

На правах рукописи

Яковлев Дмитрий Сергеевич

**КОНДЕНСИРОВАННЫЕ АЗОЛЫ – НОВЫЙ КЛАСС ЛИГАНДОВ
СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственном бюджетном учреждении Волгоградский медицинский научный центр

Научный консультант: Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Спасов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты:

Зиганшин Айрат Усманович, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета с курсом фармакогнозии и ботаники.

Мирзоян Рубен Симонович, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», заведующий лабораторией фармакологии цереброваскулярных расстройств.

Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии.

Ведущее учреждение:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "___" _____ 2016 г. в ___ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Автореферат разослан "___" _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного
Совета, доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Поиск новых биологически активных соединений, разработка и создание на их основе эффективных лекарственных средств остается одной из главных задач фармакологии (Шимановский Н.Л. и др. Молекулярная и нанофармакология. М., 2009; Галенко-Ярошевский П.А. и др. Перспективы развития современной фармакологии в XXI веке. Краснодар, 2011 ; Петров В.И. и др. Фундаментальные и прикладные достижения ученых ВолгГМУ в области фармакологии. Волгоград, 2012 ; Середенин С.Б. и др. Acta Naturae (рус. верс.). 2013. №19. С.116-120).

К настоящему времени накоплено достаточно данных о причастности нарушений обмена серотонина (5-гидрокситриптамина, 5-НТ) к развитию многих заболеваний и патологических состояний (Crowell M.D. Br. J. Pharmacol. 2004. Vol.141. P.1285-1293 ; Мирзоян Р.С. и др. Бюлл. сибирск. мед. 2006. Прил.2. С. 55-57 ; Vardin L. Behav. Pharmacol. 2011. №5-6. P.390-404 ; Амелин А.В. и др. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия. М., 2011 ; Thompson A.J. Trends Pharmacol. Sci. 2013. №2. P.100-109 ; Belkind-Gerson J. et al. Inflamm. Bowel. Dis. 2015. № 4. P.870-878).

За 25 лет с момента наиболее детальной идентификации 7 семейств серотониновых рецепторов (5-НТ₁₋₇), было выявлено значительное количество химических веществ, способных взаимодействовать с их отдельными представителями (Hoyer D. J. et al. J. Recept. Res. 1991. №1-4. P.197-214 ; Miyata K. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1991. №259. P.15-21 ; Сергеев В.П. и др. Рецепторы физиологически активных веществ. М.-Волгоград, 1999 ; Зефирова О.Н. и др. Успехи химии. 2001. №4. С.382-407 ; Анисимова В.А. и др. Пат. РФ 2285006. Бюл. 2006. №28 ; Спасов А.А. и др. Хим.-фарм. журн. 2006. №11. С.23-26 ; Черников М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ. Волгоград, 2008).

И если для первого среди четырех наиболее детально и длительно исследованных семейств 5-НТ-рецепторов уже разработано и внедрено несколько поколений «триптанов» – 5-НТ_{1B/D}-агонистов, то для оставшихся продолжает сохраняться дефицит эффективных препаратов с 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₃-антагонистическими, 5-НТ₄-агонистическими механизмами действия (Diener H.C. et al. Lancet Neurol. 2015. №10. P.1010-1022 ; Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: <http://www.rlsnet.ru> (дата обращения 15.01.2016)).

В этой связи не ослабевают востребованность к исследованиям по созданию

новых лигандов 5-HT_{2A/3/4}-рецепторов, способных корректировать патологические состояния, связанные с дисрегуляцией серотонинергической системы (Yang Y. et al. Expert Opin. Ther. Pat. 2016. №1. P.1-18). Сохраняется повышенный интерес к изучению фундаментальной зависимости биологической активности от структуры химических соединений (Blaazer A.R. et al. ChemMedChem. 2008. №9. P.1299-1309 ; Cappelli A. et al. Curr. Top. Med. Chem. 2010. №5. P.504-526 ; Bureau R. et al. Curr. Top. Med. Chem. 2010. №5. P.527-553 ; Черников М.В. и др. Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2013. №3. С.38-41 ; Иващенко А.В. и др. Хим.-фарм. журн. 2013. №1. С.13-20 ; Nirogi R. et al. Eur. J. Med. Chem. 2015. №103. P.289-301).

Обзор литературных данных позволяет выделить конденсированный азольный фрагмент в базовой структуре отдельных представителей серотонинергически активных соединений, часто сопряженный с электроположительными заместителями (Yang Z. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. №22. P.6538-6541 ; Manesh R. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. №4. P.1253-1256 ; Hayat F. Et al. Bioorg. Med. Chem. 2015. №6. P.1313-1320). Принимая это во внимание, а также руководствуясь предварительно проведенными исследованиями, можно предполагать, что производные конденсированных азолов, содержащие в своей структуре полярные заместители, могут являться перспективным классом химических веществ для поиска лигандов 2(A), 3, 4 типов серотониновых рецепторов.

Степень научной разработанности проблемы

С момента обнаружения серотонина в головном мозге и изучения опосредованных им эффектов в значительной мере сформировалось представление о разнообразии серотониновых рецепторов (Alexander S.P. et al. Br. J. Pharmacol. 2013. №8. P.1449-1458). Расшифрована их полипептидная структура определена топология (5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS. URL: <http://www.guidetopharmacology.org> (дата обращения 15.01.2016)). Существенно детализировались представления об этиологии и патогенезе многих заболеваний, появилась научная база, приближающая к пониманию роли серотонинергической нейротрансмиссии в развитии дисциркуляторных изменений головного мозга (Амелин А.В. и др. Мигрень ... 2011 ; Мирзоян Р.С. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ред. Миронов А.Н Ч.1. М., 2012. С.478-485); депрессивного и тревожного синдромов, в регуляции обучения и памяти (Branes N. et al. Neuropharmacology. 1999. №38. P.1083-1152 ; Воронина Т.А. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С.264-275 ; Bell R. et al. Sci. Rep. 2014. №4. P.3881), синдрома раздраженного кишечника,

серотониновой тошноты, рвоты и др. (Andrews P. et al. Eur. J. Cancer. 1993. S.11. P.1-16 ; Плотникова Е.Ю. и др. Лечащий врач. 2014. №8. С.40).

В дополнение к известным фактам о вовлеченности 5-HT₂-антагонистов в процессы регуляции тонуса сосудов головного мозга (Бюлл. сибирской мед. 2006. С. 55-57), функционального состояния тромбоцитов широко обсуждается возможность их использования при различных психических нарушениях – тревожных состояниях, шизофрении (Mestre T.A. et al. Expert Opin. Investig Drugs. 2013. №4. P.411-421 ; Clinard C.T. et al. Neuropharmacology. 2015. №90. P.102-112). Антагонисты 3 типа серотониновых рецепторов зарекомендовали себя как противорвотные средства для коррекции побочного действия химиотерапевтических средств, применяемых в онкологической практике, использование которых позволяет существенно повысить качество жизни пациентов и тем самым усилить противоопухолевую терапию (Абрамов М.Е. и др. Фарматека. 2014. №281. С.29-34). Появляется доказательная база об анальгетической активности (Liang D.Y. et al. Anesthesiology. 2011. №5. P.1080-1089 ; Kumar B. et al. Indian J. Exp. Biol. 2012. P.625-632), характерной для некоторых блокаторов 5-HT₃-рецепторов, что, несомненно, расширяет их клинический потенциал.

Агонисты 5-HT₄-рецепторов, также как и 5-HT₃-блокаторы в настоящее время интенсивно изучаются в качестве агентов, способных уменьшать проявления синдрома раздраженного кишечника, гастроэзофагеального рефлюкса, уменьшая кинетику ЖКТ (Camilleri M. Neurogastroenterol Motil. 2014. №8. P.1070-1078 ; Lacy B.E. et al. Gastroenterol. Hepatol. (NY). 2015. S.2. P.1-19 ; Yu Y. et al. Neurogastroenterol. Motil. 2015. №7. P.914-928).

К настоящему времени получено значительное количество веществ, способных взаимодействовать с различными типами серотониновых рецепторов (5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS). В то же время существует дефицит соединений с избирательным действием либо веществ с новыми, из числа потенциально перспективных для клинического применения 5-HT_{2A/3/4}-лигандов, свойствами (анксиолитическое, противомигренозное, анальгетическое, противодиарейное), проявляющих при этом меньшее побочное и токсическое действие. Этот вопрос становится еще более значимым, если учитывать полное отсутствие оригинальных отечественных препаратов с подобными механизмами действия на российском фармацевтическом рынке и крайне малое количество возможных зарубежных аналогов (ондансетрон, трописетрон, ципрогептадин), использование которых весьма осложняется фармакоэкономическими аспектами.

