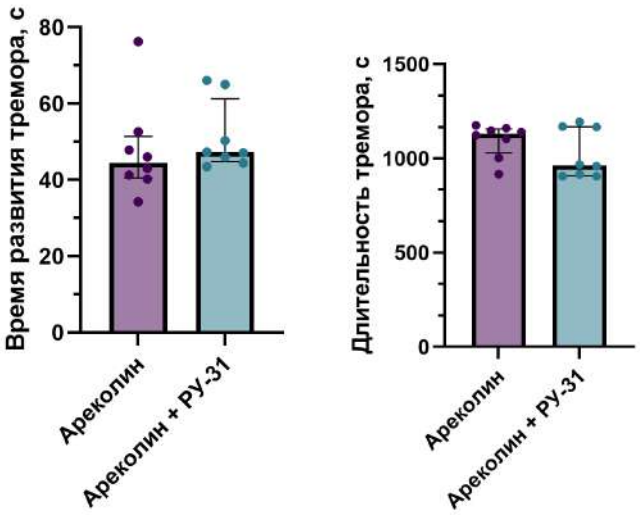


Рисунок 4.19 – Влияние соединения РУ-31 (130 мкг и.ц.в.) на выраженность тремора, вызванного введением ареколина (15 мг/кг, в/б), Me(IQR), n = 8

4.3.6. Взаимодействие с L-ДОФА

По результатам проведенного исследования установлено, что L-DOPA после введения в дозе 500 мг/кг приводила к повышению двигательной активности мышей с элементами стереотипного поведения ($p < 0,05$). Интенсивность стереотипии, индуцированной введением L-DOPA, достигала максимального значения на 60-й минуте эксперимента. Применение L-DOPA в дозе 100 мг/кг не сопровождалось развитием стереотипии, характерной для более высоких доз. Соединение РУ-31 (25 мкг и.ц.в.) не потенцировало эффекты малых доз L-DOPA (рисунок 4.20).

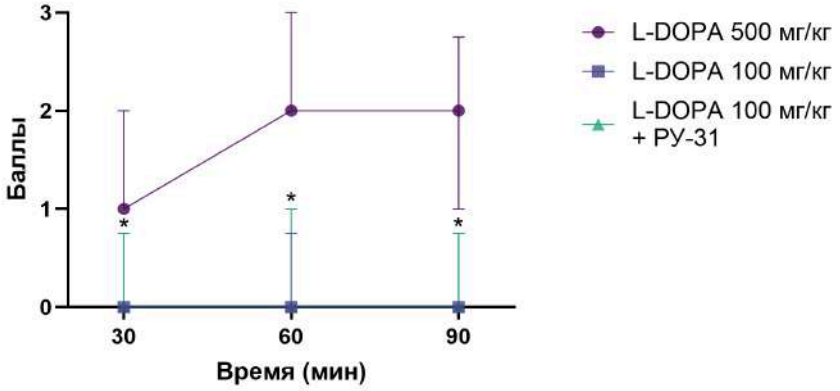


Рисунок 4.20 – Влияние соединения РУ-31 (25 мкг и.ц.в.) на эффекты L-DOPA (100 и 500 мг/кг, в/б), Me(IQR), n = 8
Примечание: * - различия статистически значимы относительно группы L-DOPA 500 мг/кг ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у соединения РУ-31 значимой МАО-ингибирующей активности, поскольку в ходе исследования не было зарегистрировано усиления L-DOPA-индуцированных поведенческих реакций.

4.4. Оценка влияния соединения РУ-31 на медиальную префронтальную область коры путем локальных микроинъекций

Препульсовое ингибирование (PPI) является валидированным показателем сенсомоторного гейтинга, его снижение при шизофрении рассматривают главным образом как маркер нарушенной фильтрации сенсорной информации, ассоциированный с дефицитами внимания и исполнительных функций. Антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов рассматриваются как перспективные средства для коррекции когнитивных нарушений при шизофрении (Kantrowitz J.T., 2020), поскольку они способны нормализовать уровень дофамина в префронтальной коре (предполагается, что снижение дофаминергической активности в mPFC является одной из главных причин когнитивных нарушений).

Предыдущие исследования показали, что системное введение антагонистов 5-HT_{2A} рецепторов, таких как MDL 100,907, увеличивает высвобождение дофамина в медиальной префронтальной коре и может оказывать антипсихотическое действие, подобное клозапину (Prus A.J. et al., 2016). Локальное введение MDL 100,907 непосредственно в mPFC также приводило к увеличению высвобождения дофамина в этой области (Schmidt C.J., 1995). Учитывая, что кетамин вызывает когнитивные нарушения (в том числе подавляет PPI) и используется для моделирования шизофреноподобных нарушений, локальные микроинъекции в mPFC позволили определить, действительно ли антипсихотический эффект соединения РУ-31 с 5-HT_{2A} антагонистической активностью реализуется в этой области мозга.

В левой части рисунка 4.21 изображен временной профиль звукового сигнала, включающего два компонента: препульс и основной импульс. Препульс – это предварительный звуковой сигнал с меньшей амплитудой (75 дБ), который предшествует основному импульсу с большей амплитудой (120 дБ). Справа на рисунке 4.21 верхний график (фиолетового цвета) отражает стартл-реакцию, вызванную основным импульсом без предварительного препульса. Нижний график (зеленого цвета) иллюстрирует реакцию на стимул с препульсом. Существенные различия в амплитуде обусловлены подавлением стартл-реакции под влиянием предварительного звукового сигнала. В основе феномена лежит сенсомоторный гейтинг – механизм, который позволяет центральной нервной системе фильтровать или предвосхищать интенсивные стимулы, что предотвращает перегрузку сенсомоторных систем при обработке информации.

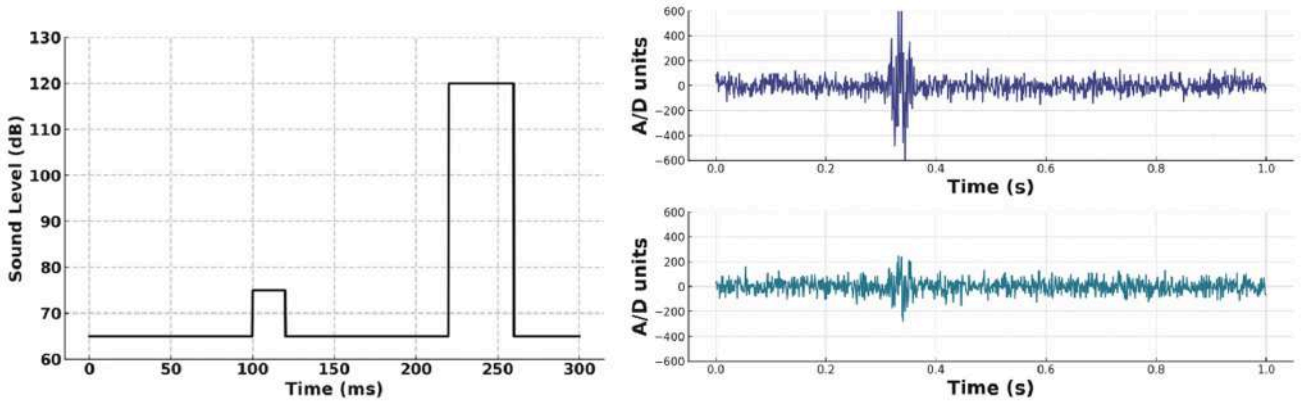


Рисунок 4.21 – Слева показан звуковой сигнал: препульс с меньшей амплитудой и основной импульс с большей амплитудой. Справа вверху отражена стартл-реакция на основной импульс (без препульса) и снизу показана реакция на стимул с препульсом

В контрольной группе отмечается относительно высокий уровень препульсового ингибирования, который снижается на 32,02% под воздействием кетамина ($p < 0,05$). Введение галоперидола в префронтальную кору способствует усугублению нарушения PPI ($p < 0,05$), снижая значение на 28,96% относительно группы позитивного контроля. Клозапин в сочетании с кетамином незначительно улучшает исследуемый показатель. Наибольший эффект среди протестированных соединений показало исследуемое вещество РУ-31, восстанавливая уровень препульсового ингибирования (на 34,94%) до значений, близких к негативному контролю ($p < 0,05$; рисунок 4.22).

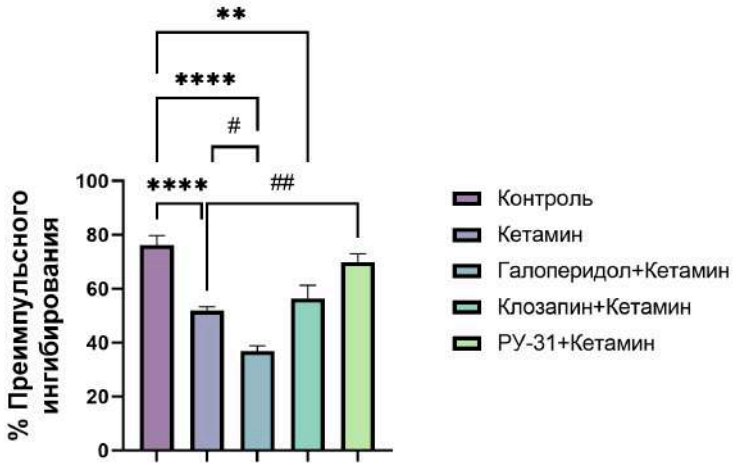


Рисунок 4.22 – Влияние галоперидола (5 мкг), клозапина (10 мкг) и соединения РУ-31 (15 мкг) на эффекты кетамина (10 мг/кг, в/б) в тесте препульсового ингибирования, M ± SEM, n = 8
Примечание: ** – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,01$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки). **** – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,0001$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки). # – различия статистически значимы относительно группы Кетамин ($p < 0,05$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки). ## – различия статистически значимы относительно группы Кетамин ($p < 0,01$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Полученные результаты хорошо согласуются с теорией о том, что дофаминергическая дисфункция лежит в основе развития когнитивных нарушений при шизофрении. Снижение препульсового ингибирования под действием кетамина моделирует нарушения сенсомоторного гейтинга, характерные для шизофрении. Это может быть связано с антагонистическим действием кетамина на NMDA-рецепторы, что приводит к нарушению глутаматергической нейротрансмиссии и, как следствие, к дисбалансу дофаминергической системы. Локальное введение галоперидола, блокирующее D_2-рецепторы, ухудшало препульсовое ингибирование, что свидетельствует о поддерживающей роли D_2-опосредованной модуляции в медиальной префронтальной коре для реализации механизмов сенсорной фильтрации. Умеренное повышение PPI при клозапине укладывается в рамки его мультитаргетного профиля, включающего антагонизм 5-HT_{2A}-рецепторов. Наиболее выраженный эффект РУ-31, сопровождающийся восстановлением препульсового ингибирования до значений, близких к группе негативного контроля, согласуется с тем, что селективная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов может оптимизировать серотонин-дофаминергическую модуляцию в префронтальной коре. В совокупности результаты поддерживают роль префронтальной дофаминергической регуляции в нарушениях сенсомоторного гейтинга при шизофрении и указывают на целесообразность 5-HT_{2A}-направленных подходов к их фармакологической коррекции. Полученные данные свидетельствуют в пользу локализации эффекта РУ-31 на уровне медиальной префронтальной коры.

4.5. Спектр антипсихотической активности соединения РУ-31

4.5.1. Оценка взаимодействия с апоморфином

4.5.1.1. Влияние на феномен вертикализации, вызванной введением апоморфина

В эксперименте были получены кривые «доза-эффект» для галоперидола, клозапина и соединения РУ-31 на модели вертикализации, вызванной апоморфином у мышей (рисунок 4.23). В ходе исследования оценивали потенциальную антипсихотическую активность соединений исходя из подавления стереотипного поведения, индуцированного апоморфином.

Галоперидол показал наиболее высокую эффективность среди протестированных соединений, с ED80 равным 0,9753 мг/кг и коэффициентом детерминации (R^2) 0,8917, что свидетельствует о высокой корреляции между дозой и эффектом. Клозапин продемонстрировал промежуточную эффективность с ED80 на уровне 7,659 мг/кг и R^2 = 0,8924. Соединение РУ-31 показало активность близкую к клозапину, с ED80 = 10,16 мг/кг и коэффициентом детерминации 0,8150.

Таким образом, галоперидол, клозапин и соединение РУ-31 существенно снижали стереотипное поведение мышей, вызванное апоморфином, при этом типичный нейролептик галоперидол проявляет наибольшую активность в данном тесте. Полученные значения ED80 для всех соединений использовались для дальнейших фармакологических исследований.

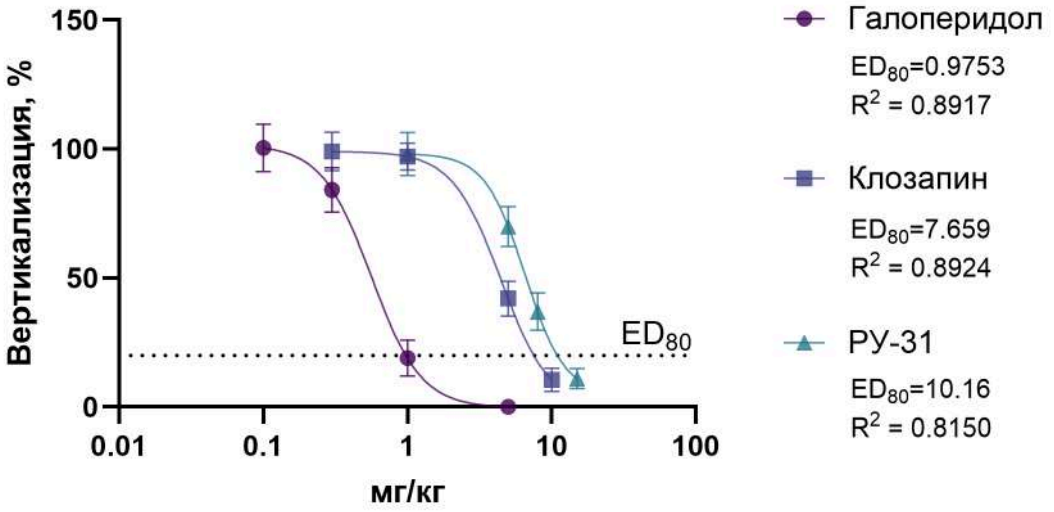


Рисунок 4.23 – Кривые «доза-эффект» для возрастающих доз (в/б) галоперидола, клозапина и соединения РУ-31 в тесте вертикализации у мышей со стереотипическим расстройством, индуцированным однократным введением апоморфина (5 мг/кг)
Примечание: данные представлены в виде M ± SEM (n = 8).

4.5.1.2. Влияние на апоморфиновую гиперактивность в открытом поле

На рисунке представлены результаты исследования апоморфиновой гиперактивности у крыс в тесте открытого поля после введения соединений с антипсихотической активностью. На графике показан уровень двигательной активности крыс, выраженный через количество пересеченных линий арены поля (рисунок 4.24). В контрольной группе, получавшей физиологический раствор, наблюдалась высокая двигательная активность. Введение галоперидола (1 мг/кг) значительно снизило количество пересеченных линий, что указывает на его выраженное ингибирующее действие на двигательную активность, вероятно, за счет блокирования дофаминовых рецепторов. В группе, получавшей клозапин (7,5 мг/кг), двигательная активность не была снижена по сравнению с контролем. Соединение РУ-31 (10 мг/кг) также не изменило количество пересеченных линий по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о его нейтральном влиянии на двигательную активность крыс в данном эксперименте, что характерно для веществ с атипичной антипсихотической активностью, подобной клозапину.

Таким образом, результаты демонстрируют, что галоперидол снижает апоморфиновую гиперактивность у крыс, при этом клозапин и соединение РУ-31 не оказывают значительного влияния на двигательную активность.

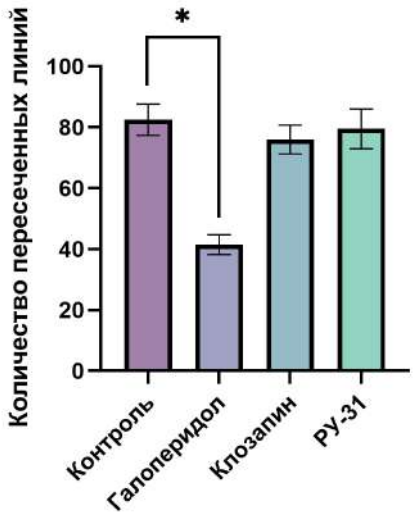


Рисунок 4.24 – Влияние галоперидола (1 мг/кг), клозапина (7,5 мг/кг) и соединения РУ-31 (10 мг/кг) на гиперактивность крыс, вызванную апоморфином (5 мг/кг) в тесте открытого поля
Примечание: данные представлены в виде M ± SEM, n = 8. Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета.

4.5.1.3. Влияние на стереотипное поведение, вызванное введением апоморфина

На графике представлены результаты влияния галоперидола (1 мг/кг), клозапина (7,5 мг/кг) и соединения РУ-31 (10 мг/кг) на апоморфин-индуцированное стереотипное поведение у животных в течение 120 минут (рисунок 4.25). В контрольной группе животных наблюдается постепенное снижение уровня исследуемого показателя с максимальными значениями в первые 15 минут и постепенным уменьшением до минимальных значений к 120 минутам.

Галоперидол демонстрирует значительное снижение выраженности апоморфиновой стереотипии по сравнению с контролем. На 15-й минуте этот эффект был статистически значим ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), а к 30-й минуте ингибирующее действие препарата усиливалось ($p < 0,01$). В течение всего периода наблюдения галоперидол продолжает показывать снижение уровня стереотипного поведения, наиболее выраженное в первые 30 минут.

В течение 45 минут наблюдения клозапин показывает незначительную тенденцию к снижению уровня стереотипии по сравнению с контролем. В последующие временные точки ее выраженность в группе, получавшей клозапин, не отличалась от контрольных значений.

Соединение РУ-31 не оказало статистически значимого влияния на интенсивность апоморфиновой стереотипии. На протяжении всего эксперимента оценочные баллы в данной группе не имели статистически значимых отличий от показателей группы контроля.

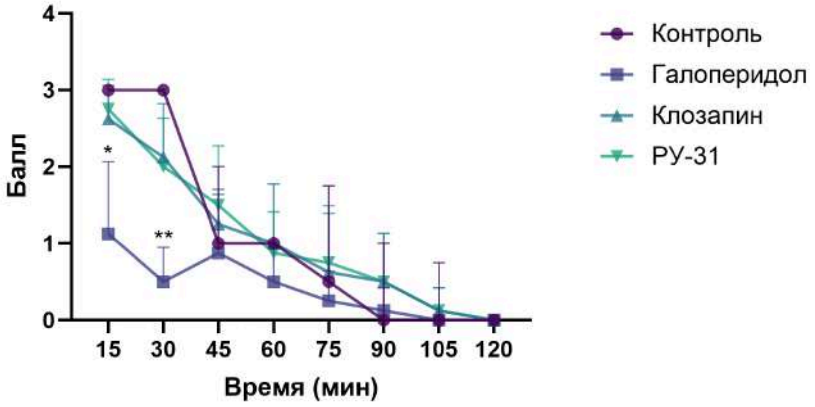


Рисунок 4.25 – Влияние галоперидола (1 мг/кг), клозапина (7,5 мг/кг) и соединения РУ-31 (10 мг/кг) на стереотипное поведение у крыс, вызванное апоморфином (1 мг/кг)
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

4.5.1.4. Влияние на эффекты малых (пресинаптических) доз апоморфина

Результаты показали (таблица 4.7), что в группе, получавшей галоперидол (1 мг/кг), число зеваний снизилось на 81,5%, что значительно меньше по сравнению с группой контроля

($p < 0,05$). В группе, получавшей клозапин (7,5 мг/кг), исследуемый показатель сократился на 65,7%, что также значительно ниже по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В группе, получавшей соединение РУ-31 (10 мг/кг), среднее число зеваний было на 49,3% меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Таким образом, все исследованные соединения статистически значимо снижали исследуемый параметр по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о наличии антипсихотической активности.

Таблица 4.7 – Влияние галоперидола (1 мг/кг), клозапина (7,5 мг/кг) и соединения РУ-31 (10 мг/кг) на зевательное поведение крыс, вызванное малыми дозами апоморфина (0,1 мг/кг)

Группа (n = 10)	**Число зеваний**	**p-значение**
Контроль	24,3 ± 3,4	–
Галоперидол	4,5 ± 1,3	<0,05
Клозапин	8,3 ± 2,2	<0,05
Соединение РУ-31	12,3 ± 6,7	<0,05

Примечание: данные представлены в виде M ± SEM. Различия статистически значимы относительно группы контроля: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Даннета.

4.5.1.5. Влияние на агрессивное поведение в тесте с апоморфином

На графиках показана динамика изменений агрессивного поведения крыс под действием апоморфина в течение 12 дней (рисунок 4.26). Левый график демонстрирует латентный период (время до первой агрессивной реакции), который постепенно уменьшается с 15 до 6 минут, что указывает на усиление агрессивного поведения. Второй график иллюстрирует выраженность агрессии в баллах, которая возрастает с 0 до 2 и более баллов к 12-му дню, также отражая усиление агрессивных реакций.

На рисунке 4.27 показано влияние различных тестируемых соединений на агрессивное поведение на 15-й день эксперимента. На левой диаграмме показано, что галоперидол (1 мг/кг) значимо увеличивает латентный период по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Клозапин (7,5 мг/кг) также значительно увеличивает латентный период ($p < 0,05$), однако это увеличение менее выражено по сравнению с галоперидолом. Латентный период в группе, получавшей соединение РУ-31 (10 мг/кг), не отличается значимо от контроля.

На правой диаграмме отражено влияние веществ на интенсивность агрессии. Галоперидол существенно снижает баллы агрессии по сравнению с контролем ($p < 0,001$), в то время как клозапин и соединение РУ-31 не оказывают значимого влияния на этот показатель.

Таким образом, галоперидол наиболее эффективно подавляет апоморфин-индуцированную агрессию, что проявляется в значительном увеличении латентного

периода и снижении интенсивности агрессивных действий. Клозапин оказывает умеренное действие на агрессию, в то время как вещество РУ-31 не проявляет значимого эффекта.

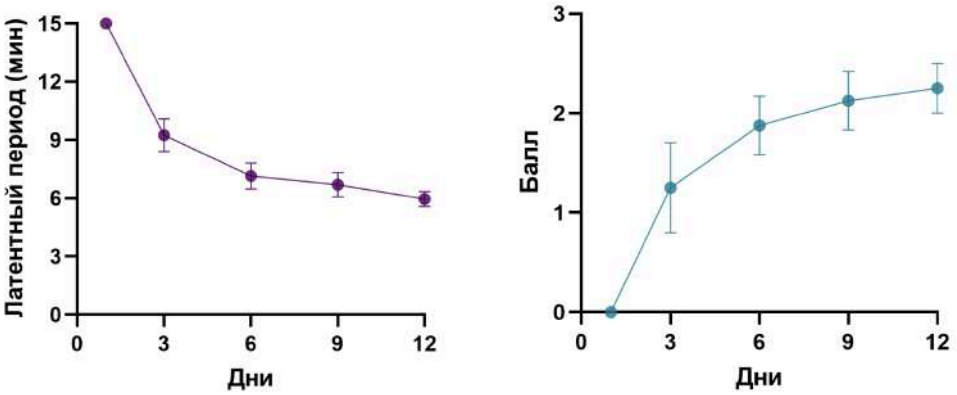


Рисунок 4.26 – Динамика показателей агрессивного поведения у крыс, вызванного апоморфином (1 мг/кг) до введения веществ с антипсихотической активностью
Примечание: данные представлены в виде M ± SEM, n = 8.

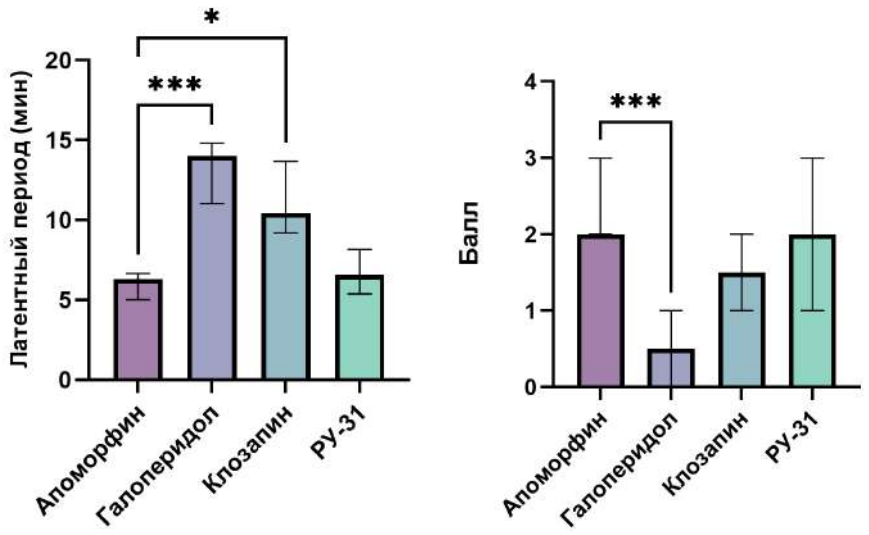


Рисунок 4.27 – Влияние галоперидола (1 мг/кг), клозапина (7,5 мг/кг) и соединения РУ-31 (10 мг/кг) на агрессивное поведение у крыс, вызванное апоморфином (1 мг/кг) на 15 день эксперимента
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

4.5.2. Оценка нейролептической активности соединения РУ-31 на моделях расстройства психотического спектра в батарее поведенческих тестов

4.5.2.1. Оценка нейролептической активности на модели психотического расстройства, вызванного деструкцией вентрального гиппокампа

Локомоторная активность

Локомоторная активность животных оценивалась по числу пересеченных линий в тесте открытого поля (рисунок 4.28). В группе позитивного контроля наблюдалось статистически

значимое увеличение двигательной активности по сравнению с ложнооперированными животными (Me = 98, $Q_1;Q_3$[69,0;119,0]; $p < 0,01$). Соединение РУ-31 привело к статистически значимому снижению локомоторной активности у животных с разрушенным вентральным гиппокампом (Me = 58, $Q_1;Q_3$[26,75;65,5]; $p < 0,05$) по сравнению с животными, не получавшими лечения. Клозапин, использованный в качестве препарата сравнения, также статистически значимо уменьшал количество пересеченных линий (Me = 47, $Q_1;Q_3$[20,0;59,5]; $p < 0,01$) по сравнению с группой позитивного контроля. Наблюдаемое снижение локомоторной активности под действием как РУ-31, так и клозапина может свидетельствовать об их потенциальной антипсихотической активности в данной экспериментальной модели.

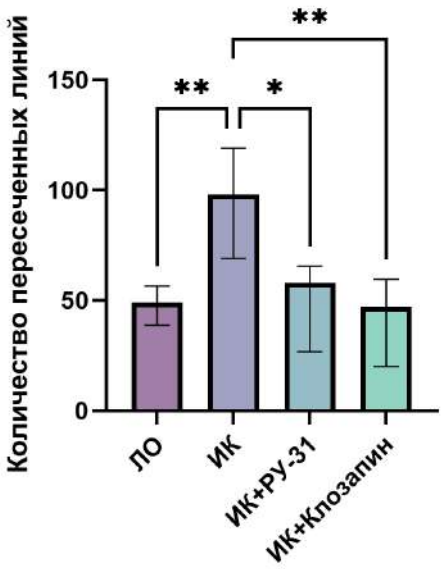


Рисунок 4.28 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на локомоторную активность крыс в модели неонатального разрушения вентрального гиппокампа
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы животных с моделированным психозом: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Социальное взаимодействие

В тесте на социальное взаимодействие у животных с моделью психоза наблюдалось статистически значимое снижение времени, проведенного в активном социальном поведении, по сравнению с группой негативного контроля (Me = 153,84, $Q_1;Q_3$[96,6;159,2]; $p < 0,001$). Соединение РУ-31 при введении оперированным животным вызывало статистически значимое увеличение времени социального взаимодействия по сравнению с группой позитивного контроля (Me = 227,6, Q1;Q3[176,5;236,0]; $p < 0,05$). Клозапин не оказал статистически значимого влияния на время социального взаимодействия (Me = 152,83, $Q_1;Q_3$[101,3;192,7]; $p > 0,05$) по сравнению с животными, не получавшими лечения (рисунок 4.29). Полученные результаты указывают на способность соединения РУ-31 ослаблять негативную симптоматику в

данной экспериментальной модели психоза, что проявляется в улучшении социального взаимодействия животных.

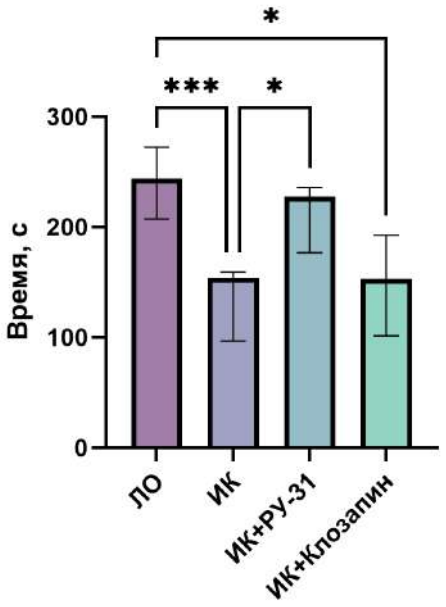


Рисунок 4.29 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на социальное взаимодействие крыс в модели неонатального разрушения вентрального гиппокампа

Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы животных с моделированным психозом: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Распознавание нового объекта

В ходе анализа данных теста на распознавание нового объекта было выявлено (рисунок 4.30), что у животных с психозом, вызванным разрушением вентрального гиппокампа, не наблюдалось значимых изменений коэффициента дискриминации (КД) в фазе кратковременного удержания по сравнению с ЛО группой (Me = 0,64, $Q_1;Q_3$[0.41;0.7]; $p > 0,05$). Однако в фазе долговременного удержания у данных животных наблюдалось статистически значимое снижение КД (Me = 0,29, $Q_1;Q_3$[0,23;0,37]; $p < 0,001$).

Введение РУ-31 и клозапина не оказало существенного влияния на КД в фазе кратковременного удержания как у оперированных животных, так и у ложнооперированных животных. В фазе долговременного удержания оба вещества значительно увеличили КД у животных по сравнению с позитивным контролем (Me = 0,73, $Q_1;Q_3$[0,48;0,82] для РУ-31; Me = 0,68, $Q_1;Q_3$[0,48;0,8] для клозапина; $p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что разрушение вентрального гиппокампа иботеновой кислотой избирательно нарушает процессы долговременного удержания информации, не оказывая существенного влияния на кратковременное. РУ-31 и клозапин

продемонстрировали способность корректировать эти нарушения, улучшая показатели долговременного удержания информации у животных с моделированным психозом.

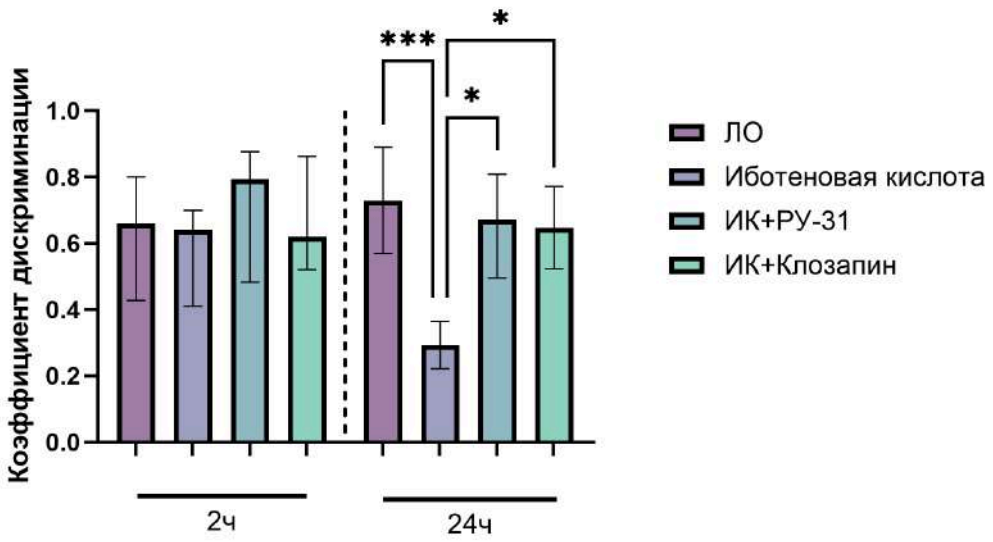


Рисунок 4.30 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на эпизодическую память крыс в модели неонатального разрушения вентрального гиппокампа
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы животных с моделированным психозом: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

4.5.2.2. Оценка нейролептической активности на модели психотического расстройства, вызванного кетамином

Локомоторная активность

Проведенные исследования показали, что введение кетамина вызывает статистически значимое увеличение уровня локомоторной активности у экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой (рисунок 4.31). Так, в группе животных с кетамин-индуцированным психозом медиана и интерквартильный размах составили 108,5 [71,75;114,80] против 30,50 [20,00;76,00] в контрольной группе ($p = 0,0028$).

При совместном введении кетамина с соединением РУ-31 наблюдалось достоверное снижение кетамин-индуцированной гиперактивности (46,50 [21,50;96,00], $p = 0,0441$), что свидетельствует о потенциальном антипсихотическом эффекте РУ-31. Аналогичный эффект продемонстрирован при комбинации кетамина с клозапином: уровень локомоции составил 40,00 [18,00;92,25] ($p = 0,0088$).

Результаты непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса, $H = 13,46$, $p = 0,0037$) выявили статистически значимые межгрупповые различия по уровню локомоторной активности. Таким образом, комбинированное введение кетамина с РУ-31 или клозапином значительно ослабляло кетамин-индуцированное повышение двигательной активности, что может указывать на антипсихотический потенциал исследуемого соединения.

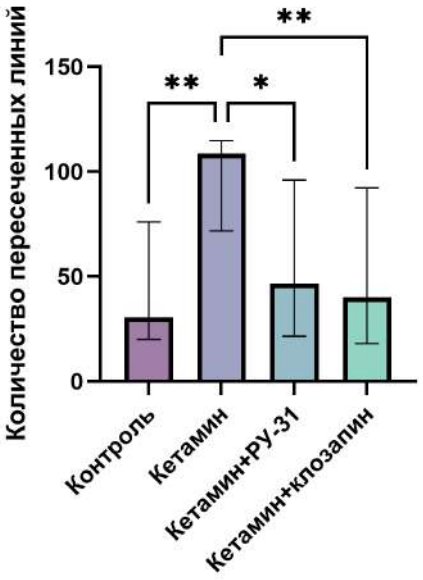


Рисунок 4.31 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на локомоторную активность мышей в модели кетамин-индуцированного психоза
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы Кетамин: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Социальное взаимодействие

В тесте социального взаимодействия выявлены статистически значимые межгрупповые различия (критерий Краскела-Уоллиса: $H = 13,17$, $p = 0,0043$). В контрольной группе показатель составил 66,58 с [52,36;72,32], тогда как у животных, получавших кетамин, снижался до 10,22 с [6,19;25,66]. Совместное введение кетамина с РУ-31 (10 мг/кг, в/б) или клозапином (7,5 мг/кг, в/б) восстанавливало социальное взаимодействие до 63,2 с [31,95;70,77] и 62,38 с [29,76; 69,92] соответственно. При апостериорном сравнении по критерию Данна группа позитивного контроля статистически значимо отличалась как от контрольной группы ($p = 0,003$), так и от групп животных, которым вводили соединение РУ-31 ($p = 0,0109$) и клозапин ($p = 0,0431$), что указывает на выраженное ингибирование социального поведения кетамином и способность РУ-31 и клозапина нивелировать данные проявления (рисунок 4.32).

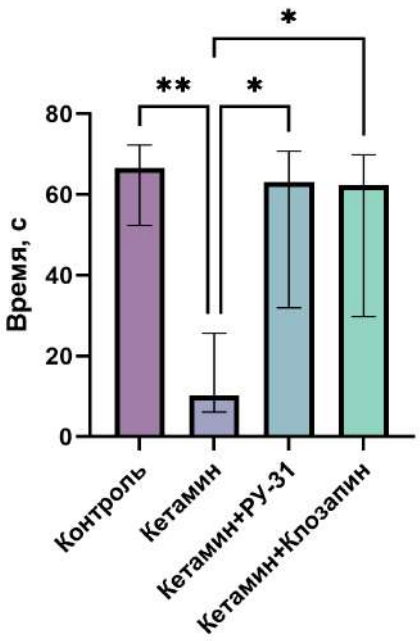


Рисунок 4.32 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на социальное взаимодействие мышей в кетамин-индуцированной модели психоза
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы Кетамин: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Распознавание нового объекта

На этапе кратковременного удержания (через 2 часа) в тесте распознавания нового объекта статистически значимые различия между группами отсутствовали (критерий Краскела-Уоллиса: $H = 5,934$, $p = 0,1148$). Пост-хок анализ (критерий Данна) также не выявил достоверных отличий ($p > 0,05$), что указывает на отсутствие значимого влияния кетамина на показатели распознавания нового объекта при кратковременном удержании информации (рисунок 4.33).

На этапе долговременного удержания (через 24 ч) установлены статистически значимые межгрупповые различия ($H = 14,42$; $p = 0,0024$). У контрольных животных медиана коэффициента дискриминации составила 0,82 [0,5175;0,905], тогда как в группе животных с кетамин-индуцированным психозом она снижалась до 0,21 [0,1775; 0,265]. При комбинации кетамина с РУ-31 или клозапином медиана показателя достигала 0,685 [0,315; 0,8925] и 0,565 [0,29; 0,8975] соответственно. Пост-хок анализ (критерий Данна) показал статистически значимое уменьшение показателя в группе животных с кетамин-индуцированным психозом по сравнению с контролем ($p = 0,0018$), а также достоверное повышение при введении соединения РУ-31 ($p = 0,0082$) и клозапина ($p = 0,0221$). Эти результаты указывают на негативное влияние кетамина на когнитивные функции при длительном удержании информации и демонстрируют, что РУ-31 и клозапин могут корригировать данные нарушения, подтверждая их возможный

антипсихотический и прокогнитивный эффект в кетамин-индуцированной модели психоза у мышей.

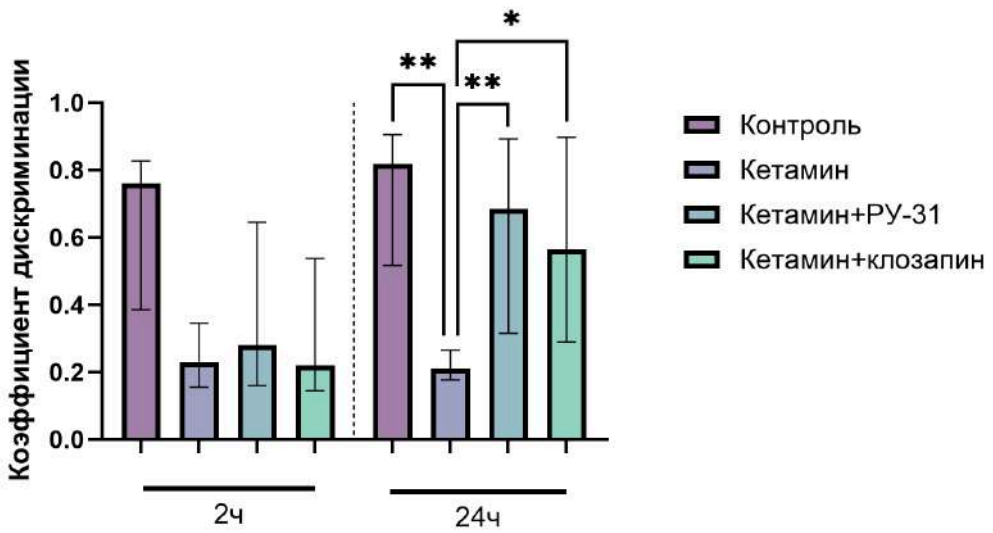


Рисунок 4.33 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на эпизодическую память мышей в кетамин-индуцированной модели психоза
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы Кетамин: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

4.5.2.3. Оценка нейролептической активности на модели психотического расстройства, вызванного липополисахаридом

Локомоторная активность

В модели материнской иммунной активации, индуцированной введением липополисахарида (ЛПС), при оценке локомоторной активности выявлены статистически значимые межгрупповые различия (критерий Краскела-Уоллиса: H = 13,38; p = 0,0039). У крыс после пренатального воздействия ЛПС показатель составил 123,5 [95,0;129,5], что статистически значимо превышает контрольные значения (51,0 [15,5;92,25]; p = 0,002, пост-хок тест Данна). Введение РУ-31 или клозапина в экспериментальных группах приводило к снижению данного показателя до 88,0 [13,75;95,25] (p = 0,0166) и 77,0 [52,25;96,25] (p = 0,0408) соответственно (рисунок 4.34).

Социальное взаимодействие

При анализе социального взаимодействия (H = 12,76; p = 0,0052) у крыс после пренатального воздействия ЛПС наблюдалось значительное снижение показателя (98,5 [45,75;189,0]) по сравнению с контрольной группой (236,5 [193,0; 252,0]; p = 0,0031). Введение РУ-31 (220,0 [177,5;247,5]; p = 0,0161) или клозапина (220,0 [109,0;242,3]; p = 0,0453) в

экспериментальных группах нормализовало социальное поведение до уровня контрольных значений (рисунок 4.35).

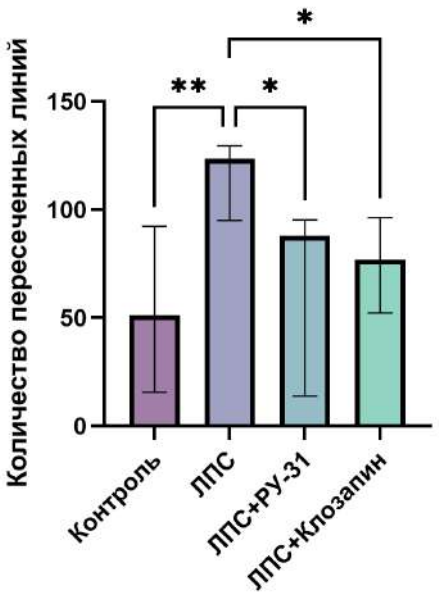


Рисунок 4.34 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на локомоторную активность крыс в модели материнской иммунной активации, индуцированной ЛПС

Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы ЛПС: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

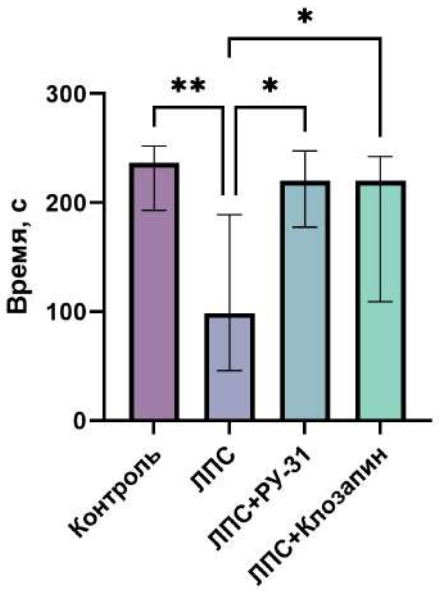


Рисунок 4.35 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на социальное взаимодействие крыс в модели материнской иммунной активации, индуцированной ЛПС

Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы ЛПС: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Распознавание нового объекта

В тесте распознавания нового объекта на этапе кратковременного удержания (2 часа) (H = 9,981; p = 0,0187) у крыс после пренатального воздействия ЛПС наблюдалось достоверное снижение коэффициента дискриминации (0,2900 [0,1725;0,33]) относительно контрольной группы (0,825 [0,6975;0,8975]; p = 0,0088). Соединение РУ-31 (0,2850 [0,21;0,8325]) и клозапин (0,445 [0,1950;0,71]) в экспериментальных группах не оказывали статистически значимого влияния на данный показатель по сравнению с группой позитивного контроля (p > 0,05), что свидетельствует об отсутствии эффекта на кратковременное удержание информации (рисунок 4.36).

При оценке фазы долговременного удержания (через 24 часа) в тесте распознавания нового объекта (критерий Краскела-Уоллиса: H = 14,62; p = 0,0022) у животных с пренатальным воздействием ЛПС наблюдалось значительное снижение КД (0,235 [0,15;0,435]) по сравнению с контрольной группой (0,83 [0,685; 0,93]; p = 0,0007). Соединение РУ-31 (0,74 [0,635;0,795]; p = 0,022) или клозапин (0,67 [0,4775;0,8475]; p = 0,049) у животных экспериментальных групп частично восстанавливали нарушенные показатели, что свидетельствует о потенциальном прокогнитивном действии исследуемых соединений при нарушениях долговременного удержания информации, вызванных пренатальной иммунной активацией.

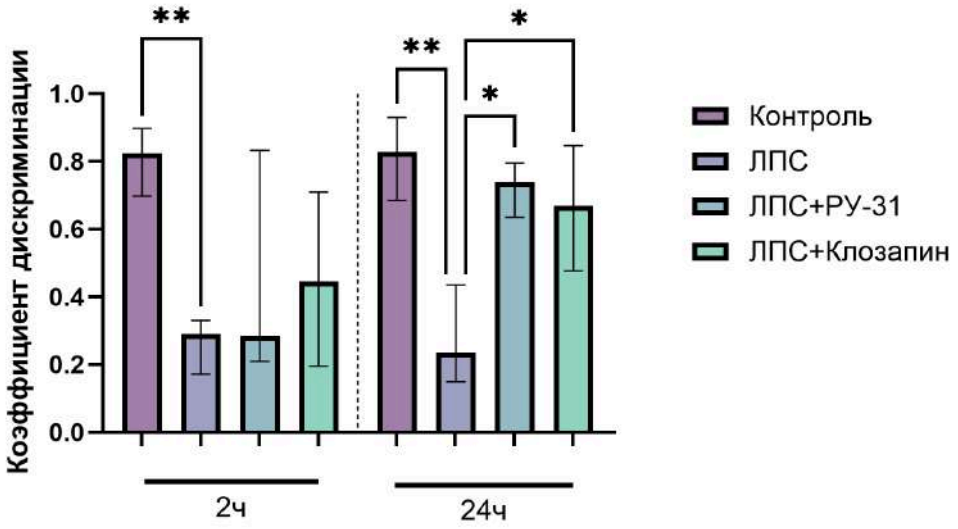


Рисунок 4.36 – Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, в/б) и клозапина (7,5 мг/кг, в/б) на эпизодическую память крыс в модели материнской иммунной активации, индуцированной ЛПС
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 10. Различия статистически значимы относительно группы ЛПС: * – p < 0,05; ** – p < 0,01, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

4.6. Оценка влияния соединения РУ-31 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»

В проведенном исследовании изучалось влияние двух атипичных антипсихотических соединений, клозапина и вещества РУ-31, на поведение интактных крыс. Для оценки изменений с помощью автоматизированной системы с компьютерным зрением были выделены 12 элементарных параметров, которые охватывали различные формы локомоции, ориентировочные реакции и груминговое поведение (рисунок 4.37). Вещества вводили в двух дозах: клозапин 7,5 и 15 мг/кг, РУ-31 10 и 20 мг/кг.

При введении клозапина выявлялось выраженное дозозависимое снижение большинства параметров, связанных с двигательной и ориентировочной активностью. Так, быстрая поступательная локомоция (параметр 1) достоверно уменьшалась уже при 7,5 мг/кг ($p < 0,01$), причем при повышении дозы до 15 мг/кг эффект усиливался ($p < 0,0001$). Аналогичная динамика отмечалась для вертикальных стоек (параметр 4), быстрых поворотов головы (параметр 8) и продолжительной интенсивной активности (параметр 11) ($p < 0,05$). При увеличении дозы до 15 мг/кг дополнительно угнетались повороты на месте (параметр 3), короткие остановки (параметр 9), прерывистые мелкие перемещения (параметр 10) и вертикальные попытки подъема (параметр 12), причем многие из этих эффектов достигали высоких уровней значимости ($p < 0,0001$). Медленная поступательная локомоция (параметр 2) в низкой дозе оставалась без существенных изменений, но при 15 мг/кг статистически значимо снижалась ($p < 0,01$). Совокупность этих фактов свидетельствует о выраженном седативном компоненте действия клозапина, затрагивающем практически все аспекты активного поведения.

Помимо этого, у крыс возрастали показатели, отражающие груминговые и некоторые стереотипные формы поведения. Так, для груминга (параметр 5), интенсивного принюхивания (параметр 6) и вылизывания лап (параметр 7) регистрировался статистически значимый прирост, причем эффект проявлялся в двух дозах ($p < 0,01$). Таким образом, наряду с подавлением двигательной активности у животных усиливались стереотипные элементы поведения. Полученные результаты согласуются с известной способностью клозапина вызывать выраженную седацию и частичное смещение поведенческого фокуса к более монотонным актам груминга.

Соединение РУ-31 вызывало меньшие по выраженности и более избирательные поведенческие изменения по сравнению с клозапином. При дозе 10 мг/кг отчетливо снижались лишь некоторые ориентировочные показатели: вертикальные стойки (параметр 4) и быстрые повороты головы (параметр 8) ($p < 0,05$). При этом быстрая поступательная локомоция (параметр 1), повороты на месте (параметр 3) и другие аспекты подвижности существенно не отличались от контроля. Увеличение дозы РУ-31 до 20 мг/кг усиливало угнетение

локомоторных форм поведения: дополнительно снижались быстрая поступательная локомоция (параметр 1) и повороты на месте (параметр 3) ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно). Тем не менее даже при более высокой дозе спектр подавления двигательной активности оставался уже, чем у клозапина: короткие остановки (параметр 9), прерывистые мелкие перемещения (параметр 10), а также большинство других паттернов либо не изменялись вовсе, либо менялись статистически не значимо.

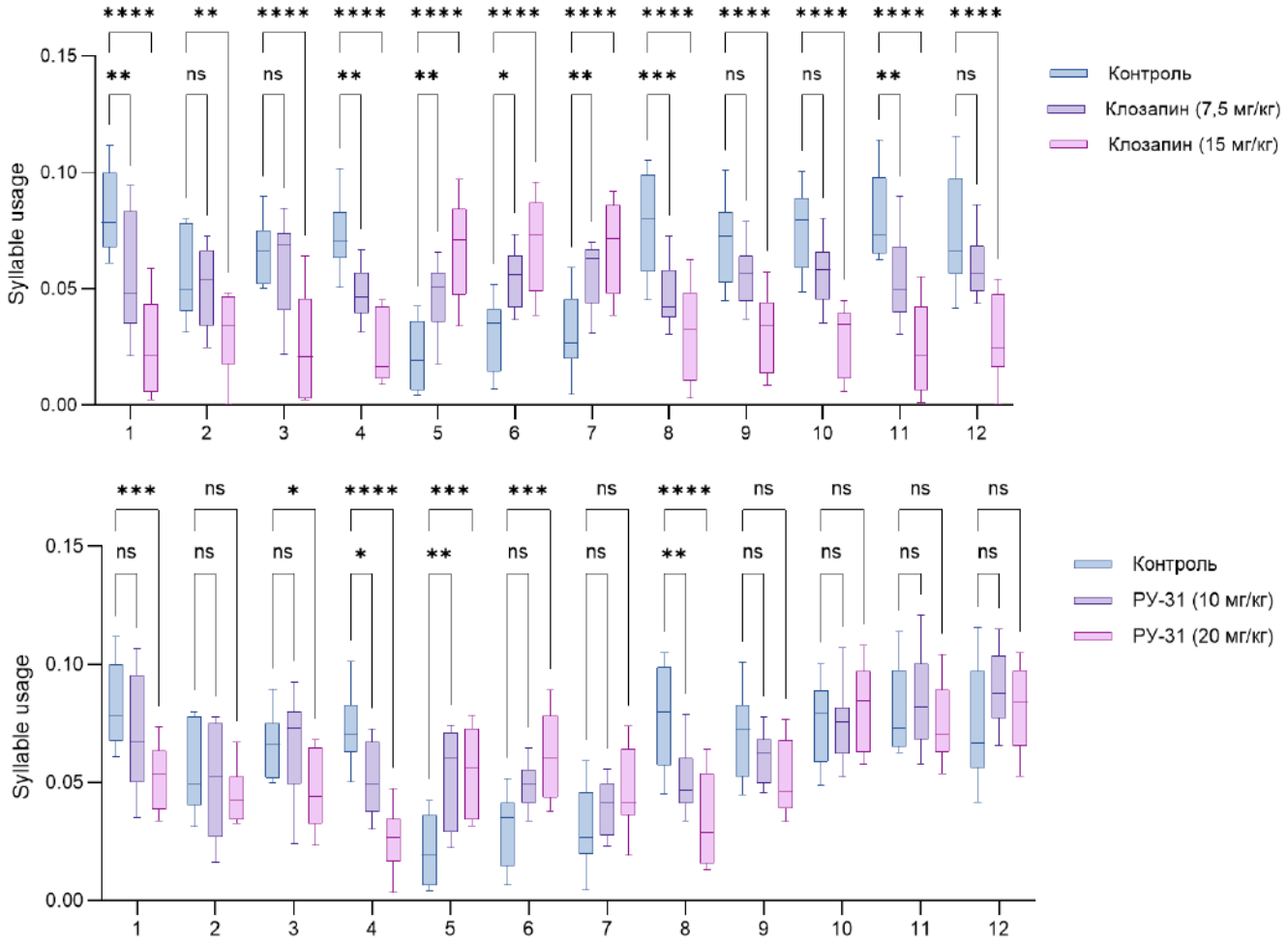


Рисунок 4.37 – Диаграммы частот встречаемости двенадцати элементарных поведенческих действий у здоровых крыс, получавших атипичный антипсихотик клозапин (7,5 или 15 мг/кг) или экспериментальное вещество РУ-31 (10 или 20 мг/кг)
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0$ 0001, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 9$).

Соединение РУ-31 повышало груминговые компоненты поведения (параметр 5) уже при 10 мг/кг ($p < 0,01$), причем эта реакция была даже более сильной, чем при низкой дозе клозапина. При 20 мг/кг дополнительно усиливалось интенсивное принюхивание (параметр 6) ($p < 0,001$), хотя эффект в целом оставался умеренным. Отсутствие выраженных изменений других «рутинных» паттернов (таких как вылизывание лап, параметр 7) при введении РУ-31 также указывает на более селективное действие этого вещества. В целом можно заключить, что

РУ-31 характеризуется менее глубоким седативным эффектом по сравнению с клозапином и в большей степени модулирует лишь отдельные аспекты поведения.

Сопоставление эффектов клозапина и вещества РУ-31 дает основание утверждать, что клозапин проявляет более широкий спектр депримирующего влияния на различные формы локомоции и ориентировочного поведения. При этом оба вещества усиливают груминговое поведение, что характерно для некоторых атипичных нейролептиков (Kang S. et al., 2020). Более благоприятный профиль у соединения РУ-31 согласуется с предположением о его меньшей способности вызывать двигательные расстройства и избыточную депрессию ЦНС, что подтверждает высокую перспективность данного соединения как более безопасного атипичного антипсихотика.

4.7. Оценка влияния соединения РУ-31 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием

В эксперименте оценивали влияние вещества РУ-31 и препарата сравнения клозапина на рабочую память в задаче спонтанного чередования в Т-образном лабиринте.

У животных, которым вводили соединение РУ-31 в более низкой дозе, отмечалось некоторое снижение процента чередований по сравнению с контролем, однако это изменение не достигало уровня статистической значимости. Напротив, при увеличении дозы РУ-31 до 20 мг/кг наблюдалось значительное уменьшение показателя рабочей памяти, что указывает на более выраженное негативное воздействие на когнитивные процессы при повышенной концентрации вещества ($p < 0,05$).

Анализ данных, полученных после введения клозапина, также выявил существенные различия в отношении его влияния на когнитивные функции. При введении менее высокой дозы клозапина спонтанная альтернация значительно снижалась, демонстрируя статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$). При удвоении дозы препарат оказывал более выраженное действие, приводя к резкому подавлению показателя спонтанного чередования ($p < 0,001$). Подобные результаты согласуются с данными литературы о том, что высокие дозы антипсихотических средств, к которым относится клозапин, могут значительно ослаблять рабочую память у экспериментальных животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о менее выраженном влиянии соединения РУ-31 на рабочую память в задаче спонтанного чередования по сравнению с классическим атипичным антипсихотиком клозапином. Эти данные важно учитывать при дальнейшем изучении фармакологических свойств РУ-31 и выборе терапевтического окна для соединения, а также при экстраполяции результатов на клинические исследования антипсихотических препаратов.

Таблица 4.8 – Влияние вещества РУ-31 (10 и 20 мг/кг, внутрибрюшинно) и клозапина (7,5 и 15 мг/кг, внутрибрюшинно) на рабочую память в тесте спонтанного чередования в Т-образном лабиринте

Группа (n = 10)	**Доза, мг/кг**	**%СЧ, Me [Q_1;Q_3]**
Контроль (растворитель)	–	73,15 [67,05;80,68]
РУ-31	10	57,15 [51,38;67,45]
РУ-31	20	53,60 [45,75;59,45]*
Клозапин	7,5	54,85 [44,15;61,83]*
Клозапин	15	28,95 [26,00;41,58]***

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна); *** – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

4.8. Заключение

Исследована антагонистическая активность серии производных бензимидазола в отношении рецепторов 5-HT_{2A}. Применение вычислительных методов (QSAR-моделирование, фармакофорный анализ, гибкий молекулярный докинг и молекулярная динамика) позволило установить основные структурно-функциональные закономерности связывания данных соединений с 5-HT_{2A} рецептором, определить энергетические параметры взаимодействия и выявить наиболее перспективные представители для дальнейших исследований. Полученные *in silico* результаты согласуются с данными *in vitro* и *in vivo*, что формирует надежную основу для дальнейшего направленного поиска и оптимизации структуры новых высокоаффинных лигандов в данном химическом классе.

Важной составляющей исследования стало сопоставление спектра фармакологических эффектов соединения РУ-31 с препаратами сравнения (галоперидолом и клозапином). Установлено, что вещество РУ-31 (10 мг/кг), как и клозапин (7,5 мг/кг), обладает выраженной 5-HT_{2A}-антагонистической активностью, в меньшей степени влияет на дофаминергические системы. Для соединения РУ-31 доказана способность ослаблять психопатологическую симптоматику в ряде экспериментальных моделей психотических расстройств (кетамин- и ЛПС-индуцированная модели психоза, неонатальное разрушение вентрального гиппокампа). Соединение эффективно снижало локомоторную гиперактивность, вызванную про-психотическими агентами, улучшало показатели социального взаимодействия и когнитивные функции (распознавание нового объекта, PPI, задача спонтанного чередования). Отсутствие выраженного постсинаптического антагонизма в отношении D_2-рецепторов подтверждается данными о влиянии соединения РУ-31 на галоперидоловую каталепсию,

апоморфин-индуцированную стереотипию и гиперактивность: в используемых дозах и условиях РУ-31 не вызывало выраженных экстрапирамидных побочных эффектов, характерных для типичных нейролептиков.

При исследовании воздействия соединения РУ-31 (350 мкг, и.ц.в.) на ГАМК-ергическую систему выявлено снижение судорожной активности, вызванной пикротоксином, а также отсутствие влияния на α_2-адренорецепторы при моделировании гипотермического ответа клонидина. Исследование мембранных токов отдельных нейронов продемонстрировало способность соединения РУ-31 уменьшать 5-НТ-индуцированные выходящие токи за счет специфического антагонизма к 5-HT_{2A} рецепторам. Нейрофизиологические эксперименты (исследование ЭКоГ-сигналов и локальных полевых потенциалов) показали, что вещество РУ-31, как и атипичные антипсихотики, вносит значительный вклад в модуляцию нейрональной активности в mPFC и гиппокампе, приводя к изменениям ключевых паттернов активности, связанных с действием кетамина или психопатологическими состояниями.

Анализ поведенческой активности посредством автоматизированных методов с компьютерным зрением свидетельствует, что вещество РУ-31 превосходит клозапин по безопасности (особенно в аспекте седативного действия), вызывая менее выраженное угнетение локомоции и ориентировочно-исследовательского поведения. В задаче Т-образного лабиринта показан более щадящий по сравнению с клозапином характер влияния на когнитивные параметры, что выражалось в сохранении функций рабочей памяти при использовании эффективных доз РУ-31.

Широкий спектр антипсихотической активности, благоприятный профиль безопасности, доказанная способность корректировать когнитивные нарушения и отсутствие экстрапирамидных симптомов подтверждают высокую ценность соединения РУ-31 для фармакотерапии психоневрологических заболеваний, ассоциированных с серотониновой дисфункцией.

ГЛАВА 5. ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

5.1. Исследование противосудорожной активности *in silico*

Современные подходы к поиску и оптимизации потенциальных лекарственных соединений все чаще опираются на методы молекулярного моделирования, позволяющие ускорить и удешевить процесс разработки новых препаратов. В контексте поиска эффективных противосудорожных средств особый интерес вызывают производные бензимидазола, показавшие перспективные результаты активности в отношении каппа-опиоидного рецептора. Целью настоящих исследований является комплексная оценка структурно-активностных взаимосвязей (QSAR), моделирование взаимодействия перспективных соединений с мишенью (докинг), а также углубленный анализ стабильности образующихся комплексов с помощью молекулярной динамики. Такой подход дает возможность выявить ключевые структурные элементы, необходимые для высокой аффинности к целевому рецептору, и обосновать потенциальный вклад каждого взаимодействия в формирование фармакологического ответа.

5.1.1. QSAR моделирование с построением ландшафта каппа-опиоидной активности

На начальном этапе исследования был проведен анализ взаимосвязи «структура-активность» для исходной библиотеки, включающей 4876 соединений с известной эффективной дозой. Для этой цели были построены карты структурно-активного сходства (SAS-карты), основанные на расчете коэффициентов Танимото с использованием молекулярных отпечатков ECFP4. Анализ распределения пар соединений на SAS-карте (рисунок 5.1) выявил высокую плотность данных в квадранте II, который соответствует парам структурно близких соединений с незначительной разницей в активности. Это указывает на наличие в датасете областей с плавным, непрерывным SAR, что является предпосылкой для успешного построения QSAR-моделей. Присутствие данных в квадранте III свидетельствует о наличии «активностных обрывов», когда минимальные структурные модификации приводят к резкому изменению активности. Сходное распределение данных для тестовой выборки (рисунок 5.1, слева) подтверждает ее репрезентативность по отношению ко всему набору данных.

Для построения прогностической модели и повышения ее робастности из исходной библиотеки была сформирована выборка из 3865 соединений. Отбор производился с целью минимизации влияния «активностных обрывов» и формирования набора данных с более гомогенным и непрерывным градиентом биологической активности. Химическое пространство этой выборки было визуализировано путем построения ландшафта каппа-опиоидной активности (рисунок 5.2). Данный ландшафт представляет собой двумерную проекцию

многомерного пространства химических структур (полученную методом MDS на основе сходства ECFP4), где третья ось (Z) соответствует нормализованной активности (pEC50). Сложный рельеф поверхности с множественными пиками и провалами наглядно иллюстрирует гетерогенность SAR, указывая на существование множества различных структурных кластеров, ассоциированных как с высокой, так и с низкой агонистической активностью.

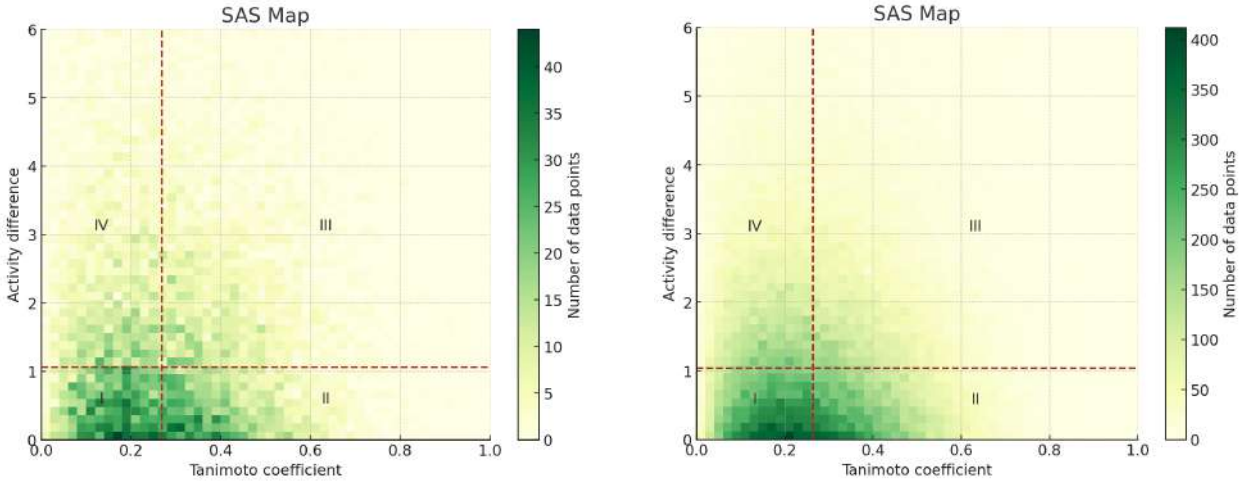


Рисунок 5.1 – SAS-карта (Structure-Activity Similarity Map) для библиотеки 4876 соединений с известной активностью в отношении каппа-опиоидного рецептора. На SAS-карте выделены четыре квадранта: I – соответствует области скаффолд-хоппинга (низкое структурное сходство и низкая разница в активности); II – область плавного изменения SAR (высокое структурное сходство и низкая разница в активности); III – включает активностные обрывы (высокое структурное сходство и высокая разница в активности); IV – представляет область неопределенности (низкое структурное сходство и высокая разница в активности). Справа – карта для всех пар соединений. Слева – карта для пар соединений тестовой выборки. Пунктирными линиями обозначены медианные значения

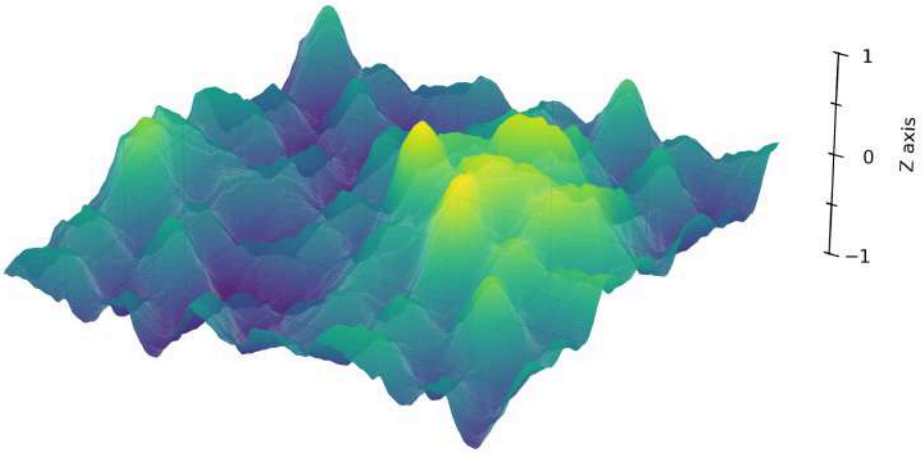


Рисунок 5.2 – Ландшафт каппа-опиоидной активности для 3865 соединений итогового датасета. Для визуализации использовались молекулярные отпечатки ECFP4, на основании которых рассчитаны парные коэффициенты сходства Танимото между всеми соединениями с последующим построением химического пространства при помощи метода многомерного шкалирования (MDS). Активность вещества (нормализованные значения pEC50, масштабированные в [−1,1]) представлена по оси Z

На основе отобранного набора данных была разработана и валидирована QSAR-модель для прогнозирования каппа-агонистической активности с использованием алгоритма случайного леса (Random Forest). Коэффициент детерминации (R^2) составил 0,842 для валидационной выборки и 0,824 для независимой тестовой выборки. Соответствующие значения среднеквадратичной ошибки (RMSE) составили 0,126 и 0,150. Высокие значения R^2 в сочетании с низкими значениями RMSE, а также их близость для валидационного и тестового наборов свидетельствуют о высокой точности, робастности и хорошей обобщающей способности разработанной модели, что подтверждает ее применимость для виртуального скрининга и направленного дизайна новых потенциальных лигандов каппа-опиоидных рецепторов.

Таблица 5.1 – Оценка производительности QSAR модели на основе алгоритма Random forest на валидационных и тестовых данных

Фолд	**R^2 (валидация)**	**RMSE (валидация)**	**R^2 (тест)**	**RMSE (тест)**
1	0,85	0,12	0,83	0,15
2	0,82	0,14	0,8	0,18
3	0,87	0,11	0,86	0,12
4	0,84	0,13	0,81	0,16
5	0,83	0,13	0,82	0,14
Средний	0,842	0,126	0,824	0,15

Полученная QSAR-модель была применена для *in silico* прогнозирования активности новой серии галогенфенилзамещенных производных бензимидазола. Данные соединения были получены в ходе направленного синтеза в НИИ ФОХ ЮФУ в рамках работы по поиску более эффективных структурных аналогов соединения-лидера РУ-1205. С использованием построенной модели, а также дополнительных инструментов для синтезированных веществ был выполнен расчет каппа-агонистической активности и ключевых физико-химических свойств, результаты которого представлены на рисунке 5.3. На основании комплексного анализа прогностических данных в качестве наиболее перспективных кандидатов для дальнейшего экспериментального изучения были отобраны три соединения с лабораторными шифрами BIF-70, BIF-72 и BIF-74.

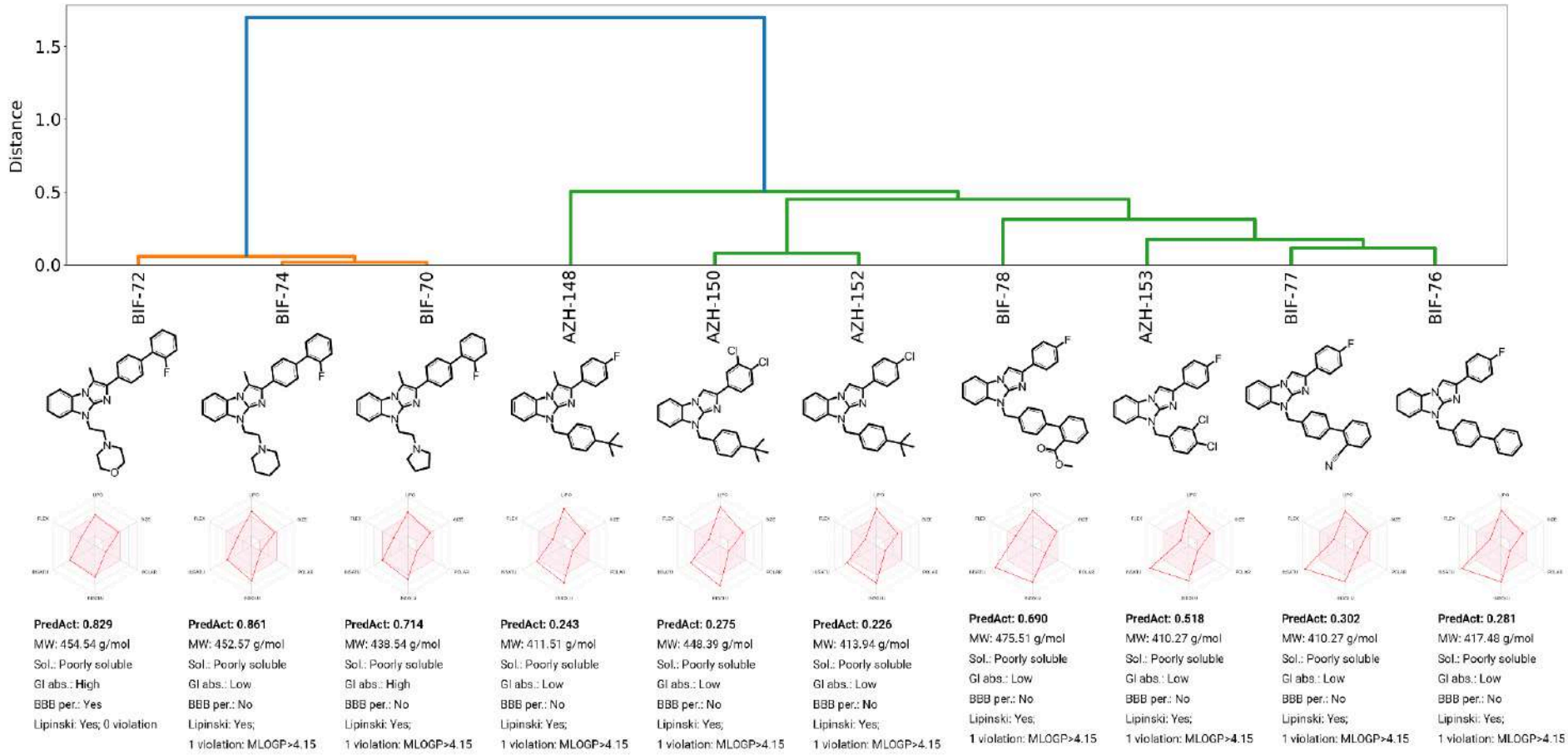


Рисунок 5.3 – Кластеризация выборки галогенфенилзамещенных производных бензимидазола и прогнозные оценки для каждого соединения
Примечание: PredAct - прогнозный уровень активности; MW - молекулярная масса; Sol. - растворимость; GI abs. - абсорбция в ЖКТ; BBB per. - проницаемость через ГЭБ.

5.1.2. Гибкий молекулярный докинг

В ходе исследования взаимодействия перспективных производных бензимидазола с каппа-опиоидным рецептором методом Induced Fit Docking были получены значения «docking score» (таблица 5.2), отражающие различную степень аффинности исследуемых соединений к рецептору. Среди протестированных соединений наиболее низкий показатель «docking score» был зафиксирован для BIF-72 (−9,230), что свидетельствует о его наивысшем прогнозируемом сродстве к рецептору. Анализ взаимодействий BIF-70 и BIF-72 выявил образование солевого мостика с аминокислотным остатком ASP138 и π-стэкинга с остатком TYR139. В то же время для соединения BIF-74 наблюдался существенно более высокий «docking score» и формирование π-π-связи с TYR139.

Важно отметить, что согласно литературным данным, классические агонисты каппа-опиоидного рецептора, буторфанол и U-50488, также образуют солевой мостик с ASP138 (Zaidi S.A., 2022). При этом, для буторфанола характерно образование π-π-стэкинга с TYR320 (Ji G., 2020), а для U-50488 – π-стэкинга с TYR312 (Laus A. et al., 2023). Полученные данные позволяют предположить, что образование солевого мостика с ASP138 является необходимым, но недостаточным условием для проявления агонистической активности в отношении каппа-опиоидного рецептора. Усиление аффинности, вероятно, достигается за счет π-стэкинга с тирозиновыми остатками, в то время как π-π-стэкинг может вносить меньший вклад в исследуемую активность.

Для дальнейшего углубленного изучения были отобраны соединения BIF-70 и BIF-72, что обусловлено их более низкими значениями «docking score» и совпадением типа формируемых ключевых взаимодействий с рецептором.

Таблица 5.2 – Результаты расчета значений «docking score» для изучаемых и референсных соединений, а также типы взаимодействия с аминокислотными остатками каппа-опиоидного рецептора

Шифр	**Docking score**	**Солевой мостик**	**π-стэкинг**	**π-π-стэкинг**
BIF-70	−9,015	ASP138	TYR139	−
BIF-72	−9,23	ASP138	TYR139	−
BIF-74	−7,7	−	−	TYR139
Буторфанол	−9,2	ASP138	−	TYR320
U-50488	−7,8	ASP138	TYR312	−

5.1.3. Молекулярная динамика

На графиках (рисунки 5.4 и 5.5) представлены результаты молекулярной динамики двух комплексов каппа-опиоидного рецептора с производными бензимидазола, демонстрирующими наилучший «docking score». RMSD белка (Cα) достигает значений 3,5–4,0 Å с последующей стабилизацией после 50 нс симуляции. RMSD лиганда также стабилизируется в диапазоне 2,5–3,0 Å после 50 нс. Данные показатели свидетельствуют о достижении устойчивого состояния как белком, так и лигандом, которое сохраняется на протяжении всей симуляции.

Анализ второго комплекса показал аналогичную динамику RMSD белка (Cα) со стабилизацией в пределах 3,5–4,0 Å после 50 нс, в то время как RMSD лиганда стабилизируется в более широком диапазоне 2,5–4,0 Å.

При сравнении комплексов наблюдаются схожие траектории RMSD, что, вероятно, указывает на аналогичный характер взаимодействия различных производных бензимидазола при связывании с рецептором.

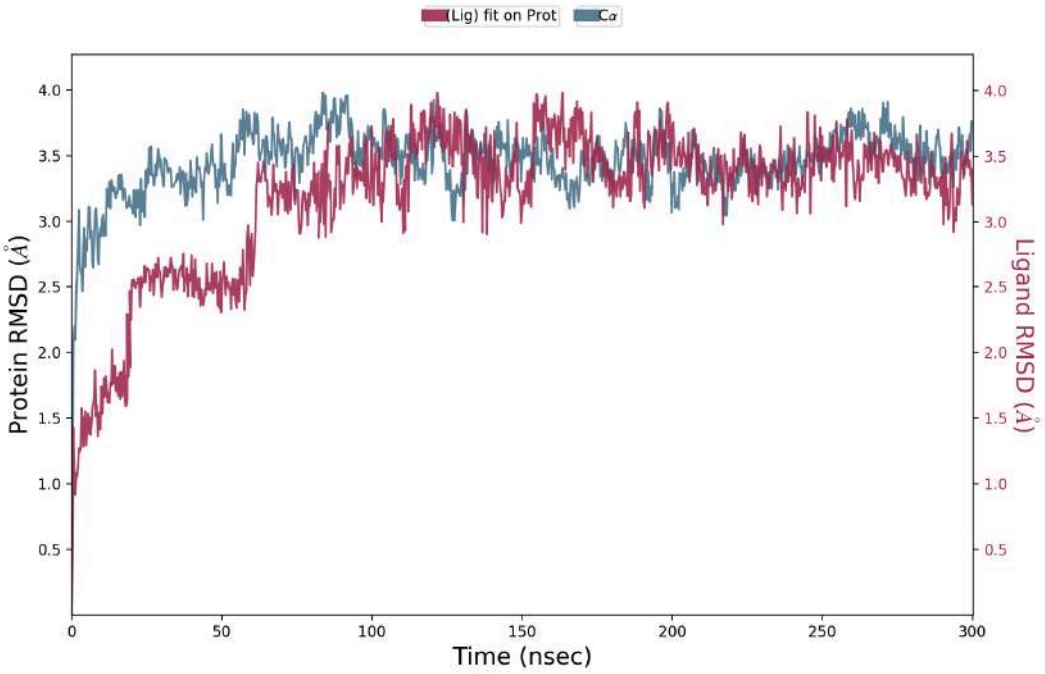


Рисунок 5.4 – График, отражающий изменение RMSD белка и лиганда во времени при моделировании молекулярной динамики комплекса каппа-опиоидного рецептора и соединения BIF-70

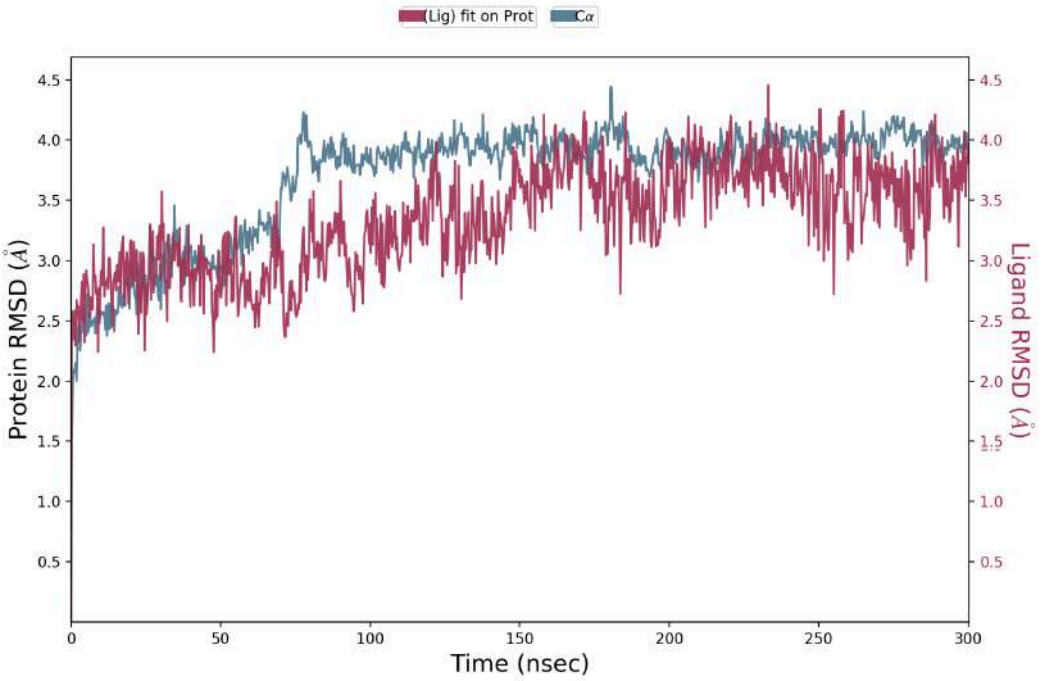


Рисунок 5.5 – График, отражающий изменение RMSD белка и лиганда во времени при моделировании молекулярной динамики комплекса каппа-опиоидного рецептора и соединения BIF-72

5.2. Биопотенциал-опосредованная оценка противосудорожной активности новых соединений

Для оценки сходства эффектов исследуемых веществ с эффектами известных противосудорожных и проконвульсивных средств проведен анализ электрокортикограмм с помощью автоэнкодера на основе сверточных нейронных сетей, получавшего на вход сигналы, зарегистрированные после введения различных проконвульсивных и антиконвульсивных средств, а также экспериментальных соединений (рисунок 5.6).

Валидность модели оценивалась полносвязным слоем-классификатором параметров бутылочного горлышка методом 5-кратной кросс-валидации. Средняя точность распознавания для 11 классов составила 0,631 ± 0,024. Полученная точность классификации была равномерно распределена между классами и значительно превышала показатель случайного классификатора, который составил 0,091 ± 0,045 для 11 препаратов ($p < 0,0001$).