Цель

Исследование серотонинергических, а именно 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₃- и 5-НТ₄-опосредованных, свойств конденсированных производных азола, а также экспериментальное обоснование перспективности использования представителей данного класса в качестве новой основы для разработки оригинальных серотонинергических средств.

Задачи исследования

1. Разработка методологии целенаправленного поиска высокоактивных соединений – антагонистов 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-рецепторов с использованием информационных технологий компьютерного прогноза биологической активности химических соединений в ряду новых конденсированных азолов.
2. Проведение направленного поиска новых антагонистов 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-рецепторов, а также стартового поиска новых агонистов 5-НТ₄-рецепторов среди производных конденсированных азолов *in vitro*.
3. Выявление и обобщение закономерностей между 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₃- и 5-НТ₄-активностью изученных представителей конденсированных азолов, их химической структурой и физико-химическими свойствами.
4. Изучение аспектов механизма действия наиболее активных среди выявленных антагонистов серотониновых рецепторов 2А и 3 типа на рецепторном и нейромедиаторном уровне.
5. Изучение специфического фармакологического действия (влияние на цереброваскулярный кровоток, анальгетическое, анксиолитическое действие) соединения, демонстрирующего наиболее выраженные 5-НТ_{2А}-антагонистические свойства.
6. Изучение специфической фармакологической активности наиболее перспективного соединения со свойствами 5-НТ₃-антагониста (антиэметическое, анальгетическое, антидиарейное, анксиолитическое действие).
7. Изучение острой токсичности и нейротоксикологических свойств наиболее активных соединений.
8. Разработка рекомендаций по использованию результатов работы с целью создания основы для разработки новых оригинальных препаратов с серотонинергическими механизмами действия для лечения заболеваний ЖКТ, нервно-психических заболеваний, мигрени, уменьшения негативных эметических эффектов антибластомных средств.

Научная новизна

Разработана методология целенаправленного поиска новых высокоактивных соединений – антагонистов 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₃-рецепторов, основанная на сочетании консенсусного виртуального прогноза активности и экспериментального тестирования *in vitro*.

Впервые проведен многоэтапный скрининг 240 новых производных конденсированных азолов на предмет наличия 5-НТ_{2A/3/4}-активности на различных моделях *in vitro*.

Проведен комплексный анализ зависимости 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₃- и 5-НТ₄-серотонинергической активности от химического строения и физико-химических свойств соединений, обобщенный с ретроспективными данными о серотонинергической активности веществ структурно близких к изученным производным конденсированных азолов.

Получены новые, а также дополнены ранее известные представления, о наиболее значимых субструктурах, ответственных за развитие 5-НТ_{2A/3}-антагонистического и 5-НТ₄-агонистического действия.

Изучены аспекты механизма действия, а также специфические фармакологические эффекты выявленного высокоактивного 5-НТ_{2A}-антагониста авазола на моделях, отражающих противомигренозные, анальгетические и анксиолитические свойства.

Проведено исследование механизмов действия, специфических антиэметических, противодиарейных, анальгетических, анксиолитических эффектов нового соединения с 5-НТ₃-антагонистическими свойствами – эметазола.

Научно-практическая значимость

Разработанная методология поиска веществ с 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-антагонистическими свойствами позволит оптимизировать направленный поиск соединений с указанными видами активности.

Накопленные данные о структуре соединений, демонстрирующих эффекты 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₃-антагонистов, 5-НТ₄-агонистов и уровне указанных видов активности, расширят эталонную базу данных для методов виртуального компьютерного QSAR/SAR-зависимого прогноза биологической активности химических соединений.

Выявленные обобщенные признаки высокого уровня 5-НТ_{2A/3}-антагонистической и 5-НТ₄-агонистической активности могут быть использованы для улучшения виртуального конструирования и направленного синтеза соединений с данными видами активности.

Новые высокоэффективные соединения – 5-НТ₃-антагонист эметазол и 5-НТ_{2A}-антагонист авазол – представляют перспективную основу для проведения дальнейшего доклинического (фармакокинетического, токсикологического, фармацевтического) исследования с целью разработки биологически активных веществ с антиэметическими и противодиарейными, а также противомигренозными, анальгетическими и анксиолитическими свойствами соответственно.

Методология и методы исследования

В исследовании использован мишень-ориентированный подход к поиску новых биологически активных соединений, разработана и использована консенсусная методология направленного поиска лигандов 5-НТ_{2A/3}-рецепторов с применением современных методов *in silico*: системы PASS (Филимонов Д.А. и др. Росс. хим. журн. 2006. №2. С.66-75), TestSim ИТ Микрокосм, количественный подструктурный и частотный анализы (Васильев П.М. Информационная технология прогноза фармакологической активности химических соединений. Волгоград, 2009), а также валидированных методов тестирования активности соединений *in vitro* (Деркачев Э.Ф. и др. Пат. РФ 2108579. Бюл. 1998. № 10. С. 298 ; Yoshida S. et al. Bioorg. Med. Chem. 2007. №15. P.3515-3523).

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противомигренозной, анальгетической, анксиолитической активностью (Воронина Т.А. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С.197-218, 264-275; Там же, Мирзоян Р.С. и др. С.478-485), а также в соответствии с общепринятыми и используемыми в современной мировой фармакологии подходами к изучению механизмов действия, специфических и токсикологических свойств (Там же, Арзамасцев Е.В. и др. С.13-24 ; Irwin S. Psychosomatics. 1964. Vol. 5. P.174-179 ; Espinoza S. et al. Methods Mol. Biol. 2013. Vol. 964. P.107–122). В исследовании использована методическая база НИИ фармакологии, кафедры фармакологии, кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, отдела нейронауки и исследований мозга Итальянского института технологий (NBT Istituto Italiano di Tecnologia).

Использованы рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов (Сергиенко В.И. и др. //

Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С. 889-940).

Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол №154-2012 от 12.03.2012г.

Реализация результатов исследования

Данные об обобщенных признаках высокого уровня 5-НТ_{2A/3}-антагонистической и 5-НТ₄-агонистической активности используются при синтезе новых соединений в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Разработанная методология целенаправленного поиска новых серотонинергически активных соединений применяется в работе лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ, кафедры фармакологии, кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России.

По результатам проведенных исследований авазола и эметазола подготовлены и представлены заявки на формирование тематики работ в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по мероприятию «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств».

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедры фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедры фармакологии Пермской государственной медицинской академии, кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко, кафедре фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии Башкирского государственного медицинского университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Для представителей конденсированных азолов, а именно 1,3-дизамещенных индолов, 1,2-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов характерна высокая 5-НТ_{2A/3}-антагонистическая и 5-НТ₄-агонистическая активность.
2. Для исследованных соединений из класса конденсированных азолов:

- а. наличие высокой 5-НТ_{2А}-антагонистической активности определяет обобщенная 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная структура с вариативными компонентами в виде С²-4-этоксифенила; N⁹-диэтиламинопропила либо N⁹-диэтиламиноэтила;
- б. наличие высокого 5-НТ₃-антагонистического действия определяет обобщенная структура в виде N¹,С³-дизамещенной индольной либо N¹,С²-дизамещенной имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы с липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N¹-положении и фенил-замещенным фрагментом в составе С²/С³-заместителя. Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в составе N¹-заместителя, а также фторфенил либо метоксифенил в качестве указанного фенил-замещенного фрагмента;
- в. наличие 5-НТ₄-агонистического действия зависит от сочетания в структуре С²,N⁹-дизамещенной имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы и *a*-нафтильного заместителя в С²-положении.
3. Вещество 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазол – авазол – является конкурентным 5-НТ_{2А}-антагонистом и проявляет выраженные анксиолитические, противомигренозные и анальгетические эффекты.
4. Вещество 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазол – эметазол – демонстрирует свойства высокоактивного антагониста 5-НТ₃-рецепторов, оказывает выраженное противорвотное, антидиарейное и анальгетическое действие.

Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на перевиваемых линиях почечных эмбриональных клеток человека (НЕК-293Т), нелинейных половозрелых мышах, крысах обоего пола, собаках, морских свинках, кроликах породы «Шиншилла»; с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологичного оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противомигренозной, анальгетической, анксиолитической, антиэметической активностью, а также применением рекомендованных методов статистической обработки данных (Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. 944с.). Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива,

посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета (Волгоград, 10-14 сентября 2015); международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 27-28 ноября 2014); VII международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, ноябрь 2014); юбилейной 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014); XIX региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2014); XXII съезде физиологического общества имени И. П. Павлова (Волгоград, 17 сентября 2013); первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 3-5 июня 2013); первой российской конференции по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием (Москва, 10 сентября 2013); V всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием (Волгоград, 6 ноября 2013); IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 18-21 сентября 2012); 26-ом конгрессе европейской коллегии нейропсихофармакологов (26th Congress ECNP) (Барселона, 6 октября 2013); IV всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (Волгоград, 29-31 октября 2012); 25-ом конгрессе европейской коллегии нейропсихофармакологов (25th ECNP Congress) (Вена, Австрия, 13-17 октября 2012); 17-ой мультидисциплинарной международной конференции «Стресс и поведение» (17th Multidisciplinary International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry “Stress and Behavior” (Санкт-Петербург, 16-19 мая 2012); V международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2010); 2-ом всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии» (Волгоград, 2010); XIV российском национальном конгрессе “Человек и лекарство» (Москва, 16-20 апреля 2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 50 печатных работ, в том числе 17 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получено 2 патента на изобретения.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 339 страницах машинописного текста, иллюстрирована 57 таблицами (а также 63 таблицами в приложениях), 36 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VI), обсуждения результатов (глава VII), заключения, включающего выводы, практические рекомендации, списка литературы и приложений. Список литературы состоит из 254 источников: отечественных 61, иностранных 193.

Личный вклад автора

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах решения поставленных задач: разработке методологии поиска новых лигандов 5-HT_{2A/3/4}-рецепторов, проведении их экспериментального поиска *in vitro*, выполнении обобщенного с ретроспективными данными структурно-функционального анализа свойств представителей конденсированных азолов, проведении фармакодинамических, в том числе токсикологических исследований наиболее активных соединений, а также выполнении статистического анализа полученных данных, интерпретации и обсуждении результатов, формулировании выводов и практических рекомендаций, сборе и анализе данных литературы, оформлении рукописи диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен литературный обзор работ, отражающих современные представления о серотониновых рецепторах как перспективных мишенях для поиска и разработки новых биологически активных веществ. В первой части обзора приводятся данные о современной классификации, детальной локализации, особенностях строения, физиологической роли 5-HT_{2A/3/4}-рецепторов. Во второй части проводится анализ и обобщение информации о фармакологических свойствах, потенциале (антимигренозном, анальгетическом, анксиолитическом, антиэметическом, противодиарейном и др.) и востребованности для практического использования в медицине 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-блокаторов, а также 5-HT₄-стимуляторов. Анализируются структурные описания наиболее известных 5-HT-лигандов, в том числе исследованных ранее в Волгоградском государственном медицинском университете (Киабия С.Т. Поиск и изучение фармакологических свойств антагонистов третьего подтипа серотониновых ... Волгоград, 2003. 24с. ; Черников М.В. Производные бензимидазола ... 2008 ; Горягин И.И. Поиск и изучение 5-HT₂ антисеротониновой активности ... Волгоград, 2008. 24с.), выделяются часто встречаемые гетероциклические конденсированные азольные основы. В

заключительной части обзора литературы с позиций концепции описанных функционально-значимых фармакофоров, а также привилегированности субструктур обосновывается перспективность изучения представителей расширенного химического класса конденсированных азолов как лигандов 5-HT_{2A/3/4}-рецепторов.

В главе 2 представлены материалы и методы, использованные для проведения исследований.

Материалы. Исследовались структурные описания 1532 новых производных конденсированных азолов, а также субстанции 240 веществ (синтезированных в лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, кафедры химии природных и высокомолекулярных соединений Южного федерального университета, химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова)¹, принадлежащих к различным подклассам: индолы (1,3-дизамещенные индолы; индолы, сопряженные с бицикло[3.3.1]нонановыми и бицикло[3.2.1]октановыми каркасами); N¹-бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиразоло[1,2-*a*]бензимидазолы; 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы; N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N⁹-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N¹-1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы (Рисунок 1).

Использовались биоинформационные описания базы данных UniProtKB (Knowledgebase. URL: <http://www.uniprot.org> (дата обращения 08.01.2016)), сервера Швейцарского института биоинформатики ExPASy (Bioinformatics Resource ... URL: <http://www.expasy.org> (дата обращения: 30.11.2010)) о структуре 5-HT_{2A}- и 5-HT₄-рецептора. Информацию о точках связывания лигандов с активным центром 5-HT_{2A}-рецептора заимствовали из работ Nichols D., Braden M. и Ponnala S. (Mol. Pharmacol. 2007. №5. P.1200-1209 ; Memb. Trans. Signal. 2012. №5. P.559–579 ; Bioorg.Med.Chem.Let. 2014. №7. P.1664-1667); 5-HT₄-рецептора – из работ Miale J. и соавт. (Br. J. Pharmacol. 2000. Vol.130. P. 527-538).

В работе использовалось следующее программное обеспечение: CS Chem3D 8.0; MDL ISIS / Draw 2.5 Standalone; программный пакет AutoDock Vina 1.1.1 в комплекте с дополнительными инструментами AutoDock Tools и PyMol, для подготовки

¹ Выражаем искреннюю благодарность в.н.с., к.х.н. В.А. Анисимовой, н.с. О.Н. Жуковской, акад. РАН Н.С. Зефинову, к.х.н. О.Н. Зефировой, к.х.н. К.Ф. Суздальеву за предоставление информационных описаний, синтез и предоставление субстанций веществ.

электронного описания молекулярных структур соединений использовали программы HyperChem 7.1 Evaluation Copy 2002 и МОРАС2009.

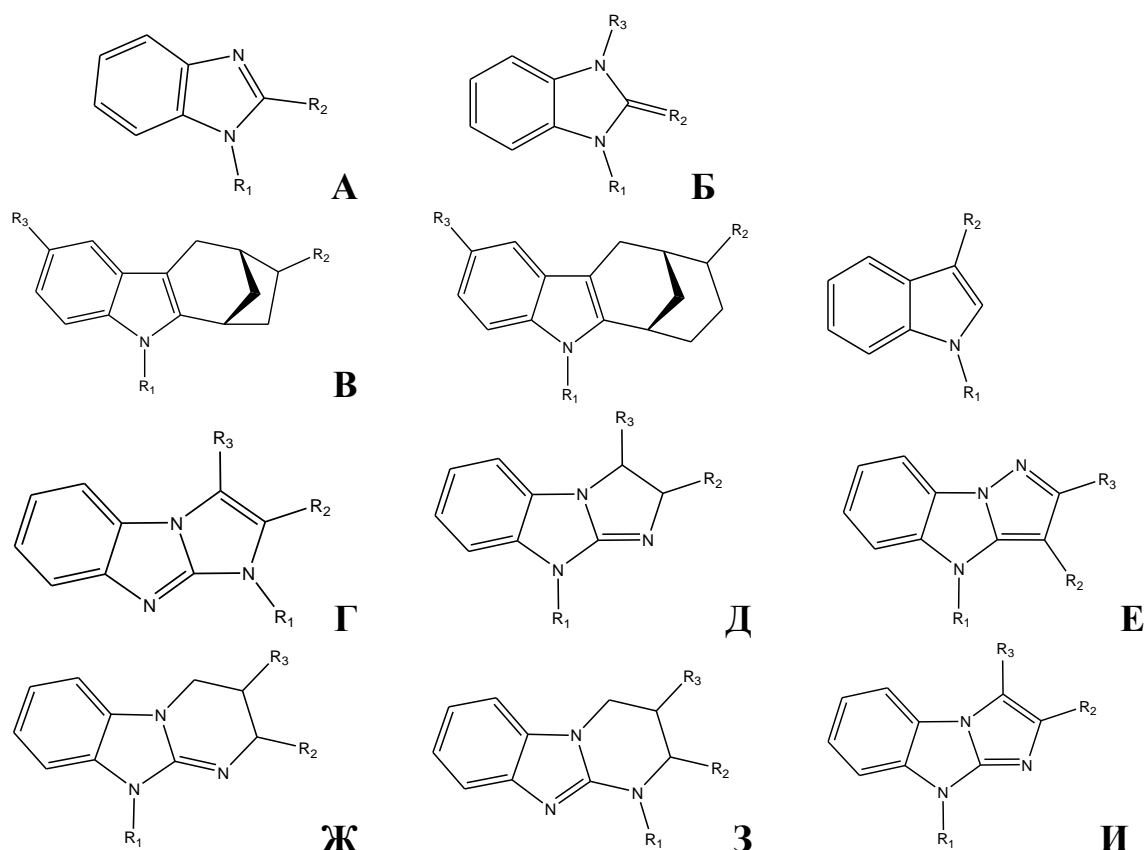


Рисунок 1. Общие структуры изученных классов соединений.