В результате исследования были получены данные о степени сходства фармакологического действия различных препаратов на биоэлектрическую активность мозга крыс, что позволило выявить как группы однотипных лекарственных средств, так и препараты с уникальными эффектами. Высокий коэффициент сходства между коразолом и пикротоксином (0,9) указывает на аналогичные механизмы действия этих веществ. Оба вещества относятся к проконвульсантам, блокирующим ГАМК-рецепторы, что объясняет их близкое влияние на биоэлектрическую активность мозга. Пилокарпин и ареколин также обладают высокой

степенью сходства (0,8), что согласуется с их общим холиномиметическим действием. Описанные четыре кластера формируют хорошо обособленный суперкластер проконвульсантов.

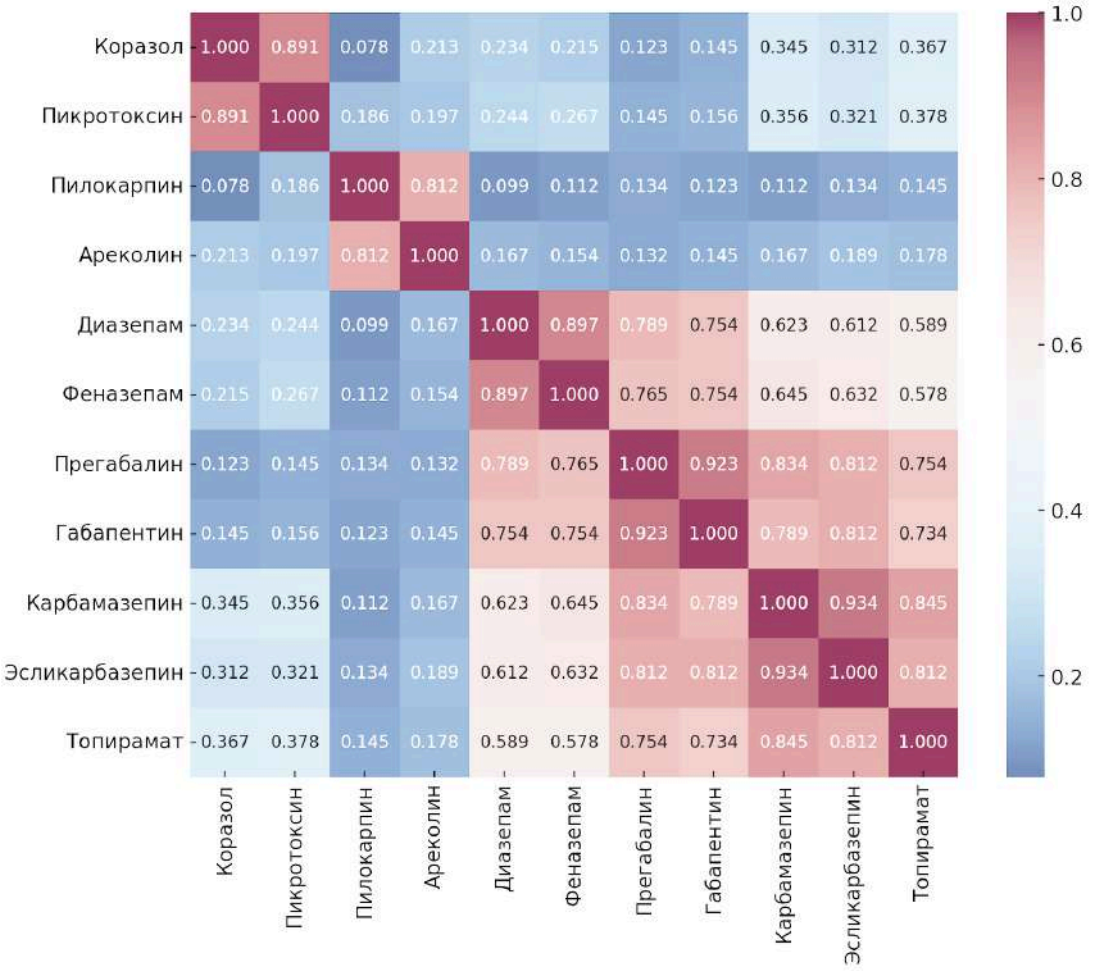


Рисунок 5.6 – Относительная близость кластеров ЭКоГ-сигналов в параметрическом пространстве. Коэффициенты сходства безразмерны, относительны и вычисляются как расстояния между кластерами в 80-мерном пространстве бутылочного горлышка автоэнкодера

Отдельного внимания заслуживает группа противоэпилептических препаратов, включающая диазепам, феназепам, прегабалин, габапентин, карбамазепин, эсликарбазепин и топирамат. Эта группа объединена общей направленностью действия, связанной с подавлением избыточной нейронной активности. Особенно высокое сходство отмечается между диазепамом и феназепамом (0,9), а также между прегабалином и габапентином (0,9), что обусловлено их принадлежностью к одним фармакологическим группам – бензодиазепинам и габапентиноидам соответственно. Карбамазепин и эсликарбазепин имеют высокую степень сходства (0,9), поскольку эсликарбазепин является активным метаболитом карбамазепина. Необходимо отметить, что топирамат, хотя и проявил значительное сходство с другими противоэпилептическими препаратами, имеет более низкие коэффициенты, в основе чего может лежать его уникальный фармакологический профиль. Важно подчеркнуть, что вещества с

различными механизмами действия, такие как коразол и диазепам, демонстрируют низкую степень сходства (0,2), что подтверждает специфичность использованного метода.

В целом, полученные результаты хорошо отражают известные фармакологические свойства препаратов и предоставляют ценную информацию о сходстве их влияния на биоэлектрическую активность мозга крыс. Эти данные могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов действия лекарственных средств и разработки новых терапевтических агентов.

При анализе данных, полученных для бифенилпроизводных бензимидазола BIF-72 и BIF-70, были рассчитаны значения сходства, которые отражены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Оценка сходства изменений биоэлектрической активности мозга на фоне действия соединений BIF-70, BIF-72 по сравнению с различными психотропными средствами с антиконвульсивной и проконвульсивной активностью

Вещество сравнения	**BIF-72**	**BIF-70**	**Растворитель**
Коразол	0,167	0,488	0,467
Пикротоксин	0,145	0,497	0,465
Пилокарпин	0,178	0,492	0,517
Ареколин	0,186	0,516	0,454
Диазепам	0,643	0,546	0,535
Феназепам	0,675	0,442	0,511
Прегабалин	0,756	0,526	0,474
Габапентин	0,714	0,472	0,496
Карбамазепин	0,721	0,46	0,503
Эсликарбазепин	0,758	0,49	0,441
Топирамат	0,847	0,51	0,447

Для соединения BIF-72 отмечается смещение параметров сигнала в сторону веществ с противосудорожной активностью, установлено наиболее высокое сходство с топираматом (0,847). При этом сигналы, ассоциированные с введением соединения BIF-70 и физиологического раствора, имеют приблизительно равноудаленную позицию в пространстве признаков по отношению как к проконвульсивным, так и противосудорожным веществам, что может говорить об отсутствии значимого влияния на возбудимость центральной нервной системы.

5.3. Изучение механизма действия активных соединений на модели активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния[3]

Для верификации полученных прогнозов была выполнена экспериментальная оценка каппа-агонистической активности всей выборки веществ (таблица 5.4). Только 5 соединений оказались растворимы в воде с ДМСО, два из которых BIF-72 и BIF-74, проявили норбиналторфимин-обратимое действие на активацию тромбоцитов. Соединения BIF-74 и BIF-78, несмотря на высокую активность в тесте *in vitro*, оказались недостаточно растворимыми для исследований *in vivo*, из-за чего были исключены из дальнейших экспериментов. Для дальнейшего изучения выбраны вещества BIF-70 и BIF-72.

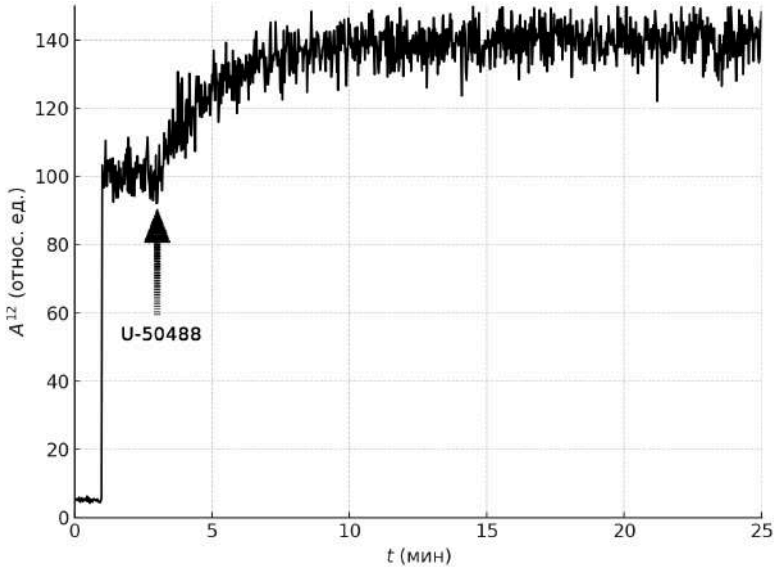


Рисунок 5.7 – Влияние эталонного каппа-опиоидного агониста U-50488 (10^{-4} М) на функциональную активность тромбоцитов в контроле

Таблица 5.4 – Влияние соединений экспериментальной выборки и U-50488 в скрининговой концентрации (10^{-4} М) на активацию тромбоцитов кролика (каппа-опиоидная агонистическая активность), Δ %

Шифр	**Активация тромбоцитов, Δ%**	**Активация тромбоцитов на фоне norBNI Δ%**
BIF-70	26,8 (23,5–30,1)	27,2 (23,2–31,3)
BIF-72	33,3 (25,3–41,3)	22,3 (19,21–25,24)
BIF-74	71,1 (66,5–75,7)	45,9 (35,8–56,1)
BIF-78	29,7 (26,9–32,5)	27,5 (25,4–30,2)
AZH-159	8,1 (4,9–11,2)	7,5 (3,9–10,3)

[3] Выражается благодарность доценту кафедры фармакологии и биоинформатики к.м.н. Н. В. Елисеевой за помощь в проведении исследований.

AZH-148	не растворим	–
AZH-150	не растворим	–
AZH-152	не растворим	–
AZH-153	не растворим	–
BIF-76	не растворим	–
BIF-77	не растворим	–
U-50488	22,8 (20,4–23,7)	8,6 (7,1–10,1)

Примечание: вещества растворяли в ДМСО с водой в соотношении 1:10.

5.4. Оценка противосудорожной активности соединений BIF-70 и BIF-72 в скрининговых тестах

5.4.1. Максимальный электрошок

Развитие тонических судорог наблюдалось у всех животных. Длительность судорог приводится на рисунке 5.8. Выживаемость после МЭШ представлена на рисунке 5.9. В контрольной группе медианная длительность судорог составила 14,5 [12,25;20,0] с, а выживаемость была на уровне 16,67%. Карбамазепин в дозе 20 мг/кг в 2,5 раза снижал длительность судорог ($p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллиса), что указывает на выраженную противосудорожную активность. При этом выживаемость в этой группе достигала 75% ($p < 0,05$ по точному тесту Фишера), что подтверждает высокую эффективность карбамазепина в данном тесте.

Соединение BIF-70 в дозе 20 мг/кг не приводило к изменению длительности судорог (17,0 [11,0;20,25] с) и сохраняло выживаемость на уровне 33,33%. Соединение BIF-72 также не снижало статистически значимо длительности судорог (17,5 [13,25;21,75] с), однако существенно повышало выживаемость животных до 66,67% ($p < 0,05$ по точному тесту Фишера), что может свидетельствовать о наличии нейропротекторного эффекта.

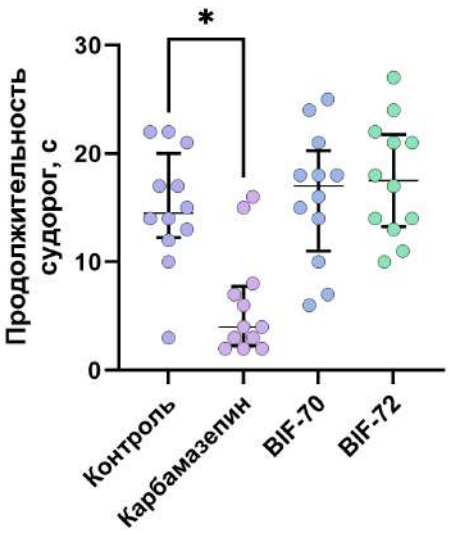


Рисунок 5.8 – Сравнение продолжительности судорог на фоне введения соединений BIF-70 (20 мг/кг), BIF-72 (20 мг/кг) и препарата сравнения карбамазепина в дозе 20 мг/кг
Примечание: * - различия статистически значимы относительно группы контроля (критерий Краскела-Уоллиса, $p < 0,05$). Данные представлены как Me(IQR), n = 12.

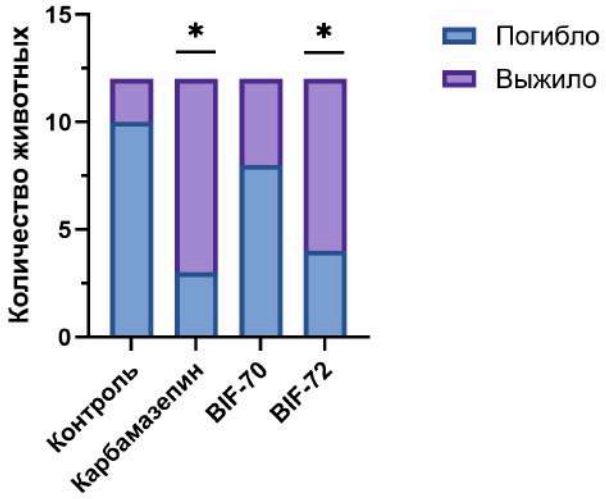


Рисунок 5.9 – Количество выживших животных на фоне введения соединений BIF-70 (20 мг/кг), BIF-72 (20 мг/кг) и препарата сравнения карбамазепина в дозе 20 мг/кг
Примечание: * - различия статистически значимы относительно группы контроля (точный тест Фишера, $p < 0,05$).

5.4.2. Коразоловые судороги

В тесте коразоловых судорог диазепам в дозе 1 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении статистически значимо увеличивал латентный период развития миоклонуса в 12,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой и полностью предотвращал развитие клонических и тонических судорог. Соединение BIF-70 (20 мг/кг) не оказывало значимого влияния на время до начала миоклонических и клонических судорог, период развития тонических судорог увеличивался в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с

контрольной группой. Соединение BIF-72 (20 мг/кг) также не влияло на ЛП миоклонуса и клонических судорог, но значительно увеличивало продолжительность развития тонических судорог в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Влияние диазепама (1 мг/кг), соединений BIF-70 (20 мг/кг) и BIF-72 (20 мг/кг) на развитие судорог в тесте с коразолом (75 мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении (M ± SEM)

Группа (n = 8)	**Латентный период развития миоклонуса, с**	**Латентный период развития клонических судорог, с**	**Латентный период развития тонических судорог, с**
Контроль	34,38 ± 2,195	74,88 ± 2,460	156,4 ± 5,967
Диазепам (1 мг/кг)	443,1 ± 61,9*	–	–
BIF-70 (20 мг/кг)	43,75 ± 2,864	66,00 ± 4,583	224,1 ± 22,67*
BIF-72 (20 мг/кг)	37,25 ± 2,950	68,50 ± 7,051	229,5 ± 13,07*

Примечание: * – различия статистически значимы по отношению к группе контроля (one-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета, $p < 0,05$).

5.5. Изучение спектра противосудорожной активности соединения BIF-72

5.5.1. Влияние соединения на фокальные судороги, вызванные пенициллином

В исследовании оценивали влияние карбамазепина и бифенилпроизводного бензимидазола BIF-72 на фокальную эпилептическую активность, вызванную аппликацией пенициллина на кору головного мозга крыс (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Влияние карбамазепина (10 мг/кг) и BIF-72 (20 мг/кг) на фокальную эпилептическую активность, вызванную аппликацией пенициллина на кору головного мозга крыс (M ± SEM)

Группа (n = 8)	**ЛП ИИР, мин**	**ЛП ИР, мин**	**ИР за время существования очага**	**Средняя длительность ИР, с**	**ДСО, мин**
Контроль	4,45 ± 1,22	9,12 ± 1,31	38,53 ± 4,28	17,75 ± 2,43	112,37 ± 4,54
Карбамазепин	7,83 ± 1,45*	15,67 ± 1,89*	24,91 ± 3,76*	11,32 ± 2,08*	89,65 ± 3,21*
BIF-72	4,34 ± 1,35	9,14 ± 1,35	35,42 ± 4,24	16,43 ± 2,63	105,11 ± 4,56

Примечание: * – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета).
Расшифровка сокращений: ЛП – латентный период; ИИР – интериктальный разряд; ИР – иктальный разряд; ДСО – длительность существования очага эпилептической активности.

Карбамазепин (10 мг/кг) вызывал увеличение латентного периода как для интериктальных разрядов, так и для иктальных разрядов по сравнению с контрольной группой

($p < 0,05$). Также наблюдалось значительное снижение числа иктальных разрядов за время существования очага и их средней продолжительности ($p < 0,05$). Длительность существования очага эпилептической активности была существенно снижена по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Соединение BIF-72 (20 мг/кг) проявило слабое антиэпилептиформное действие. Латентный период интериктальных и иктальных разрядов, а также количество и средняя длительность иктальных разрядов оставались на уровне значений группы контроля. Наблюдалось некоторое уменьшение длительности существования очага эпилептической активности, хотя это изменение не было статистически значимым.

Таким образом, карбамазепин продемонстрировал выраженное противосудорожное действие, тогда как вещество BIF-72 не оказало значительного влияния на фокальную эпилептическую активность, вызванную пенициллином. Результаты указывают на необходимость дальнейших исследований для оценки потенциала соединения BIF-72.

5.5.2. Изучение противоэпилептической активности соединения на модели эпилептогенеза со спонтанными рецидивирующими судорогами, вызванными пилокарпином

В исследовании оценивалось влияние противосудорожных веществ на развитие спонтанных рецидивирующих судорог (СРС) у крыс, перенесших эпилептический статус (ЭС). В качестве лечения животные получали ГАМК-ергическое средство диазепам, топирамат (мультитаргетное противосудорожное средство, модифицирующее течение эпилепсии) и экспериментальное соединение BIF-72. Мониторинг СРС проводился ежедневно в течение 4 недель.

На графике (рисунок 5.10) показан прирост судорожных событий по дням для каждой группы. В контрольной группе (получавшей физиологический раствор) наблюдалось значительное увеличение числа судорог с 12 дня. После 16 дня динамика прироста принимала линейный характер и сохранялась на протяжении всего периода наблюдения. В группе, получавшей диазепам, наблюдалось более раннее ($p < 0,05$; рисунок 5.11) и интенсивное развитие судорожной активности, что может быть связано с симптомом рикошета, развившимся после отмены препарата на 7-й день наблюдения. Топирамат и экспериментальное вещество BIF-72 статистически значимо сокращали частоту судорог. При этом значимое сокращение продолжительности судорог вызывал только топирамат ($p < 0,05$; рисунок 5.12).

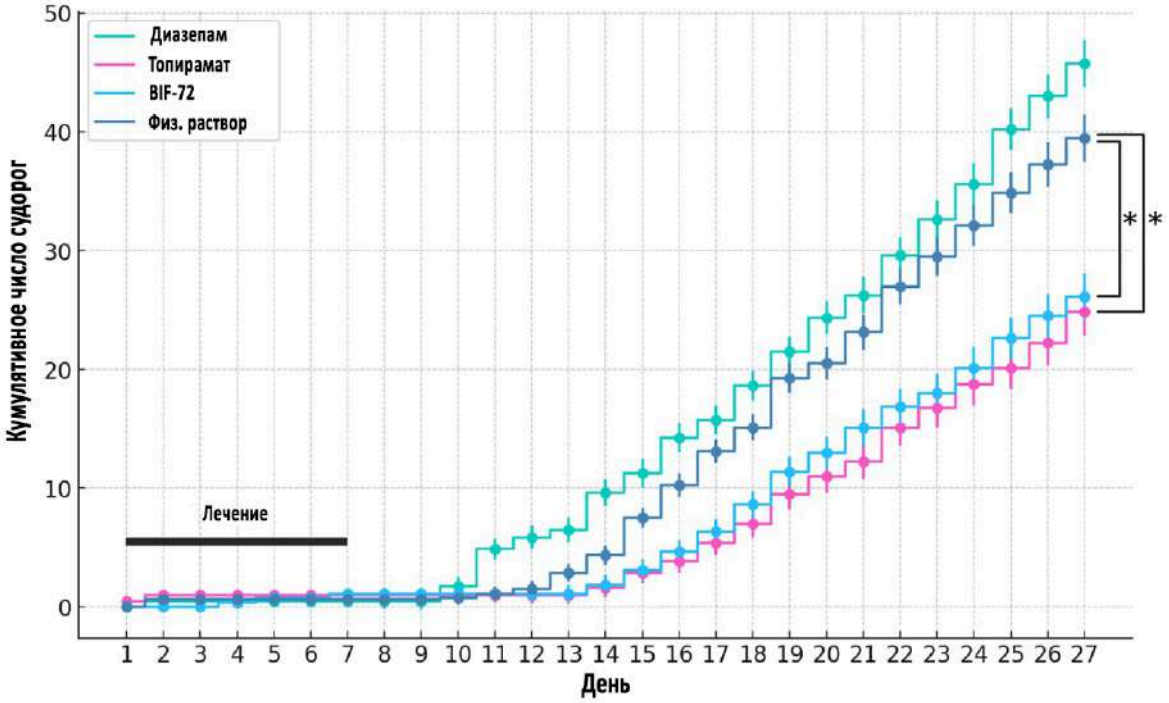


Рисунок 5.10 – Кумулятивный график прироста судорожной активности (4 и 5 степени тяжести по шкале Racine) под влиянием диазепама (2 мг/кг), топирамата (30 мг/кг) или соединения BIF-72 (20 мг/кг) в модели спонтанных рецидивирующих судорог, вызванных пилокарпином (320 мг/кг) у крыс. Данные отражены как M ± SEM

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета).

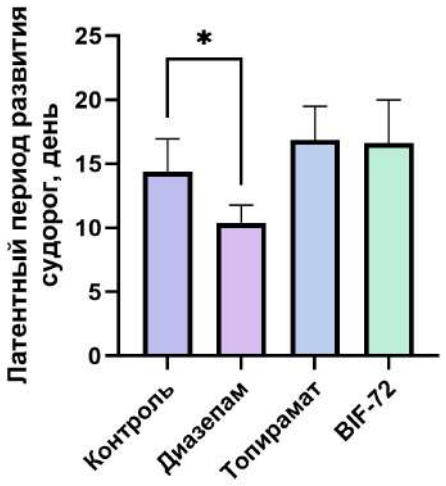


Рисунок 5.11 – Влияние диазепама (2 мг/кг), топирамата (30 мг/кг) или соединения BIF-72 (20 мг/кг) на латентный период развития судорог (4 и 5 степени тяжести по шкале Racine) в модели хронических рецидивирующих судорог, вызванных пилокарпином (320 мг/кг), M ± SEM.

Примечание: * – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета).

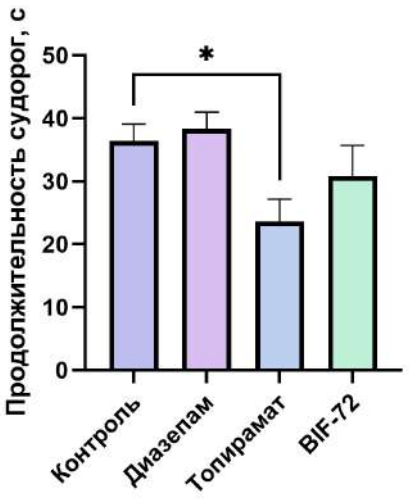


Рисунок 5.12 – Влияние диазепама (2 мг/кг), топирамата (30 мг/кг) или соединения BIF-72 (20 мг/кг) на среднюю продолжительность судорог (4 и 5 степени тяжести по шкале Racine) в модели хронических рецидивирующих судорог, вызванных пилокарпином (320 мг/кг), M ± SEM
Примечание: * – различия статистически значимы относительно группы контроля ($p < 0,05$, one-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета).

В исследовании топирамат продемонстрировал нейропротекторный и антиэпилептогенный эффект, что подтверждается значительным уменьшением числа животных, у которых развивались спонтанные судороги после отмены лечения. Это указывает на потенциальное влияние на процессы, связанные не только с изменением нейровозбудимости, но и предотвращением гибели нейронов в результате нейровоспаления и запуска иных патологических каскадов, что наблюдается в первые дни после ЭС. Напротив, диазепам, являясь классическим ГАМК-ергическим препаратом, продемонстрировал выраженное снижение судорожной активности на ранних этапах эксперимента. Однако его отмена приводила к увеличению частоты судорог в последующий период.

Таким образом, модифицирующие эффекты топирамата и соединения BIF-72 выражались в значительном сокращении частоты и/или продолжительности СРС в отсутствие лечения, что свидетельствует о способности воздействовать на механизмы, лежащие в основе хронификации эпилепсии.

5.5.3. Изучение противоэпилептической активности соединения на модели эпилептогенеза, методом коразолового киндлинга

В группе контроля на модели киндлинга судорожная активность прогредиентно нарастала и достигала максимума к 17-му дню на уровне 4,56 баллов. Затем кривая судорожной активности выходила на плато и сохранялась на протяжении эксперимента до 31-го дня. У 44% животных наблюдался генерализованный судорожный синдром с потерей постурального контроля и утратой рефлекса переворачивания, тонические судороги с последующей гибелью,

что соответствует 5 баллам. В 22% случаев у животных регистрировались «барабанный бой», «дикий бег», оцениваемые в 4 балла. У 33% животных зафиксированы серийные подергивания всего тела, симптом Штраубе, что соответствует 2 и 3 баллам по шкале судорожной активности (рисунок 5.13).

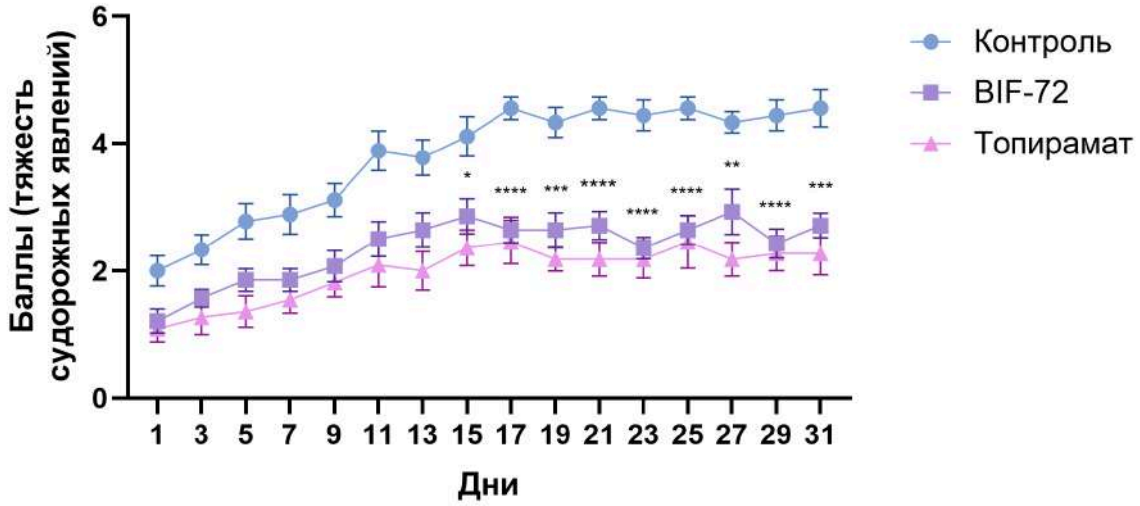


Рисунок 5.13 – Влияние соединения BIF-72 (20 мг/кг) и топирамата (30 мг/кг) на развитие судорожного синдрома на модели киндлинг-прогрессии
Примечание: данные представлены в виде M ± SEM. Различия статистически значимы в сравнении с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0$ 0001, two-way ANOVA апостериорным тестом Даннета.

Соединение BIF-72 (20 мг/кг, в/б) статистически значимо снижало тяжесть судорожных явлений по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), препятствуя развитию киндлинга, а также существенно предотвращало гибель животных на протяжении всего эксперимента (таблица 5.7). При этом общий уровень судорожной активности не превышал 2.5 балла, что преимущественно проявлялось миоклоническими подергиваниями и оживленным поведением животных.

Топирамат (30 мг/кг, в/б) также проявил высокую противосудорожную активность, равную с соединением BIF-72 (статистически значимые различия отсутствовали).

В группе животных, получавших соединение BIF-72, гибель была на 7% ниже по сравнению с группой, получавшей топирамат, и на 34% ниже по сравнению с группой негативного контроля.

Таблица 5.7 – Влияние соединения BIF-72 (20 мг/кг) и топирамата (30 мг/кг) на выживаемость крыс к 31 дню киндлинга

Вещество	**Выживаемость (абс.)**	**Выживаемость %**
Коразол + растворитель	8/15	53,33
Коразол + топирамат	12/15	80,00*
Коразол + BIF-72	13/15	86,67*

Примечание: * - $p < 0,05$ по критерию χ^2-квадрат по сравнению с контролем.

Соединение BIF-72 показало высокую эффективность на киндлинг-модели судорог, вызванных коразолом. Изучаемое вещество значительно сокращало тяжесть судорожных проявлений и гибель животных.

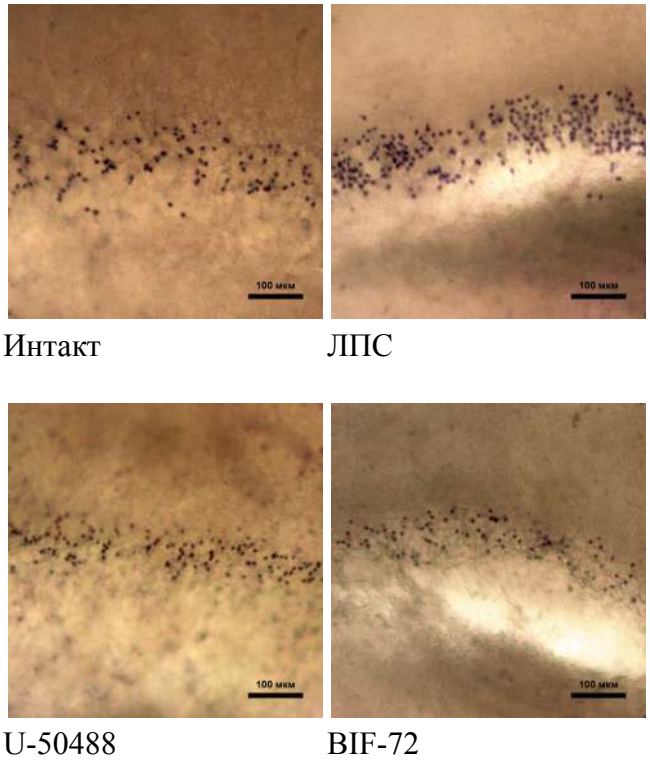
5.6. Нейропротективные и противовоспалительные свойства соединения BIF-72

5.6.1. Изучение нейропротективных свойств соединения на модели нейровоспаления, вызванного ЛПС, на срезах мозга

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил значительные различия в уровнях выживаемости нейронов между группами, $F_{(3,16)} = 13,74$, $p < 0,005$. *Post hoc* анализ с использованием теста Даннета по отношению к группе ЛПС показал статистически значимое повышение выживаемости нейронов после применения соединения U-50488 ($p < 0,005$) и BIF-72 ($p < 0,05$), как представлено на рисунке 5.14.

В модели нейровоспаления, вызванного липополисахаридом, вещество BIF-72 проявило статистически значимый нейропротективный эффект, увеличивая выживаемость нейронов гиппокампа в условиях воспалительного процесса, что особенно актуально при эпилептических приступах. Полученные данные дополнительно подтверждают перспективность использования BIF-72 в качестве болезнь-модифицирующей терапии, а также служат основанием для более углубленного изучения вещества на предмет наличия способности предотвращать нейродегенерацию, связанную с воспалением.

А **Б**



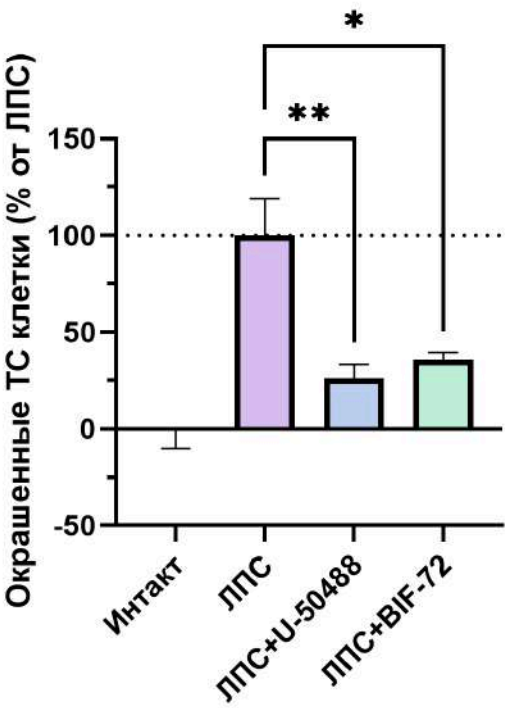


Рисунок 5.14 – Нейропротективные эффекты соединений на срезах мозга гиппокампа крыс. (А) Репрезентативные изображения с окрашиванием трипановым синим (ТС). (Б) График отражает уровни ЛПС-индуцированной гибели нейронов при обработке соединением BIF-72 (* – $p < 0,05$) и U-50488 (** – $p < 0,005$) по сравнению с ЛПС-контролем. Данные представлены как M ± SEM

5.6.2. Изучение нейропротективных свойств соединения на модели обратимой окклюзии средней мозговой артерии

Оценка влияния соединения BIF-72 на неврологический дефицит

При оценке степени выраженности неврологического дефицита через 24 часа после моделирования ишемии-реперфузии (ИР) в контрольной группе было выявлено угнетение двигательной активности (рисунок 5.15). Совокупный балл, рассчитанный как среднее значение по тестам данной категории (таблица 2.4), в контрольной группе был статистически значимо ниже (1,00 [0,08;2,00]) по сравнению с показателями интактной группы (3,00 [3,00;3,00]; $p < 0,01$). Соединение U-50488 оказывало нейропротекторное действие, способствуя сохранению двигательных функций, о чем свидетельствует более высокий интегральный балл (3,00 [2,08; 3,00]) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Аналогичный эффект в отношении двигательной активности был выявлен и для соединения BIF-72, итоговый балл в данной группе (3,00 [1,17;3,00]) также был статистически значимо выше значений контрольной группы ($p < 0,05$).

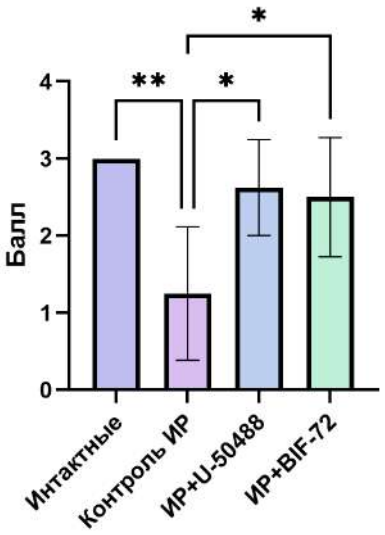


Рисунок 5.15 – Влияние агонистов каппа-опиоидных рецепторов U-50488 (10 мг/кг) и BIF-72 (10 мг/кг) на двигательную активность крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Статистическая значимость различий в сравнении с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. ИР – ишемия-реперфузия.

Ишемическое событие с последующей реперфузией приводило к снижению мышечного тонуса у животных контрольной группы (интегральный балл составил 1,50 [0,08;2,00]), что было статистически ниже показателей интактной группы (3,00 [3,00;3,00]; $p < 0,01$). После применения соединений U-50488 и BIF-72 проявлялась тенденция к улучшению мышечного тонуса, однако статистически значимых отличий по сравнению с группой контроля выявлено не было ($p > 0,05$; рисунок 5.16).

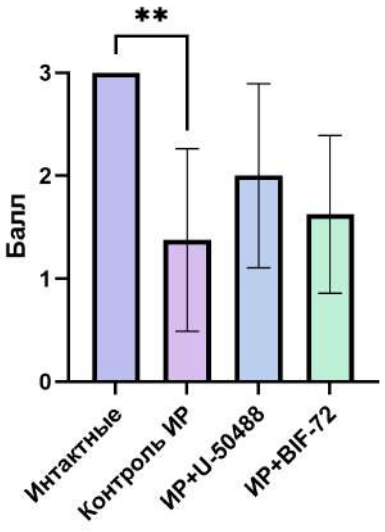


Рисунок 5.16 – Влияние агонистов каппа-опиоидных рецепторов U-50488 (10 мг/кг) и BIF-72 (10 мг/кг) на мышечный тонус крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Статистическая значимость различий при сравнении с контролем: ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. ИР – ишемия-реперфузия.

В группе ИР показатель хватательного рефлекса (1,00 [1,00;2,00]) был статистически значимо ниже, чем у животных интактной группы (3,00 [3,00;3,00]; $p < 0,001$). У крыс, получавших вещество U-50488, хватательный рефлекс был сохранен (3,00 [2,00;3,00]), значительно превышая значения контрольной группы ($p < 0,05$), что позволяет предположить наличие нейропротекторного эффекта у данного соединения. Введение соединения BIF-72 не приводило к статистически значимым изменениям в тесте хватательного рефлекса (2,00 [2,00;3,00]; $p > 0,05$) относительно контрольных значений (рисунок 5.17).

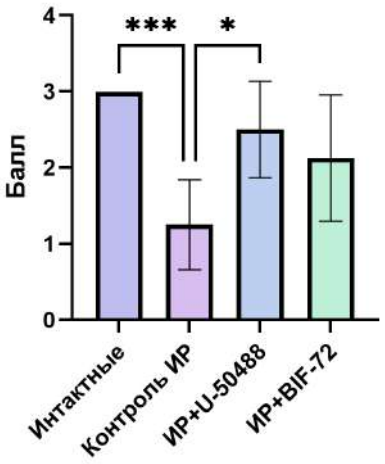


Рисунок 5.17 – Влияние агонистов каппа-опиоидных рецепторов U-50488 (10 мг/кг) и BIF-72 (10 мг/кг) на хватательный рефлекс крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Статистическая значимость различий при сравнении с контролем: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. ИР – ишемия-реперфузия.

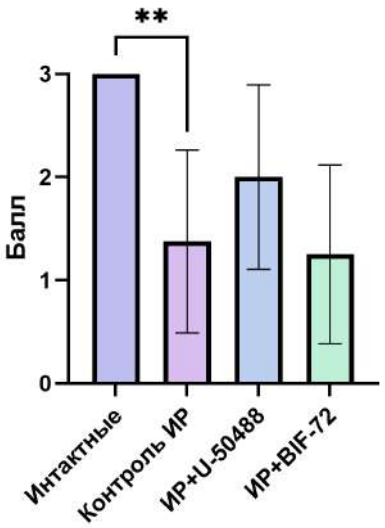


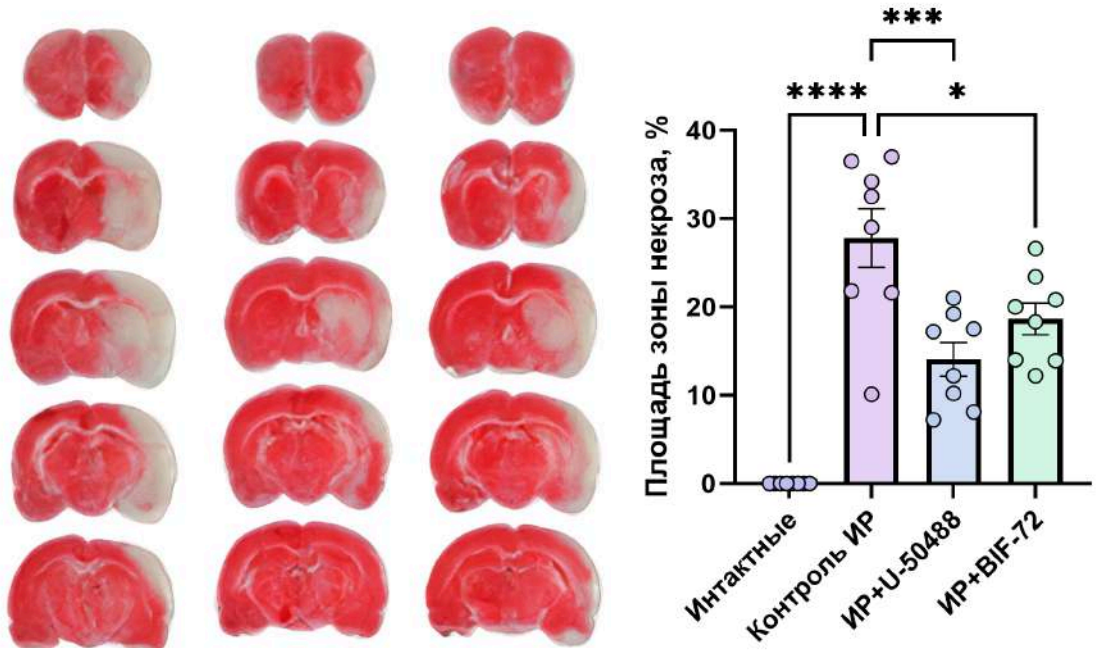
Рисунок 5.18 – Влияние агонистов каппа-опиоидных рецепторов U-50488 (10 мг/кг) и BIF-72 (10 мг/кг) на восстановление чувствительности у крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА
Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), n = 8. Статистическая значимость различий при сравнении с контролем: ** – $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. ИР – ишемия-реперфузия.