А – N^1 -бензимидазолы; Б – 2,3-дигидро- N^1 -бензимидазолы; В – индолы (1,3-дизамещенные индолы; индолы, сопряженные с бициклононановыми и бициклооктановыми каркасами); Г – N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазолы; Д – N^9 -дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; Е – N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазолы; Ж – пиридино[1,2-а]бензимидазолы; З – N^1 -1,2,3,4-тетрагидропиридино[1,2-а]бензимидазолы; И – пиразоло[1,2-а]бензимидазолы.

В качестве фармакологических реактивов, препаратов и веществ сравнения использованы: 5-гидрокситриптамиин, кетансерин, ципрогептадин, фенилэтиламин, 3-метиламин, изопротеренол, квинпирол, ангиотензин II, валсартан, MRS1279, динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ), ацетилхолин йодистый, карбахолин, апоморфин, фенамин, L-диоксифенилаланин, 5-гидрокситриптофан, никотин, резерпин, пикротоксин, ритансерин, метисергид (*Sigma*, США); ML10302, SZD205557 (*Sigma-Aldrich*, США); галоперидол, верапамил (*Мосхимфармпрепараты*, Россия); клофелин (*Органика*, Россия), ареколин, атропина сульфат (*Фармакон*, Россия); ондансетрон (*Ленс-Фарм*, Россия); реагент Lipofectamin 2000 (*Invitrogen*, США); целентеразин Н (*Promega*, США); хлоралгидрат (*Panreak*, Испания); клопидогрель, тиклопидин (*Sanofi-syntelabo*, Франция); адреналина гидрохлорид, коллаген (*Ренам*, Венгрия); формалин (*Агат-мед*, Россия); адьювант Фрейнда (*Grand Island Biol. Company*, США); буторфанола тартрат (*Московская фармацевтическая*

фабрика, Россия); диклофенак натрия (*Хемофарм*, Сербия); лоперамид (*Верофарм*, Россия); диазепам (Реланиум, *Польфа*, Польша).

Использовано оборудование: лазерный анализатор частиц «ЛАСКА-1К» (*Люмекс*, Россия), ридер Infinite F500 (*Tesap*, Швейцария), доплерограф Допплер-К (*Минимакс*, Россия) с датчиком диаметром 2 мм, оборудование для работы с изолированными органами и тканями: изотонический датчик 7006, регистрирующий модуль Data Capsul Evo и самописец Unirecord, одиночная камера для работы с изолированными органами и тканями 4000 (*UGO Basile*, Италия), лазерный анализатор агрегации тромбоцитов Биола 220 LA (Россия), компьютерный гемодинамический анализатор на базе программы BEAT (Москва, Россия).

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 1158 неинбредных крысах обоего пола (питомник РАМТН, Москва; питомник РАППОЛОВО, Ленинградская обл.); 615 неинбредных мышах обоего пола (питомник РАМТН, Москва); 12 беспородных собаках, массой 9-12 кг (питомник РАМТН, Москва); 12 кроликах породы Шиншилла; 30 морских свинок (питомник РАППОЛОВО, Ленинградская обл.).

Животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3-96 и 51000.4-96).

Методы. При проведении исследований *in silico* использованы методы прогнозной оценки фармакологического действия химических соединений в системе «PASS» (Филимонов Д.А. Росс. хим. журн. 2006)²; метод сходства с эталонами (модуль «TestSim» программного комплекса ИТ «Микрокосм»³) (Васильев П.М. Информационная технология ... 2009 ; Васильев П.М. и др. Применение метода сходства к эталонам ... // "Человек и лекарство" М., 2013. С. 341-342). Для уточнения 5-HT_{2A/4}-взаимодействия наиболее активных соединений использован метод 3D-докинга с помощью ПО AutoDock Vina. Расчет и выбор наиболее выгодных энергетических конформаций комплекса лиганд-рецептор осуществлялся с помощью

² Выражаем искреннюю благодарность д.б.н., проф. В.В. Пороикову за предоставление системы PASS и базы данных PASS10.SAR.

³ Выражаем искреннюю благодарность д.б.н., с.н.с. П.М. Васильеву за предоставление системы ИТ Микрокосм и помощь в освоении и выполнении методов компьютерного прогноза и анализа активности химических соединений.

генетического алгоритма (Morris G.M. et al. J. Comput. Chem. 2009. №16. P.2785-2791). Для выявления закономерностей между химической структурой, физико-химическими свойствами соединений и уровнем их 5-HT_{2A/3/4}-активности использовались методы подструктурного, частотного анализов (Васильев П.М. Информационная технология ... 2009). Кластеризация веществ по уровням активности осуществлялась вероятностным методом гистограмм и геометрическим методом расстояний (Мандель И.Д. Кластерный анализ М., 1988). При обобщенном подструктурном анализе использовались подструктурный и частотный методы обобщения собственных данных об активности и физико-химических свойствах соединений, полученных в ходе экспериментальной части настоящего исследования, с ранее опубликованными данными об активности представителей бензимидазолов (Киабия С.Т. Поиск и изучение ... 2003; Яковлев Д.С. Поиск антагонистов серотониновых 5-HT₃-рецепторов ... Волгоград, 2007. 24с. ; Черников М.В. Производные бензимидазола ... 2008).

Экспериментальное фармакологическое исследование антагонистической активности соединений *in vitro* по отношению к серотониновым 5-HT₂-рецепторам проводили на модели серотонинозависимой активации тромбоцитов (Сакаев М.Р. и др. Эксп. клин. фармакол. 2000. №3. С.22-23) методом малоуглового светорассеяния (Деркачев Э.Ф. Бюл. 1998); по отношению к серотониновым 5-HT₃-рецепторам – по методу Yoshida S. (Bioorg. Med. Chem. 2007); 5-HT₄-агонистического действия – по методу Miyata K. (Jpn. J. Pharmacol. 1995. №69. P.205-214).

Детализация механизмов действия наиболее активных соединений *in vitro* проводилась с помощью: метода радиорецепторного анализа с применением [³H]кетансерина (Ковалев Г.И. Ж. невр. и псих. 2012. №3. С.39-43), метода измерения биoluminesцентного резонансного переноса энергии (BRET)⁴, активируемого *α*АМФ, в линиях клеток человека НЕК-293Т, экспрессирующих TAAR1, TAAR5, β₂-, D₂-рецепторы, *α*АМФ-биосенсор (Barak L.S. et al. Mol. Pharmacol. 2008. Vol.74. P.585-594. 2008 ; Espinoza S. Methods Mol. Biol. 2013), метода ангиотензин II-индуцированного спазмогенного эффекта изолированной портальной вены крысы, метода P2Y₁-зависимой активации тромбоцитов (Сакаев М.Р. Эксп. клин. фармакол. 2000). Влияние на кальциевый ионный ток изучали с помощью гиперкалиевой

⁴ Исследование выполнялось автором в отделе нейронауки и исследований мозга Итальянского института технологий (Италия) в рамках гранта фонда Centro di Cultura Scientifica “Alessandro Volta”, за что выражаем искреннюю благодарность проф. Р.Р. Гайнетдинову.

контрактуры изолированной портальной вены крысы (Ratz P.H. et al. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2005. №4. P.769-783), М-холинергическое действие – по методу Gathers С. на изолированном препарате подвздошной кишки морской свинки (Gen. Pharmacol. 1993. №3. P.659-961). Детализацию механизмов действия соединений *in vivo* проводили с помощью методов взаимодействия с агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем (Yamano M. et al. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1995. №2. P.177-189 ; Damaj M.I. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999. №3. P.1284-1291 ; Андреева Н.И. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению ... Ред. Хабриев Р.У. М., 2005. С. 244-253 ; Воронина Т.А. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С. 212-263).

Влияние соединений на скорость мозгового кровотока исследовали доплерографически в условиях нормы, ишемии головного мозга и при серотониновой нагрузке у крыс по методу Мирзояна Р.С. и соавт. (Эксп. и клин. фармакология. 2010. №9. С.13-16). Влияние соединений на системную гемодинамику проводили по методике описанной Спасовым А.А. с соавт. (Кардиология. 2012. №10. С.39-44). Антиагрегантную активность веществ исследовали по методу Born G. (Nature. 1962. Vol.194. P.927-929) в модификации Габбасова В.А. (Лаб. дело. 1989. №10. С.15-18). Антитромботическое действие – доплерографически при стимуляции сонной артерии крыс хлоридом железа (III) (Kurz K.D. Thromb. Res. 1990. Vol.15. P.269-280), а также на модели электроиндуцированного тромбоза по методу Guglielmi G. (J. Neurosurg. 1991. Vol.75. P.1-7). Влияние соединений на вязкость крови оценивали вискозиметрическим методом (Добровольский Н.А. и др. Реологические исследования в медицине. М., 1998. С. 45-51).