После церебральной ишемии наблюдалось снижение чувствительности, оцениваемой по реакции на прикосновение к вибриссам (рисунок 5.18). Медианное значение показателя в контрольной группе составило 1,50 [0,25; 2,00], что было статистически значимо ниже, чем в группе интактных животных (3,00 [3,00; 3,00]; $p < 0,01$).

Применение исследуемых соединений U-50488 и BIF-72 не оказало значимого влияния на уровень сохранности функции. Так, в группе, получавшей U-50488, медиана составила 2,00 [1,25; 3,00], а в группе BIF-72 – 1,00 [0,25; 2,00]. В обоих случаях различия с показателями контрольной группы не были статистически значимыми ($p>0,05$).

Оценка влияния соединения BIF-72 на объем инфаркта мозга

При гистологическом исследовании срезов мозга крыс после моделирования обратимой окклюзии ЛСМА отмечается белая область (зона инфаркта), включая ишемическое ядро и пенумбру, которая составила 27,84 ± 3,307 (рисунок 5.19). У животных, получавших исследуемые соединения U-50488 и BIF-72 за 30 минут до моделирования ишемии-реперфузии площадь зоны инфаркта головного мозга составила 14,08 ± 1,877 и 18,65 ± 1,783 (рисунок 5.19), что на 49,28% и 32,73% меньше по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$).



Контроль ИР ИР + U-50488 ИР + BIF-72

Рисунок 5.19 – Репрезентативные окрашенные 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом коронарные срезы головного мозга крыс, отражающие влияние агонистов каппа-опиоидных рецепторов U-50488 (10 мг/кг) и BIF-72 (10 мг/кг) на площадь зоны повреждения головного мозга
Примечание: данные представлены в виде M ± SEM. Различия статистически значимы относительно группы «Контроль ИР»: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета. ИР – ишемия-реперфузия.

5.6.3. Оценка влияния исследуемых соединений на уровни оксида азота (II) и лактатдегидрогеназы[4]

В ходе экспериментов на культурах перитонеальных макрофагов исследовано влияние соединений BIF-70 и BIF-72 на продукцию оксида азота (NO) (рисунок 5.20), а также на жизнеспособность клеток в условиях воздействия липополисахарида (ЛПС), оцениваемую по уровню лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (рисунок 5.21).

Для BIF-70 в диапазоне 0,1–10 мкМ уровни продукции NO и жизнеспособности (ЛДГ) соответствовали ЛПС-контролю. На 100 мкМ отмечено статистически значимое сокращение продукции NO ($p < 0,05$), сопровождаемое одновременным снижением жизнеспособности. Расчетное значение IC50 составило для BIF-70 более 100 мкМ, а CC50 была равна 54,01 мкМ. Поскольку эффект на продукцию NO проявлялся в концентрации, превышающей CC50, наблюдаемое снижение NO необходимо рассматривать преимущественно как следствие токсического влияния, а не как специфическое противовоспалительное действие.

Для BIF-72 зарегистрировано дозозависимое снижение продукции NO (IC50 = 1,293 мкМ), при этом в диапазоне до 100 мкМ соединение не вызывало существенного снижения уровня ЛДГ. Этот результат количественно выражается более высоким значением CC50 (192,6 мкМ) и указывает на меньшую цитотоксичность соединения.

При сопоставлении данных двух тестов (ингибирования NO и определения ЛДГ) показано, что BIF-70 в низких концентрациях не влияет на продукцию NO, а при 100 мкМ вызывает гибель клеток и тем самым снижает уровень NO за счет цитотоксического эффекта. BIF-72, напротив, обеспечивает выраженное подавление NO без признаков повреждения клеток.

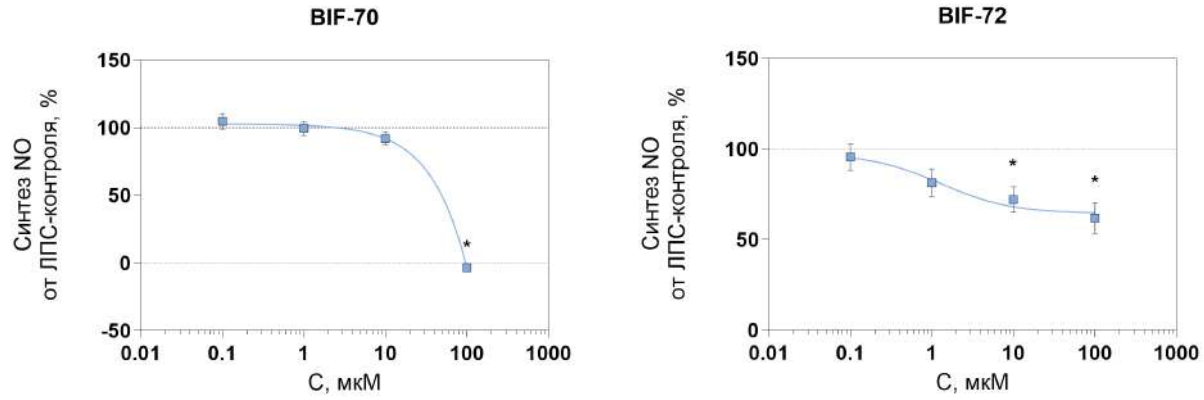


Рисунок 5.20 – Графики, отражающие относительные изменения уровня оксида азота в культуре перитонеальных макрофагов под действием исследуемых соединений
Примечание: данные представлены как M ± SD. Различия статистически значимы относительно ЛПС-контроля: * – $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета (n = 3).

[4] Выражается благодарность профессору кафедры фармакологии и биоинформатики д.фарм.н Д. А. Бабкову за помощь в проведении исследований.

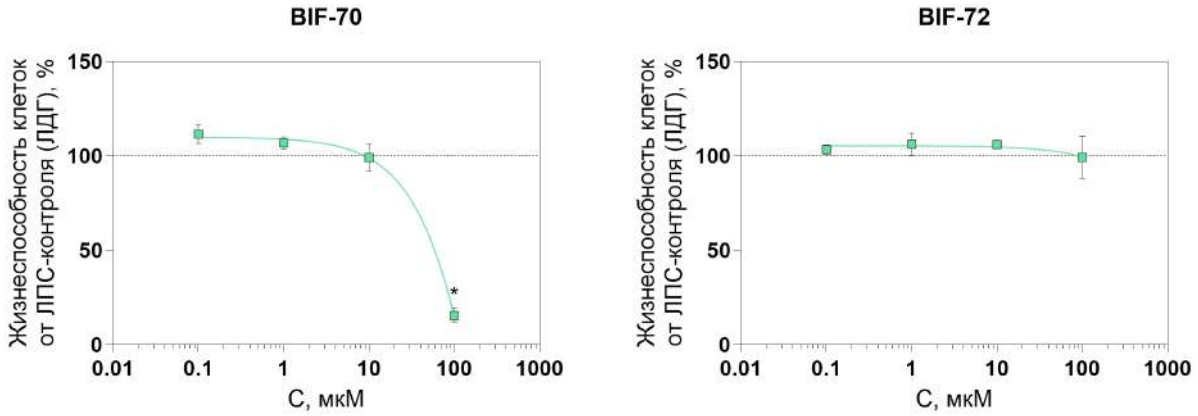


Рисунок 5.21 – Графики, отражающие изменение жизнеспособности перитонеальных макрофагов под действием исследуемых соединений
Примечание: данные представлены как M ± SD. Различия статистически значимы относительно ЛПС-контроля: * – $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета (n = 3).

5.7. Изучение нейротоксикологического профиля соединения BIF-72

5.7.1. Оценка влияния соединения BIF-72 на поведение крыс с помощью методов автоматизированного анализа и технологий «компьютерного зрения»

В проведенном эксперименте анализировались девять выделенных элементарных поведенческих паттернов (параметров), представляющих собой различные аспекты двигательной и исследовательской активности крысы (рисунок 5.22). При сравнении контрольной группы с группами, получавшими BIF-72 или топирамат, выявлялись как общие дозозависимые, так и специфичные для вещества изменения в частоте проявления этих паттернов. Поведенческие параметры связаны с различными формами локомоции, в том числе поступательными движениями разной интенсивности, с изменением ориентации в пространстве, вертикализацией, грумингом, периодами относительной неподвижности, а также с выраженностью исследовательских действий, например, связанных с поиском или анализом окружающей среды.

Изменения под влиянием BIF-72 проявлялись в переакцентуации отдельных двигательных компонентов, что отражалось в статистически значимом изменении частоты встречаемости ряда поведенческих паттернов (например, отмечались сдвиги в паттернах, соответствующих параметрам 1, 3, 6, 7 и 9) при введении разных доз препарата ($p < 0,05$). При этом некоторые паттерны, предположительно отражающие более активные варианты ориентировочно-исследовательских действий (наблюдаемые, в частности, в параметрах 1, 6, 7 и 9), встречались реже, а частота элементов, которые могут быть связаны с вертикальной ориентировкой (например, параметр 3), возрастала при более высокой дозе ($p < 0,05$). В различных концентрациях остальные наблюдаемые паттерны, в том числе относимые к условно более спокойным или рутинным видам двигательной активности (как в параметрах 2, 4, 5 и 8),

оставались близкими к уровню контроля, что в целом говорит о специфическом воздействии BIF-72 на баланс между различными формами двигательных паттернов, при этом по суммарной интенсивности изменений оно было менее выраженным, чем у топирамата.

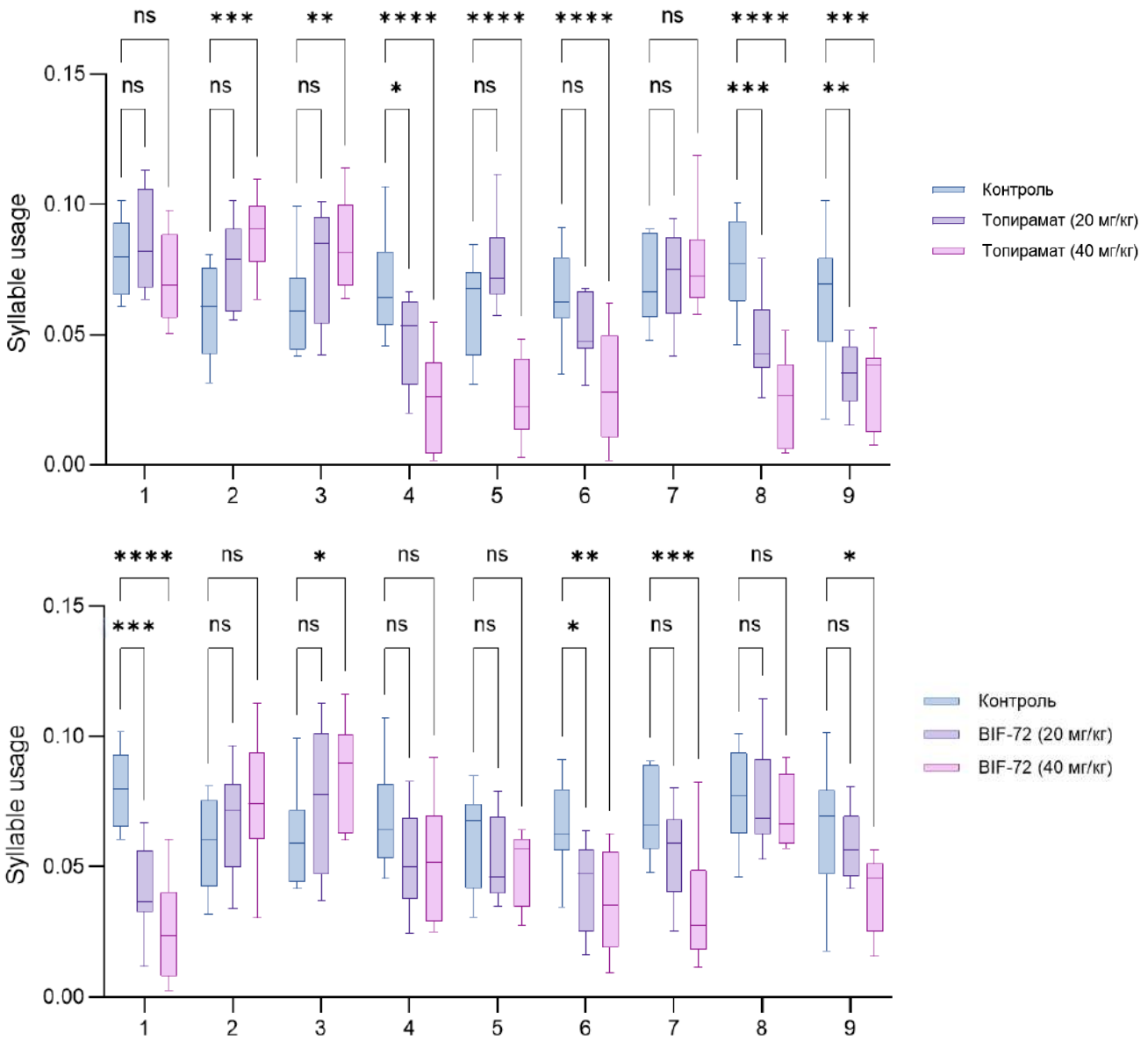


Рисунок 5.22 – Диаграммы частот встречаемости девяти элементарных поведенческих действий у здоровых крыс, получавших противосудорожный препарат топирамат (20 или 40 мг/кг) или экспериментальное вещество BIF-72 (20 или 40 мг/кг)

Примечание: данные представлены в виде Me(IQR). Различия статистически значимы относительно группы контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0\ 0001$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна ($n = 9$).

Воздействие топирамата характеризовалось более широким спектром изменений и смещением поведенческих паттернов в сторону уменьшения частоты ряда элементов (в частности, изменения затрагивали паттерны, ассоциированные с параметрами 4, 5, 6, 8 и 9), которые могут быть связаны с груминговым поведением и более стереотипными формами активности ($p < 0,05$). Одновременно увеличивалась частота некоторых медленных

локомоторных компонентов и вертикальных элементов (например, параметры 2 и 3), а также паттернов, потенциально отражающих сложные исследовательские движения ($p < 0,05$). В отдельных случаях отмечалось уменьшение периодов, потенциально соответствующих относительной неподвижности (например, параметр 5) ($p < 0,05$). При этом некоторые элементы поведения, вероятно соответствующие более быстрым или прямолинейным перемещениям и ориентировочным реакциям (например, параметры 1 и 7), существенно не менялись, подчеркивая избирательный характер действия топирамата.

Топирамат демонстрирует более широкий и выраженный сдвиг в сторону ослабления ряда стереотипных форм активности и груминга при одновременном увеличении вертикальных элементов и «медленных» локомоторных компонентов, что может отражать более масштабные изменения в нейронных сетях, ответственных за регуляцию двигательной активности и поведенческой гибкости. Соединение BIF-72, напротив, оказывает относительно более узкое воздействие, преимущественно меняя ориентировочно-исследовательские действия и усиливая вертикальную ориентацию при повышенных дозах, в то время как более спокойные или рутинные двигательные элементы остаются близкими к уровню контроля. Подобное сочетание сходств (общая направленность на модуляцию двигательных паттернов, типичных для противосудорожных средств) и различий (ширина и глубина поведенческих перестроек, а также прицельный характер изменений) может указывать на отличающиеся механизмы и «точки приложения» этих соединений в центральной нервной системе, определяя потенциальные различия в профилях активности при клиническом применении в качестве антиэпилептических препаратов.

5.7.2. Влияние на координацию движений в тесте вращающегося стержня

Исследование в тесте ротарод проводилось на следующий день после предварительного приучения животных к установке (таблица 5.8). В эксперименте оценивалось влияние двух соединений – BIF-72 и топирамата – на способность лабораторных животных сохранять равновесие на вращающемся стержне.

В контрольной группе, получавшей только растворитель, животные демонстрировали наиболее продолжительное удержание на вращающемся стержне. При введении BIF-72 в низкой и высокой дозе не приводило к статистически значимому сокращению времени удержания на стержне, что может свидетельствовать об отсутствии выраженного седативного и миорелаксирующего эффекта. Аналогичную тенденцию продемонстрировали животные, получавшие топирамат.

Таблица 5.8 – Влияние вещества BIF-72 (20 или 40 мг/кг, внутрибрюшинно) и топирамата (20 и 40 мг/кг, внутрибрюшинно) на период до первого падения в тесте на вращающемся стержне

Группа (n = 10)	**Доза (мг/кг)**	**ЛП первого падения, с Me [Q_1;Q_3])**
Контроль (растворитель)	–	69,29 [38,16;74,34]
BIF-72	20	57,0 [31,48;66,16]
BIF-72	40	44,44 [34,06;47,74]
Топирамат	20	55,57 [29,77;67,24]
Топирамат	40	44,77 [31,96;48,45]

5.7.3. Оценка влияния соединения BIF-72 на тонус мышц в тесте удержания на сетке

В ходе эксперимента была исследована способность лабораторных животных удерживаться на сетке через 30 минут после внутрибрюшинного введения двух доз вещества BIF-72 и двух доз топирамата (таблица 5.9). Целью данного теста являлась оценка влияния изучаемых препаратов на координацию движений и мышечную силу, которая отражается в показателе времени удерживания на сетке.

Таблица 5.9 – Влияние вещества BIF-72 (20 и 40 мг/кг, внутрибрюшинно) и топирамата (20 и 40 мг/кг, внутрибрюшинно) на время удержания на сетке

Группа (n = 10)	**Доза, мг/кг**	**Время удерживания, с Me [Q_1;Q_3]**
Контроль (растворитель)	–	309,8 [195,5;331,0]
BIF-72	20	278,8 [210,8;314,6]
BIF-72	40	224,2 [186,0;258,9]
Топирамат	20	285,3 [172,7;333,2]
Топирамат	40	228,0 [178,2;251,8]

Сравнительный анализ полученных данных показал отсутствие статистически значимых отличий между опытными (соединение BIF-72, топирамат) и контрольной группой. Несмотря на некоторую вариабельность величин времени удерживания, она не достигла уровня, указывающего на достоверное изменение моторной функции или мышечного тонуса под влиянием данных веществ.

Таким образом, результаты теста на удержание на сетке свидетельствуют о том, что ни BIF-72, ни топирамат, введенные в исследованных дозах, не оказывают статистически

значимого влияния на способность животных сохранять равновесие и удерживаться на сетке. Эти данные могут служить дополнительным подтверждением безопасности изучаемых соединений в отношении их возможного негативного воздействия на двигательные функции и могут быть учтены в дальнейших исследованиях по оценке других фармакологических характеристик данных препаратов.

5.7.4. Оценка влияния соединения BIF-72 на когнитивные функции крыс в тесте Т-образного лабиринта со спонтанным чередованием

В ходе исследования была оценена динамика спонтанного чередования в Т-образном лабиринте, которое рассматривается в качестве показателя рабочей памяти у животных (таблица 5.10). Для этого экспериментальным группам вводили различные дозы BIF-72 и топирамата, а в контрольной группе – растворитель (дистиллированную воду в эквивалентном объеме). Параметром анализа служил процент спонтанного чередования, указывающий на способность животных удерживать и использовать информацию о предыдущем выборе при последующем прохождении лабиринта.

Таблица 5.10 – Влияние вещества BIF-72 (20 и 40 мг/кг, внутрибрюшинно) и топирамата (20 и 40 мг/кг, внутрибрюшинно) на рабочую память в тесте спонтанного чередования в Т-образном лабиринте

Группа (n = 10)	**Доза, мг/кг**	**%СЧ, Me[Q_1;Q_3]**
Контроль (растворитель)	–	72,20 [65,43;78,83]
BIF-72	20	61,30 [51,90;66,40]
BIF-72	40	56,45 [44,78;66,83]**
Топирамат	20	66,20 [52,25;71,20]
Топирамат	40	52,45 [50,88;62,43]**

Примечание: ** – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

Результаты показали, что в контрольной группе процент спонтанного чередования сохранялся на высоком уровне. Введение низкой дозы BIF-72 лишь незначительно снижало показатели, тогда как при увеличении дозировки наблюдалось более выраженное снижение качества рабочей памяти, статистически значимое по сравнению с контролем $p < 0,005$). Сходные данные были получены и для топирамата: в меньшей дозе препарат не оказывал существенного влияния на спонтанное чередование, но при его повышении происходило достоверное ухудшение способности животных к чередованию в лабиринте ($p < 0,005$).

Снижение процента спонтанного чередования свидетельствует о возможном негативном влиянии повышенных доз исследуемых веществ на рабочую память, что характерно для препаратов с противосудорожной активностью.

5.7.5. Оценка аверсивных свойств

В ходе предварительного этапа исследования была построена регрессионная модель (MAE = 9,78), оценивающая степень аверсии на основе параметров электроэнцефалографической активности. Модель была протестирована на сигналах мозговой активности, записанных после введения ACSF (контроль), а также вещества BIF-70 (350 мкг) и BIF-72 (350 мкг) (таблица 5.11).

Таблица 5.11 – Сравнение фактических и предсказанных регрессионной моделью значений степени аверсии для соединений BIF-72 и BIF-70

Группа (n = 8)	**Ожидаемая степень аверсии (предсказанная моделью), с**	**Фактическая степень аверсии в тесте УРИМ, с**
Контроль (растворитель)	15,18 ± 16,32	6,38 ± 18,44
BIF-72	−8,54 ± 14,63	−2,00 ± 12,99
BIF-70	30,49 ± 18,34	26,88 ± 11,09*

Примечание: результаты представлены как M ± SD. * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета)

Для контрольной группы животных, получавших растворитель, моделью был спрогнозирован незначительный положительный сдвиг времени пребывания в отсеке, ассоциированным с введением (15,18 с). Следует отметить, что данная погрешность прогноза для нейтрального стимула, вероятно, обусловлена тем, что модель была обучена на выборке данных с преобладанием выраженных аверсивных эффектов (проблема экстраполяции за пределы распределения исходных данных). При этом среднее изменение времени (6,38 ± 18,44 с) не имело статистически значимых отличий от нулевого значения, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния неспецифических факторов процедуры тестирования.

При введении соединения BIF-72 моделью также был предсказан незначительный отрицательный сдвиг (−8,54 с). Результаты поведенческого теста были близкими (−2,00 ± 12,99 с) и статистически не отличались от показателей контрольной группы.

Влияние на поведение было зафиксировано для соединения BIF-70. Модель спрогнозировала его подкрепляющие свойства, предсказав увеличение времени пребывания в

экспериментальном отсеке (30,49 с). Этот прогноз был подтвержден экспериментально, фактическое увеличение времени составило 26,88 ± 11,09 с, что указывает на слабое предпочтение животными отсека, ассоциированного с веществом, при сравнении с контролем ($p = 0,0402$).

5.8. Заключение

В ходе выполненных исследований была реализована многоэтапная стратегия поиска перспективных противосудорожных средств на основе производных бензимидазола, которая включала этапы компьютерного моделирования (QSAR, молекулярный докинг, молекулярная динамика), электрофизиологические исследования с применением алгоритмов машинного обучения, экспериментальную оценку *in vitro* (для определения каппа-агонистической активности, противовоспалительного потенциала и нейропротекторных свойств), а также методы *in vivo* с использованием различных моделей эпилептических расстройств и поведенческих тестов.

Результаты QSAR-моделирования и гибкого молекулярного докинга показали, что соединения BIF-70 и BIF-72 обладают предпочтительными физико-химическими свойствами и высокой прогнозируемой аффинностью к каппа-опиоидному рецептору по сравнению с другими протестированными аналогами. При моделировании молекулярной динамики лиганд-рецепторных комплексов для двух соединений были подтверждены стабильные конформации на временном промежутке 50–100 нс. Ключевую роль в молекулярном узнавании играли солевой мостик с остатком ASP138 и арильные взаимодействия с TYR139, которые ранее были зафиксированы для известных каппа-агонистов. Данные результаты, с одной стороны, подтвердили целесообразность дальнейшего изучения соединений BIF-72 и BIF-70, а с другой – позволили точнее оценить влияние структурных особенностей бензимидазольного скаффолда на фармакологический потенциал.

Анализ биоэлектрической активности мозга с помощью построенной модели автоэнкодера на базе сверточных нейронных сетей указал на функциональное сходство эффектов соединения BIF-72 с противоэпилептическими препаратами, в частности, с топираматом. В то же время у соединения BIF-70 не было выявлено специфического влияния на биоэлектрическую активность при сравнении с референтными препаратами, что согласуется с данными последующих тестов *in vivo*, где вещество BIF-70 не проявило выраженной противосудорожной активности.

При исследовании механизма действия на модели активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния было верифицировано каппа-опиоидное агонистическое действие целой серии веществ, среди которых соединение BIF-72 продемонстрировало выраженную и

норбиноторфиминобратимую активацию. При этом ряд соединений, таких как соединения BIF-74 и BIF-78, исключили из дальнейшего *in vivo* тестирования в силу проблем с растворимостью, что подчеркивает важность оптимизации физико-химических свойств на ранних этапах разработки.

Следующим этапом были выполнены тесты *in vivo* на различных моделях судорог. Соединение BIF-70 (20 мг/кг, в/б) не влияло на основные параметры судорожного синдрома. В то же время вещество BIF-72 (20 мг/кг, в/б) существенно снижало частоту и выраженность судорог, а также в ряде моделей уменьшало гибель животных. Наиболее высокая активность соединения BIF-72 проявилась в моделях эпилептогенеза (индуцированного коразолом или пилокарпином), что указывает на болезнь-модифицирующее действие соединения BIF-72, направленное не только на устранение судорог, но и на предотвращение развития патологических процессов в ЦНС.

Дальнейший анализ нейропротективных свойств вещества BIF-72 показал его способность защищать клетки в условиях нейровоспаления (модель с ЛПС на срезах гиппокампа) и снижать объем ишемического очага при обратимой окклюзии средней мозговой артерии у крыс. Эти эффекты сопровождались уменьшением выраженности неврологического дефицита, указывая на полимодальное действие, сочетающее противоэпилептический и противовоспалительный/нейропротективный потенциал. При изучении клеточной токсичности вещество BIF-70 при более высоких концентрациях проявляло цитотоксический эффект, тогда как соединение BIF-72 сохраняло более широкий «терапевтический коридор».

Детальный анализ нейротоксикологического профиля, включавший автоматизированную мультипараметрическую оценку поведенческих изменений, координации движений, мышечного тонуса, когнитивных функций и аверсивных свойств, выявил у соединения BIF-72 относительно умеренное воздействие на центральную нервную систему в дозе 20 мг/кг. Хотя при повышении дозы до 40 мг/кг отмечалось снижение показателей рабочей памяти и более грубые нарушения поведения, это явление характерно для целого ряда противоэпилептических препаратов. При этом показатели координации, мышечного тонуса и аверсивного профиля оставались близкими к контрольным значениям, что позволяет говорить о более оптимальном соотношении эффективности и переносимости по сравнению с препаратом сравнения – топираматом и веществом U-50488.

Таким образом, комплексные данные, полученные в рамках данной работы, свидетельствуют о высоком фармакологическом потенциале производных бензимидазола, в частности, соединения BIF-72, как перспективного объекта для последующей оптимизации.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках настоящей работы была реализована комплексная экспериментальная стратегия, направленная на идентификацию и валидацию новых лигандов каппа-опиоидного рецептора в ряду конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. Исследование включало последовательное применение методов вычислительной химии (фармакофорное моделирование, гибкий молекулярный докинг, полноатомная молекулярная динамика) с последующей экспериментальной верификацией наиболее перспективных кандидатов с использованием комплекса электрофизиологических и поведенческих тестов. Ключевая методологическая задача заключалась в ранней рационализации и редукции исходного химического пространства с целью целенаправленной идентификации соединений-лидеров, обладающих профилем высокоаффинных агонистов КОР и оптимальным прогнозным ADME-T профилем (абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность).

Подобный подход соответствует парадигме рационального дизайна лекарственных средств и, как показывает мировая практика, позволяет существенно снизить финансовые и временные затраты, а также минимизировать риск неудач на поздних, наиболее ресурсоемких стадиях доклинической разработки (Giordano D. et al., 2022). Литературные данные подтверждают, что высокая частота неблагоприятных исходов для соединений, действие которых направлено на ЦНС-мишени, обусловлена неоптимальной фармакокинетикой и токсичностью, дополнительно подчеркивают актуальность применения ранних предиктивных методов (Alavijeh M.S. et al., 2005; Walker A.L. et al., 2018).

Для исходной совокупности (>2000 структур) была проведена процедура многопараметрической фильтрации с использованием эвристических алгоритмов и общепринятых физико-химических дескрипторов. Данная процедура включала оценку соответствия «правилу пяти» Липински для прогнозирования пероральной биодоступности, расчет предиктивных моделей проницаемости через гематоэнцефалический барьер, что является критическим параметром для нейроактивных соединений, а также вычисление интегрального индекса CNS MPO (Central Nervous System Multi-Parameter Optimization), учитывающего ключевые свойства (липофильность, pKa, молекулярная масса, топологическая полярная поверхность и др.) для успешной разработки препарата. В результате был сформирован пул структур-кандидатов, из которого были удалены соединения с потенциально и заведомо неблагоприятным фармакокинетическим профилем (низкая биодоступность, слабая пенетрация в ЦНС) и потенциальными токсикологическими рисками (например, наличие структурных мотивов, классифицируемых как PAINS – pan-assay interference compounds). Такой

многостадийный дизайн исследования является реализацией концепции иерархического виртуального скрининга, эффективность которой многократно подтверждена в мировой практике при поиске и оптимизации новых лигандов для рецепторов центральной нервной системы (Lipinski C.A. et al., 2001; Wager T.T. et al., 2016; Lipinski C.A., 2016; Urbina F., 2021).

Фармакофорный анализ позволил построить шестифункциональную (ADHHRR) модель, отражающую ключевые точки взаимодействия лигандов с каппа-опиоидным рецептором. Было показано, что вещество РУ-1205 наиболее полно соответствует этой модели. Совокупность фармакофорных признаков (доноры и акцепторы водородных связей, гидрофобные участки и ароматические кольца) свидетельствует о том, что соединение РУ-1205 обладает высокой аффинностью к рецептору.

Данные гибкого молекулярного докинга и анализ межмолекулярных взаимодействий подтвердили эту гипотезу. Установлено, что консервативный остаток ASP138 в трансмембранном домене рецептора образует с соединением РУ-1205 водородные связи и солевой мостик. Известно, что вовлечение ASP138 в ионное взаимодействие является критически важным для обеспечения высокой аффинности и селективности агониста. Кроме того, обнаружено π-стэкинг взаимодействие с TYR139, а также ряд дополнительных контактов с GLY115 и SER211. Комплекс водородных связей, солевого мостика и ароматических взаимодействий стабилизирует лиганд-рецепторный комплекс в “активной” конформации, что повышает вероятность наличия агонистического действия.

Сравнительный анализ оценок докинга показал, что другие исследованные производные (например, РУ-1196, РУ-1197, РУ-1204) имеют более высокую энергию связывания по сравнению с соединением РУ-1205. Несмотря на то, что некоторые из них также формировали солевой мостик с ASP138, общее число и энергетическая характеристика этих связей оказались ниже.

Результаты молекулярной динамики (MD) дополнительно подтвердили устойчивость комплекса соединения РУ-1205 с каппа-опиоидным рецептором в ходе длительных (100 нс) вычислительных экспериментов. Анализ RMSF показал, что динамика внутриклеточных участков рецептора в комплексах с РУ-1205 и налфурафином (известным функциональным агонистом) имеет сходные паттерны, в то время как у сбалансированного агониста U-50488 выявлены иные особенности подвижности ключевых участков трансмембранных доменов. Это позволяет предположить, что соединение РУ-1205 может проявлять «смещенную» агонистическую активность, преимущественно активируя пути G-белков при меньшем вовлечении бета-аррестина. Данный механизм представляет особый интерес с точки зрения разработки селективных опиоидных препаратов, которые обладают меньшим риском дисфории, аддикции и других характерных для классических опиоидов побочных эффектов.

Однако одним из главных вопросов при создании каппа-опиоидных агонистов остаются их потенциальные психотропные и дисфорические эффекты, а также возможное негативное влияние на когнитивные функции и эмоциональный статус. Молекулярно-биологические данные не гарантируют успешной экстраполяции *in silico* результатов на целый организм, особенно на центральную нервную систему. Поэтому следующий этап исследования включал электрофизиологические эксперименты (регистрацию LFP-сигналов, анализ когерентности, вычисление взвешенного индекса фазовой задержки с использованием методов машинного обучения) и локальную аппликацию веществ непосредственно в структуры мозга.

Спектральный анализ сигналов позволяет количественно оценивать изменения частотных характеристик биоэлектрической активности мозга. Эти изменения могут указывать на различные нейро- и психотропные эффекты изучаемых веществ. Например, повышение мощности высокочастотных компонентов является наиболее типичным проявлением эффектов стимуляторов (подобные изменения ассоциируются с усиленной когнитивной активностью и бодрствованием), тогда как соединения с депримирующим действием на ЦНС преимущественно усиливают низкочастотный диапазон.

Воздействие каппа-опиоидных агонистов на электроэнцефалографическую активность подробно изучено в исследованиях на животных и людях. Данный класс веществ вызывает ряд специфических изменений корковой активности, среди которых можно выделить характерное повышение мощности сигнала в диапазоне 5–7 Гц (усиление тета-активности) (Young G.A., 1984; Young G.A., 1989). В некоторых исследованиях установлено повышение мощности в дельта-диапазоне, а также снижение активности в альфа-, бета-диапазонах (Young G.A., 1989; Ranganathan M. et al., 2012). В целом, особенности фармако-ЭЭГ профиля сбалансированного каппа-опиоидного агониста U-50488 согласуются с полученными результатами. В частности, отмечается повышение мощности низкочастотных ритмов на фоне снижения вклада высокочастотных диапазонов. Такие спектральные изменения ассоциируются с состояниями, характеризующимися седативным и транквилизирующим действиями, а также могут отражать снижение активности дофаминергической нейротрансмиссии в кортико-лимбических областях, что коррелирует с уменьшением общей возбудимости центральной нервной системы (Sogabe S. et al., 2013; Newson J.J., 2018). Ряд исследований подчеркивает важную роль медиальной префронтальной коры, миндалины и гиппокампа в регуляции состояний страха и тревоги. Показано, что усиление тета-синхронизации между mPFC и миндалиной является нейрофизиологическим коррелятом состояний страха. В то же время, распознавание безопасности и активное подавление страха опосредуются нисходящим модулирующим влиянием mPFC на базолатеральное ядро миндалины, которое сопровождается увеличением мощности в гамма-диапазоне (Stujenske J.M. et al., 2014; Likhtik E. et al., 2014). Кроме того, в

условиях острой тревоги наблюдается усиление низкочастотных осцилляций в mPFC и повышение ее функциональной связи с вентральным гиппокампом, что сопряжено с интеграцией эмоционального и когнитивного компонентов адаптивного ответа на стресс (Adhikari A. et al., 2010). Для гиппокампа в условиях острого стресса характерно усиление осцилляций в тета- и гамма-диапазонах, что может отражать реорганизацию сетевой активности, направленную на переход к более адаптивным стратегиям обработки информации, включая консолидацию памяти о стрессовом событии (Merino E. et al., 2021). Таким образом, учитывая, что активация каппа-опиоидных рецепторов оказывает модулирующее влияние на кортико-лимбические сети, вызывая характерную реорганизацию ритмической активности, можно полагать, что это ведет к развитию депрессивноподобных и дисфорических состояний (Ebner S.R. et al., 2010; Jacobson M.L. et al., 2020), а также снижению связности и возбудимости ключевых нейрональных структур, включая медиальную префронтальную кору, миндалину и гиппокамп (Simmons M.L. et al., 1994; Huge V. et al., 2009; Tejeda H.A. et al., 2015). При этом примечательно, что соединение РУ-1205 не оказывало столь выраженных изменений, особенно в диапазоне высоких частот, что соответствует его профилю активности в поведенческих тестах.

Анализ биоэлектрической активности позволил с высокой вероятностью дифференцировать эффекты классического сбалансированного каппа-агониста U-50488, блокатора MAPK p38 SB203580 и исследуемого вещества РУ-1205. Наши данные продемонстрировали, что U-50488 характеризуется наиболее выраженными сдвигами в электрофизиологических показателях. Соединение РУ-1205, напротив, вызывало более ограниченные изменения, не затрагивая ряд исследуемых областей (прилежащее ядро, вентральная тегментальная область, миндалина), где каппа-опиоидные рецепторы широко представлены. Исходя из этого, можно предположить, что вещество РУ-1205 задействует иные сигнальные пути или реализует свои эффекты более селективно. В группе, получавшей вещество SB203580, наблюдались значительно менее выраженные изменения по сравнению с животными, которым вводилось соединение U-50488, при этом сходств с соединением РУ-1205 не фиксировалось.

Когерентный анализ выявил снижение интракортикальных связей и усиление функциональных взаимодействий с миндалиной при введении U-50488, что в ряде литературных источников связывают с аверсивным/дисфорическим действием (Zan G.Y. et al., 2016; Hein M. et al., 2021). У соединения РУ-1205 подобная картина не наблюдалась, что хорошо согласуется с поведенческими исследованиями. На основании данных функциональной коннективности, обработанных с помощью методов машинного обучения, соединение РУ-1205 было классифицировано как вещество, не обладающее ингибирующей активностью в

отношении MAPK p38. Иными словами, вещество РУ-1205 не воспроизводит “фенотип” блокатора MAPK p38, но при этом вызывает значительно менее выраженные изменения LFP и коннективности по сравнению с классическими каппа-агонистами.

Исследования методом patch clamp показали, что РУ-1205 устраняет индуцированное U-50488 усиление спайковой активности пирамидных нейронов миндалины за счет конкурентного антагонизма в сайте связывания. Это подтверждается правосторонним сдвигом дозозависимой кривой при комбинированном применении с U-50488 и сохранением исходного уровня плато (максимального эффекта). В отличие от этого, классический ингибитор MAPK p38 SB203580 проявлял неконкурентное антагонистическое действие, преимущественно меняя наклон кривой (slope) и уменьшая максимальный эффект U-50488.

Указанная особенность РУ-1205 представляет значительный научный и фармакологический интерес. Как отмечалось ранее, классические каппа-агонисты, такие как U-50488 или U-69593, способны вызывать выраженные аверсивные и дисфорические эффекты (Ji G., 2020; Spasov A.A. et al., 2020). Предполагается, что β-аррестин-зависимая активация p38 MAPK в лимбических структурах, в том числе в миндалине, связана с развитием аверсивных и дисфорических реакций (Knoll A.T., 2010; Ehrich J.M. et al., 2015). Эта гипотеза подтверждается данными доклинических исследований, в которых фармакологическое ингибирование p38 MAPK в миндалине с использованием соединения SB203580 приводило к снижению тревожных и аффективно-подобных проявлений (Zan G.Y. et al., 2016). Учитывая, что p38 MAPK является ключевым компонентом множества сигнальных путей, а ингибиторы обладают ограниченной селективностью, их дальнейшее клиническое изучение было сопряжено со значительными рисками развития нежелательных явлений (Davies S.P. et al., 2000; Hammaker D., 2010). В ходе исследований регистрировали гепатотоксичность, кожные реакции, нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, повышенный риск инфекций, а также кардио- и нейротоксичность (Banerjee A. et al., 2012).

В отличие от пострецепторной активности SB203580, соединение РУ-1205 демонстрирует селективное конкурентное взаимодействие с каппа-рецептором, не приводя к чрезмерному вовлечению β-аррестина и не нарушая его физиологическую функцию в организме. Таким образом, РУ-1205 потенциально может обеспечивать терапевтический (в том числе обезболивающий) эффект, опосредованный G-белком, и при этом не вызывать аверсивные эффекты, ассоциированные с β-аррестиновым сигналингом. Отмечается, что аналогичные результаты были получены для иных G-белок смещенных функциональных каппа-опиоидных агонистов (например, 6′-GNTI) (Zangrandi L. et al., 2016; Schattauer S.S. et al., 2017).

Дополнительные эксперименты (таблица 6.1) с локальными микроинъекциями в ключевые структуры мозга (околоводопроводное серое вещество, большое ядро шва,

миндалина, гиппокамп, прилежащее ядро) подтвердили, что РУ-1205, аналогично U-50488, проявляет выраженный анальгетический эффект при введении в околоводопроводное серое вещество и, в несколько меньшей степени, в большое ядро шва и миндалину. Эти области признаны критически важными звеньями в нисходящих антиноцицептивных путях (Fields H., 2004; Ossipov M.H. et al., 2010). Одним из объяснений отмеченного эффекта может служить активация каппа-рецепторов на ГАМК-ергических нейронах в PAG и NRM, что устраняет тоническое торможение выходных нейронов данной системы (Pan Z.Z., 2006; Lau B.K. et al., 2020). Данный механизм схожим образом реализуется при активации μ-рецепторов, однако каппа-агонисты, как правило, вовлекают и дополнительные сигнальные каскады, включая JNK и p38 MAPK (Bruchas M.R., 2010).

Таблица 6.1 – Сводные данные по влиянию каппа-опиоидных агонистов на болевую чувствительность при локальных микроинъекциях в различные структуры мозга крыс

Вещество	**U-50488**	**РУ-1205**
Околоводопроводное серое вещество (PAG)	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
Большое ядро шва (NRM)	↓ ↓ -	↓ ↓ -
Гиппокамп (Hipp)	- - -	- - -
Миндалевидное тело (Amy)	- ↓ -	- ↓ -
Прилежащее ядро (NAc)	- - -	- - -

Примечание: стрелками обозначены статистически значимые эффекты, полученные в (1) тесте термической боли, (2) тесте с формалином, (3) тесте механической боли.

Установлено, что интраамигдалярное введение агонистов каппа-опиоидных рецепторов РУ-1205 и U-50488 приводит к подавлению ноцицептивного поведения в острой фазе (0–5 мин) формалинового теста, не влияя при этом на пороги острой термической и механической болевой чувствительности. Эти данные свидетельствуют о модально-зависимой роли миндалины в супраспинальной регуляции боли. Тем не менее, заключение о преимущественном влиянии на аффективно-мотивационные, а не на сенсорно-дискриминативные компоненты ноцицепции, требует осторожной интерпретации (Neugebauer V., 2020; Kiritoshi T. et al., 2024). С другой стороны, в ряде исследований продемонстрировано, что активация КОР в центральном ядре миндалины может усиливать аверсивные реакции и фасилитировать ноцицептивную передачу. Этот эффект опосредован механизмом пресинаптического подавления ГАМК-ергической нейротрансмиссии (Gilpin N.W. et al., 2014; Ji G., 2020; Hein M. et al., 2021). Предполагается, что наблюдаемые расхождения в результатах могут быть связаны с функциональной гетерогенностью структур миндалевидного комплекса и методическими различиями в

используемых поведенческих парадигмах (Neugebauer V., 2020). Таким образом, несмотря на подтвержденный анальгетический потенциал, роль амигдалярной КОР-системы в модуляции боли остается сложной и требует дальнейшего изучения.

В экспериментах с локальным введением РУ-1205 и U-50488 в гиппокамп и прилежащее ядро не выявлено выраженного влияния на термическую, механическую и химическую чувствительность. Это согласуется с данными о том, что гиппокамп в большей степени вовлечен в память и пространственную ориентацию, а прилежащее ядро – в механизм вознаграждения и формирование аддиктивных состояний (Berridge K.C., 2015; Eichenbaum H., 2017). Хотя часть исследований демонстрирует определенную модуляцию ноцицепции на этих уровнях, по-видимому, при локальной активации каппа-рецепторов анальгетический эффект отсутствует или он выражен крайне слабо.

Таким образом, совокупность данных подтверждает, что анальгетический профиль РУ-1205 определяется его способностью активировать нисходящие антиноцицептивные механизмы (PAG, NRM), а также, вероятно, воздействовать на эмоциональный (аффективный) компонент боли через миндалину. При этом данный каппа-агонист не активирует β-аррестиновый каскад в миндалине, что снижает риск развития дисфорических реакций, характерных для многих каппа-рецепторных лигандов. Дальнейшие исследования могут быть сфокусированы на более детальном анализе поведенческих последствий длительного применения РУ-1205 и уточнении спектра сигнальных внутриклеточных путей, регуляция которых лежит в основе его уникальных свойств. Важным направлением исследований может стать создание аналогов и производных соединения РУ-1205, избирательно усиливающих G-белок-опосредованный ответ при минимальной активации β-аррестина, что позволит расширить терапевтические возможности в лечении болевых синдромов.

Одним из ключевых этапов работы стало экспериментальное исследование противозудных свойств соединения РУ-1205. Известно, что функциональные каппа-агонисты, такие как налфурафин, успешно применяются при лечении различных форм зуда, особенно холестатического (Inui S., 2015). Проведенные исследования на моделях острого (серотонин-индуцированного) и хронического (модель «сухой кожи») зуда показали, что каппа-опиоидные агонисты РУ-1205 и U-50488 достоверно снижали частоту эпизодов зуда. Эти данные соответствуют ранее установленной роли каппа-агонистов в модуляции периферической и центральной сенсорной проводимости.

Заключительным шагом были выполнены поведенческие исследования на здоровых животных, где оценивалось действие вещества РУ-1205 в сравнении с буторфанолом (классическим смешанным агонистом-антагонистом, обладающим активностью в отношении каппа-рецепторов). Использование буторфанола ассоциируется с комбинированным седативным

и частично дисфорическим эффектом, что подтверждается данными многих авторов (Commiskey S. et al., 2005). Подобное действие проявлялось в угнетении ориентировочно-исследовательского поведения и росте однообразных (стереотипных) форм активности, таких как круговые перемещения, повторяющееся обнюхивание и груминг.

В тесте открытого поля соединение РУ-1205 продемонстрировало более благоприятный профиль действия. В дозе 5 мг/кг вещество вызывало минимальные изменения поведенческих паттернов, а при повышении дозы до 10 мг/кг наблюдалось умеренное снижение двигательной активности без выраженных признаков дисфории и седации. Такие различия могут быть обусловлены особенностями взаимодействия РУ-1205 с каппа-опиоидными рецепторами. Полученные данные указывают на более оптимальное терапевтическое окно, позволяющее сохранять анальгетические и противозудные эффекты без грубых поведенческих нарушений, свойственных классическим каппа-агонистам.

В ходе исследования когнитивных функций в тесте спонтанного чередования в Т-образном лабиринте было установлено, что соединение РУ-1205, в отличие от буторфанола, не вызывает значимого угнетения рабочей памяти. Полученные результаты согласуются с концепцией функциональной селективности и находят подтверждение в данных по другим лигандам со схожим профилем. Так, смещенный мю-агонист олицеридин (TRV130) оказывает анальгетическое действие, сопровождающееся менее выраженными нейрокогнитивными нарушениями в сравнении с морфином (Moss L. et al., 2023), а смещенный каппа-агонист triazole 1.1 проявляет обезболивающий эффект без характерного для классических лигандов седативного влияния (Brust T.F. et al., 2016). Механизм такой избирательности, вероятно, связан с тем, что негативное влияние опиоидов на память и обучение опосредуется преимущественно через бета-аррестиновый путь.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сформулировать следующие основные тезисы. Во-первых, вещество РУ-1205 проявляет устойчивое взаимодействие с каппа-опиоидным рецептором, образуя комплекс связей (ASP138, TYR139 и др.), подтвержденных докингом и МД-симуляциями. Во-вторых, по совокупности данных можно заключить, что вещество обладает способностью преимущественно активировать пути, связанные с G-белком, вызывая анальгезию и противозудный эффект, но при этом значительно меньше индуцирует аррестин-зависимые реакции, ответственные за дисфорические и депрессивные состояния. В-третьих, соединение РУ-1205 не проявляет прямой активности блокатора MAPK p38, однако способно конкурировать с полным сбалансированным агонистом U-50488 на уровне КОР и устранять избыточную активацию бета-аррестин-сигнального пути. В-четвертых, эксперименты, в которых РУ-1205 вводили непосредственно в PAG, NRM и

миндалину, указывают на сходный с другими опиоидами механизм нисходящей модуляции боли, что полнее раскрывает механизм его центрального обезболивающего действия.

Объединяя все эти факторы, можно заключить, что соединение РУ-1205 может рассматриваться как перспективный представитель класса каппа-агонистов, которые способны обеспечивать выраженный анальгетический и противозудный эффект при существенно более низкой вероятности развития дисфории и когнитивного дефицита. Разработка подобных агентов открывает перспективу создания альтернатив традиционным мю-опиоидным анальгетикам с их высокой способностью к формированию зависимости. При этом соединение РУ-1205, как показали выполненные эксперименты, не обладает внерецепторными эффектами, сходными с ингибиторами MAPK p38, поэтому не вызывает побочных эффектов, затрагивающих иммунный гомеостаз.

Тем не менее, требуется дальнейшая валидация результатов, включающая расширенные доклинические исследования. Особый интерес представляет уточнение молекулярных детерминант селективности и смещенного агонизма. Кроме того, актуальной задачей являются исследования с длительным введением, анализ анальгетической активности, феномена толерантности, гипералгезии, вызванной опиоидами, а также супраспинальных эффектов (включая эмоционально-аффективные и когнитивные сферы) на альтернативных видах лабораторных животных.

В заключение следует отметить, что совокупный подход, объединяющий структурное моделирование, взаимодополняющие друг друга *in vitro* и *in vivo* методы, а также поведенческий анализ, позволил сформировать более целостное представление о механизмах действия и фармакологическом профиле соединения РУ-1205.

Следующим этапом диссертационного исследования стал поиск и изучение соединений с атипичной антипсихотической активностью среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. Анализ полученных экспериментальных данных целесообразно проводить в контексте существующих представлений о роли серотонинергической системы в регуляции психических процессов, а также с учетом современных представлений о механизмах фармакологического действия атипичных антипсихотических препаратов (Aringhieri S. et al., 2018). Эволюция подходов к созданию антипсихотических средств в первую очередь была продиктована необходимостью преодоления недостатков типичных нейролептиков, механизм действия которых преимущественно связан с блокадой дофаминовых D_2-рецепторов и характеризуется высоким риском развития экстрапирамидных побочных эффектов. Существенным прогрессом в этой области явилось открытие антипсихотических препаратов атипичного профиля, для которых характерно сочетанное воздействие на дофаминергическую и серотонинергическую системы головного мозга. Центральным компонентом современных

теоретических концепций механизма действия таких препаратов является антагонизм в отношении серотониновых 5-HT_{2A}-рецепторов, что, как предполагается, способствует модуляции дофаминергической нейротрансмиссии в ключевых структурах мозга и ведет к расширению спектра терапевтического действия и улучшению переносимости. В качестве объектов исследования были выбраны соединения, относящиеся к производным бензимидазола. Данный выбор обусловлен принадлежностью бензимидазольного скаффолда к классу «привилегированных структур», для которых накоплен значительный объем экспериментальных данных по направленной модификации структурных элементов, определяющих фармакологическое действие на центральную нервную систему.

При сопоставлении данных QSAR-моделирования и фармакофорного анализа с результатами гибкого докинга и молекулярной динамики можно предположить, что высокая аффинность производных бензимидазола к серотониновому 5-HT_{2A}-рецептору обусловлена прежде всего характерными структурными особенностями, способствующими образованию стабильных π-π-стэкинг взаимодействий с TRP336 и PHE340, а также ионного (солевого) мостика с ASP155. Указанные три аминокислотных остатка играют ключевую роль во взаимодействии антагонистов с 5-HT_{2A}-рецептором, что неоднократно подтверждалось для хорошо изученных соединений, таких как кетансерин (Kristiansen K. et al., 2000), рисперидон и зотепин (Kimura K.T. et al., 2019). Соединение РУ-30, отличающееся этоксифенильным радикалом, формировало дополнительную водородную связь с ASP155, что объясняет более высокие значения энергии связывания по сравнению с соединением РУ-204, несущим тиофен-2-ил заместитель. При этом результаты молекулярной динамики подтвердили, что все три соединения (РУ-30, РУ-31 и РУ-204) устойчиво удерживались в лиганд-связывающем кармане рецептора, сохраняя ключевые взаимодействия на протяжении 100 нс симуляции. Исследование подтвердило высокую перспективность производных бензимидазола в качестве потенциальных антагонистов 5-HT_{2A}-рецептора.

Применение алгоритма UMAP для анализа изменений биоэлектрической активности головного мозга, вызванных введением различных психотропных препаратов, позволило выполнить успешное разделение данных с формированием кластеров, соответствующих каждому веществу. Пространственное расположение кластеров относительно друг друга может служить индикатором сходства или различия физиологических и психотропных эффектов, оказываемых различными веществами. Близкое расположение кластеров указывает на наличие общих фармакологических эффектов и механизмов воздействия соответствующих веществ на центральную нервную систему, в то время как изолированное положение кластера свидетельствует об уникальности или значительном отличии эффектов данного вещества на головной мозг по сравнению с другими исследуемыми соединениями. Анализ внутренней

структуры кластеров, а именно равномерность распределения и плотность точек внутри каждого из них, позволяет оценить стабильность и воспроизводимость воздействия каждого вещества на ЭКоГ-показатели. Большая плотность и равномерность распределения точек внутри кластера указывают на устойчивость и повторяемость реакций головного мозга на введение данного вещества, в то время как рассредоточенность точек свидетельствует о значительной вариабельности ответов между различными субъектами или экспериментальными сессиями.

Сравнительный анализ показал высокую степень сходства эффектов вещества РУ-31 с клозапином, а также с кетансерином и ципрогептадином, известными антагонистами 5-HT_{2A} рецепторов. Этот результат указывает на ключевую роль серотонинергической системы в механизме действия РУ-31. Примечательно, что сходство с клозапином, обладающим полимодальным механизмом действия, может говорить о более сложном фармакологическом профиле РУ-31. Нельзя исключать возможность взаимодействия соединения РУ-31 с дополнительными фармакологическими мишенями, участвующими в патогенезе психоза.

Электрофизиологические эксперименты, включающие анализ LFP, позволили понять, как антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов могут влиять на функциональную активность отдельных областей мозга (таблица 6.2). В частности, анализ спектральной плотности в медиальной префронтальной коре (mPFC) и гиппокампе (Hipp) показал, что кетамин вносит существенные искажения в ритмическую активность мозга, усиливая дельта-, тета-, альфа- и гамма-активность в префронтальной коре и подавляя альфа- и бета-ритм в гиппокампе. Эта перестройка электрогенеза согласуется с известным антагонизмом кетамина в отношении NMDA-рецепторов (Kalmoe M.C. et al., 2020) и с теорией гипоглутаматергической дисфункции при шизофрении (Li C.T. et al., 2019; Kruse A.O. et al., 2022). Атипичный антипсихотик клозапин фактически не восстанавливал нормальные паттерны ритмической активности, при этом дополнительно усиливая патологический гамма-ритм. Селективный 5-HT_{2A}-антагонист РУ-31 в целом демонстрировал схожую тенденцию, повышая мощность гамма-полосы частот в mPFC, однако способствовал нормализации альфа-ритма в mPFC и бета-ритма в гиппокампе. Отличие спектрального профиля вещества РУ-31 от клозапина свидетельствует о том, что селективная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов формирует специфический паттерн кортико-гиппокампальной модуляции, не тождественный мультирецепторному действию клозапина.

Таблица 6.2 – Сводные данные по изменениям мощности спектральной плотности LFP-сигналов, зарегистрированных после введения исследуемых веществ

	Дельта (2–8 Гц)		**Тета (8–12 Гц)**		**Альфа (10–14 Гц)**		**Бета (18–25 Гц)**		**Гамма (30–48 Гц)**	
Отведение	PFC	Hipp	PFC	Hipp	PFC	Hipp	PFC	Hipp	PFC	Hipp
Кетамин	↑	–	↑	↓	↑	–	–	↓	↑	–
РУ-31	↓	↑	↓	↓	–	–	↑	↑	↑	↑
Клозапин	↑	–	–	↓	–	↓	–	–	↑	–

Примечание: ↑ – повышение мощности; ↓ – снижение мощности; "–" – отсутствие влияния.

Исследование соединения РУ-31 в тестах фармакологического взаимодействия также выявило ряд закономерностей. Показано, что вещество не влияет на каталепсию, вызванную галоперидолом, что говорит об отсутствии или крайне малом блокировании дофаминовых D_2-рецепторов в нигростриарном тракте. С одной стороны, это свидетельствует о меньшей вероятности экстрапирамидных побочных эффектов, которые характерны для типичных нейролептиков (Ali T. et al., 2021). С другой – такая особенность может указывать на отсутствие выраженной антипсихотической активности в отношении позитивной симптоматики, которая обусловлена дофаминергической гиперактивностью в мезолимбической системе. Тем не менее дополнительные эксперименты с апоморфином, вызывающим стереотипное поведение, вертикализацию, гиперактивность, агрессию и зевательные движения (в малых дозах), продемонстрировали, что соединение РУ-31 способно в определенной мере подавлять некоторые аспекты дофамин-зависимого поведения, хотя и менее выраженно, чем галоперидол и клозапин. Этот феномен объясняется несколькими механизмами. Во-первых, антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов снижают высвобождение дофамина в стриатуме опосредованно. В первую очередь, они блокируют 5-HT_{2A}-рецепторы на глутаматергических нервных окончаниях, что приводит к уменьшению высвобождения глутамата (Ferguson M.C. et al., 2014). Снижение уровня глутамата, в свою очередь, ослабляет активацию холинергических интернейронов, тем самым сокращается стимуляция дофаминовых терминалей и, как следствие, это способствует угнетению секреции дофамина (Threlfell S. et al., 2012). Во-вторых, существует прямое межрецепторное взаимодействие, поскольку 5-HT_{2A} и D_2-рецепторы могут образовывать функциональные гетеродимерные комплексы (Borroto-Escuela D.O. et al., 2010; Albizu L. et al., 2011; Perreault M.L. et al., 2014). В рамках таких комплексов антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов способны аллостерически изменять конформацию и эффективность передачи сигнала D_2-рецептором, не вступая с ним в прямое конкурентное взаимодействие, что в итоге ослабляет эффекты агониста дофамина апоморфина.

Отдельно стоит отметить данные о взаимодействии соединения РУ-31 с ГАМК-ергической системой. В тесте пикротоксиновых судорог соединение демонстрировало способность увеличивать латентный период судорог и снижать общее количество судорожных приступов, что согласуется с возможной модуляцией ГАМК-ергической передачи. Согласно литературным данным антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов предотвращают индуцированное агонистами (5-НТ, DOI) ослабление ГАМК-ергической передачи в корковых нейронах (Wang H. et al., 2016). Предполагается, что именно этот механизм, поддерживающий тормозные процессы в нейросетях, лежит в основе, наблюдаемой в ряде экспериментальных моделей противосудорожной активности данных соединений (Celada P. et al., 2013; Ray A. et al., 2019). Следовательно, тот факт, что соединение РУ-31 снижало частоту судорог, вызванных пикротоксином, хорошо согласуется с ранее описанными механизмами серотониновой регуляции ГАМК-ергической передачи.

В тестах на клонидиновую гипотермию и взаимодействие с ареколином не было обнаружено существенного влияния соединения РУ-31, что говорит об отсутствии значимого α_2-адренергического или М-холиноблокирующего компонента действия. С практической точки зрения отсутствие влияния на α_2-адренорецепторы может рассматриваться как положительная характеристика, поскольку некоторые нежелательные эффекты (например, чрезмерная седация и гипотензия), связанные со взаимодействием с адренорецепторами, в данном случае маловероятны. Наряду с этим отсутствие заметного антагонизма к М-холинорецепторам уменьшает риск развития антихолинергических побочных явлений, таких как сухость во рту, задержка мочеиспускания, запоры и когнитивные нарушения. Клозапин, известный своим широким профилем рецепторной активности, особенно выраженно влияет на М-холинорецепторы, что ограничивает его терапевтическую применимость из-за ряда побочных эффектов (Michal P et al.., 1999; Every-Palmer S., 2017). Следовательно, более узкая направленность действия соединения РУ-31, сфокусированная на 5-HT_{2A}, может быть преимуществом, особенно в аспекте переносимости и безопасности.

Отдельная часть работы, посвященная исследованию нейрональных ионных токов и взаимодействию с 5-НТ, проливает свет на еще один аспект функциональной роли 5-HT_{2A}-рецепторов. Введение 5-НТ приводило к возникновению исходящих гиперполяризующих токов в пирамидных нейронах L6 медиальной префронтальной коры, что подтверждает участие 5-HT_{2A}-рецепторов в регуляции возбудимости этих клеток. Обнаружено, что соединение РУ-31 значительно снижало амплитуду тока, при этом галоперидол практически не изменял реакцию, а клозапин давал схожий эффект с веществом РУ-31.

В ранее проведенном исследовании (Tian M.K. et al., 2016) было показано, что серотонин оказывает значительное ингибирующее действие на пирамидные нейроны 6 слоя медиальной

префронтальной коры и подавляет исходящие сигналы к интернейронам слоя 5 (L5) в медиальной префронтальной коре. Это подавление активности L6 под воздействием 5-НТ обусловлено совместным действием рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A}. С помощью трансгенных мышей и оптогенетических методов исследователи выявили функциональную связь между пирамидными нейронами L6 и интернейронами L5, которая признана важной для поддержания когнитивных функций. Пирамидные нейроны L6 в префронтальной коре возбуждают две основные группы интернейронов в L5, включая экспрессирующие парвальбумин и соматостатин.

Дальнейшие эксперименты показали, что большинство интернейронов L5 (как быстроспайковые, так и неспайковые) слабо реагируют на 5-НТ. Лишь небольшое число этих клеток демонстрировало электрофизиологические ответы, которые в большинстве случаев были недостаточны для вызова спайков. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что активация рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} может ингибировать возбудимость нейронов L5 в префронтальной коре, опосредованно через нейроны L6. Учитывая, что при шизофрении фиксируется гипофункция нейронов L5, это может быть одним из механизмов, способствующих развитию когнитивных нарушений при шизофрении, которые могут быть устранены антагонистами 5-HT_{2A}, что в полной мере согласуется с полученными нами результатами.

В исследованиях на модели препульсового ингибирования (PPI), применяемой для оценки сенсомоторного гейтинга и когнитивной дисфункции, соединение РУ-31 продемонстрировало способность восстанавливать угнетенный кетамином уровень PPI до контрольных значений. Известно, что кетамин, будучи антагонистом NMDA-рецепторов, вносит вклад в дисбаланс дофаминергической системы в префронтальной коре, и, предположительно, именно этот эффект моделирует ключевые аспекты шизофреноподобных нарушений.

Предыдущие исследования показали, что системное введение антагонистов 5-HT_{2A} рецепторов, таких как MDL 100,907, приводит к увеличению высвобождения дофамина в медиальной префронтальной коре (Schmidt C.J., 1995). Локальное введение ритансерина непосредственно в mPFC также способствует увеличению высвобождения дофамина в этой области (Pehek E.A., 1996). Примечательно, что локальное введение типичного антипсихотика галоперидола усугубляло дефицит PPI, что согласуется с данными о том, что блокада D_2-рецепторов в медиальной префронтальной коре может усиливать когнитивные нарушения, характерные для шизофрении. Клозапин, хотя и продемонстрировал некоторую тенденцию к восстановлению PPI, не достигал той степени эффективности, которая была отмечена при введении вещества РУ-31, что позволяет предположить более выраженный модулирующий эффект последнего в условиях гиподофаминергии префронтальных областей.

Исследования на апоморфиновых моделях также подтвердили, что РУ-31 способно влиять на дофаминергическую систему, но без выраженного угнетения двигательной активности, характерного для типичных антипсихотиков. В тестах вертикализации и стереотипного поведения, вызванных апоморфином, галоперидол ожидаемо проявил высокую активность, наиболее эффективно блокируя проявления гипердопаминергического стереотипного поведения. Однако сопутствующим эффектом у него фиксировалась выраженная редукция общей двигательной активности (в том числе в тесте открытого поля), что отражает типичную картину побочных экстрапирамидных эффектов. Клозапин и вещество РУ-31, напротив, были менее эффективны (включая тест с агрессивным поведением).

Экспериментальная оценка вещества РУ-31 на нескольких моделях психопатологии (неонатальной деструкции вентрального гиппокампа, кетамин-индуцированного и ЛПС-индуцированного психоза) указывает на его широкий спектр действия, схожий с профилем атипичных антипсихотиков. В частности, соединение РУ-31, как и клозапин, снижало гиперактивность и восстанавливало социальное поведение, что свидетельствует о влиянии как на негативные, так и позитивные симптомы. При этом в ряде случаев (например, в модели с деструкцией вентрального гиппокампа) вещество РУ-31 оказывало более заметный эффект на социальные взаимодействия, чем клозапин. Вместе с тем, вещество РУ-31 и клозапин проявляли прокогнитивную активность, а именно улучшали показатели распознавания нового объекта на этапах долговременного удержания информации, тогда как при кратковременных интервалах этого эффекта не отмечалось. Такой паттерн может быть объяснен тем, что патологические механизмы, связанные с нарушениями долгосрочной памяти при моделированных психотических состояниях, в большей степени зависят от дофаминергического дефицита в префронтальной коре, тогда как кратковременные процессы, вероятно, вовлекают иные нейромедиаторные системы (McLean S.L. et al., 2017; Papp M. et al., 2019; Landeta A.B. et al., 2022).

В ходе анализа поведения с помощью компьютерного зрения выявилось, что РУ-31 в меньшей степени, чем клозапин, проявляет седативный эффект и подавляет локомоцию. При введении вещества РУ-31 отмечалось избирательное снижение некоторых форм ориентировочного поведения, в то время как клозапин угнетал практически все аспекты двигательной активности и существенно изменял структуру грумингового поведения. Такое воздействие соединения РУ-31 на поведенческие паттерны согласуется с общим предположением о его благоприятном профиле безопасности и более селективном эффекте в отношении ключевых патогенетических звеньев шизофрении. Похожая тенденция проявилась и при проведении исследований в Т-образном лабиринте: соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг незначительно влияло на рабочую память, тогда как более высокая доза (20 мг/кг) подобно

клозапину приводила к снижению показателя спонтанного чередования. Очевидно, что при повышении концентрации вещество способно нарушать функции структур мозга, ответственных за когнитивный контроль, при этом терапевтическое окно вещества РУ-31 выглядит предпочтительнее на фоне выраженного когнитивного подавления, наблюдаемого при введении клозапина.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что комплексное применение методов скрининга *in silico*, электрофизиологии и поведенческих тестов не только подтвердило целесообразность разработки производных бензимидазола с 5-HT_{2A}-антагонистической активностью, но и позволило выявить наиболее перспективное соединение РУ-31. Особый интерес вызывает способность соединения РУ-31 в ряде психотических моделей корректировать когнитивные нарушения, что согласуется с современной концепцией о важной роли 5-HT_{2A}-рецепторов в регуляции дофаминовой передачи, особенно в префронтальной коре (Courtiol E. et al., 2021). Проявляя высокий уровень избирательности и низкую выраженность седативных свойств, вещество РУ-31 в составе моно- и комбинированной терапии может обеспечить как антипсихотический эффект, так и улучшение некоторых когнитивных функций, которые обычно угнетаются при использовании типичных антипсихотиков.

Такой эффект хорошо отвечает современным требованиям к лечению шизофрении, где качество жизни пациента не сводится лишь к контролю бреда и галлюцинаций. Значение приобретает восстановление социальных функций, мотивации, внимания, исполнительных функций.

Заключительным блоком диссертационной работы явились исследования новых галогенфенилзамещенных производных бензимидазола. Предварительные данные свидетельствуют о наличии у производных бензимидазола ряда свойств, позволяющих рассматривать их как перспективный класс для доклинических исследований в качестве потенциальных противоэпилептических и нейропротективных агентов. Выбор исследуемых соединений, в том числе был обоснован их вероятной способностью взаимодействовать с каппа-опиоидным рецептором, что обусловлено структурной близостью с веществом РУ-1205.

Известно, что каппа-опиоидная система оказывает влияние не только на процессы ноцицепции, но и на регуляцию возбудимости центральной нервной системы (Pina M.M. et al., 2020; Ji M.J. et al., 2021). Ряд исследований указывает на потенциальную роль агонистов каппа-опиоидных рецепторов в модуляции судорожной активности, что предположительно связано с их способностью регулировать пресинаптическое высвобождение различных нейромедиаторов, таких как глутамат, дофамин и ГАМК (Queenan B.N. et al., 2018; Karkhanis A.N. et al., 2023). В связи с этим направленная модуляция активности каппа-опиоидных рецепторов представляет собой перспективную стратегию для разработки новых

противосудорожных средств. В частности, селективное воздействие на КОР может снизить риск развития тяжелых нежелательных явлений, ассоциированных с активацией мю-рецепторов, таких как угнетение дыхательного центра, развитие толерантности и лекарственной зависимости (Albert-Vartanian A. et al., 2016; Günther T. et al., 2018; Herman T.F. et al., 2025).

На начальном этапе исследования была разработана QSAR-модель, предназначенная для прогнозирования агонистической активности соединений в отношении каппа-опиоидного рецептора. Прогностическая способность построенных моделей подтверждается высокими значениями коэффициентов детерминации ($R^2 > 0,8$) на валидационной и тестовой выборках, а также низкими значениями среднеквадратичной ошибки (RMSE). Данные показатели свидетельствуют о релевантности использованных молекулярных дескрипторов и адекватности применения метода Random Forest для решения задач данного класса.

Установлено, что к числу ключевых структурных детерминант, обусловливающих высокую активность, относится наличие гидрофобных фрагментов, которые участвуют в π-стэкинге и других типах нековалентных взаимодействий в гидрофобном кармане рецептора. В соответствии с литературными данными, важным фактором для связывания агонистов с каппа-опиоидным рецептором является формирование солевого мостика с анионным центром, в роли которого, как правило, выступает остаток аспартата в трансмембранном домене (Martinez-Mayorga K. et al., 2013).

Результаты, полученные методом гибкого молекулярного докинга, подтверждают необходимость наличия в структуре лигандов функциональных групп, способных к формированию прочного взаимодействия с остатком ASP138. Эта закономерность согласуется с классической моделью, согласно которой активный сайт опиоидных рецепторов содержит анионный участок, ответственный за стабилизацию катионной группы лиганда (Vardy E. et al., 2013). Низкое значение показателя «docking score» (порядка −9,2 ккал/моль) для соединения BIF-72, сопоставимое с показателями для референсных лигандов (например, буторфанола), позволяет предположить его высокую способность к принятию энергетически выгодной конформации в активном сайте. Следует отметить, что, хотя «docking score» не является прямым предиктором фармакологической активности *in vivo*, он служит эффективным инструментом для отбора наиболее перспективных молекул для дальнейших углубленных исследований.

Данные молекулярно-динамического моделирования свидетельствуют о стабилизации положения лигандов в связывающем кармане рецептора к 50 нс симуляции. С учетом того, что изученные комплексы с веществами BIF-70 и BIF-72 продемонстрировали близкие профили стабилизации RMSD (как для белка, так и для лиганда), можно предположить, что структурное общее ядро этих производных обеспечивает схожие принципы связывания. Вместе с тем, наблюдаемые различия в амплитуде флуктуаций лигандов (2,5–3,0 Å и 2,5–4,0 Å)

свидетельствуют о том, что наличие или отсутствие периферических заместителей определяет формирование дополнительных взаимодействий (в частности, π-стэкинга с остатками тирозина), которые, предположительно, и обусловливают более высокое сродство. Ключевая роль остатков тирозина (TYR139, TYR312, TYR320 и др.) во взаимодействии с лигандами каппа-опиоидного рецептора подтверждается и другими исследованиями, демонстрирующими формирование π-π-взаимодействий между агонистами и данными ароматическими остатками (Santino F., 2023). В целом, стабильность комплексов с рецептором может рассматриваться как фактор, коррелирующий с высокой вероятностью функционального ответа в условиях *in vivo*.

Была проведена оценка потенциальной противосудорожной активности соединений с использованием электрофизиологических методов и алгоритмов машинного обучения. Анализ электрокортикографических данных показал, что по профилю влияния на биоэлектрическую активность мозга соединение BIF-72 в пространстве признаков располагается вблизи с известными антиконвульсантами (в частности, с топираматом), что свидетельствует о его вероятном противосудорожном действии. Напротив, соединение BIF-70 по результатам анализа биопотенциалов заняло промежуточное положение между контрольной группой и проконвульсантами. Вместе с тем, результаты теста условного предпочтения места указывают на возможное наличие у соединения BIF-70 слабо выраженного подкрепляющего (потенциально эйфорического) эффекта, поскольку животные демонстрировали предпочтение камеры, ассоциированной с введением данного вещества. Для соединения BIF-72 аналогичных поведенческих изменений не наблюдалось. Эти данные противоречат классическим представлениям о функциональной роли каппа-опиоидных рецепторов, активация которых, как правило, ассоциируется с дисфорией и аверсивными реакциями. Такое несоответствие может быть обусловлено функциональной активностью вещества BIF-72, тогда как эффект соединения BIF-70 может объясняться взаимодействием с другими подтипами опиоидных рецепторов, хотя данные SAR это не подтверждают.

Эксперименты на животных с использованием классических тестов для оценки противосудорожной активности (максимальный электрошок, коразоловые судороги, модели фокальной эпилепсии и хронических рецидивирующих судорог) продемонстрировали неоднозначные результаты. Так, в тесте с максимальным электрошоком соединение BIF-70 не снижало длительности судорог, а соединение BIF-72 увеличивало выживаемость, хотя и не предотвращало судорожные проявления полностью. Данный результат можно интерпретировать с позиции того, что максимальный электрошок является “жесткой” моделью, чувствительной лишь к ограниченному спектру антиконвульсантов, например, агентам, которые блокируют натриевые каналы (фенитоин или карбамазепин) (Brodie M.J., 2017; Barker-Haliski M. et al., 2018). В то же время способность повышать выживаемость животных даже при отсутствии

заметного подавления судорог может косвенно указывать на нейропротективное действие. Аналогичная тенденция заметна и в тесте коразоловых судорог, где соединения BIF-70 и BIF-72 не оказывали существенного воздействия на миоклонус и развитие клонических приступов, однако увеличивали латентное время до тонической фазы судорог. Такая комбинация противосудорожных и нейропротекторных свойств уже наблюдается у ряда современных препаратов, которые не устраняют судорожные припадки полностью, но значительно повышают уровень выживаемости нейронов в условиях приступа, снижая выраженность нейродегенеративных изменений (Smith G.R. et al., 2014; Liu L. et al., 2017; Osuntokun O.S. et al., 2021). Увеличение времени наступления наиболее тяжелой стадии судорог указывает, что вещество может модифицировать нейрон-глиальные процессы (Ahmadirad N. et al., 2014; Diaz Verdugo C. et al., 2019). При этом эффект оказался наиболее заметным у вещества BIF-72, что подтверждает его более высокую эффективность в сравнении с веществом BIF-70.

В моделях хронической эпилепсии, включая пилокарпиновую модель спонтанных рецидивирующих судорог и модель коразолового киндлинга, для соединения BIF-72 были установлены статистически значимые противосудорожные эффекты. В то же время, в модели острых фокальных судорог, индуцированных пенициллином, данное соединение не оказывало существенного влияния на тяжесть и латентный период приступов.

Данное расхождение, предположительно, обусловлено различиями в патогенезе моделей. В пенициллиновой модели первичная гипервозбудимость связана с локальной блокадой $ГАМК_A$-рецепторов в коре головного мозга. Отсутствие у BIF-72 прямого влияния на этот механизм объясняет его низкую эффективность. Напротив, в хронических моделях эпилептогенеза, где ключевую роль играет общая модуляция возбудимости в гиппокампе и других лимбических структурах, воздействие на каппа-опиоидные рецепторы приобретает большее значение. Наблюдаемое снижение частоты судорог согласуется с данными о том, что активация каппа-опиоидных рецепторов подавляет избыточную глутаматергическую передачу, влияет на нейровоспалительные каскады и может модифицировать процессы эпилептогенеза (Queenan B.N. et al., 2018; Liu L. et al., 2020; Reeves K.C. et al., 2022).

Кроме того, предполагается, что активация каппа-рецепторов может предотвращать апоптоз нейронов за счет модуляции воспалительного ответа и снижения продукции цитокинов (Beck T.C. et al., 2019; Fan J. et al., 2021). Это предположение было подтверждено в экспериментах по изучению нейропротекторных свойств, в которых соединение BIF-72 продемонстрировало способность повышать выживаемость нейронов в модели ЛПС-индуцированного воспаления, а также уменьшать объем инфаркта при окклюзии средней мозговой артерии (модель ишемического инсульта). Вероятный механизм данного нейропротекторного действия связан со способностью соединения ингибировать продукцию

провоспалительного медиатора оксида азота в культуре макрофагов в нецитотоксических концентрациях. Снижение уровня NO обеспечивает комплексный цитопротекторный эффект, поскольку оксид азота является ключевым участником нейровоспалительных и оксидативных процессов, ведущих к гибели нейронов при эпилепсии и ишемии.

Наблюдения в модели ишемического повреждения мозга (эндоваскулярная окклюзия ЛСМА) подтверждают, что соединение BIF-72 уменьшает объем инфаркта и снижает выраженность двигательных нарушений у экспериментальных животных. Однако полного восстановления неврологического дефицита не наблюдалось. Выявленные эффекты соответствуют действию классического каппа-агониста U-50488, что подтверждает роль каппа-рецепторов в патогенезе ишемического повреждения (Chunhua C. et al., 2014; Dalefield M.L. et al., 2022). Каппа-агонисты, как известно, способны улучшать регионарный кровоток за счет сложных гемодинамических эффектов, а также снижать уровень провоспалительных цитокинов и ослаблять микроглиальную воспалительную реакцию (Wang Z. et al., 2012; Liu L. et al., 2020; Misilimu D. et al., 2022). Полученные результаты позволяют предположить, что соединение BIF-72 может задействовать аналогичные механизмы, приводя к уменьшению зоны некроза и снижению выраженности двигательных нарушений. Однако остается открытым вопрос об эффективности вещества при отложенном введении. Подобные ограничения отмечаются и у ряда других нейропротекторов (цитиколин, церебролизин, NXY-059), терапевтический эффект которых при острой ишемии существенно зависит от того, на какой стадии патологического процесса был применен препарат (Dávalos A. et al., 2002; Lees K.R. et al., 2006; Zhang D. et al., 2017).

При наличии нейропротекторного и противосудорожного потенциала, соединение BIF-72 не оказывало значимого негативного влияния на моторную функцию и мышечную силу крыс, что было подтверждено в тестах «вращающийся стержень» и «удержание на сетке». Это свидетельствует о том, что при подборе терапевтически релевантных доз возможно минимизировать риск развития нежелательных явлений, характерных для антиконвульсантов (седация, миорелаксация, атаксия) (Hansen C.C. et al., 2018; Akyüz E. et al., 2021). Вместе с тем, было выявлено умеренное негативное влияние на когнитивные функции в тесте спонтанной альтернации в Т-образном лабиринте, что выражалось в дозозависимом снижении процента правильных чередований. Тем не менее, степень выраженности данного эффекта для BIF-72 была ниже, чем у препарата сравнения топирамата. Данный результат согласуется с литературными данными о том, что многие противосудорожные препараты в высоких дозах способны нарушать функции рабочей памяти (Witt J.A. et al., 2015; Helmstaedter C., 2020; Callisto S.P. et al., 2020). В том числе для топирамата показано, что он оказывает отрицательное влияние на когнитивную сферу (в частности, на эпизодическую память и речевые функции)

(Novak A. et al., 2022). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить наличие у соединения BIF-72 более благоприятного профиля безопасности в отношении когнитивных функций, что обосновывает целесообразность его дальнейшего доклинического изучения.

Сравнительный анализ влияния соединения BIF-72 и препарата сравнения топирамата на спонтанное поведение крыс в открытом поле выявил как общие, так и специфические закономерности в модуляции двигательной активности. Воздействие соединения BIF-72 носило более селективный характер, проявляясь преимущественно в снижении частоты активных ориентировочно-исследовательских действий при одновременном дозозависимом усилении вертикальной ориентации и сохранении на уровне контроля иных рутинных форм активности. В отличие от этого, топирамат демонстрировал более генерализованное влияние, вызывая масштабную перестройку поведенческого профиля, которая включала подавление стереотипных форм активности и груминга на фоне увеличения доли медленных локомоторных компонентов. Установленные поведенческие профили, несмотря на общую направленность терапевтических эффектов у обоих соединений, указывают на различные нейробиологические механизмы и мишени в центральной нервной системе. Терапевтический потенциал агонистов каппа-опиоидных рецепторов при эпилепсии и ишемических повреждениях головного мозга обусловлен их комплексным действием, включающим снижение нейрональной возбудимости, улучшение регионарного мозгового кровотока и реализацию антиэксайтотоксического эффекта посредством ингибирования высвобождения глутамата и подавления нейровоспалительных процессов (Chunhua C. et al., 2014).

Проведенные исследования позволили установить, что структурные особенности соединений BIF-70 и BIF-72, в частности наличие фрагментов, обеспечивающих взаимодействие с ASP138 и остатками тирозина каппа-опиоидного рецептора, определяют их аффинность к данной мишени. Это подтверждается результатами молекулярного докинга, высокой стабильностью комплексов в ходе молекулярно-динамического моделирования, а также данными на модели активации тромбоцитов. Эксперименты *in vivo* выявили существенные различия в фармакологической активности: соединение BIF-72 продемонстрировало статистически значимые противосудорожные и нейропротекторные свойства, в то время как BIF-70 показало низкую эффективность и более высокую цитотоксичность. Установлено, что одним из механизмов действия BIF-72 является ингибирование продукции оксида азота (NO), что указывает на значимый вклад противовоспалительного компонента в его нейропротекторный эффект. При этом соединение не оказывает существенного влияния на моторные функции, хотя в высоких дозах демонстрирует умеренное негативное воздействие на рабочую память.