Антиэметическое действие веществ изучалось с использованием методики цисплатин-индуцированной рвоты у собак (Fukui H.A. et al. Japan J. Pharmacol. 1992. №59. P.221-226). Антидиарейное действие с помощью методов серотонининдуцированной и стресс-индуцированной дефекации, описанными Miyata К. и соавт. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 1991).

Анальгетическая активность соединений изучалась в тестах «горячая пластина» по методу Ohlsson L. в модификации Ворониной Т.А. и соавт., «электрическое раздражение корня хвоста крысы», «формалиновая гипералгезия» (Act. Pharmacol. Toxicol. (Copenh). 1953. №4. P.322-331 ; Carrol N.M. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1960. №125. P.383-403 ; Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С.197-218).

Анксиолитическое действие изучалось на моделях анксиогенеза: «наказуемое взятие воды по Vogel», «приподнятый крестообразный лабиринт», «темная/светлая камера» при однократном и 14-дневном введении (Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С.264-275).

Исследование острой токсичности проводили на мышах-самцах при внутривенном введении (Там же, С.13-24). Нейротоксическое действие соединений оценивали при помощи набора тестов по Irwin S. (Psychosomatics. 1964).

Для статистической обработки данных в качестве параметрических критериев использован t-критерий Стьюдента, для множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой по Ньюману-Кеулсу. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Мана-Уитни либо критерий Краскела-Уолиса с посттестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов. Качественные параметры оценивались с помощью Хи-квадрат теста.

В главе 3 представлены результаты направленного информационно-экспериментального поиска антагонистов 5-HT_{2A/3}- и агонистов 5-HT₄-рецепторов среди представителей указанных выше классов конденсированных азолов, а также результаты обобщенного фундаментального анализа зависимости 5-HT_{2A/3/4}-активности от химической структуры и физико-химических свойств.

На первом этапе исследования, основываясь на описанных (Анисимова В.А. Бюл. 2006 ; Черников М.В. Производные бензимидазола ... 2008 ; Горягин И.И. Поиск и изучение ... 2008) ранее данных о серотонинергической активности отдельных представителей ряда азотсодержащих гетероциклических соединений: бензимидазола, бензимидазолина, была разработана и применена стратегия направленного поиска антагонистов серотониновых рецепторов 2A типа. Методология сочетала в себе: элементы ретроспективного обобщения данных о серотонинергической активности наиболее близких по химическому строению соединений (Таблица 1); использование методов 2D-QSAR анализа с помощью прогнозных систем определения активности неиспытанных химических веществ (PASS, TestSim) (Рисунок 2) (Филимонов Д.А. Росс. хим. журн. 2006 ; Васильев П.М. Информационная технология ... 2009); методы консенсусного обобщения результатов прогнозов активности с экспериментальными ретроспективными данными о 5-HT₂-активности соединений; проспективное экспериментальное тестирование новых химических соединений.

Таблица 1. Ретроспективный подструктурный анализ влияния типа «кóра»⁵ на высокий⁶ уровень 5-HT_{2A}-антагонистической активности конденсированных производных азола.

Химический класс	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
N ¹ -бензимидазолы	0,41	0,59	0,69	2,4×10 ⁻¹	0
N ⁹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	0,58	0,42	1,14	1,3×10 ⁻¹	1
N ¹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	0,11	0,89	3,19	7,1×10 ⁻⁴	-5
2,3-дигидро-N ¹ -бензимидазолы	0,10	0,90	3,36	3,9×10 ⁻⁴	-5
N ⁹ -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	0,39	0,61	0,30	3,8×10 ⁻¹	0
Пиримидо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	0,27	0,73	1,10	1,4×10 ⁻¹	-1
Индолы	0,89	0,11	3,13	8,7×10 ⁻⁴	5

Примечания: P_h – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с высоким уровнем активности; P_{nh} – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих высокой активности; Z – биномиальный критерий, характеризующий различия P_h и P_{nh}; Pr – достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие активности; Ind – индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния; 1 – тенденция; 2 – слабое; 3 – выраженное статистически достоверное; 4 – сильное; 5 – очень сильное; «+» - положительное; «-» - отрицательное).

В результате информационного исследования *in silico* из общего числа (1532)



Реализована стратегия комбинированного предварительного прогноза активности класса конденсированных азолов с применением PASS и ИТ Микрокосм (настройка TestSim) и использованием в качестве эталонов веществ мирового ассортимента с доказанным 5-HT_{2A}-антагонистическим действием (5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS) либо веществ, производных бензимидазола, с ранее выявленной 5-HT_{2A}-антагонистической активностью.

Рисунок 2. Вероятность встречаемости 5-HT_{2A}-активных соединений среди изучаемых представителей конденсированных азолов.

изучаемых структурных описаний новых производных азола с помощью указанного подхода, а также исходя из соответствия физико-химических свойств конечных субстанций условиям тестирования *in vitro* для экспериментального исследования на предмет наличия 5-HT_{2A}-активности было отобрано 154.

При дальнейшем изучении *in vitro* было установлено, что для 61% рекомендованных веществ, характерно наличие значимого 5-HT_{2A}-

⁵ Кор (ядро, «сердцевина») (термин из медицинской химии) - это достаточно общая базовая структура, как правило, без радикалов.

⁶ Подавление эффектов серотонина более чем на 30% в концентрации 0,1 мкМ (согласно результатам кластерного анализа).

антисеротонинового эффекта, достоверно отличающегося от показателей контрольных измерений. Для 17 из них уровень активности соответствовал либо превосходил аналогичный показатель препарата сравнения ципрогептадина.

Проведенный анализ эффективности предложенной методологии поиска консенсусного обобщения прогнозных правил при одновременном снижении коэффициентов значимости оценки фармакологической активности по каждому из используемых прогнозных методов в отдельности позволил выявить ее преимущество перед использованными прогнозными методами, примененными отдельно. Коэффициент (R) корреляции между консенсусным прогнозным суждением об активности (5-НТ_{2А}) и итоговым значением активности, полученным при экспериментальном фармакологическом тестировании, равнялся 0,8; превосходя аналогичный показатель для монопрогнозов при тех же параметрах значимости оценки: коэффициент корреляции, в зависимости от используемой системы (PASS, TestSim), а также набора эталонных структур (TestSim) не превышал 0,6.

На следующем этапе предложенная методология была использована для направленного поиска новых 5-НТ₃-антагонистов в ряду обозначенных производных азола. В результате проведения обобщенного прогноза для экспериментального изучения 5-НТ₃-активности из 1532 веществ было отобрано 128.

В ходе экспериментального тестирования для 49 веществ, было выявлено статистически значимое подавление 5-НТ₃-опосредованных эффектов серотонина. При этом 10 соединений превосходили или соответствовали по уровню активности метоклопрамиду, 3 из которых (Г8, Г12, Г10) равнялись по величине антисеротонинового эффекта более селективному ондансетрону.

Иную методологию использовали для поиска активных соединений в отношении 5-НТ₄-рецепторов. В исследовании проводили эмпирическую оценку структурного сходства, а также оценку перспективности подклассов конденсированных азолов только с помощью систем PASS и TestSim, без использования эталонной выборки 5-НТ₄-активных, близких по структуре соединений и без интеграции данных ретроспективного подструктурного анализа. Это было обусловлено впервые проводимым поиском 5-НТ₄-агонистов среди изучаемых подклассов конденсированных азолов и отсутствием экспериментальных данных о 5-НТ₄-активности наиболее близких структурных аналогов.

В результате обобщения прогнозных оценок 5-НТ₄-активности представителей конденсированных азолов, для экспериментального исследования *in vitro* из 1532 были отобраны 103 вещества.

В ходе фармакологического тестирования были выявлены 6 соединений (E107, E17-18, E43, E28, E33), демонстрирующих статистически значимое 5-HT₄-агонистическое действие. Выявленная активность указанных веществ полностью подавлялась селективным 5-HT₄-антагонистом SDZ-205557. Наибольшую активность продемонстрировали соединения E107 и E17, уступая при этом по величине эффекта серотонину и веществу сравнения селективному 5-HT₄-агонисту ML10302.

Полученные результаты о выявлении среди прогнозируемых 5-HT₄-активных соединений допускают возможность использования такого подхода для стартового поиска в условиях недостаточности данных о структурно-функциональной зависимости близких по химическому строению соединений. Вместе с тем, полученные результаты количественного соотношения выявленных 5-HT_{2A/3/4}-активных соединений среди прогнозируемых свидетельствуют о меньшей результативности использованного подхода в сравнении с более полной предложенной для направленного скрининга 5-HT_{2A/3}-антагонистов консенсусной методологией.