Таким образом, совокупность полученных данных характеризует соединение BIF-72 как перспективный лиганд каппа-опиоидных рецепторов. Его ключевым преимуществом является сочетание умеренной антиконвульсантной активности с выраженным нейропротекторным действием и отсутствием аверсивных эффектов, характерных для агонистов данного типа. В отличие от стандартных антиконвульсантов, действующих, главным образом, на ионные каналы или ГАМК-ергическую систему, соединение BIF-72, предположительно, реализует свой эффект через альтернативные сигнальные пути, что представляет особый интерес для терапии лекарственно-резистентных форм эпилепсии и коморбидных состояний, таких как постинсультная эпилепсия.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о перспективности производных бензимидазола и определяют направления для дальнейших исследований. К ним относятся детальное изучение фармакокинетики BIF-72, включая его проницаемость через гематоэнцефалический барьер, оценка эффектов при хроническом введении, а также исследование его потенциала в комбинированной терапии. Дальнейшего изучения требуют и клеточные механизмы его действия, включая влияние на экспрессию цитокинов, активацию микроглии и окислительный стресс. Тем не менее, уже на данном этапе можно заключить, что соединение BIF-72 обладает оптимальным соотношением эффективности и безопасности, что позволяет рассматривать его в качестве наиболее перспективного кандидата для дальнейшей доклинической разработки.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждено, что конденсированные производные бензимидазола представляют собой перспективный класс химических соединений для разработки новых нейропсихотропных средств. В рамках диссертационного исследования среди молекул с бензимидазольным кором идентифицированы и охарактеризованы селективный каппа-опиоидный агонист с анальгетической и противозудной активностью (соединение РУ-1205), атипичный антипсихотик с 5-HT_{2A}-антагонистической активностью (соединение РУ-31) и антиэпилептогенное средство с нейропротективными свойствами (соединение BIF-72).
2. Методология *in silico* прогнозирования (QSAR-моделирование, включая построение ландшафтов активности и SAS-карт, фармакофорный анализ, молекулярный докинг и молекулярная динамика) в комбинации с биопотенциал-опосредованным подходом является эффективным инструментом для целенаправленного поиска и первичной характеристики нейропсихотропных веществ. Данный метод позволяет на ранних этапах не только предсказывать фармакологические эффекты, но и с высокой точностью дискриминировать соединения по механизму действия.
3. Установлено, что соединение РУ‑1205 проявляет центральные анальгетические свойства и косвенные признаки G‑белок‑смещенного сигналинга. При докировании вещества в каппа-опиоидный рецептор и симуляции молекулярной динамики выявлен солевой мостик с ASP138, а также устойчивые водородные связи (ASP138, GLN115, SER211) с характерными π‑стэкинг‑контактами (TYR139); при длительной МД (300 нс) установлены различия локальной подвижности внутриклеточных доменов, взаимодействующих с β‑аррестином, по сравнению с U‑50488, что согласуется с гипотезой смещенного сигналинга. На клеточном уровне (patch‑clamp) показан конкурентный антагонизм вещества РУ‑1205 с U‑50488 по месту связывания (смещение кривой «доза‑эффект» вправо без снижения $Э_{max}$), сопровождающийся устранением U‑50488-индуцированного усиления спайковой активности пирамидных нейронов миндалины. Функционально это выражалось анальгетическим эффектом при микроинъекциях в PAG и NRM (дозы 5,6 и 1,6 мкг для соединения РУ‑1205 и U‑50488; $n = 8$; $p < 0,05$ во всех тестах), и противозудной активностью как при остром серотонин‑индуцированном зуде (снижение медианы на 21,5 эпизода; $p < 0,05$), так и в модели «сухой кожи» (снижение медианы на 23,5 эпизода; $p < 0,05$), при отсутствии влияния на аллокнезис.
4. Обоснован благоприятный профиль безопасности соединения РУ‑1205. В ходе мультипараметрической оценки поведения (10 отдельных паттернов; $n = 9$) вещество не

проявляло седативные и стереотипогенные эффекты в отличие от референсного каппа-агониста буторфанола, который снижал скорость поступательного движения и подавлял элементы ориентировочно-исследовательского поведения ($p < 0,001$), что может быть отнесено к β-аррестин-опосредованным побочным эффектам. При исследовании когнитивных функций нарушений рабочей памяти после введения соединения РУ-1205 в дозах 10 и 20 мг/кг не выявлено.

5. Экспериментально доказано, что соединение РУ-31 оказывает атипичное антипсихотическое действие, что объясняется селективным антагонизмом к 5-HT_{2A} рецепторам. Гибкий докинг и МД (100 нс) подтвердили стабильное связывание с 5-HT_{2A}-рецептором за счет ключевых взаимодействий: солевого мостика с ASP155 и π-π-стэкинга с TRP336 и PHE340. В patch-clamp исследовании на пирамидных нейронах L6 mPFC введение 10 мкМ РУ-31 на 10 мин уменьшало 5-НТ-индуцированный исходящий ток на 59,11% (до 20,54 ± 7,12 пА; $n = 8$; $p < 0,0211$), эффект сопоставим с клозапином (23,37 ± 6,41 пА; $p < 0,0395$). На нейрофизиологическом уровне соединение РУ-31 восстанавливало нарушенные кетамином паттерны активности и связность в системе «mPFC-гиппокамп», а поведенчески ослабляло позитивные и когнитивные симптомы в ряде валидированных моделей (кетамин-/ЛПС-индуцированный психоз, NVHL-модель), при этом не проявляя значительной активности в апоморфиновых моделях, что указывает на преобладание 5-HT_{2A}-антагонизма при минимальном вовлечении D_2-системы.
6. Подтвержден более безопасный нейротоксикологический профиль соединения РУ-31 по сравнению с клозапином: в задаче спонтанного чередования (Т-лабиринт, $n = 10$) соединение РУ-31 в дозе 20 мг/кг умеренно снижало %СЧ до 53,60 [45,75;59,45] ($p < 0,05$) при 73,15 [67,05;80,68] в контроле, тогда как клозапин (15 мг/кг) вызывал выраженное падение показателя до 28,95 [26,00;41,58] ($p < 0,001$). В ходе мультипараметрического анализа поведения фиксировалось меньшее угнетение локомоции и исследовательской активности при введении вещества РУ-31, а экстрапирамидные нарушения не регистрировались, что согласуется с отсутствием значимого антагонизма к D_2-рецепторам.
7. Выявлено, что соединение BIF-72 обладает нейропротективным и антиэпилептогенным действием. С помощью QSAR-моделирования и гибкого докинга показано, что вещество BIF-72 взаимодействует с каппа-опиоидным рецептором с наилучшим докинг-скором (–9,230 ккал/моль), формирует ключевые связи (солевой мостик с ASP138, π-стэкинг с TYR139), стабильность которых подтверждена в ходе МД-симуляций. В ходе LFP-анализа с применением технологий машинного обучения показана близость

электрофизиологического профиля BIF⁻72 с противосудорожными средствами при наибольшем сходстве с топираматом (0,847), что указывает на общность ключевых нейросетевых мишеней. В модели коразолового киндлинга соединение в дозе 20 мг/кг уменьшало тяжесть судорожных явлений (средний балл не превышал 2,5; $p < 0,05$) и снижало летальность (выживаемость к 31⁻му дню: 87% при введении вещества BIF⁻72, 80% при введении топирамата в дозе 30 мг/кг и 53% в контроле; χ^2, $p < 0,05$). В модели СРС после введения пилокарпина вещество BIF⁻72 и топирамат сокращали частоту тяжелых припадков ($p < 0,05$). Для соединения BIF-72 установлена способность предотвращать гибель клеток в условиях ЛПС-индуцированного нейровоспаления на срезах гиппокампа ($p < 0,05$) и снижать объем ишемического очага при окклюзии средней мозговой артерии у крыс на 32,73% по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$), в основе чего может лежать ингибирование соединением продукции оксида азота (II).

8. Показано, что применение соединения BIF⁻72 не сопровождается выраженными побочными эффектами. В Т⁻лабиринте соединение в дозе 20 мг/кг не вызывало статистически значимого снижения рабочей памяти относительно контроля, тогда как повышение дозы до 40 мг/кг приводило к умеренному угнетению спонтанного чередования на 15,75% ($p < 0,01$), сопоставимому с эффектом топирамата 40 мг/кг (снижение на 19,75%; $p < 0,01$). При этом в тестах на вращающемся стержне и удержании на сетке соединение BIF-72 не вызывало нарушений координации и мышечного тонуса. В тесте условного предпочтения места и по данным регрессионной LFP-модели соединение продемонстрировало нейтральный профиль, лишенный аверсивных и эйфорических свойств.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Продолжить направленный поиск и оптимизацию новых соединений с нейропсихотропной активностью в ряду конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. Установленные в ходе исследования взаимосвязи «структура-активность», а также построенные QSAR- и фармакофорные модели целесообразно использовать в качестве валидированного инструмента для дизайна и скрининга новых молекул с заданными фармакологическими свойствами.
2. Рекомендуется завершить полный цикл доклинических исследований соединения-лидера РУ-1205 как анальгетика нового поколения с уникальным профилем безопасного селективного каппа-опиоидного агониста.
3. Целесообразно проведение углубленных доклинических исследований соединения РУ-31 5-$НТ_{2А}$-антагонистическим механизмом действия в качестве потенциального атипичного антипсихотика или адъювантного средства, способного корректировать позитивную и когнитивную симптоматику без развития экстрапирамидных нарушений.
4. Представляется перспективным проведение полных доклинических исследований соединения BIF-72 в качестве нейропротекторного и болезнь-модифицирующего противоэпилептического средства.
5. Разработанную методологию комплексной оценки нейропсихотропной активности, основанную на биопотенциал-опосредованном подходе с применением алгоритмов машинного обучения, рекомендуется внедрить в практику доклинических исследований в научно-исследовательских центрах и фармацевтических компаниях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан

в/б – внутрибрюшинно

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДСО – длительность существования очага (эпилептической активности)

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИК – иботеновая кислота

ИР – иктальный разряд / ишемия-реперфузия

ИИР – интериктальный разряд

и.ц.в. – интрацереброventрикулярно

КД – коэффициент дискриминации

КОР – каппа-опиоидный рецептор

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛП – латентный период

ЛПС – липополисахарид

ЛСМА – левая средняя мозговая артерия

МАО – моноаминоксидаза

МД – молекулярная динамика

МЭШ – максимальный электрошок

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ПАМ – положительные аллостерические модуляторы

ПД – постнатальный день

п/к – подкожно

ПЭП – противоэпилептические препараты

СРС – спонтанные рецидивирующие судороги

СЧ – спонтанные чередования

УРИМ– условнорефлекторная реакция избегания места

ЦНС – центральная нервная система

ЭКоГ – электрокортикография

ЭЭГ – электроэнцефалография

ЭС – эпилептический статус

5-НТ (5-hydroxytryptamine) – 5-гидрокситриптамин, серотонин

α,β-meATP (α,β-methylene-ATP) – агонист пуринергических рецепторов

ACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid) – искусственная спинномозговая жидкость

ADME-T (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) – абсорбция, распределение, метаболизм, выведение, токсичность

AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолилпропионовая кислота

BBB (Blood–Brain Barrier) – гематоэнцефалический барьер

BLA (BasoLateral Amygdala) – базолатеральный комплекс миндалины

CC (Cytotoxic Concentration) – полуцитотоксическая концентрация

CNN (Convolutional Neural Network) – сверточная нейронная сеть

CRF (Corticotropin-Releasing Factor) – кортикотропин-рилизинг фактор

EC (Effective Concentration) – эффективная концентрация

ED (Effective Dose) – эффективная доза

DL (Deep Learning) – глубокое обучение

FBS (Fetal Bovine Serum) – фетальная бычья сыворотка.

FFT (Fast Fourier Transform) – быстрое преобразование Фурье

GPC (Gaussian Process Classifier) – классификатор на гауссовских процессах

Hipp (Hippocampus) – гиппокамп

ICA (Independent Component Analysis) – метод независимых компонент

IC (Inhibitory Concentration) – ингибирующая концентрация

Ki (inhibition constant) – константа ингибирования

LFP (Local Field Potentials) – локальные полевые потенциалы

LSTM (Long Short-Term Memory) – долгосрочная краткосрочная память

MAE (Mean Absolute Error) – средняя абсолютная ошибка

MAPK (p38) (Mitogen-Activated Protein Kinase p38) – митоген-активируемая протеинкиназа p38

MED (Minimum Effective Dose) – минимально эффективная доза

ML (Machine Learning) – машинное обучение

mPFC (medial PreFrontal Cortex) – медиальная префронтальная кора

NAc (Nucleus Accumbens) – прилежащее ядро

NMDA (N-methyl-D-aspartate) – N-метил-D-аспартат

norBNI (nor-binaltorphimine) – норбиналторфимин

NRM (Nucleus Raphe Magnus) – большое ядро шва

PAG (PeriAqueductal Gray) – околоводопроводное серое вещество

PCA (Principal Component Analysis) – метод главных компонент

PLSR (Partial Least Squares Regression) – регрессия по наименьшим частным квадратам

PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) – гамма-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом

PPI (PrePulse Inhibition) – препульсовое ингибирование

QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationships) – количественные соотношения «структура–активность»

RF (Random Forest) – случайный лес

R^2 (coefficient of determination) – коэффициент детерминации

RMSE (Root Mean Square Error) – среднеквадратичная ошибка

RMSD (Root Mean Square Deviation) – среднеквадратичное отклонение

RMSF (Root Mean Square Fluctuation) – среднеквадратичная флуктуация

SAR (Structure–Activity Relationships) – соотношения «структура–активность»

SVM (Support Vector Machine) – метод опорных векторов

t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) – стохастическое вложение соседей с t-распределением

UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) – равномерная аппроксимация и проекция многообразия

VTA (Ventral Tegmental Area) – вентральная область покрышки

wPLI (weighted Phase-Lag Index) – взвешенный индекс фазовой задержки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ взаимодействия производного диазепино[1,2-а]бензимидазола соединения ДАБ-21 с основными лигандами нейромедиаторных систем / Д. В. Мальцев, А. А. Спасов, М. В. Мирошников [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 1(77). – С. 131-136.
2. Анксиолитический потенциал нового ряда производных диазепинобензимидазола / А. А. Спасов, Л. Н. Диваева, Д. В. Мальцев [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3(67). – С. 19-23.
3. Антипсихотик-индуцированное удлинение интервала QT и развитие Torsade de Pointes у пациентов с психическими расстройствами: обзор / Р. Ф. Насырова, А. В. Кидяева, М. М. Петрова, Н. А. Шнайдер // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2024. – Т. 12. – № 4. – С. 380-395.
4. Антиэпилептические препараты третьего поколения: механизм действия, фармакокинетика, взаимодействие и применение в детском возрасте / З. Г. Тадтаева, А. Н. Галустян, О. А. Громова, И. С. Сардарян // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2023. – Т. 15, № 2. – С. 160-170.
5. Влияние антагонистов α2-адренорецепторов на характеристики электроэнцефалограмм кроликов при введении дексмедетомидина / А. Ю. Гришина, У. В. Шаркова, Ю. И. Сысоев [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 51-59.
6. Влияние феназепама на амплитудные характеристики ритмов электрокортикограмм у крыс / А. В. Кан, В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый // Бюллетень медицинской науки. – 2021. – № 4(24). – С. 108-111.
7. Воронин, М. В. Молекулярные механизмы нейротропного действия афобазола / М. В. Воронин, И. А. Кадников, Е. В. Абрамова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 2. – С. 15-22.
8. Воронина, Т. А. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств / Т. А. Воронина, Л.Н. Неробкова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России. Том Часть 1. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 239.
9. Воронина, Т. А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Т. А. Воронина, Л.С. Гузеватых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Научный центр экспертизы средств

медицинского применения Минздравсоцразвития России. Том Часть 1. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 197-218.

10. ГАМКергический механизм противосудорожного эффекта соединения РУ-1205 / К. Ю. Калитин, О. Ю. Гречко, А. А. Спасов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 11. – С. 582-588.
11. Гречко, О. Ю. Конденсированные бензимидазолы - новый класс каппа-опиоидных агонистов : специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология" : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Гречко Олеся Юрьевна. – Волгоград, 2012. – 200 с.
12. Гуськова, Т. А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований / Т. А. Гуськова // Российские медицинские вести. – 2009. – Т. 14, № 1. – С. 91-93.
13. Диазепинобензимидазолы — новый класс для поиска соединений с анксиолитической активностью / Д. В. Мальцев, А. С. Таран, М. О. Скрипка [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № 11S. – С. 101а.
14. Заболеваемость всего населения России в 2023 году : статистические материалы. Часть II / И. А. Деев, О. С. Кобякова, В. И. Стародубов [и др.]. – М. : ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России, 2024. – 154 с.
15. Заболеваемость всего населения России в 2023 году с диагнозом, установленным впервые в жизни : статистические материалы. Часть I / И. А. Деев, О. С. Кобякова, В. И. Стародубов [и др.]. – М. : ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России, 2024. – 152 с.
16. Калитин, К. Ю. Противосудорожные свойства новых парагалогенфенил производных бензимидазола : специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Калитин Константин Юрьевич, 2018. – 194 с.
17. Котова, О.В. Современные методы диагностики и лечения тревожных и депрессивных расстройств / О. В. Котова, А. А. Беляев, Е. С. Акарачкова // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2021. – Т. 5, № 10. – С. 648-653.
18. Крот, К. В. Социально-экономическая значимость психических расстройств: региональные аспекты / К. В. Крот, С. Ю. Мешалкина, Е. В. Слободенюк // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 1. – С. 91-96.
19. Кушакова, К. А. Антипсихотические средства / К. А. Кушакова, А. В. Конакова // Инновации. Наука. Образование. – 2022. – № 50. – С. 93-97.

20. Лусникова, И. В. Связь качества жизни с приверженностью к лечению и удержанием на терапии у пациентов с эпилепсией / И. В. Лусникова // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2022. – Т. 14, № 1. – С. 65-73.
21. Министерство здравоохранения Российской Федерации; Российское общество психиатров. Шизофрения у взрослых: клинические рекомендации [Электронный ресурс]. – М., 2024. – URL: https://diseases.medelement.com/disease/шизофрения-у-взрослых-кр-рф-2024/18263.
22. Мелерзанов, А. В. Инновационные подходы к разработке лекарств / А. В. Мелерзанов, Я. А. Иваненков // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2017. – № 9-10. – С. 55-61.
23. Метаболические последствия антипсихотической терапии: состояние проблемы и возможные пути ее решения / А. В. Балашова, Д. В. Мамлеева, Л. В. Мачехина, Е. Н. Дудинская // Ожирение и метаболизм. – 2023. – Vol. 19. – № 4. – С. 431-441.
24. Методические рекомендации по доклиническому изучению нейролептической активности лекарственных средств / Р. У. Островская, К. С. Раевский, Т. А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России. Том Часть 1. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 252-254.
25. Мнемотропная и анксиолитическая активность мексидола и эноксифола / И. А. Трегубова, В. А. Косолапов, А. А. Спасов, В. А. Анисимова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2015. – № 4. – С. 10.
26. Направленный поиск соединений с противосудорожной активностью в ряду производных бензимидазола / П. М. Васильев, К. Ю. Калитин, А. А. Спасов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 11. – С. 80-85.
27. Нейровизуализация эффектов психоактивных средств посредством нормализации электрограмм головного мозга / Н. Н. Каркищенко, В. Н. Каркищенко, Ю. В. Фокин, С. Ю. Харитонов // Биомедицина. – 2019. – Т. 15, № 1. – С. 12-34.
28. Нейроиммунные аспекты шизофрении с выраженными негативными симптомами: новые маркеры диагностики фенотипов болезни / И. К. Малашенкова, В. Л. Ушаков, Н. В. Захарова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2021. – Т. 13, № 6. – С. 24-35.
29. Нейропротекторная активность 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола) и 2-этилтиобензимидазола (бемитила) на модели окклюзии среднемозговой артерии / Е. Ю. Заварина, Е. К. Красова, И. А. Титович, А. Н. Кимаев // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 231-238.
30. Нейропротекторные свойства нового ингибитора Na+/H+-обменника соединения РУ-1355 на модели фокальной ишемии у крыс / А. А. Спасов, В. Ю. Муравьева, Н. А. Гурова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 4. – С. 3-7.

31. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-А] бензимидазола / Я. В. Агацарская, Д. С. Яковлев, Д. В. Мальцев [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1(69). – С. 120-124.
32. Патент № 2108579 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов : № 96116232/14 : заявл. 30.07.1996 : опубл. 10.04.1998 / Э. Ф. Деркачев, И. В. Миндукшев, А. И. Кривченко, А. А. Крашенинников.
33. Перфильев, М. А. Прогноз ГАМКА-агонистической активности трициклических производных бензимидазола с использованием множественного докинга в нейросетевом моделировании / М. А. Перфильев // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины : Сборник статей 81-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 19–21 апреля 2023 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2023. – С. 295.
34. Поиск ингибиторов Na+/H+ обменника среди пиримидиновых производных гуанидина / Н. А. Гурова, А. А. Спасов, В. В. Вишневская, А. А. Озеров // Инновационные технологии в фармации : Сборник научных трудов, Иркутск, 14–15 июня 2019 года / Под общей редакцией Е. Г. Приваловой. Том Выпуск 6. – Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2019. – С. 408-412.
35. Придворов, Г. В. Энтропийный анализ ЭЭГ на фоне действия веществ с опиоидной активностью / Г. В. Придворов, О. Ю. Муха, В. А. Липатов // Forcipe. – 2021. – Т. 4, № S1. – С. 912.
36. Проект межсекторального глобального плана действий по борьбе с эпилепсией и другими неврологическими расстройствами на 2022-2031 гг. // Всемирная организация здравоохранения. Семьдесят пятая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения. Последующие меры в контексте политической декларации третьего совещания высокого уровня Генеральной Ассамблеи по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними : A75/10 Add.4 ; 27 апреля 2022 г. – URL: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA75/A75_10Add4-ru.pdf
37. Противогипоксические свойства конденсированных производных бензимидазола с антиоксидантной активностью / А. А. Спасов, В. А. Косолапов, В. А. Анисимова, О. Н. Жуковская // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17, № 1. – С. 31-36.
38. Противосудорожная активность соединения РУ-1205 на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя / К. Ю. Калитин, О. Ю. Гречко, А. А. Спасов,

В. А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 4. – С. 3-5.

39. Противосудорожная и мембранотропная активность соединения РУ-1205 / К. Ю. Калитин, А. А. Спасов, О. Ю. Гречко [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 9. – С. 28-34.
40. Противоэпилептическая активность нового производного бензимидазола РУ-1205 / А. А. Спасов, К. Ю. Калитин, О. Ю. Гречко, В. А. Анисимова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 320-323.
41. Рецептор-зависимые механизмы противосудорожного действия производного бензимидазола РУ-1205 в сравнении с диазепамом и U-50,488H / А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, К. Ю. Калитин, В. А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 2. – С. 3-6.
42. Сакаев, М. Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность (Экспериментальное исследование) : специальность 14.00.25 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Сакаев Марат Рустамович. – Санкт-Петербург, 2000. – 115 с.
43. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023624590 Российская Федерация. Производные бензимидазола с нейротропным и психотропным действием : № 2023623995 : заявл. 18.11.2023 : опубл. 12.12.2023 / К. Ю. Калитин, А. А. Спасов, Г. В. Придворов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
44. Симашкова, Н. В. Расстройства аутистического спектра: диагностика, лечение, наблюдение: Клинические рекомендации (протокол лечения) / Н. В. Симашкова, Е. В. Макушкин // Российское общество психиатров. – 2015. – № 4. – С. 48
45. Судорожный порог, феномен "отдачи" и развитие толерантности к противосудорожному эффекту соединения РУ-1205 и диазепама / О. Ю. Гречко, А. А. Спасов, К. Ю. Калитин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 12. – С. 3-6.
46. Таран, А. С. Нейропсихотропные эффекты производных диазепино[1,2а]бензимидазола : специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Таран Алена Сергеевна, 2017. – 178 с.
47. Черетаев, И. В. Нейротропные, психоактивные и обезболивающие свойства бензимидазола и его производных: физиологические механизмы / И. В. Черетаев, И. И. Коренюк, А. Д.

Ноздрачев // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 4. – С. 381-390.

48. Черников, М. В. Исследование зависимости 5-НТ2-и 5-НТ3-антисеротониновой активности би- и трициклических производных бензимидазола от их физико-химических свойств / М. В. Черников, П. М. Васильев // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сборник научных трудов. – Пятигорск : Волгоградский государственный медицинский университет, 2015. – С. 260-262.
49. Эпидемиология фармакорезистентной эпилепсии у взрослых / Е. А. Народова, Н. А. Шнайдер, С. В. Прокопенко [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 207-216.
50. Яковлев, Д. С. Конденсированные азолы - новый класс лигандов серотониновых рецепторов : специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология" : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Яковлев Дмитрий Сергеевич. – Волгоград, 2016. – 339 с.
51. 5-НТ2А-антагонистическая активность С2,N9-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов / Д. С. Яковлев, А. А. Спасов, Д. В. Мальцев [и др.] // Сборник трудов научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 10–14 сентября 2015 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2015. – С. 54-56.
52. Achar, K. C. S. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives / K. C. S. Achar, K. M. Hosamani, H. R. Seetharamareddy // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 45, No. 5. – P. 2048-2054.
53. A companion to the preclinical common data elements for pharmacologic studies in animal models of seizures and epilepsy. A Report of the TASK3 Pharmacology Working Group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force / M. Barker-Haliski, L. C. Harte-Hargrove, T. Ravizza [et al.] // Epilepsia Open. – 2018. – Vol. 3. – P. 53-68.
54. A Comprehensive Account on Recent Progress in Pharmacological Activities of Benzimidazole Derivatives / S. R. Brishty, M. J. Hossain, M. U. Khandaker [et al.] // Frontiers in pharmacology. – 2021. – Vol. 12. – Article ID 762807.
55. A Configurable and Fully Synthesizable RTL-Based Convolutional Neural Network for Biosensor Applications / P. Kumar, H. Yingge, I. Ali [et al.] // Sensors (Basel, Switzerland). – 2022. – Vol. 22, No. 7. – Article ID 2459.

56. A Deep Learning Framework for Classification of in vitro Multi-Electrode Array Recordings [Preprint] / Y. Zhao, E. Guzman, M. Audouard [et al.] – arXiv, 2019. – arXiv:1906.02241. – URL: https://arxiv.org/abs/1906.02241.
57. 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. Kroeze, D. L. Willins [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2000. – Vol. 29, No. 3. – P. 735-746.
58. A new serotonin 5-HT6 receptor antagonist with procognitive activity - Importance of a halogen bond interaction to stabilize the binding / J. A. González-Vera, R. A. Medina, M. Martín-Fontecha [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – Article ID 41293.
59. A Review of the Therapeutic Potential of Recently Developed G Protein-Biased Kappa Agonists / K. L. Mores, B. R. Cummins, R. J. Cassell, R. M. van Rijn // Frontiers in pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – Article ID 407.
60. A Review on Benzimidazole and it’s Biological Activities / G. Gajanan, S. Shital, T. Vipul [et al.] // Journal of Pharmaceutical Chemistry and Drug Formulation. – 2021. – Vol. 3, No. 1. – P. 23-32.
61. A systematic review on the kappa opioid receptor and its ligands: New directions for the treatment of pain, anxiety, depression, and drug abuse / M. I. H. Khan, B. J. Sawyer, N. S. Akins, H. V. Le // European journal of medicinal chemistry. – 2022. – Vol. 243. – Article ID 114785.
62. Aartsma-Rus, A. Assessing functional performance in the mdx mouse model / A. Aartsma-Rus, M. van Putten // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2014. – No. 85. – Article ID 51303.
63. Action of antiepileptic drugs on neurons / K. Kobayashi, F. Endoh, I. Ohmori, T. Akiyama // Brain & development. – 2020. – Vol. 42, No.1. – P. 2-5.
64. Activation of kappa opioid receptors decreases synaptic transmission and inhibits long-term potentiation in the basolateral amygdala of the mouse / V. Huge, G. Rammes, A. Beyer [et al.] // European Journal of Pain (London, England). – 2009. – Vol. 13, No. 2. – P. 124-129.
65. Additional outcomes and subgroup analyses of NXY-059 for acute ischemic stroke in the SAINT I trial / K. R. Lees, A. Davalos, S. M. Davis [et al.] // Stroke. – 2006. – Vol. 37, No. 12. – P. 2970-2978.
66. Adenosine receptors in neuropsychiatric disorders: fine regulators of neurotransmission and potential therapeutic targets / S. Pasquini, C. Contri, S. Merighi [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, No. 3. – Article ID 1219.
67. Adhikari, A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety / A. Adhikari, M. A. Topiwala, J. A. Gordon // Neuron. – 2010. – Vol. 65, No. 2. – P. 257-269.

68. Alonso-Pedrero, L. Effects of antidepressant and antipsychotic use on weight gain: A systematic review / L. Alonso-Pedrero, M. Bes-Rastrollo, A. Marti // Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity. – 2019. – Vol. 20, No. 12. – P. 1680-1690.
69. Alpha and gamma EEG coherence during on-task and mind wandering states in schizophrenia / M. Prieto-Alcántara, A. Ibáñez-Molina, Y. Crespo-Cobo [et al.] // Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology. – 2023. – Vol. 146. – P. 21-29.
70. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations / E. Passeri, K. Elkhoury, M. Morsink [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, No. 22. – Article ID 13954.
71. An update on the efficacy of anti-inflammatory agents for patients with schizophrenia: a meta-analysis / N. Çakici, N. J. M. van Beveren, G. Judge-Hundal [et al.] // Psychological medicine. – 2019. – Vol. 49, No. 14. – P. 2307-2319.
72. Anticonvulsant and neuroprotective effects of carbamazepine-levetiracetam adjunctive treatment in convulsive status epilepticus rat model: Inhibition of cholinergic transmission / O. S. Osuntokun, U. F. Abdulwahab, N. O. Akanji [et al.] // Neuroscience Letters. – 2021. – Vol. 762. – Article ID 136167.
73. Antiepileptogenesis and disease modification: Clinical and regulatory issues / J. A. French, M. Bebin, M. A. Dichter [et al.] // Epilepsia open. – 2021. – Vol. 6, No. 3. – P. 483-492.
74. Antipsychotic drug use and risk of stroke and myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis / S. Zivkovic, C. H. Koh, N. Kaza, C. A. Jackson // BMC psychiatry. – 2019. – Vol. 19, No. 1. – Article ID 189.
75. Antipsychotic-induced extrapyramidal side effects: A systematic review and meta-analysis of observational studies / T. Ali, M. Sisay, M. Tariku [et al.] // PloS One. – 2021. – Vol. 16, No. 9. – Article ID e0257129.
76. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology / S. J. Kaar, S. Natesan, R. McCutcheon, O. D. Howes // Neuropharmacology. – 2020. – Vol. 172. – Article ID 107704.
77. Arrestin-3 scaffolding of the JNK3 cascade suggests a mechanism for signal amplification / N. A. Perry, T. S. Kaoud, O. O. Ortega [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – Vol. 116, No. 3. – P. 810-815.
78. Artificial intelligence and machine-learning approaches in structure and ligand-based discovery of drugs affecting central nervous system / V. Gautam, A. Gaurav, N. Masand [et al.] // Molecular diversity. – 2023. – Vol. 27, No. 2. – P. 959-985.

79. Artificial Intelligence in Drug Discovery and Development / K. K. Mak, Y. H. Wong, M. R. Pichika // Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays / ed. by F. J. Hock, M. K. Pugsley. – Cham : Springer, 2024. – P. 1461-1498.
80. Bandelow, B. Treatment of anxiety disorders / B. Bandelow, S. Michaelis, D. Wedekind // Dialogues in Clinical Neuroscience. – 2017. – Vol. 19, No. 2. – P. 93-107.
81. Banerjee, A. p38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNFα inhibitors in COPD / A. Banerjee, C. Koziol-White, R. Panettieri // Current Opinion in Pharmacology. – 2012. – Vol. 12, No. 3. – P. 287-292.
82. Bateman, J. T. Understanding and countering opioid-induced respiratory depression / J. T. Bateman, S. E. Saunders, E. S. Levitt // British journal of pharmacology. – 2023. – Vol. 180, No. 7. – P. 813-828.
83. Beghi, E. The epidemiology of epilepsy / E. Beghi // Neuroepidemiology. – 2020. – Vol. 54, No. 2. – P. 185-191.
84. Behavioral Effects of Systemic, Infralimbic and Prelimbic Injections of a Serotonin 5-HT2A Antagonist in Carioca High- and Low-Conditioned Freezing Rats / L. A. León, V. Castro-Gomes, S. Zárate-Guerrero [et al.] // Frontiers in behavioral neuroscience. – 2017. – Vol. 11. – Article ID 117.
85. Bennett, F. C.The immune system and psychiatric disease: a basic science perspective / F. C. Bennett, A. V. Molofsky // Clinical and experimental immunology. – 2019. – Vol. 197, No. 3. – P. 294-307.
86. Benzimidazole derivatives. Part 5: design and synthesis of new benzimidazole-arylpiperazine derivatives acting as mixed 5-HT1A/5-HT3 ligands / M. L. López-Rodríguez, B. Benhamú, M. J. Morcillo [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2004. –Vol. 12, No. 19. – P. 5181-5191.
87. Benzimidazole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists / I. Borza, S. Kolok, A. Gere [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2006. – Vol. 16, No. 17. – P. 4638-4640.
88. Benzimidazoles as Potent and Orally Active mGlu5 Receptor Antagonists with an Improved PK Profile / D. Carcache, I. Vranesic, J. Blanz [et al.] // ACS medicinal chemistry letters. – 2010. – Vol. 2, No. 1. – P. 58-62.
89. Berridge, K. C. Pleasure systems in the brain / K. C. Berridge, M. L. Kringelbach // Neuron. – 2015. – Vol. 86, No. 3. – P. 646-664.
90. Biased agonists of the kappa opioid receptor suppress pain and itch without causing sedation or dysphoria / T. F. Brust, J. Morgenweck, S. A. Kim [et al.] // Science Signaling. – 2016. – Vol. 9, No. 456. – Article ID ra117.

91. Brigo, F. Anti-convulsant Agents: Benzodiazepines (Clobazam, Clonazepam, Diazepam, Lorazepam, Midazolam) / F. Brigo, S. Lattanzi // NeuroPsychopharmacotherapy / ed. by P. Riederer, G. Laux, T. Nagatsu, W. Le, C. Riederer. – Cham : Springer, 2022. – P. 3753-3760.
92. Brodie, M. J. Sodium Channel Blockers in the Treatment of Epilepsy / M. J. Brodie // CNS drugs. – 2017. – Vol. 31, No. 7. – P. 527-534.
93. Bruchas, M. R. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor / M. R. Bruchas, C. Chavkin // Psychopharmacology. – 2010. – Vol. 210, No. 2. – P. 137-147.
94. Bschor, T. Are antidepressants effective? A debate on their efficacy for the treatment of major depression in adults / T. Bschor, L. L. Kilarski // Expert review of neurotherapeutics. – 2016. – Vol. 16, No. 4. – P. 367-374.
95. Butorphanol: effects of a prototypical agonist-antagonist analgesic on kappa-opioid receptors / S. Commiskey, L. W. Fan, I. K. Ho, R. W. Rockhold // Journal of Pharmacological Sciences. – 2005. – Vol. 98, No. 2. – P. 109-116.
96. Canal, C. E. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model / C. E. Canal, D. Morgan // Drug Testing and Analysis. – 2012. – Vol. 4, No. 7-8. – P. 556-576.
97. Candidate biomarkers in psychiatric disorders: state of the field / A. Abi-Dargham, S. J. Moeller, F. Ali [et al.] // World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA). – 2023. – Vol. 22, No. 2. – P. 236-262.
98. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Epilepsy: State of the Art and Future Perspectives / L. Ciccone, C. Cerri, S. Nencetti, E. Orlandini [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 26, No. 21. – Article ID 6380.
99. Catalepsy induced by morphine or haloperidol: effects of apomorphine and anticholinergic drugs / C. Erzin-Waters, P. Muller, P. Seeman // Canadian journal of physiology and pharmacology. – 1976. – Vol. 54, No. 4. – P. 516-519.
100. Celada, P. Serotonin modulation of cortical neurons and networks / P. Celada, M. V. Puig, F. Artigas // Frontiers in Integrative Neuroscience. – 2013. – Vol. 7. – Article ID 25.
101. Cells and circuits for amygdala neuroplasticity in the transition to chronic pain / T. Kiritoshi, V. Yakhnitsa, S. Singh [et al.] // Cell Reports. – 2024. – Vol. 43, No 9. – Article ID 114669.
102. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery / T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos // ACS chemical neuroscience. – 2016. – Vol. 7, No. 6. – P. 767-775.
103. Chambers R. A. A Method to the Madness: Producing the Neonatal Ventral Hippocampal Lesion Rat Model of Schizophrenia / R. A. Chambers, B. K. Lipska // Animal Models of

Schizophrenia and Related Disorders / ed. by P. O'Donnell. – Totowa, NJ : Humana Press, 2011. – (Neuromethods; vol. 59). – P. 1-24.

104. Characterization of new PPARgamma agonists: benzimidazole derivatives-importance of positions 5 and 6, and computational studies on the binding mode / M. Goebel, G. Wolber, P. Markt [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2010. – Vol.18, No. 16. – P. 5885-5895.

105. Chemotype-selective modes of action of κ-opioid receptor agonists / E. Vardy, P. D. Mosier, K. J. Frankowski [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288, No. 48. – P. 34470-34483.

106. Cholinergic muscarinic M1 and M4 receptors as therapeutic targets for cognitive, behavioural, and psychological symptoms in psychiatric and neurological disorders / D. Erskine, J. P. Taylor, G. Bakker [et al.] // Drug discovery today. – 2019. – Vol. 24, No.12. – P. 2307-2314.

107. Chopko, T. C. Classics in Chemical Neuroscience: Risperidone / T. C. Chopko, C. W. Lindsley // ACS chemical neuroscience. – 2018. – Vol. 9, No. 7. – P. 1520-1529.

108. Classification of antiseizure drugs in cultured neuronal networks using multielectrode arrays and unsupervised learning / A. Bryson, D. Mendis, E. Morrisroe [et al.] // Epilepsia. – 2022. – Vol. 63, No. 7. – 1693-1703.

109. Clonidine for sedation and analgesia for neonates receiving mechanical ventilation / O. Romantsik, M. G. Calevo, E. Norman, M. Bruschettini // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – Vol. 5, No. 5. – Article ID CD012468.

110. Clozapine generates obsessive compulsive disorder-like behavior in mice / S. Kang, H. J. Noh, S. H. Bae [et al.] // Molecular Brain. – 2020. – Vol. 13, No. 1. – Article ID 84.

111. Clozapine interaction with the M2 and M4 subtypes of muscarinic receptors / P. Michal, M. Lysíková, E. E. El-Fakahany, S. Tucek // European Journal of Pharmacology. – 1999. – Vol. 376, No. 1-2. – P. 119-125.

112. Comparing the Pfizer Central Nervous System Multiparameter Optimization Calculator and a BBB Machine Learning Model / F. Urbina, K. M. Zorn, D. Brunner, S. Ekins // ACS chemical neuroscience. – 2021. – Vol. 12, No.12. – P. 2247-2253.

113. Condensed benzimidazoles are a novel scaffold for antioxidant agents' search and development / V. A. Kosolapov, A. A. Spasov, V. A. Anisimova, O. N. Zhukovskaya // IntechOpen. – 2019.

114. Conn, K. A. Subcortical Dopamine and Cognition in Schizophrenia: Looking Beyond Psychosis in Preclinical Models / K. A. Conn, T. H. J. Burne, J. P. Kesby // Frontiers in neuroscience. – 2020. – Vol. 14. – Article ID 542.

115. Correll, C. U. Treatment-Resistant Schizophrenia: Definition, Predictors, and Therapy Options / C. U. Correll, O. D. Howes // The Journal of Clinical Psychiatry. – 2021. – Vol. 82, No. 5. – Article ID 36608.

116. Correll, C.U. Emerging treatments in schizophrenia / C. U. Correll, A. Abi-Dargham, O. D. Howes // The Journal of Clinical Psychiatry. – 2022. – Vol. 83, No. 1. – Article ID 39683.

117. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase / E. Dermitzaki, C. Tsatsanis, A. Gravanis, A. N. Margioris // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, No. 14. – P. 12280-12287.

118. Courtiol, E. Serotonergic regulation of the dopaminergic system: Implications for reward-related functions / E. Courtiol, E. C. Menezes, C. M. Teixeira // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. – 2021. – Vol. 128. – P. 282-293.

119. Cowan, A. Itching-like behavior: A common effect of the kappa opioid receptor antagonist 5′-guanidinonaltrindole and the biased kappa opioid receptor agonist 6′-guanidinonaltrindole in mice / A. Cowan, L. Y. Liu-Chen, S. Inan // Medicine in Drug Discovery. – 2021. – Vol. 11. – Article ID 100097.

120. Current computational methods for predicting protein interactions of natural productsv / A. F. A. Moumbock, J. Li, P. Mishra [et al.] // Computational and structural biotechnology journal. – 2019. – Vol. 17. – P. 1367-1376.

121. Current Strategies to Enhance Delivery of Drugs across the Blood-Brain Barrier / R. I. Teleanu, M. D. Preda, A. G. Niculescu [et al.] // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, No. 5. – Article ID 987.

122. Dautov, C. P. Destek Vektör Makinesi ile Yeni Öz Benzerlik İndeksi Kullanarak Epilepsi Tespiti = Epilepsy Detection Using a Novel Self Similarity Index Combined with Support Vector Machine / C. P. Dautov, M. S. Özerdem, R. Dautov // 2021 29th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU); Istanbul, Turkey, 9-11 June 2021. – IEEE, 2021. – P. 1-4.

123. Davies, C. Cannabidiol as a potential treatment for psychosis / C. Davies, S. Bhattacharyya // Therapeutic advances in psychopharmacology. – 2019. – Vol. 9 – Article ID 2045125319881916.

124. Deacon, R. M. Measuring motor coordination in mice / R. M. Deacon // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2013. – No. 75. – Article ID e2609.

125. Deciphering the molecular basis of the kappa opioid receptor selectivity: A Molecular Dynamics study / A. H. Saleh, A. Abdelwaly, K. M. Darwish [et al.] // Journal of molecular graphics & modelling. – 2021. – Vol. 106. – Article ID 107940.

126. Deeks, E. D. Difelikefalin: First Approval / E. D. Deeks // Drugs. – 2021. – Vol. 81, No. 16. – P. 1937-1944.

127. DeepSite: protein-binding site predictor using 3D-convolutional neural networks / J. Jiménez, S. Doerr, G. Martínez-Rosell [et al.] // Bioinformatics (Oxford, England). – 2017. – Vol. 33, No. 19. – P. 3036-3042.

128. Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens / S. R. Ebner, M. F. Roitman, D. N. Potter [et al.] // Psychopharmacology. – 2010. – Vol. 210, No. 2. – P. 241-252.

129. Design, synthesis and biological evaluation of some novel benzimidazole derivatives for their potential anticonvulsant activity / P. Jain, P. K. Sharma, H. Rajak [et al.] // Archives of pharmacal research. – 2010. – Vol. 33, No. 7. – P. 971-980.

130. Design, synthesis, and evaluation of anxiolytic activity of 2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-1H-benz[d]imidazole and 2-(4-phenylpiperazin-1-methyl)-1H-benz[d]imidazole derivatives / B. S. Mahajan, L. A. Kawale, V. S. Nade [et al.] // Future Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2024. – Vol. 10, No. 1. – Article ID 50.

131. Design, synthesis and identification of novel benzimidazole derivatives as highly potent NPY Y5 receptor antagonists with attractive in vitro ADME profiles / Y. Tamura, N. Omori, N. Kouyama [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – Vol. 22, No. 1. – P. 5498-5502.

132. Design, synthesis and molecular docking studies of 5, 6-difluoro-1H-benzo [d] imidazole derivatives as effective binders to GABAA receptor with potent anticonvulsant activity / M. S. Raghu, H. A. Swarup, B. S. Prathibha [et al.] // Journal of Molecular Structure. – 2023. – Vol. 1285. – Article ID 135502.

133. Design, synthesis, and evaluation of anxiolytic activity of 2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-1 H-benz [d] imidazole and 2-(4-phenylpiperazin-1-methyl)-1 H-benz [d] imidazole derivatives / B. S. Mahajan, L. A. Kawale, V. S. Nade [et al.] // Future Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2024. – Vol. 10, No. 1. – Article ID 50.

134. Design, Synthesis, and Pharmacological Screening of Pyridazinone Hybrids as Anticonvulsant Agents / S. Partap, M. S. Yar, M. Z. Hassan [et al.] // Archiv der Pharmazie. – 2017. – Vol. 350, No. 10. – Article ID 1700135.

135. Design, synthesis, antioxidant properties and mechanism of action of new N, N′-disubstituted benzimidazole-2-thione hydrazone derivatives / N. O. Anastassova, D. Y. Yancheva, A. T. Mavrova [et al.] // Journal of Molecular Structure. – 2018. – Vol. 1165. – P. 162-176.

136. Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of highly potent benzimidazole-spaced phosphono-alpha-amino acid competitive NMDA antagonists of the AP-6 type / R. B. Baudy, H. Fletcher 3rd, J. P. Yardley [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 2001. – Vol. 44, No. 10. – P. 1516-1529.

137. Detrimental effects of hypercortisolism on brain structure and related risk factors / Y. Chen, J. Zhang, H. Tan [et al.] // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – Article ID 12708.

138. Development of a rat pilocarpine model of seizure/status epilepticus that mimics chemical warfare nerve agent exposure / L. M. Tetz, P. E. Rezk, R. H. Ratcliffe [et al.] // Toxicology and industrial health. – 2006. – Vol. 22, No. 6. – P. 255-266.

139. Dhaliwal, A. Physiology, Opioid Receptor / A. Dhaliwal, M. Gupta // StatPearls [Internet]. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK546642/.

140. Di Carlo, P. Brain-derived neurotrophic factor and schizophrenia / P. Di Carlo, G. Punzi, G. Ursini // Psychiatric genetics. – 2019. – Vol. 29, No. 5. – P. 200-210.

141. Different potential biological activities of benzimidazole derivatives / A. S. Al-Wasidi, M. S. Refat, A. M. Naglah, A. A. Elhenawy // Egyptian Journal of Chemistry. – 2021. – Vol. 64, No. 5. – P. 2631-2646.

142. Differential discriminative-stimulus effects of cigarette smoke condensate and nicotine in nicotine-discriminating rats / J. Y. Lee, M. J. Choi, E. S. Choe [et al.] // Behavioural brain research. – 2016. – Vol. 306. – P. 97-201.

143. Ding, J. B. Cigarette Smoking and Schizophrenia: Etiology, Clinical, Pharmacological, and Treatment Implications / J. B. Ding, K. Hu // Schizophrenia research and treatment. – 2021. – Article ID 7698030.

144. Directly and Indirectly Targeting the Glycine Modulatory Site to Modulate NMDA Receptor Function to Address Unmet Medical Needs of Patients With Schizophrenia / J. C. Pei, D. Z. Luo, S. S. Gau [et al.] // Frontiers in psychiatry. – 2021. – Vol. 12. – Article ID 742058.

145. Discovery of Oxazolobenzimidazoles as Positive Allosteric Modulators for the mGluR2 Receptor / R. M. Garbaccio, E. J. Brnardic, M. E. Fraley [et al.] // ACS medicinal chemistry letters. – 2010. – Vol. 1, No. 8. – P. 406-410.

146. Discriminative stimulus properties of 1.25mg/kg clozapine in rats: Mediation by serotonin 5-HT2 and dopamine D4 receptors / A. J. Prus, L. E. Wise, A. L. Pehrson [et al.] // Brain Research. – 2016. – Vol. 164, Pt. A. – P. 298-305.

147. DNA methylation and histone modifications associated with antipsychotic treatment: a systematic review / D. Marques, N. Vaziri, S. C. Greenway, C. Bousman // Molecular psychiatry. – 2025. – Vol. 30, No. 1. – P. 296-309.

148. Dopamine dysregulation in the prefrontal cortex relates to cognitive deficits in the sub-chronic PCP-model for schizophrenia: A preliminary investigation / S. L. McLean, M. K. Harte, J. C. Neill, A. M. Young // Journal of Psychopharmacology (Oxford, England). – 2017. – Vol. 31, No. 6. – P. 660-666.

149. Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT(2A) receptors assemble into functionally interacting heteromers / D. O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, A. O. Tarakanov [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – Vol. 401, No. 4. – P. 605-610.

150. Dorahy, G. Computer-Aided Drug Design towards New Psychotropic and Neurological Drugs / G. Dorahy, J. Z. Chen, T. Balle // Molecules (Basel, Switzerland). – 2023. – Vol. 28, No. 3. – Article ID 1324.

151. Dose-related behavioral, subjective, endocrine, and psychophysiological effects of the κ opioid agonist Salvinorin A in humans / M. Ranganathan, A. Schnakenberg, P. D. Skosnik [et al.] // Biological Psychiatry. – 2012. – Vol. 72, No. 10. – P. 871-879.

152. Dougherty, T. S. Chapter 13 - Antihistamines (H1 Receptor Antagonists) / T. S. Dougherty. – Text : electronic // Side Effects of Drugs Annual : A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions / S. D. Ray ed. – Elsevier, 2017. – Vol. 39. – P. 157-159.

153. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach / D. Giordano, C. Biancaniello, M. A. Argenio, A. Facchiano // Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). – 2022. – Vol. 15, No. 5. – P. 646.

154. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery / M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, A. M. Palmer // NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2005. – Vol. 2, No. 4. – P. 554-571.

155. Drug resistance in epilepsy / E. Perucca, P. Perucca, H. S. White, E. C. Wirrell // The Lancet. Neurology. – 2023. – Vol. 22, No. 8. – P. 723-734.

156. Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options / W. Löscher, H. Potschka, S. M. Sisodiya, A. Vezzani // Pharmacological reviews. – 2020. – Vol. 72, No. 3. – P. 606-638.

157. Dual Molecules Targeting 5-HT6 and GABA-A Receptors as a New Approach to Combat Depression Associated with Neuroinflammation / M. Marcinkowska, B. Mordyl, A. Siwek [et al.] // ACS chemical neuroscience. – 2023. – Vol. 14, No. 8. – P. 1474-1489.

158. Dubovsky, S. L. Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice / S. L. Dubovsky, D. Marshall // Psychotherapy and psychosomatics. – 2022. – Vol. 91, No. 5. – P. 307-334.

159. Dynorphin activation of kappa opioid receptor promotes microglial polarization toward M2 phenotype via TLR4/NF-κB pathway / L. Liu, Y. Xu, H. Dai [et al.] // Cell & bioscience. – 2020. – Vol. 10. – Article ID 42.

160. Dynorphin activation of kappa opioid receptor protects against epilepsy and seizure-induced brain injury via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathway / H. Dai, P. Wang, H. Mao [et al.] // Cell cycle (Georgetown, Tex.). – 2019. – Vol. 18, No. 2. – P. 226-237.

161. Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway / A. F. K. Vizuete, F. Fróes, M. Seady [et al.] // Journal of neuroinflammation. – 2022. – Vol. 19, No. 1. – Article ID 255.

162. ECG diagnostic support system (EDSS): A deep learning neural network based classification system for detecting ECG abnormal rhythms from a low-powered wearable biosensors / E. B. Panganiban, A. C. Paglinawan, W. Y. Chung, G. L. S. Paa // Sensing and Bio-Sensing Research – 2021. – Vol. 31 – Article ID 100398.

163. Effect of 5-HT(2A) receptor antagonists on blood flow in the carotid vessels upon elevation of serotonin level / D. S. Yakovlev, A. A. Spasov, D. V. Mal'tsev, V. A. Anisimova // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2014. – Vol. 157, No. 3. – P. 350-352.

164. Effect of mGluR2 positive allosteric modulation on frontostriatal working memory activation in schizophrenia / D. H. Wolf, D. Zheng, C. Kohler [et al.] // Molecular psychiatry. – 2022. – Vol. 27, No. 2. – P. 1226-1232.

165. Effect of minocycline on pentylenetetrazol-induced chemical kindled seizures in mice / N. Ahmadirad, A. Shojaei, M. Javan [et al.] // Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology. – 2014. – Vol. 35, No. 4. – P. 571-576.

166. Effect of sedation with butorphanol on variables pertaining to the ophthalmic examination in dogs / J. Y. Douet, A. Regnier, A. Dongay [et al.] // Veterinary Ophthalmology. – 2018. – Vol. 21, No. 5. – P. 452-458.

167. Effects of Acute Stress on the Oscillatory Activity of the Hippocampus-Amygdala-Prefrontal Cortex Network / E. Merino, D. Raya-Salom, V. Teruel-Martí [et al.] // Neuroscience. – 2021. – Vol. 476. – P. 72-89.

168. Effects of clonidine and xylazine on body temperature in the rat / A. Livingston, J. Low, B. Morris // British journal of pharmacology. – 1984. – Vol. 81, No. 1. – P. 189-193.

169. Effects of Maternal Separation on Nicotine-Induced Conditioned Place Preference and Later Spatial Learning and Memory Function in Adolescent Male Rats / F. Delavari, V. Sheibani, K. Esmaeilpour [et al.] // Addiction & Health. – 2016. – Vol. 8, No. 4. – P. 261-269.

170. Effects of risperidone and quetiapine on cognition in patients with schizophrenia and predominantly negative symptoms / M. Riedel, I. Spellmann, M. Strassnig [et al.] // European archives of psychiatry and clinical neuroscience. – 2007. – Vol. 257, No. 6. – P. 360-370.

171. Efficacy and safety of anti-inflammatory agents in treatment of psychotic disorders - A comprehensive systematic review and meta-analysis / R. Jeppesen, R. H. B. Christensen, E. M. J. Pedersen [et al.] // Brain, behavior, and immunity. – 2020. – Vol. 90. – P. 364-380.

172. Efficacy and Safety of Cerebrolysin for Acute Ischemic Stroke: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / D. Zhang, Y. Dong, Y. Li [et al.] // BioMed Research International. – 2017. – Vol. 2017. – Article ID 4191670.

173. Efficacy and safety of clozapine in psychotic disorders-a systematic quantitative meta-review / E. Wagner, S. Siafis, P. Fernando [et al.] // Translational Psychiatry. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – Article ID 487.

174. Efficacy and Safety of MIN-101: A 12-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a New Drug in Development for the Treatment of Negative Symptoms in Schizophrenia / M. Davidson, J. Saoud, C. Staner [et al.] // The American journal of psychiatry. – 2017. – Vol. 174, No. 12. – P. 1195-1202.

175. Eichenbaum, H. The role of the hippocampus in navigation is memory / H. Eichenbaum // Journal of Neurophysiology. – 2017. – Vol. 117, No. 4. – P. 1785-1796.

176. Elucidating the Potential Side Effects of Current Anti-Seizure Drugs for Epilepsy / E. Akyüz, B. Köklü, C. Ozenen [et al.] // Current Neuropharmacology. – 2021. – Vol. 19, No. 11. – P. 1865-1883.

177. Employing Molecular Conformations for Ligand-Based Virtual Screening with Equivariant Graph Neural Network and Deep Multiple Instance Learning / Y. Gu, J. Li, H. Kang [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2023. – Vol. 28, No. 16. – Article ID 5982.

178. Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors / S. Loacker, M. Sayyah, W. Wittmann [et al.] // Brain : a journal of neurology. – 2007. – Vol. 130, No. 4. – P. 1017-1028.

179. Enhancement of the anticonvulsant effect of the h3 histamine receptor blocker thioperamid against the use of pioglitazone / O. Yehorenko, M. Pervak, O. Poshyvak [et al.] // Journal of Education, Health and Sport. – 2022. – Vol. 12, No. 4. – P. 293-302.

180. Ensemble Docking in Drug Discovery / R. E. Amaro, J. Baudry, J. Chodera [et al.] // Biophysical journal. – 2018. – Vol. 114, No. 10. – P. 2271-2278.

181. Epigenetic Basis of Psychiatric Disorders: A Narrative Review / F. Panariello, G. Fanelli, C. Fabbri [et al.] // CNS & neurological disorders drug targets. – 2022. – Vol. 21, No. 4. – P. 302-315.

182. Epigenetic regulation in major depression and other stress-related disorders: molecular mechanisms, clinical relevance and therapeutic potential / M. Yuan, B. Yang, G. Rothschild [et al.] // Signal transduction and targeted therapy. – 2023. – Vol. 8, No. 1. – Article ID 309.

183. Epigenetics in Neurological and Psychiatric Disorders: A Comprehensive Review of Current Understanding and Future Perspectives / H. Grezenko, C. Ekhator, N. U. Nwabugwu [et al.] // Cureus. – 2023. – Vol. 15, No. 8. – Article ID e43960.

184. Evaluation and comparison of anticonvulsant activity of telmisartan and olmesartan in experimentally induced animal models of epilepsy / V. H. Pushpa, K. Padmaja Shetty, R. N. Suresha

[et al.] // Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. – 2014. – Vol. 8, No. 10. – P. HC08-HC11.

185. Every-Palmer, S. Clozapine-Induced Gastrointestinal Hypomotility: A 22-Year Bi-National Pharmacovigilance Study of Serious or Fatal “Slow Gut” Reactions, and Comparison with International Drug Safety Advice / S. Every-Palmer, P. M. Ellis // CNS drugs. – 2017. – Vol. 31, No. 8. – P. 699-709.

186. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – Vol. 46, No. 1-3. – P. 3-26.

187. Exploring the evidence for epigenetic regulation of environmental influences on child health across generations / C. V. Breton, R. Landon, L. G. Kahn [et al.] // Communications biology. – 2021. – Vol. 4, No. 1. – Article ID 769.

188. Faay, M. D. M. Efficacy of typical and atypical antipsychotic medication on hostility in patients with psychosis-spectrum disorders: a review and meta-analysis / M. D. M. Faay, P. Czobor, I. E. C. Sommer // Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2018. – Vol. 43, No. 12. – P. 2340-2349.

189. Faouzi, A. Biased Opioid Ligands / A. Faouzi, B. R. Varga, S. Majumdar // Molecules (Basel, Switzerland). – 2020. – Vol. 25, No. 18. – Article ID 4257.

190. Fear and Safety Engage Competing Patterns of Theta-Gamma Coupling in the Basolateral Amygdala / J. M. Stujenske, E. Likhtik, M. A. Topiwala, J. A. Gordon // Neuron. – 2014. – Vol. 83, No. 4. – P. 919-933.

191. Ferguson, M. C. Reverse microdialysis of a 5-HT2A receptor antagonist alters extracellular glutamate levels in the striatum of the MPTP mouse model of Parkinson’s disease / M. C. Ferguson, T. Nayyar, T. A. Ansah // Neurochemistry International. – 2014. – Vol. 71. – P. 36-46.

192. Fields, H. State-dependent opioid control of pain / H. Fields // Nature Reviews. Neuroscience. – 2004. – Vol. 5, No. 7. – P. 565-575.

193. Fragment-based drug discovery-the importance of high-quality molecule libraries / M. Bon, A. Bilsland, J. Bower, K. McAulay // Molecular oncology. – 2022. – Vol. 16, No. 21. – P. 3761-3777.

194. Frau R. Repurposing steroidogenesis inhibitors for the therapy of neuropsychiatric disorders: Promises and caveats / R. Frau, M. Bortolato // Neuropharmacology. – 2019. – Vol. 147. – P. 55-65.

195. French, A. R. An updated assessment of the translational promise of G-protein-biased kappa opioid receptor agonists to treat pain and other indications without debilitating adverse effects / A. R. French, R. M. van Rijn // Pharmacological research. – 2022. – Vol. 177. – Article ID 106091.

196. From High Dimensions to Human Insight: Exploring Dimensionality Reduction for Chemical Space Visualization / A. A. Orlov, T. N. Akhmetshin, D. Horvath [et al.] // Molecular informatics. – 2025. – Vol. 44, No. 1. – Article ID e202400265.

197. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT2A and dopamine D2 receptors / L. Albizu, T. Holloway, J. González-Maeso, S. C. Sealfon // Neuropharmacology. – 2011. – Vol. 61, No. 4. – P. 770-777.

198. Functional lateralization in the prefrontal cortex of dopaminergic modulation of memory consolidation / M. Papp, P. Gruca, M. Lason [et al.] // Behavioural Pharmacology. – 2019. – Vol. 30, No. 6. – P. 514-520.

199. G protein signaling-biased agonism at the κ-opioid receptor is maintained in striatal neurons / J. H. Ho, E. L. Stahl, C. L. Schmid // Science signaling. – 2018. – Vol. 11, No. 542. – Article ID eaar4309.

200. GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // The Lancet Psychiatry. – 2022. – Vol. 9, No. 2. – P. 137-150.

201. Genome-wide Association of Endophenotypes for Schizophrenia From the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS) Study / T. A. Greenwood, L. C. Lazzeroni, A. X. Maihofer [et al.] // JAMA psychiatry. – 2019. – Vol. 76, No. 12. – P. 1274-1284.

202. Ghallab, Y. K. Biochemical and Neuropharmacology of Psychiatric Disorders / Y. K. Ghallab, O. S. Elassal // Nutrition and Psychiatric Disorders: An Evidence-Based Approach to Understanding the Diet-Brain Connection / ed. by W. Mohamed, F. Kobeissy. – Singapore : Springer Singapore, 2024. – P. 25-47.

203. Glia-neuron interactions underlie state transitions to generalized seizures / C. Diaz Verdugo, S. Myren-Svelstad, E. Aydin [et al.] // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10, No. 1. – Article ID 3830.

204. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2021 (GBD 2021) Results [Электронный ресурс]. – Seattle, United States : Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2024. – URL: https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/.

205. Global patterns of opioid use and dependence: harms to populations, interventions, and future action / L. Degenhardt, J. Grebely, J. Stone [et al.] // Lancet (London, England). – 2019. – Vol. 394, No. 10208. – P. 1560-1579.

206. Global synergistic actions to improve brain health for human development / M. O. Owolabi, M. Leonardi, C. Bassetti [et al.] // Nature reviews. Neurology. – 2023. – Vol. 19, No. 6. – P. 371-383.

207. Grammatopoulos, D. K. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction / D. K. Grammatopoulos // British Journal of Pharmacology. – 2012. – Vol. 166, No. 1. – P. 85-97.

208. Gribkoff, V. K. The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes / V. K. Gribkoff, L. K. Kaczmarek // Neuropharmacology. – 2017. – Vol. 120 – P. 11-19.

209. Grinchii, D. Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs in Mood Disorders / D. Grinchii, E. Dremencov // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, No. 24. – Article ID 9532.

210. Guaiana, G. Hydroxyzine for generalised anxiety disorder / G. Guaiana, C. Barbui, A. Cipriani // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. – No. 12. – Article ID CD006815.

211. Guglielmo, R. Evaluating endophenotypes for bipolar disorder / R. Guglielmo, K. W. Miskowiak, G. Hasler // International journal of bipolar disorders. – 2021. – Vol. 9, No. 1. – Article ID 17.

212. Haddad, P. M. The acute efficacy of antipsychotics in schizophrenia: a review of recent meta-analyses / P. M. Haddad, C. U. Correll // Therapeutic advances in psychopharmacology. – 2018. – Vol. 8, No. 11. – P. 303-318.

213. Halberstadt, A. L. Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice: detection of the behavior based on the dynamics of head movement / A. L. Halberstadt, M. A. Geyer // Psychopharmacology. – 2013. – Vol. 227, No. 4. – P. 727-739.

214. Haloperidol and Ziprasidone for Treatment of Delirium in Critical Illness / T. D. Girard, M. C. Exline, S. S. Carson [et al.] // The New England journal of medicine. – 2018. – Vol. 379, No. 26. – P. 2506-2516.

215. Haloperidol pretreatment unmasks the kappa opioid effects of U-50, 488H on cortical EEG and EEG power spectra in rats / G. A. Young, K. L. Marquis, N. C. Paquette [et al.] // Neuropharmacology. – 1989. – Vol. 28, No. 8. – P. 881-884.

216. Haloperidol versus first-generation antipsychotics for the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders / M. Dold, M. T. Samara, C. Li [et al.] // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2015. – Vol. 1, No. 1. – Article ID CD009831.

217. Hammaker, D. “Go upstream, young man”: lessons learned from the p38 saga / D. Hammaker, G. S. Firestein // Annals of the rheumatic diseases. – 2010. – Vol. 69, Suppl. 1. – P. i77-i82.

218. Han, L. Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies / L. Han, C. Jiang // Acta pharmaceutica Sinica. B. – 2021. – Vol. 11, No. 8. – P. 2306-2325.

219. Han, M. BDNF as a pharmacogenetic target for antipsychotic treatment of schizophrenia / M. Han, C. Deng // Neuroscience letters. – 2020. – Vol. 726. – Article ID 133870.

220. Hanada, T. Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors / T. Hanada // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, No. 3. – Article ID 464.

221. Hanrahan, B. Ethosuximide / B. Hanrahan, R. P. Carson // StatPearls [Internet]. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544244/

222. Hauser, M. J. Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia / M. J. Hauser, D. Isbrandt, J. Roeper // Behavioural brain research. – 2017. – Vol. 332. – P. 316-326.

223. Helmstaedter, C. Anticonvulsant Drugs and Cognition / C. Helmstaedter, J. A. Witt. – Text : electronic // NeuroPsychopharmacotherapy. – Cham : Springer, 2022. – P. 1-12.

224. Herman, T. F. Mu Receptors / T. F. Herman, M. Cascella, M. R. Muzio // StatPearls [Internet]. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551554/

225. Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance / M. L. Perreault, A. Hasbi, B. F. O'Dowd, S. R. George // Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2014. – Vol. 39, No. 1. – P. 156-168.

226. Higazy, I. M. Brain targeting stealth lipomers of combined antiepileptic-anti-inflammatory drugs as alternative therapy for conventional anti-Parkinson's / I. M Higazy // Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society. – 2020. – Vol. 28, No. 1. – P. 33-57.

227. High-throughput screening platforms in the discovery of novel drugs for neurodegenerative diseases / H. Aldewachi, R. N. Al-Zidan, M. T. Conner, M. M. Salman // Bioengineering (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 8, No. 2. – Article ID 30.

228. Histone Deacetylase Inhibitors and Psychiatric Disorders / S. Chakravarty, U. A. Bhat, R. G. Reddy [et al.] // Epigenetics in Psychiatry / ed. by J. Peedicayil, D. R. Grayson, D. Avramopoulos. – Cambridge, MA : Academic Press, 2021. – P. 657–699.

229. Histogranin-like antinociceptive and anti-inflammatory derivatives of o-phenylenediamine and benzimidazole / H. T. Le, I. B. Lemaire, A. K. Gilbert [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2004. – Vol. 309, No. 1. – P. 146-155.

230. Howes, O. D. Treatment resistance in psychiatry: state of the art and new directions / O. D. Howes, M. E. Thase, T. Pillinger // Molecular psychiatry. – 2022. – Vol. 27, No. 1. – P. 58-72.

231. Identifying drug targets for neurological and psychiatric disease via genetics and the brain transcriptome / D. A. Baird, J. Z. Liu, J. Zheng [et al.] // PLoS genetics. – 2021. – Vol. 17, No. 1. – Article ID e1009224.

232. Identifying the mechanism of action of the Kv7 channel opener, retigabine in the treatment of epilepsy / A. Zahra, R. Liu, J. Wang, J. Wu // Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology. – 2023. – Vol. 44, No. 11. – P. 3819-3825.

233. Immune-inflammatory markers and psychosis risk: A systematic review and meta-analysis / B. Misiak, F. Bartoli, G. Carrà [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2021. – Vol. 127. – Article ID 105200.

234. Impact of N-alkylamino substituents on serotonin receptor (5-HTR) affinity and phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibition of isoindole-1, 3-dione derivatives / A. Czopek, A. Partyka, A. Bucki [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No. 17. – Article ID 3868.

235. In silico characterization of ligand-receptor interactions for U-47700, N,N-didesmethyl-U-47700, U-50488 at mu- and kappa-opioid receptors / A. Laus, A. Kumar, P. Caboni [et al.] // Archiv Der Pharmazie. – 2023. – Vol. 356, No. 9. – Article ID e2300256.

236. In silico strategy for isoform-selective 5-HT2AR and 5-HT2CR inhibitors / X. Geng, Y. Wang, H. Wang [et al.] // Molecular Systems Design & Engineering. – 2021. – Vol. 6, No. 2. – P. 139-155.

237. Inan, S. Antipruritic Effects of Kappa Opioid Receptor Agonists: Evidence from Rodents to Humans / S. Inan, A. Cowan // Handbook of experimental pharmacology. – 2020. – Vol. 271. – P. 275-292.

238. Inflammation in first-episode psychosis: The contribution of inflammatory biomarkers to the emergence of negative symptoms, a systematic review and meta-analysis / C. Dunleavy, R. J. Elsworthy, R. Upthegrove [et al.] // Acta psychiatrica Scandinavica. – 2022. – Vol. 146, No. 1. – P. 6-20.

239. Information transmission in HPC-PFC network for spatial working memory in rat / M. Xia, T. Liu, W. Bai [et al.] // Behavioural Brain Research. – 2019. – Vol. 356. – P. 170-178.

240. Inhibition of glutamate release by presynaptic kappa 1-opioid receptors in the guinea pig dentate gyrus / M. L. Simmons, G. W. Terman, C. T. Drake, C. Chavkin // Journal of Neurophysiology. – 1994. – Vol. 72, No. 4. – P. 1697-1705.

241. Intranasal Salvinorin A Improves Long-term Neurological Function via Immunomodulation in a Mouse Ischemic Stroke Model / D. Misilimu, W. Li, D. Chen [et al]. // Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology. – 2022. – Vol. 17, No. 1-2. – P. 350-366.

242. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats / J. Chen, P. R. Sanberg, Y. Li [et al.] // Stroke. – 2001. – Vol. 32, No. 11. – P. 2682-2688.

243. Inui, S. Nalfurafine hydrochloride to treat pruritus: a review / S. Inui // Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. – 2015. – Vol. 8. – P. 249-255.

244. Involvement of Chaperone Sigma1R in the Anxiolytic Effect of Fabomotizole / M. V. Voronin, Y. V. Vakhitova, I. P. Tsypysheva [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, No. 11. – Article ID 5455.

245. Ion Channels in Epilepsy: Blasting Fuse for Neuronal Hyperexcitability / S. Zhang, Y. Zhu, J. Cheng, J. Tao // Epilepsy: Advances in Diagnosis and Therapy / ed. by I. J. Al-Zwaini, B. A.-H. M. Albadri. – London : IntechOpen, 2019. – P. 171-192.

246. Is psychosis a multisystem disorder? A meta-review of central nervous system, immune, cardiometabolic, and endocrine alterations in first-episode psychosis and perspective on potential models / T. Pillinger, E. D'Ambrosio, R. McCutcheon, O. D. Howes // Molecular psychiatry. – 2019. – Vol. 24, No. 6. – P. 776-794.

247. Isotonitazene: Fatal intoxication in three cases involving this unreported novel psychoactive substance in Switzerland / F. Mueller, C. Bogdal, B. Pfeiffer [et al.] // Forensic science international. – 2021. – Vol. 320. – Article ID 110686.

248. Jacobson, M. L. Kappa Opioid Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for Stress-Related Disorders / M. L. Jacobson, C. A. Browne, I. Lucki // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2020. – Vol. 60. – P. 615-636.

249. Jamadarkhana, S. Clonidine in adults as a sedative agent in the intensive care unit / S. Jamadarkhana, S. Gopal // Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology. – 2010. – Vol. 26, No. 4. – P. 439-445.

250. Ji, G. Kappa opioid receptors in the central amygdala modulate spinal nociceptive processing through an action on amygdala CRF neurons / G. Ji, V. Neugebauer // Molecular Brain. – 2020. – Vol. 13. – № 1. – P. 128.

251. Johannessen, S. I. Anti-convulsant Agents: Phenobarbital and Primidone / S. I. Johannessen, C. Johannessen Landmark // NeuroPsychopharmacotherapy / ed. by P. Riederer, G. Laux, T. Nagatsu, W. Le, C. Riederer. – Cham : Springer, 2022. – P. 3537-3546.

252. Kantrowitz, J. T. Targeting Serotonin 5-HT2A Receptors to Better Treat Schizophrenia: Rationale and Current Approaches / J. T. Kantrowitz // CNS drugs. – 2020. – Vol. 34, No. 9. – P. 947-959.

253. Kappa opioid agonists in the treatment of itch: just scratching the surface? / T. C. Beck, E. M. Wilson, E. Wilkes [et al.] // Itch (Philadelphia, Pa.). – 2023. – Vol. 8, No. 4. – Article ID e0072.

254. Kappa opioid receptor activation decreases inhibitory transmission and antagonizes alcohol effects in rat central amygdala / N. W. Gilpin, M. Roberto, G. F. Koob, P. Schweitzer // Neuropharmacology. – 2014. – Vol. 77. – P. 294-302.

255. Kappa opioid receptor activation in the amygdala disinhibits CRF neurons to generate pain-like behaviors / M. Hein, G. Ji, D. Tidwell [et al.] // Neuropharmacology. – 2021. – Vol. 185. – P. 108456.

256. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes / M. R. Bruchas, T. A. Macey, J. D. Lowe, C. Chavkin // The Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281. – № 26. – P. 18081-18089.

257. Kappa Opioid Receptor Agonist and Brain Ischemia / C. Chunhua, X. Chunhua, S. Megumi, L. Renyu // Translational Perioperative and Pain Medicine. – 2014. – Vol. 1, No. 2. – P. 27-34.

258. Kappa Opioid Receptor Blockade in the Amygdala Mitigates Pain Like-Behaviors by Inhibiting Corticotropin Releasing Factor Neurons in a Rat Model of Functional Pain / V. Yakhnitsa, G. Ji, M. Hein [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – Article ID 903978.

259. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons / J. M. Ehrich, D. I. Messinger, C. R. Knakal [et al.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2015. – Vol. 35, No. 37. – P. 12917-12931.

260. Kappa Opioid Receptors Drive a Tonic Aversive Component of Chronic Pain / S. S. Liu, S. Pickens, N. E. Burma [et al.] // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. – 2019. – Vol. 39, No. 21. – P. 4162-4178.

261. Kappa opioid receptors regulate hippocampal synaptic homeostasis and epileptogenesis / B. N. Queenan, R. L. Dunn, V. R. Santos [et al.] // Epilepsia. – 2018. – Vol. 59, No. 1. – 106-122.

262. Karkhanis, A. N. Kappa opioid receptor agonist U50,488 inhibits dopamine more in caudal than rostral nucleus accumbens core / A. N. Karkhanis, A. M. West, S. R. Jones // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2023. – Vol. 133, No. 5. – P. 526-534.

263. Kessler, A. Complex regional pain syndrome: An updated comprehensive review / A. Kessler, M. Yoo, R. Calisoff // NeuroRehabilitation. – 2020. – Vol. 47, No. 3. – P. 253-264.

264. Ketamine and nitrous oxide: The evolution of NMDA receptor antagonists as antidepressant agents / M. C. Kalmoe, A. M. Janski, C. F. Zorumski [et al.] // Journal of the Neurological Sciences. – 2020. – Vol. 412. – Article ID 116778.

265. Kharibegashvili, A. Pathogenesis of epilepsy and mental diseases, the role of the blood-brain barrier in the context of neurochemical theories / A. Kharibegashvili // International Journal of Psychiatry Research. – 2022. – Vol. 4, No. 1. – P. 6-14.

266. Khokhar, M. A. Droperidol for psychosis-induced aggression or agitation / M. A. Khokhar, J. Rathbone // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2016. – Vol. 12, No. 12. – Article ID CD002830.

267. Knoll, A. T. Dynorphin, stress, and depression / A. T. Knoll, W. A. Carlezon // Brain Research. – 2010. – Vol. 1314. – P. 56-73.

268. Kokh, D. B. Receptor flexibility in small‐molecule docking calculations / D. B. Kokh, R. C. Wade, W. Wenzel // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2011. – Vol. 1, No. 2. – P. 298-314.

269. Kroning K. Engineering Genetically Encoded Fluorescent Integrators for G-protein-coupled Receptor Agonist Detection : Dissertation (PhD) / K. Kroning. – Ann Arbor : University of Michigan, Horace H. Rackham School of Graduate Studies, 2023.

270. Kruse, A. O. Glutamatergic dysfunction in Schizophrenia / A. O. Kruse, J. R. Bustillo // Translational psychiatry. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – Article ID 500.

271. Kulkarni, J. Estrogens and SERMS as adjunctive treatments for schizophrenia / J. Kulkarni, S. Butler, A. Riecher-Rössler // Frontiers in neuroendocrinology. – 2019. – Vol. 53. – Article ID 100743.

272. LAB_066 T or Y Maze Testing for Rodents : UQ Animal Ethics Committee - Standard Operating Procedure / Queensland Brain Institute. – Версия 1; AEC Reviewed & Approved: March 2025; SOP Expiry: March 2026. – 3 p.

273. Landeta, A. B. de. Dopamine D1/D5 Receptors in the Retrosplenial Cortex Are Necessary to Consolidate Object Recognition Memory / A. B. de Landeta, J. H. Medina, C. Katche // Frontiers in Behavioral Neuroscience. – 2022. – Vol. 16. – Article ID 922971.

274. Lankhuijzen, L. M. Opioids, microglia, and temporal lobe epilepsy / L. M. Lankhuijzen, T. Ridler // Frontiers in neurology. – 2024. – Vol. 14. – Article ID 1298489.

275. Lascelles, B. D. X. Use of thermal threshold response to evaluate the antinociceptive effects of butorphanol in cats / B. D. X. Lascelles, S. A. Robertson // American Journal of Veterinary Research. – 2004. – Vol. 65, No. 8. – P. 1085-1089.

276. Lau, B. K. Opioid presynaptic disinhibition of the midbrain periaqueductal grey descending analgesic pathway / B. K. Lau, B. L. Winters, C. W. Vaughan // British Journal of Pharmacology. – 2020. – Vol. 177, No. 10. – P. 2320-2332.

277. Lea, H. Neuroplasticity; the mechanisms and implications for treatment of neurological and psychiatric disorders / H. Lea // Archives of Clinical Psychiatry. – 2022. – Vol. 49, No. 4. – P. 1-9.

278. Leconte, C. Traumatic Stress-Induced Vulnerability to Addiction: Critical Role of the Dynorphin/Kappa Opioid Receptor System / C. Leconte, R. Mongeau, F. Noble // Frontiers in pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – Article ID 856672.

279. Leitch, B. Molecular mechanisms underlying the generation of absence seizures: identification of potential targets for therapeutic intervention / B. Leitch // International journal of molecular sciences. – 2024. – Vol. 25, No. 18. – Article ID 9821.

280. Leucht, S. Benperidol for schizophrenia / S. Leucht, B. Hartung // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2005. – Vol. 2005, No. 2. – Article ID CD003083.

281. Li, C. T. Glutamatergic Dysfunction and Glutamatergic Compounds for Major Psychiatric Disorders: Evidence From Clinical Neuroimaging Studies / C. T. Li, K. C. Yang, W. C. Lin // Frontiers in psychiatry. – 2019. – Vol. 9. – Article ID 767.

282. Lieberman, J. A. Psychotic Disorders / J. A. Lieberman, M. B. First // The New England journal of medicine. – 2018. – Vol. 379, No. 3. – P. 270-280.

283. Ligand/kappa-opioid receptor interactions: insights from the X-ray crystal structure / K. Martinez-Mayorga, K. G. Byler, A. B. Yongye [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – Vol. 66 – P. 114-121.

284. Lipinski, C. A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions / C. A. Lipinski // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 101. – P. 34-41.

285. Lipman, Z. M. Current clinical options for the management of itch in atopic dermatitis / Z. M. Lipman, A. Labib, G. Yosipovitch // Clinical, cosmetic and investigational dermatology. – 2021. – Vol. 14. – P. 959-969.

286. M100907 and BD 1047 attenuate the acute toxic effects of methamphetamine / A. Ray, C. E. Canal, J. C. Ehlen [et al.] // Neurotoxicology. – 2019. – Vol. 74. – P. 91-99.

287. Machine Learning with Neural Networks to Enhance Selectivity of Nonenzymatic Electrochemical Biosensors in Multianalyte Mixtures / Z. Zhou, L. Wang, J. Wang [et al.] // ACS applied materials & interfaces. – 2022. – Vol. 14, No. 47. – P. 52684-52690.

288. Manglik A. Molecular Basis of Opioid Action: From Structures to New Leads / A. Manglik // Biological psychiatry. – 2020. – Vol. 87. No. 1. – P. 6-14.

289. Maroney, M. Management of cognitive and negative symptoms in schizophrenia / M. Maroney // The Mental Health Clinician. – 2022. – Vol. 12, No. 5. – P. 282-299.

290. McCutcheon, R. A. Schizophrenia—an overview / R. A. McCutcheon, T. R. Marques, O. D. Howes // JAMA psychiatry. – 2020. – Vol. 77, No. 2. – P. 201-210.

291. McCutcheon, R. A. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms / R. A. McCutcheon, A. Abi-Dargham, O. D. Howes // Trends in neurosciences. – 2019. – Vol. 42, No. 3. – P. 205-220.

292. Mechanisms Underlying Aggressive Behavior Induced by Antiepileptic Drugs: Focus on Topiramate, Levetiracetam, and Perampanel / C. C. Hansen, H. Ljung, E. Brodtkorb, A. Reimers // Behavioural Neurology. – 2018. – Vol. 2018. – Article ID 2064027.

293. Meltzer, H. Y. Contrasting Typical and Atypical Antipsychotic Drugs / H. Y. Meltzer, E. Gadaleta // Focus (American Psychiatric Publishing). – 2021. – Vol. 19, No. 1. – P. 3-13.

294. Meltzer, H. Y. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs / H. Y. Meltzer, B. W. Massey // Current Opinion in Pharmacology. – 2011. – Vol. 11, No. 1. – P. 59-67.

295. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches / J. Vázquez, M. López, E. Gibert [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2020. – Vol. 25, No. 20. – Article ID 4723.