На следующем этапе был проведен многоэтапный подструктурный и частотный обобщенный с ретроспективными данными (для 5-HT_{2A/3}-активностей) анализ фундаментальной зависимости между уровнем исследованных видов активности соединений и их химической структурой, а также физико-химическими свойствами.

Ранее в работах М.В. Черникова, И. И. Горягина было показано, что наибольшую целесообразность в плане поиска 5-HT₂- и 5-HT₃-антагонистов среди производных бензимидазола представляют N⁹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы (Черников М.В. Производные бензимидазола ... 2008 ; Горягин И.И. Поиск и изучение ... 2008 ; Черников М.В. Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2013). При этом наиболее значимым для развития 5-HT₂-антагонистического действия считался пиперидиноэтильный заместитель в N⁹ положении, а для развития 5-HT₃-антагонистического эффекта – пиперидиноэтильный либо диэтиламиноэтильный (Киабия С.Т. Поиск и изучение ... 2003).

В результате проведения настоящего исследования данное предположение было существенно дополнено. Было статистически подтверждено, что наибольшее значение в развитии 5-HT_{2A}-антагонистического действия среди не только бензимидазолов, но и всех изученных в рамках представленного исследования общих структур конденсированных азолов вносит базовая основа имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с заместителями в положении N⁹ (Рисунок 3).

Вместе с тем дополнительно были установлены общие структуры с наибольшей вероятностью влияющие на отсутствие высокой 5-HT_{2A}-антагонистической активности: N¹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N¹-замещенные 2,3-дигидробензимидазолы, а также пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы. Уровень значимости «кóра» индолы, равно как и N¹-замещенных бензимидазолов в развитии указанного эффекта, оказался недостоверным.

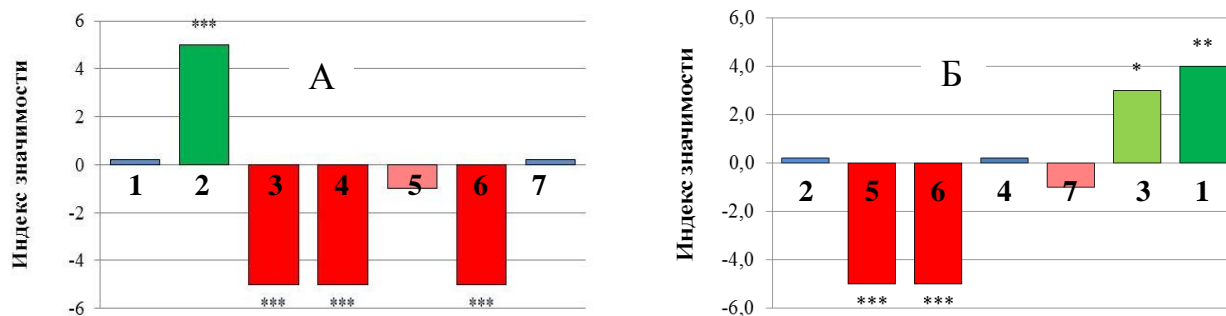


Рисунок 3. Расширенный подструктурный анализ зависимости наличия высокой (А) 5-HT_{2A}- и (Б) 5-HT₃-антагонистической активности от общей структуры (кóра) изученных производных азола.

Примечания: 1 – 1,3-дизамещенные индолы, 2 – N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, 3 – N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, 4 – 2,3-дигидро-N₁-бензимидазолы, 5 – N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, 6 – пиримидобензимидазолы, 7 – N¹-бензимидазолы. Статистическая значимость признака: ****p*<0,001; ** *p*<0,01, **p*<0,05; высокий положительный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности развития 5-HT_{2A}-антагонистического эффекта; высокий отрицательный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности отсутствия эффекта; низкий индекс значимости свидетельствуют о незначимой структурно-функциональной зависимости.

В результате проведения обобщенного анализа также были выявлены заместители в положениях 2, 9 наиболее значимого имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного ядра, оказывающие преимущественное влияние на развитие высокого 5-HT_{2A}-антагонистического действия. В положении С² ими явились 4-метоксифенил, 2-тиенил, *трет*-бутил; в положении N⁹ – диэтиламинопропил, диэтиламиноэтил. Кроме того, дополнительно, в качестве С²-заместителей, вносящих значимый отрицательный вклад в развитие указанного действия, были определены: метил, 4-гидроксифенил, 3,4-дигидроксифенил. Для заместителей в положении С³ в результате обобщения наличия статистически достоверного влияния изученных заместителей, в том числе с учетом ретроспективных данных, выявлено не было.

В результате проведения частотного анализа зависимости уровня активности от физико-химических свойств, были определены диапазоны значений параметра липофильности ($1,86 \leq \text{LogP} < 2,37$ для С²-заместителей; $0,88 \leq \text{LogP} < 1,35$ для N⁹-заместителей) и стерического параметра молекулярной рефракции ($17,55 \leq \text{MR} < 24,67$ для С²-заместителей), определяющие наиболее значимое влияние на

возможность развития высокой 5-НТ_{2А}-антагонистической активности среди соединений, содержащих имидазо[1,2-а]бензимидазольный «кор». Выявленные зависимости позволили определить общие субструктуры, соответствующие указанным физико-химическим признакам.

В результате суммарной количественной оценки проведенных анализов была выявлена обобщенная зависимость между наличием высокой 5-НТ_{2А}-антагонистической активностью и описанными выше свойствами различных подклассов азолов, реализованная в итоговой обобщенной химической структуре – «скаффолде»⁷ (Рисунок 4). Основная часть «скаффолда» сформирована 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо-[1,2-а]бензимидазолом.

Вариативными

компонентами указанной обобщенной структуры являются C²-4-этоксифенил; N⁹-диэтиламиноэтил, а также пропильный фрагмент вместо этильного в составе N⁹-заместителей.

Аналогичный подход был использован для анализа зависимости 5-НТ_{3/4}-эффекта от структурных и физико-химических свойств изученных конденсированных производных азолов.

Полученные в результате обобщения данные позволили выявить принципиально новые статистически более значимые структурные дескрипторы, а также подтвердить значимость пиперидиноэтильного/диэтиламиноэтильного заместителей, определяющие развитие 5-НТ₃-антагонистического действия.

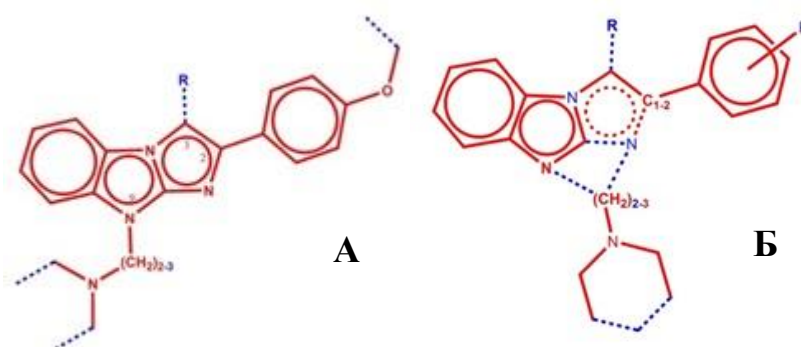


Рисунок 4. Интегральные «скаффолды», ответственные за развитие высокого (А) 5-НТ_{2А}- и (Б) 5-НТ₃-антагонистического действия.

Примечания: «скаффолды» построены с учетом значимости соответствующего признака, рассчитанной в результате обобщенного подструктурного и частотного анализов влияния химического строения и физико-химических свойств на уровень активности соединений; непрерывной линией обозначен основной «скаффолд», пунктиром – вариативная часть.

⁷ Скаффолд (термин из медицинской химии) – базовая молекула (кор, ядро), модифицированная некоторыми структурными фрагментами (например, заместителями), присутствие которых может определять наличие или высокий уровень заданного вида биологической активности.

Наибольшее значение в развитии выраженных 5-НТ₃-блокирующих свойств имеет N¹,C³-замещенная индольная либо N¹,C²-замещенная имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная базовые структуры ядра молекулы, формирующие «скаффолд» совместно с фенил-замещенным фрагментом в составе C^{2/3}-заместителей и липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N¹-положении. Вариативными компонентами являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в составе N¹-заместителя, а также фторфенил и метоксифенил в качестве фенил-замещенного дескриптора в положении C² или C³ (в зависимости от индольного или бензимидазольного ядра молекулы).