296. Merz, J. Comparative efficacy and acceptability of pharmacological, psychotherapeutic, and combination treatments in adults with posttraumatic stress disorder: a network meta-analysis / J. Merz, G. Schwarzer , H. Gerger // JAMA psychiatry. – 2019. – Vol. 76, No. 9. – P. 904-913.

297. Mesocortical dopamine system modulates mechanical nociceptive responses recorded in the rat prefrontal cortex / S. Sogabe, Y. Yagasaki, K. Onozawa, Y. Kawakami // BMC neuroscience. – 2013. – Vol. 14. – P. 65.

298. Metabolic Syndrome in Psychotic Disorder Patients Treated With Oral and Long-Acting Injected Antipsychotics / A. Ventriglio, R. J. Baldessarini, G. Vitrani [et al.] // Frontiers in psychiatry. – 2019. – Vol. 9. – Article ID 744.

299. Modulation of the kappa and mu opioid axis for the treatment of chronic pruritus: A review of basic science and clinical implications / S. Elmariah, S. Chisolm, T. Sciascia, S. G. Kwatra // JAAD international. – 2022. – Vol. 7. – P. 156-163.

300. Moirangthem, P. D. Antiepileptic effect of telmisartan and valsartan alone and in combination with ethosuximide on pentylenetetrazol induced experimental model of epilepsy in albino mice / P. D. Moirangthem, B. Laishram // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2023. – Vol. 14, No. 9. – P. 4509–4512.

301. Molecular Interaction Between Butorphanol and κ-Opioid Receptor / J. Ji, W. Lin, A. Vrudhula [et al.] // Anesthesia and Analgesia. – 2020. – Vol. 131, No. 3. – P. 935-942.

302. Molecular mechanism of biased signaling at the kappa opioid receptor / A. E. Daibani, J. M. Paggi, K. Kim [et al.] // Nature communications. – 2023. – Vol. 14, No. 1. – Article ID 1338.

303. Molecular mechanisms of topiramate and its clinical value in epilepsy / Y. F. Bai, C. Zeng, M. Jia, B. Xiao // Seizure. – 2022. – Vol. 98. – P. 51-56.

304. Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences / S. Aringhieri, M. Carli, S. Kolachalam [et al.] // Pharmacology & Therapeutics. – 2018. – Vol. 192 – P. 20-41.

305. Mukhtar, I. Inflammatory and immune mechanisms underlying epileptogenesis and epilepsy: From pathogenesis to treatment target / I. Mukhtar // Seizure. – 2020. – Vol. 82. – P. 65-79.

306. Munaf, Z. A. Quality of life, adherence and knowledge of epileptic patients and the impact of a pharmacist‐led educational intervention: A review / Z. A. Munaf, S. I. Mohammed // Medicine Advances. – 2024. – Vol. 2, No. 1. – P. 29-42.

307. Muscarinic Cholinergic Receptor Agonist and Peripheral Antagonist for Schizophrenia / S. K. Brannan, S. Sawchak, A. Miller C. [et al.] // The New England journal of medicine. – 2021. – Vol. 384, No. 8. – P. 717-726.

308. Nagase, H. Research and development of κ opioid receptor agonists and δ opioid receptor agonists / H. Nagase, A. Saitoh // Pharmacology & therapeutics. – 2020. – Vol. 205. – Article ID 107427.

309. Nalfurafine is a G-protein biased agonist having significantly greater bias at the human than rodent form of the kappa opioid receptor / S. S. Schattauer, J. R. Kuhar, A. Song, C. Chavkin // Cellular Signalling. – 2017. – Vol. 32. – P. 59-65.

310. Nalfurafine suppresses pruritogen- and touch-evoked scratching behavior in models of acute and chronic itch in mice / T. Akiyama, M. I. Carstens, D. Piecha [et al.] // Acta dermato-venereologica. – 2015. – Vol. 95, No. 2. – P. 147-150.

311. Neugebauer, V. Amygdala physiology in pain / V. Neugebauer // Handbook of Behavioral Neuroscience. – 2020. – Vol. 26. – P. 101-113.

312. Neural oscillation in bipolar disorder: a systematic review of resting-state electroencephalography studies / Z. Su, H. Zhang, Y. Wang [et al.] // Frontiers in neuroscience. – 2024. – Vol. 18. – Article ID 1424666.

313. Neurocognitive Effect of Biased μ-Opioid Receptor Agonist Oliceridine, a Utility Function Analysis and Comparison with Morphine / L. Moss, H. Hijma, M. Demitrack [et al.] // Anesthesiology. – 2023. – Vol. 139, No. 6. – P. 746-756.

314. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression / B. Guo, M. Zhang, W. Hao [et al.] // Translational psychiatry. – 2023. – Vol. 13, No. 1. – Article ID 5.

315. Neuroinflammation: A Signature or a Cause of Epilepsy? / E. Pracucci, V. Pillai, D. Lamers [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, No. 13. – Article ID 6981.

316. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats / J. H. Garcia, S. Wagner, K. F. Liu, X. J. Hu // Statistical validation. Stroke. – 1995. – Vol. 26, No. 4. – P. 627-635.

317. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy / D. C. Patel, B. P. Tewari, L. Chaunsali, H. Sontheimer // Nature reviews. Neuroscience. – 2019. – Vol. 20, No. 5. – P. 282-297.

318. Neuropeptides and oligopeptidases in schizophrenia / B. Rodríguez, J. V. Nani, P. G. C. Almeida [et al.] // Neuroscience and biobehavioral reviews. – 2020. – Vol. 108. – P. 679-693.

319. New and emerging treatments for schizophrenia: a narrative review of their pharmacology, efficacy and side effect profile relative to established antipsychotics / M. C. Lobo, T. S. Whitehurst, S. J. Kaar, O. D. Howes // Neuroscience and biobehavioral reviews. – 2022. – Vol. 132. – P. 324-361.

320. New benzimidazole-aldehyde hybrids as neuroprotectors with hypochlorite and superoxide radical-scavenging activity / N. Anastassova, D. Yancheva, N. Hristova-Avakumova [et al.] // Pharmacological reports : PR. – 2020. – Vol. 72, No. 4. – P. 846-856.

321. New discoveries for an old drug: a review of recent olanzapine research / A. M. Meftah, E. Deckler, L. Citrome, J. T. Kantrowitz // Postgraduate medicine. – 2020. – Vol. 132, No. 1. – P. 80-90.

322. New epilepsy therapies in development / P. Klein, R.M. Kaminski, M. Koepp, W. Löscher // Nature Reviews Drug Discovery. – 2024. – Vol. 23, No. 9. – P. 682-708.

323. Newson, J. J. EEG Frequency Bands in Psychiatric Disorders: A Review of Resting State Studies / J. J. Newson, T. C. Thiagarajan // Frontiers in Human Neuroscience. – 2018. – Vol. 12. – P. 521.

324. Noncanonical scaffolding of Gαi and β-arrestin by G protein-coupled receptors / J. S. Smith, T. F. Pack, A. Inoue [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2021. – Vol. 371, No. 6534. – Article ID eaay1833.

325. Nonopioid pharmacologic treatments // Pain Management and the Opioid Epidemic: Balancing Societal and Individual Benefits and Risks of Prescription Opioid Use. Chapter 2: Pain Management and the Intersection of Pain and Opioid Use Disorder / J. K. Phillips, M. A. Ford, R. J. Bonnie, editors. – Washington (DC) : National Academies Press (US), 2017. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK458655/#sec_000062.

326. Novak, A. Cognitive Impairment in People with Epilepsy / A. Novak, K. Vizjak, M. Rakusa // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – Vol. 11, No. 1. – P. 267.

327. Novel Drug Targets and Emerging Pharmacotherapies in Neuropathic Pain / J. Bernatoniene, A. Sciupokas, D. M. Kopustinskiene, K. Petrikonis // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, No. 7. – Article ID 1799.

328. Opioid Receptor-Mediated Regulation of Neurotransmission in the Brain / K. C. Reeves, N. Shah, B. Muñoz, B. K. Atwood // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2022. – Vol. 15. – Article ID 919773.

329. Opioid Receptors and Protonation-Coupled Binding of Opioid Drugs / S. Lešnik, É. Bertalan, U. Bren, A. N. Bondar // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, No. 24. – Article ID 13353.

330. Optimisation of in silico derived 2-aminobenzimidazole hits as unprecedented selective kappa opioid receptor agonists / P. K. Sasmal, C. V. Krishna, S. S. Adabala [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2015. – Vol. 25, No. 4. – P. 887-892.

331. Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials / A. Dávalos, J. Castillo, J. Alvarez-Sabín [et al.] // Stroke. – 2002. – Vol. 33, No. 12. – P. 2850-2857.

332. Organ-on-a-chip meets artificial intelligence in drug evaluation / S. Deng, C. Li, J. Cao [et al.] // Theranostics. – 2023. – Vol. 13, No. 13. – P. 4526-4558.

333. Ossipov, M. H. Central modulation of pain / M. H. Ossipov, G. O. Dussor, F. Porreca // The Journal of Clinical Investigation. – 2010. – Vol. 120, No. 11. – P. 3779-3787.

334. P, S. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis: Unveiling the Potential Mechanisms Involved in Stress-Induced Alzheimer's Disease and Depression / S. P, C. Vellapandian // Cureus. – 2024. – Vol. 16, No. 8. – Article ID e67595.

335. p38 mitogen-activated protein kinase activation in amygdala mediates κ opioid receptor agonist U50,488H-induced conditioned place aversion / G. Y. Zan, Q. Wang, Y. J. Wang [et al.] // Neuroscience. – 2016. – Vol. 320. – P. 122-128.

336. Pan, Z. Z. κ-Opioid receptor-mediated enhancement of the hyperpolarization-activated current (Ih) through mobilization of intracellular calcium in rat nucleus raphe magnus / Z. Z. Pan // The Journal of Physiology. – 2003. – Vol. 548, Pt. 3. – P. 765-775.

337. Patterson, T. A. Modification of the duration of action and pharmacodynamics of arecoline by tetraisopropylpyrophosphoramide / T. A. Patterson, J. W. Kosh // Pharmacological research. – 1994. – Vol. 29, No. 3. – P. 237-249.

338. Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates : 6th ed. / G. Paxinos, C. Watson. – Amsterdam ; Boston : Elsevier Academic Press, 2007. – 456 p.

339. Pehek, E. A. Local infusion of the serotonin antagonists ritanserin or ICS 205,930 increases in vivo dopamine release in the rat medial prefrontal cortex / E. A. Pehek // Synapse (New York, N.Y.). – 1996. – Vol. 24, No. 1. – P. 12-18.

340. Peripheral Biomarkers for First-Episode Psychosis-Opportunities from the Neuroinflammatory Hypothesis of Schizophrenia / N. Trovão, J. Prata, O. VonDoellinger [et al.] // Psychiatry investigation. – 2019. – Vol. 16, No. 3. – P. 177-184.

341. Persistence of amygdala gamma oscillations during extinction learning predicts spontaneous fear recovery / J. Courtin, N. Karalis, C. Gonzalez-Campo [et al.] // Neurobiology of Learning and Memory. – 2014. – Vol. 113. – P. 82-89.

342. Personalized Psychiatry of Psychoneurological Diseases: From Theory to Clinical Practice / R. F. Nasyrova, N. G. Neznanov, N. A. Shnayder // Handbook on Optimizing Patient Care in Psychiatry / ed. by A. Shrivastava, A. De Sousa, N. Shah. – New York ; Abingdon : Routledge, 2023. – P. 524-537.

343. Perucca, E. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: I. Role of GABA as a Modulator of Seizure Activity and Recently Approved Medications Acting on the GABA System / E. Perucca, M. Bialer,H. S. White // CNS drugs. – 2023. – Vol. 37, No. 9. – 755-779.

344. Pharmacologic Characterization of Substituted Nitazenes at μ, κ, and Δ Opioid Receptors Suggests High Potential for Toxicity / L. B. Kozell, A. J. Eshleman, K. M. Wolfrum [et al.] // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 2024. – Vol. 389, No. 2. – P. 219-228.

345. Pharmacological characterization of PD 152255, a novel dimeric benzimidazole dopamine D3 antagonist / A. E. Corbin, T. A. Pugsley, H. C. Akunne [et al.] // Pharmacology, biochemistry, and behavior. – 1998. – Vol. 59, No. 2. – P. 487-493.

346. 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 [et al.] // Archiv der Pharmazie. – 2011. – Vol. 344, No. 5. – P. 287-291.

347. Pharmacophore-Based Screening, Molecular Docking, and Dynamic Simulation of Fungal Metabolites as Inhibitors of Multi-Targets in Neurodegenerative Disorders / D. Iqbal, M. Alsaweed, Q. M. S. Jamal [et al.] // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, No. 11. – Article ID 1613.

348. Phatak, S. S. High-throughput and in silico screenings in drug discovery / S. S. Phatak, C. C. Stephan, C. N. Cavasotto // Expert opinion on drug discovery. – 2009. – Vol. 4, No. 9. – P. 947-959.

349. Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial / J. Cummings, S. Isaacson, R. Mills [et al.] // Lancet (London, England). – 2014. – Vol. 383, No. 9916. – P. 533-540.

350. Potassium channels and epilepsy / K. Gao, Z. Lin, S. Wen, Y. Jiang // Acta neurologica Scandinavica. – 2022. – Vol. 146, No. 6. – P. 699-707.

351. Potential anxiolytic agents. Part 4: novel orally-active N5-substituted pyrido [1, 2-a] benzimidazoles with high GABA-A receptor affinity / A. D. Jordan, A. H. Vaidya, D. I. Rosenthal [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2002. – Vol. 12, No. 17. – P. 2381-2386.

352. Potential anxiolytic agents. Pyrido[1,2-a]benzimidazoles: a new structural class of ligands for the benzodiazepine binding site on GABA-A receptors / B. E. Maryanoff, W. Ho, D. F. McComsey [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 1995. – Vol. 38, No. 1. – P. 16-20.

353. Precision psychiatry and Research Domain Criteria: Implications for clinical trials and future practice / L. M. Williams, W. T. Carpenter, C. Carretta [et al.] // CNS spectrums. – 2024. – Vol. 29, No. 1. – P. 26-39.

354. Preclinical Studies on Nalfurafine (TRK-820), a Clinically Used KOR Agonist / Y. Zhou, K. Freeman, V. Setola [et al.] // Handbook of experimental pharmacology. – 2022. – Vol. 271. – P. 137-162.

355. Predicting opioid receptor binding affinity of pharmacologically unclassified designer substances using molecular docking / C. R. Ellis, N. L. Kruhlak, M. T. Kim [et al.] // PloS one. – 2018. – Vol. 13, No. 5. – Article ID e0197734.

356. Prediction and Study of Anticonvulsant Properties of Benzimidazole Derivatives / P. M. Vasil'ev, K. Y. Kalitin, A. A. Spasov [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2017. – Vol. 50, No. 12. – P. 775-780.

357. Prediction of cholinergic compounds by machine-learning / S. J. Wijeyesakere, D. M. Wilson, M. S. Marty // Computational Toxicology. – 2020. – Vol. 13. – Article ID 100119.

358. Prefrontal Cortical Kappa Opioid Receptors Attenuate Responses to Amygdala Inputs / H. A. Tejeda, A. N. Hanks, L. Scott [et al.] // Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 40, No. 13. – P. 2856-2864.

359. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety / E. Likhtik, J. M. Stujenske, M. A. Topiwala [et al.] // Nature Neuroscience. – 2014. – Vol. 17, No. 1. – P. 106-113.

360. Prenatal LPS-exposure-a neurodevelopmental rat model of schizophrenia-differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring / L. Wischhof, E. Irrsack, C. Osorio, M. Koch // Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. – 2015. – Vol. 57. – P. 17-30.

361. Prevalence of cognitive impairment in patients with substance use disorder / C. J. W. H. Bruijnen, B. A. G. Dijkstra, S. J. W. Walvoort [et al.] // Drug and alcohol review. – 2019. – Vol. 38, No. 4. – P. 435-442.

362. Pringsheim, T. Pimozide for tics in Tourette’s syndrome / T. Pringsheim, C. Marras // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2009. – Vol. 2009, No. 2. – Article ID CD006996.

363. Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease / N. Vijiaratnam, T. Simuni, O. Bandmann [et al.] // The Lancet. Neurology. – 2021. – Vol. 20, No. 7. – P. 559-572.

364. Puls K. Mechanistic Characterization and Development of Tailored Small Molecule Modulators of the κ-Opioid Receptor : Dissertation / K. Puls. – Berlin : Freie Universität Berlin, 2024.

365. Quality of Life in Schizophrenia: A Meta-Analysis of Comparative Studies / M. Dong, L. Lu, L. Zhang [et al.] // The Psychiatric quarterly. – 2019. – Vol. 90, No. 3. – P. 519-532.

366. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination / J. B. Bederson, L. H. Pitts, M. Tsuji [et al.] // Stroke. – 1986. – Vol. 17, No. 3. – P. 472-476.

367. Rates of treatment-resistant schizophrenia from first-episode cohorts: systematic review and meta-analysis / D. Siskind, S. Orr, S. Sinha [et al.] // The British Journal of Psychiatry. – 2022. – Vol. 220, No. 3. – P. 115-120.

368. Ray, A. Isolation of mouse peritoneal cavity cells / A. Ray, B. N. Dittel // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2010. – No. 35. – Article ID 1488.

369. Read, J. Positive and negative effects of antipsychotic medication: an international online survey of 832 recipients / J. Read, J. Williams // Current Drug Safety. – 2019. – Vol. 14, No. 3. – P. 173-181.

370. Real-World Implementation of Precision Psychiatry: A Systematic Review of Barriers and Facilitators / H. Baldwin, L. Loebel-Davidsohn, D. Oliver [et al.] // Brain sciences. – 2022. – Vol. 12, No. 7. – Article ID 934.

371. Recent Progress and Perspectives on Neural Chip Platforms Integrating PDMS-Based Microfluidic Devices and Microelectrode Arrays / S. Xu, Y. Liu, Y. Yang [et al.] // Micromachines. – 2023. – Vol. 14, No. 4. – Article ID 709.

372. Recent progress in fragment-based drug discovery facilitated by NMR spectroscopy / L. Wang, J. Gao, R. Ma [et al.] // Magnetic Resonance Letters. – 2022. – Vol. 2, No. 2. – P. 107-118.

373. Reliable and Accurate Solution to the Induced Fit Docking Problem for Protein-Ligand Binding / E. B. Miller, R. B. Murphy, D. Sindhikara [et al.] // Journal of chemical theory and computation. – 2021. – Vol. 17, No. 4. – P. 2630-2639.

374. Revealing the interaction modes of 5-HT2A receptor antagonists and the Structure-Based virtual screening from FDA and TCMNP database / Y. Wang, J. Joseph, Y. Gao [et al.] // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2021. – Vol. 39, No. 10. – P. 3681-3692.

375. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review / E. Akyuz, A. K. Polat, E. Eroglu [et al.] // Life sciences. – 2021. – Vol. 265. – Article ID 118826.

376. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data / M. Bally, N. Dendukuri, B. Rich [et al.] // BMJ (Clinical research ed.). – 2017. – Vol. 357. – Article ID j1909.

377. Risk of upper and lower gastrointestinal bleeding in patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antiplatelet agents, or anticoagulants / Á. Lanas, P. Carrera-Lasfuentes, Y. Arguedas [et al.] // Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. – 2015. – Vol. 13, No. 5. – P. 906-912.e2.

378. Rivastigmine-Benzimidazole Hybrids as Promising Multitarget Metal-Modulating Compounds for Potential Treatment of Neurodegenerative Diseases / D. Vicente-Zurdo, L. Brunetti, L. Piemontese [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24, No. 9. – Article ID 8312.

379. Role of kappa-opioid and mu-opioid receptors in pruritus: Peripheral and central itch circuits / B. S. Kim, S. Inan, S. Ständer [et al.] // Experimental dermatology. – 2022. –Vol. 31, No. 12. – 1900-1907.

380. Rudrapal, M.Virtual screening, molecular docking and QSAR studies in drug discovery and development programme / M. Rudrapal, D. Chetia // Journal of drug delivery and therapeutics. – 2020. – Vol. 10, No. 4. – P. 225-233.

381. Sack A. S. T-Type Calcium Channels in Epilepsy / A. S. Sack, T. P. Snutch // Voltage-Gated Calcium Channels / ed. by G. W. Zamponi, N. Weiss. – Cham : Springer, 2022. – P. 533-552.

382. Saini, A. A review of Benzimidazole derivatives potential activities / A. Saini, G.P. Kumar, G. Singh // International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2023. – Vol. 5, No. 1. – P. 35-40.

383. Salvinorin A administration after global cerebral hypoxia/ischemia preserves cerebrovascular autoregulation via kappa opioid receptor in piglets / Z. Wang, N. Ma, J. Riley [et al.] // PloS One. – 2012. – Vol. 7, No. 7. – Article ID e41724.

384. Santino, F. Design of κ-Opioid Receptor Agonists for the Development of Potential Treatments of Pain with Reduced Side Effects / F. Santino, L. Gentilucci // Molecules (Basel, Switzerland). – 2023. – Vol. 28, No. 1. – P. 346.

385. Schmidt, C. J. The selective 5-HT2A receptor antagonist, MDL 100,907, increases dopamine efflux in the prefrontal cortex of the rat / C. J. Schmidt, G. M. Fadayel // European Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol. 273, No. 3. – P. 273-279.

386. Scott, C. E. Computational Analysis of the Structure of the Kappa-Opioid Receptor for the Development of Selective Antagonists / C. E. Scott, E. V. Pickering, G. T. Anderson // Physical Chemistry Research at Undergraduate Institutions: Innovative and Impactful Approaches, Volume 1 / ed. by C. A. Parish, T. A. Hopkins. – Washington, DC : American Chemical Society, 2022. – (ACS Symposium Series; 1428). – P. 99-122.

387. Scratch induction in the rat by intradermal serotonin: a model for pruritus / J. S. Thomsen, M. B. Petersen, E. Benfeldt [et al.] // Acta dermato-venereologica. – 2001. – Vol. 81, No. 4. – P. 250-254.

388. Seeman, M. V. History of the dopamine hypothesis of antipsychotic action / M. V. Seeman // World journal of psychiatry. – 2021. – Vol. 11, No. 7. – P. 355-364.

389. Seeman, M. V. Schizophrenia psychosis in women / M. V. Seeman // Women. – 2021. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-15.

390. Seeman, P. Antipsychotic drugs, dopamine receptors, and schizophrenia / P. Seeman // Clinical Neuroscience Research. – 2001. – Vol. 1, No. 1. – P. 53-60.

391. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review / A. N. Edinoff, H. A. Akuly, T. A. Hanna [et al.] // Neurology International. – 2021. – Vol. 13, No. 3. – P. 387-401.

392. Severity of Topiramate-Related Working Memory Impairment Is Modulated by Plasma Concentration and Working Memory Capacity / S. P. Callisto, S. M. Illamola, A. K. Birnbaum [et al.] // Journal of Clinical Pharmacology. – 2020. – Vol. 60, No. 9. – P. 1166-1176.

393. Seyedabadi, M. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential / M. Seyedabadi, M. H. Ghahremani, P. R. Albert // Pharmacology & therapeutics. – 2019. – Vol. 200. – P. 148-178.

394. Shukralla, A. A. Acetazolamide: Old drug, new evidence? / A. A. Shukralla, E. Dolan, N. Delanty // Epilepsia open. – 2022. – Vol. 7, No. 3. – P. 378-392.

395. Signal transduction at GPCRs: Allosteric activation of the ERK MAPK by β-arrestin / A. W. Kahsai, K. S. Shah, P. J. Shim [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2023. – Vol. 120, No. 43. – Article ID e2303794120.

396. Small-molecule anticonvulsant agents with potent in vitro neuroprotection and favorable drug-like properties / G. R. Smith, D. E. Brenneman, Y. Zhang [et al.] // Journal of molecular neuroscience: MN. – 2014. – Vol. 52, No. 3. – P. 446-458.

397. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors / S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen // The Biochemical Journal. – 2000. – Vol. 351, Pt. 1. – P. 95-105.

398. Stahl, S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate / S. M. Stahl // CNS spectrums. – 2018. – Vol. 23, No. 3. – P. 187-191.

399. Stansley, B. J. The therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulation for schizophrenia / B. J. Stansley, P. J. Conn // Current opinion in pharmacology. – 2018. – Vol. 38. – P. 31-36.

400. Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons / S. Threlfell, T. Lalic, N. J. Platt [et al.] // Neuron. – 2012. – Vol. 75, No. 1. – P. 58-64.

401. Stroup, T. S. Management of common adverse effects of antipsychotic medications / T. S. Stroup, N. Gray // World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA). – 2018. – Vol. 17, No. 3. – P. 341-356.

402. Structure-Activity Relationship Analysis of Benzimidazoles as Emerging Anti-Inflammatory Agents: An Overview / R. Veerasamy, A. Roy, R. Karunakaran, H. Rajak // Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 14, No. 7. – Article ID 663.

403. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects / A. Manglik, H. Lin, D. K. Aryal [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 537, No. 7619. – P. 185-190.

404. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence / E. H. B. Maia, L. C. Assis, T. A. de Oliveira [et al.] // Frontiers in chemistry. – 2020. – Vol. 8. – Article ID 343.

405. Structures of the 5-HT2A receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine / K. T. Kimura, H. Asada, A. Inoue [et al.] // Nature Structural & Molecular Biology. – 2019. – Vol. 26, No. 2. – P. 121-128.

406. Study of aversive and p38 mapk-inhibitory properties of kappa-agonist with analgesic activity - compound RU-1205 / A. A. Spasov, E. E. Zvartau, O. Iu. Grechko [et al.] // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, No. 3. – P. 59-65.

407. Study on the neuroprotective, radical-scavenging and MAO-B inhibiting properties of new benzimidazole arylhydrazones as potential multi-target drugs for the treatment of Parkinson's disease / N. Anastassova, D. Aluani, N. Hristova-Avakumova [et al.] // Antioxidants. – 2022. – Vol. 11, No. 5. – Article ID 884.

408. Synaptic plasticity and mental health: methods, challenges and opportunities / L. G. Appelbaum, M. A. Shenasa, L. Stolz, Z. Daskalakis // Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2023. – Vol. 48, No. 1. – P. 113-120.

409. Syntheses and biological evaluation of 1-heteroaryl-2-aryl-1H-benzimidazole derivatives as c-Jun N-terminal kinase inhibitors with neuroprotective effects / M. H. Kim, J. Lee, K. Jung [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 21, No. 8. – P. 2271-2285.

410. Synthesis and Anti-inflammatory Evaluation of Novel Benzimidazole and Imidazopyridine Derivatives / G. Chen, Z. Liu, Y. Zhang [et al.] // ACS medicinal chemistry letters. – 2012. – Vol. 4, No. 1. – P. 69-74.

411. Synthesis and antioxidant activity of some new N-alkylated pyrazole-containing benzimidazoles / M. Bellam, M. Gundluru, S. Sarva [et al.] // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2017. – Vol. 53, No. 2. – P. 173-178.

412. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole derivatives as potential neuroprotective agents in an ethanol-induced rodent model / M. Imran, F. A. Shah, H. Nadeem [et al.] // ACS Chemical Neuroscience. – 2021. – Vol. 12, No. 3. – P. 489-505.

413. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel 2,3,4,5-tetrahydro[1,3]diazepino[1,2-a]benzimidazole Derivatives as Promising Anxiolytic and Analgesic Agents / D. V. Maltsev, A. A. Spasov, P. M. Vassiliev [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 26, No. 19. – Article ID 6049.

414. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Benzimidazole-4,7-dione-Based P2X3 Receptor Antagonists as Novel Anti-Nociceptive Agents / J. Bae, Y. O. Kim, X. Han [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2022. – Vol. 27, No. 4. – Article ID 1337.

415. Synthesis of Novel Benzazole Derivatives and Evaluation of Their Antidepressant-Like Activities with Possible Underlying Mechanisms / G. Tokgöz, Ü. Demir Özkay, D. Osmaniye [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2018. – Vol. 23, No. 11. – Article ID 2881.

416. Synthesis, binding properties and receptor docking of 4-halo-6-[2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl]-1H-benzimidazoles, mixed ligands of D2 and 5-HT1A receptors / D. Andrić, G. Roglić, V. Sukalović [et al.] // European journal of medicinal chemistry. – 2008. – Vol. 43, No. 8. – P. 1696-1705.

417. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / J. Zhu, C. F. Wu, X. Li [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 21, No. 14. – P. 4218-4224.

418. Synthesis, characterization, and biological evaluation of benzimidazole derivatives as potential anxiolytics / D. Nannapaneni, A. V. Gupta, M. Reddy, R. C. Sarva // Journal of young pharmacists: JYP. – 2010. – Vol. 2, No. 3 – P. 273-279.

419. Synthesis, Characterization, In Silico and In Vivo Evaluation of Benzimidazole‐Bearing Quinoline Schiff Bases as New Anticonvulsant Agents / K. Shabana, Salahuddin, A. Mazumder, H. Singh [et al.] // ChemistrySelect. – 2023. – Vol. 8, No. 21. – Article ID e202300209.

420. 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 [et al.] // European journal of medicinal chemistry. – 2005. – Vol. 40, No. 5. – P. 481-493.

421. Synthesis, In Vivo and In Silico Evaluation of Analgesic, Anti‐Inflammatory and Antidiarrheal Activities of Benzimidazole Derivatives / S. K. Poddar, P. Saha, S. E. Spriha, S. M. Abdur Rahman // ChemistrySelect. – 2025. – Vol. 10, No. 9. – Article ID e202401267.

422. Synthesis, pharmacology and molecular modeling of N-substituted 2-phenyl-indoles and benzimidazoles as potent GABA(A) agonists / J. L. Falcó, M. Piqué, M. González [et al.] // European journal of medicinal chemistry. – 2006. – Vol. 41, No. 8. – P. 985-990.

423. Synthesis, SAR study, and biological evaluation of novel 2, 3-dihydro-1H-imidazo [1, 2-a] benzimidazole derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors / A. Chino, S. Honda, M. Morita [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 27, No. 16. – P. 3692-3706.

424. Tanaka, Y. Aniracetam attenuates the 5‐HT2 receptor‐mediated head‐twitch response in rodents as a hallucination model / Y. Tanaka, K. Nakamura, M. Kurasawa // Drug development research. – 1998. – Vol. 44, No. 4. – P. 131-139.

425. Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? / T. Günther, P. Dasgupta, A. Mann [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2018. – Vol. 175, No. 14. – P. 2857-2868.

426. Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation / M. Mogi, J. M. Li, K. Tsukuda [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 2008. – Vol. 375, No. 3. – P. 446-449.

427. Teva Pharmaceuticals USA. ORAP (Pimozide) Tablets: Prescribing Information [Электронный ресурс]. – Sellersville, PA : Teva Pharmaceuticals USA, 2008. – 15 p. – URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/017473s041lbl.pdf.

428. The amygdaloid complex: anatomy and physiology / P. Sah, E. S. L. Faber, M. Lopez De Armentia, J. Power // Physiological Reviews. – 2003. – Vol. 83, No. 3. – P. 803-834.

429. The Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Oxysophocarpine on Pilocarpine-Induced Convulsions in Adult Male Mice / G. Liu, J. Wang, X. H. Deng [et al.] // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2017. – Vol. 37, No. 2. – P. 339-349.

430. The Benzimidazole Derivatives, B1 (N-[(1H-Benzimidazol-2-yl)Methyl]-4-Methoxyaniline) and B8 (N-{4-[(1H-Benzimidazol-2-yl)Methoxy]Phenyl}Acetamide) Attenuate Morphine-Induced Paradoxical Pain in Mice / Z. Idris, M. Abbas, H. Nadeem, A. U. Khan // Frontiers in Neuroscience. – 2019. – Vol. 13. – Article ID 101.

431. The burden of mental disorders, substance use disorders and self-harm among young people in Europe, 1990–2019: Findings from the Global Burden of Disease Study 2019 / G. Castelpietra, A. K. S. Knudsen , E. E. Agardh [et al.] // The Lancet Regional Health–Europe. – 2022. – Vol. 16.

432. The Fundamentals of Antiseizure Medications: A Through Z / T. E. Welty, J. M. Conway, J. Bainbridge [et al.] // Epilepsy currents. – 2024.

433. The G-protein biased partial κ opioid receptor agonist 6’-GNTI blocks hippocampal paroxysmal discharges without inducing aversion / L. Zangrandi, J. Burtscher, J. P. MacKay [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2016. – Vol. 173, No. 11. – P. 1756-1767.

434. The kappa opioid receptor modulates GABA neuron excitability and synaptic transmission in midbrainprojections from the insular cortex / M. M. Pina, D. Pati, L. S. Hwa [et al.] // Neuropharmacology. – 2020. – Vol. 165. – Article ID 107831.

435. The Kappa Opioid Receptor: A Promising Therapeutic Target for Multiple Pathologies / M. L. Dalefield, B. Scouller, R. Bibi, B. M. Kivell // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – Article ID 837671.

436. The role of celecoxib in treatment of psychiatric disorders / M. Shalbafan, F. Malekpour, S. Donboli [et al.] // Journal of Neurology and Psychology. – 2018. – Vol. 6, No. 1. – P. 1-4.

437. The Role of the Kappa Opioid System in Comorbid Pain and Psychiatric Disorders: Function and Implications / M. J. Ji, J. Yang, Z. Q. Gao [et al.] // Frontiers in Neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – Article ID 642493.

438. The serotonin 5-HT(2A) receptor subtype does not mediate apomorphine-induced aggressive behaviour in male Wistar rats / T. Skrebuhhova-Malmros, K. Pruus, R. Rudissaar [et al.] // Pharmacology, biochemistry, and behavior. – 2000. – Vol. 67, No. 2. – P. 339-343.

439. Therapeutic efficacy of voltage-gated sodium channel inhibitors in epilepsy / J. Agbo, Z. G. Ibrahim, S. Y. Magaji [et al.] // Acta epileptologica. – 2023. – Vol. 5. – Article ID 16.

440. Therapeutic Potential of Kappa Opioid Agonists / T. C. Beck, M. A. Hapstack, K. R. Beck, T. A. Dix // Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). – 2019. – Vol. 12, No. 2. – Article ID 95.

441. Thylur, D. S. Brick by Brick: Building a Transdiagnostic Understanding of Inflammation in Psychiatry / D. S. Thylur, D. R. Goldsmith // Harvard review of psychiatry. – 2022. – Vol. 30, No. 1. – P. 40-53.

442. Tian, M. K. Serotonergic Suppression of Mouse Prefrontal Circuits Implicated in Task Attention / M. K. Tian, E. F. Schmidt, E. K. Lambe // eNeuro. – 2016. – Vol. 3, No. 5. – Article ID ENEURO.0269-16.2016.

443. Titus, C. PPAR agonists for the treatment of neuroinflammatory diseases / C. Titus, M. T. Hoque, R. Bendayan // Trends in pharmacological sciences. – 2024. – Vol. 45, No. 1. – P. 9-23.

444. Transient Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion Stroke Model in Rats: A Step-by-Step Guide and Technical Considerations / K. M. Themistoklis, T. I. Papasilekas, K. S. Melanis [et al.] // World neurosurgery. – 2022. – Vol. 168 – P. 43-50.

445. Treatment of Infantile Spasm Syndrome: Update from the Interdisciplinary Guideline Committee Coordinated by the German-Speaking Society of Neuropediatrics / G. Ramantani, B. K. Bölsterli, M. Alber [et al.] // Neuropediatrics. – 2022. – Vol. 53, No. 6. – P. 389-401.

446. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study / Z. Chen, M. J. Brodie, D. Liew, P. Kwan // JAMA neurology. – 2018. – Vol. 75, No. 3. – P. 279-286.

447. Tregellas, J. R. Alpha7 Nicotinic Receptors as Therapeutic Targets in Schizophrenia / J. R. Tregellas, K. P. Wylie // Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco. – 2019. – Vol. 21, No. 3. – P. 349-356.

448. Trifu, S. Receptor profiles of atypical antipsychotic molecules / S. Trifu, A. Trifu // UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science. – 2020. – Vol. 82. – P. 113-128.

449. Two new phenylpiperazines with atypical antipsychotic potential / M. Tomić, D. Ignjatović, G. Tovilović [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2007. – Vol. 17, No. 21. – P. 5749-5753.

450. Uno, Y. Glutamate hypothesis in schizophrenia / Y. Uno, J. T. Coyle // Psychiatry and clinical neurosciences. – 2019. – Vol. 73, No. 5. – P. 204-215.

451. Valentino, R. J. Untangling the complexity of opioid receptor function / R. J. Valentino, N. D. Volkow // Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2018. – Vol. 43, No. 13. – P. 2514-2520.

452. Ventura, L. Opioids in the Frame of New Psychoactive Substances Network: A Complex Pharmacological and Toxicological Issue / L. Ventura, F. Carvalho, R. J. Dinis-Oliveira // Current molecular pharmacology. – 2018. – Vol. 11, No. 2. – P. 97-108.

453. Vigabatrin add-on therapy for drug-resistant focal epilepsy / R. Bresnahan, M. Gianatsi, M. J. Maguire [et al.] // The Cochrane database of systematic reviews. – 2020. – Vol. 7, No. 7. – Article ID CD007302.

454. Virtual screening algorithms in drug discovery: a review focused on machine and deep learning methods / T. A. D. Oliveira, M. P. D. Silva, E. H. B. Maia [et al.] // Drugs and Drug Candidates. – 2023. – Vol. 2, No. 2. – P. 311-334.

455. Voinescu P. E. Catamenial Epilepsy / P. E. Voinescu // Neurology and Psychiatry of Women: A Guide to Gender-based Issues in Evaluation, Diagnosis, and Treatment / ed. by Mary Angela O'Neal. – Cham : Springer, 2019. – P. 85-94.

456. Wala, K. Difelikefalin in the Treatment of Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus: A Systematic Review / K. Wala, J. C. Szepietowski // Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). – 2022. – Vol. 15, No. 8. – Article ID 934.

457. Walker, A. L. Drug discovery and development: Biomarkers of neurotoxicity and neurodegeneration / A. L. Walker, S. Z. Imam, R. A. Roberts // Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.). – 2018. – Vol. 243, No. 13. – P. 1037-1045.

458. Will peripherally restricted kappa-opioid receptor agonists (pKORAs) relieve pain with less opioid adverse effects and abuse potential? / A. Albert-Vartanian, M. R. Boyd, A. L. Hall [et al.] // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. – 2016. – Vol. 41, No. 4. – P. 371-382.

459. Witt, J. A. Adverse cognitive effects of antiepileptic pharmacotherapy: Each additional drug matters / J A. Witt, C. E. Elger, C. Helmstaedter // European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 25, No. 11. – P. 1954-1959.

460. World Health Organization. WHO guidelines on mental health at work [Электронный ресурс]. – Geneva : World Health Organization, 2022. – ISBN 978-92-4-005305-2; ISBN 978-92-4-005306-9. – URL: https://iris.who.int/handle/10665/363177.

461. Wu, Q. Drugs Based on NMDAR Hypofunction Hypothesis in Schizophrenia / Q. Wu, J. Huang, R. Wu // Frontiers in neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – Article ID 641047.

462. Xu, M. Y. GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia / M. Y. Xu, A. H. C. Wong [et al.] // Acta pharmacologica Sinica. – 2018. – Vol. 39, No. 5. – P. 733-753.

463. Yilmaz, M. Wavelet Based and Statistical EEG Analysis in Patients with Schizophrenia / M. Yilmaz // Traitement du Signal. – 2021. – Vol. 38, No. 5. – P. 1477-1483.

464. Young, G. A. Differential neuropharmacological effects of mu, kappa and sigma opioid agonists on cortical EEG power spectra in the rat. Stereospecificity and naloxone antagonism / G. A. Young, N. Khazan // Neuropharmacology. – 1984. – Vol. 23, No. 10. – P. 1161-1165.

465. Young, G. A. Dissociation of naloxone-sensitive and naloxone-insensitive effects of U-50,488H / G. A. Young // Pharmacology, Biochemistry, and Behavior. – 1989. – Vol. 33, No. 1. – P. 215-217.

466. Zaidi, S. A. Structural Characterization of KOR Inactive and Active States for 3D Pharmacology and Drug Discovery / S. A. Zaidi, V. Katritch // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2022. – Vol. 271. – P. 41-64.

467. κ-opioid receptor agonist U50488H attenuates postoperative cognitive dysfunction of cardiopulmonary bypass rats through the PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathway / J. Fan, L. Li, P. Qu [et al.] // Molecular Medicine Reports. – 2021. – Vol. 23, No. 4. – P. 293.

468. 5-HT2 receptors mediate functional modulation of GABAa receptors and inhibitory synaptic transmissions in human iPS-derived neurons / H. Wang, L. Hu, C. Liu [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – Article ID 20033.

469. 6-Nitrobenzimidazole derivatives: potential phosphodiesterase inhibitors: synthesis and structure-activity relationship / K. M. Khan, Z. Shah, V. U. Ahmad [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2012. – Vol. 20, No. 4. – P. 1521-1526.

470. 6'-Guanidinonaltrindole (6'-GNTI) is a G protein-biased κ-opioid receptor agonist that inhibits arrestin recruitment / M. L. Rives, M. Rossillo, L. Y. Liu-Chen, J. A. Javitch // The Journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287, No. 32. – P. 27050-27054.