Учитывая малое количество выявленных 5-НТ₄-активных соединений, наиболее статистически обоснованные зависимости между наличием 5-НТ₄-агонистического эффекта и свойствами исследованных конденсированных азолов были получены для отрицательного влияния на изучаемый признак. Установлено, что наиболее выраженный отрицательный вклад в развитие 5-НТ₄-агонистического действия вносят N¹-замещенное имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное и N¹,C³-замещенное индольное ядро, а также N⁹- и N¹-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазольные и N¹-бензимидазольная гетероциклические основы.

Наибольшее положительное влияние на развитие 5-НТ₄-активности имеет сочетание таких признаков как N⁹-замещенное имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное ядро молекулы и *a*-нафтильный заместитель в положении C².

Дополнительное представление об участии выявленных 5-НТ_{2A/4}-значимых субструктур либо обобщенных «скаффолдов» было получено в результате детального изучения наиболее активных соединений, структурно соответствующие дескрипторы.

Для 5-НТ_{2A}-активных соединений (E75, E92, E56, E36, E53) с использованием молекулярного 3D-моделирования (Рисунок 5) была предварительно подтверждена возможность взаимодействия с активным центром 5-НТ_{2A}-рецептора,

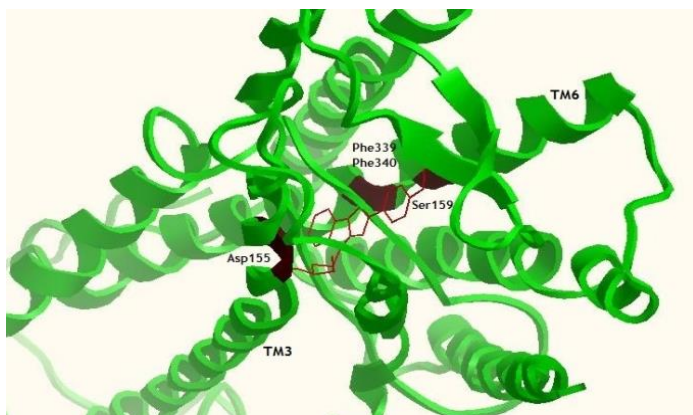


Рисунок 5. Модель сайта связывания 5-НТ_{2A}-рецептора с докированной молекулой соединения E75 (авазола) *in silico*. ТМ – трансмембранные домены рецептора.

описанным для селективного 5-HT_{2A}-антагониста кетансерина (Barden M.R. Mol. Pharmacol. 2007. №5. P.1200-1209 ; Nichols D.E. Mol. Pharmacol. 2012 ; Ponnala S. Bioorg.Med.Chem.Let. 2014).

Выявленное при этом сходство по величине минимальной энергии докиривания с кетансерином позволяет предположить взаимодействие изученных соединений с известными для последнего точками связывания (Рисунок 6). По-видимому, благодаря гетероциклическому фрагменту может образовываться

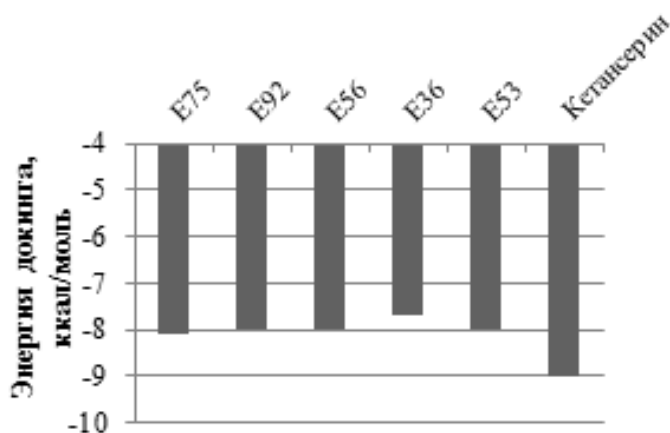


Рисунок 6. Результаты докиривания молекулы кетансерина и наиболее активных соединений в специфический сайт связывания 5-HT_{2A}-рецептора человека.

Статистически значимых отличий не выявлено.

π -связь с фенилаланином (Phe339, 340) рецептора, которое также усиливается за счет метоксифенильного/этоксифенильного заместителя в С² положении «скаффолда». Вероятна способность образования ионных связей между протонированной аминогруппой N⁹-радикалов лигандов и COO⁻ группой аспарагиновой кислоты (Asp155). Сходные данные по 3D-докириванию в активный центр 5-HT₄-рецептора были получены для наиболее активных среди выявленных 5-HT₄-агонистов (E107, E17). При этом также были получены сопоставимые с 5-HT₄-агонистами ML10302 и RS57639 величины минимальной энергии связывания с рецептором, позволяющие предполагать взаимодействие выявленных соединений с аналогичными для веществ сравнения точками связывания. По всей вероятности α -нафтильный заместитель в положении С² может образовывать гидрофобное взаимодействие с карманом, представленным триптофаном (Trp146), фенилаланином (Phe275, 276) и аспарагином (Asp279) (Mialet J. Br. J. Pharmacol. 2000); а аминогруппа в составе N⁹-заместителя формировать ионный мостик с остатком аспарагина (Asp100).

Обобщая результаты, полученные при исследовании 5-HT_{2A}-, 5-HT₃- и 5-HT₄-опосредованных эффектов расширенного класса конденсированных азолов, можно заключить, что выявленные закономерности о структурно-функциональной взаимосвязи, а также зависимости уровня активности от физико-химических свойств, обобщенные с ретроспективными данными (для 5-HT_{2A/3}-активности), позволили выявить новые и существенно дополнить ранее известные фундаментальные представления о химико-фармакологических свойствах указанного класса. В

результате выполнения первого этапа настоящего исследования, расширенный класс конденсированных азолов можно позиционировать как перспективный источник соединений с высокой серотонинергической активностью.

Глава 4. Второй этап работы был направлен на выявление и изучение фармакодинамических свойств наиболее перспективных для разработки новых биологически активных соединений с 5-HT_{2A}-блокирующими свойствами.

В результате дозозависимого исследования *in vitro*, предварительного изучения среднесмертельной дозы, наиболее перспективным для дальнейшего исследования было выбрано соединение E75 (химический шифр РУ-476) – 2-(4-метоксифенил)-9-(2-диэтиламиноэтил)имидазо[1,2-а]бензимидазола динитрат. Выявленное вещество (дальнейшее рабочее название «Авазол») превосходило по уровню активности *in vitro* (IC₅₀ 38 нМ vs. 410 нМ), показателю острой токсичности (LD₅₀) (в 1,8 раза менее токсично) препарат сравнения ципрогептадин.

При исследовании аспектов механизма действия авазола на рецепторном уровне, с использованием метода радиолигандного анализа⁸ было подтверждено наличие у него конкурентного 5-HT_{2A}-рецепторного связывания (Рисунок 7), сопоставимого по величине pIC₅₀ со спипероном.

С помощью методов исследования прямого рецепторного влияния на клеточном уровне, а также опосредованного рецепторного действия в условиях изолированных органов/тканей для авазола было выявлено TAAR5-антагонистическое действие в высоких концентрациях (10-100 мкМ); а также исключены некоторые рецепторные эффекты (5-HT_{3/4}-, TAAR1, D₂-, β₂-, M-, P2Y₁-ергические), влияние на кальциевый трансмембранный ток в диапазоне эффективных

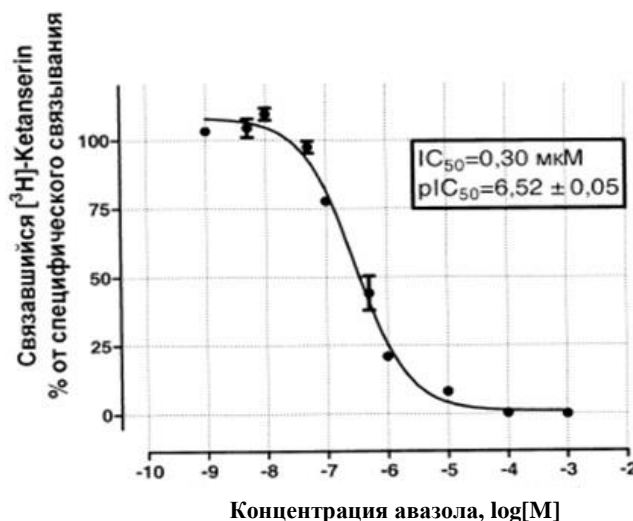


Рисунок 7. Характеристики связывания авазола с 5-HT_{2A}-рецепторами фронтальной коры крыс.

Данные представлены в виде $M \pm m$; IC₅₀ – концентрация полумаксимального вытеснения.

⁸ Выражаем благодарность д.м.н., проф. Г.И Ковалеву, за помощь в проведении исследования.

концентраций, характерных для выявленной 5-HT_{2A}-антагонистической активности вещества.

Выявленные аспекты механизма действия были подтверждены и дополнены исследованиями на медиаторном уровне при взаимодействии авазола с типичными анализаторами (агонистами/ антагонистами) различных нейромедиаторных систем.

5-HT_{2A}-антагонистическое влияние авазола на серотонинергическую систему

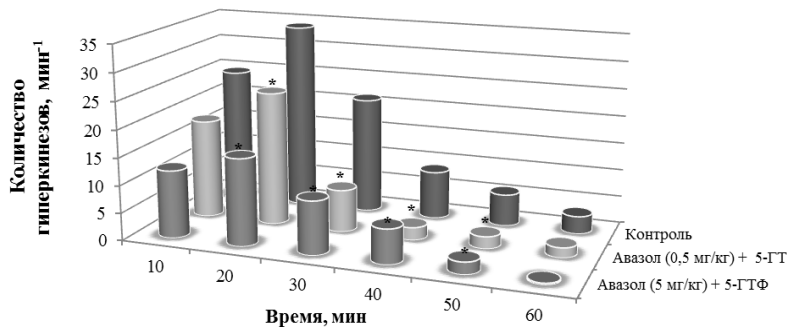


Рисунок 8. Влияние авазола на эффекты 5-гидрокситриптофана.

Внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до 5-гидрокситриптофана (300 мг/кг); * – изменения по отношению к показателям группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса).

было доказано в тесте с 5-гидрокситриптофаном (Рисунок 8), а также дополнительно была выявлена способность уменьшать проявления ГАМК_A-антагониста пикротоксина, что может свидетельствовать о ГАМК-миметическом эффекте изучаемого соединения. В исследовании также была выявлена способность авазола усиливать эффекты фенамина (пролонгирование стереотипного поведения). В то же время у авазола отсутствует влияние на эффекты апоморфина и галоперидола, а также собственная способность вызывать стереотипное поведение. Совместно с показанным отсутствием прямого D₂-рецепторного действия *in vitro* полученные данные, в целом, могут свидетельствовать об отсутствии выраженного собственного дофаминергического действия у авазола. Возможно, этот феномен связан с усилением влияния фенамина на транспортеры обратного захвата некоторых катехоламинов в присутствии авазола, характерным, в частности, для ритансерина (Pehek E.A. et al. Prog. Neuropsych. Biol. Psych. 997. №4. P.671-682 ; Ruiu S. et al. Mol. Psych. 2000. №5. P.673-677), что требует дополнительного исследования на синаптическом уровне.

Нейромедиаторный профиль авазола был дополнен данными об отсутствии влияния на адренергическую (тесты взаимодействия с клофелином, резерпином), холинергическую (взаимодействие с ареколином и никотином) системы, а также об отсутствии MAO-ингибирующего действия (тест взаимодействия с L-ДОФА) в дозах, демонстрирующих антисеротониновые свойства.

С учетом выявленных аспектов механизма действия у авазола были изучены

фармакологические свойства в условиях моделирования экспериментальной патологии. Считается, что среди периферических эффектов наибольший клинический потенциал 5-НТ_{2A}-антагонистов связан с возможностью снижать серотонинопосредованное влияние на мозговой кровоток и функциональное состояние тромбоцитов (Kovács A. Eur. J. Pharmacol. 2012. №1-3. P.160-164 ; Lin O.A. PLoS One. 2014. №1. P.e87026), имеющих наиболее важное значение в развитии транзиторных церебральных дисциркуляторных состояний. В этой связи 5-НТ_{2A}-блокаторы могут позиционироваться как возможные корректоры мигренозных состояний, особенно в случае хронической формы заболевания (Амелин А.В. и др. Мигрень ... 2011).

Было установлено, что авазол устраняет вызванное серотонином падение скорости кровотока как в бассейне средней мозговой артерии (на 62%), так и в бассейне внутренней сонной артерии (в 3,3 раза) (Рисунок 9). По эффективности авазол превосходит препарат сравнения ципрогептадин более чем на 20-30% по влиянию на кровоток в сонных артериях и соответствует действию кетансерина и ритансерина.

Более значимое антисеротониновое действие авазола (минус 66,7%) выявлено при серотониновой нагрузке у животных с моделированной субтотальной ишемией головного мозга (для ципрогептадина аналогичный показатель соответствовал значению минус 46,8%). По всей вероятности, это связано с усилением сосудистого действия серотонина, в отличие от остальных катехоламинов, при ишемии (Топчян А.В. Фармакологическая коррекция кровоснабжения ... М., 1998. 340с.) и, как следствие, способностью

5-НТ_{2A}-антагонистов

устранять его эффекты.

Также установлено, что для авазола не характерно нарушение скорости церебрального кровотока, изменение уровня систолического и диастолического артериального давления, а также хронотропизма

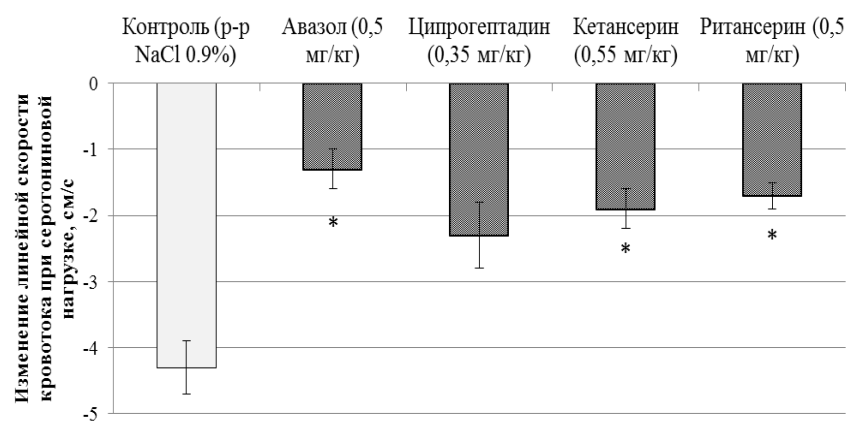


Рисунок 9. Влияние авазола, ципрогептадина, кетансерина и ритансерина на скорость кровотока во внутренней сонной артерии крыс при серотониновой нагрузке 20 мкг/кг (M±m). Соединения вводились внутривенно; дозы веществ эквиволярны средней терапевтической для ципрогептадина; * – изменения статистически значимы по отношению к показателям группы контроля (p<0,05; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

сердца в нормальных условиях у интактных животных. При этом для кетансерина и ципрогептадина, напротив, данные эффекты статистически выражены, и связаны в первую очередь с блокирующим влиянием последних на α_1 - и H_1 -рецепторы гладких миоцитов сосудов.

Более того, было показано, что авазол не влияет на выраженность системного гипотензивного действия серотонина, в то время как для ципрогептадина и кетансерина было выявлено усиление эффекта последнего.

Выявленные отличия авазола, совместно с ранее показанным отсутствием его влияния на адренергическую нейротрансмиссию в тестах взаимодействия с клофелином и резерпином, могут свидетельствовать о более селективном антисеротониновом сосудистом действии изучаемого соединения и позволяют позиционировать его не только как биологически активное вещество для устранения серотонинового спазма при начавшемся приступе мигрени, но и для длительного применения с профилактической целью и меньшим риском влияния на системную гемодинамику в межприступном периоде.

Принимая во внимание иные аспекты патогенеза дисциркуляторных мозговых нарушений (Supornsilpchai W. et al. Headache. 2010. №2. P.185-197 ; Danese E. et al. Thromb. Res. 2014. №1. P.17-22) дополнительно были изучены антиагрегантные, вязкостные, тромбогенные свойства авазола, а также его анальгетический потенциал.

Было установлено, что авазол эффективно подавляет серотонининдуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* в эффективной концентрации 1 мкМ в равной степени с кетансерином и превосходя эффект ципрогептадина и ацетилсалициловой кислоты в 1,4 и 2,5 раза соответственно. В то же время для авазола характерно значительно менее выраженное, умеренное антиагрегантное действие в условиях не связанных с повышенным содержанием серотонина (использование в качестве триггерных факторов агрегации АДФ, адреналина и коллагена), уступающее действию кислоты ацетилсалициловой и соответствующее по выраженности кетансерину и ципрогептадину (Таблица 2).

По всей вероятности это обуславливает отсутствие для авазола, равно как и для ципрогептадина и кетансерина, влияния на вязкостные параметры стандартизированной по гематокриту крови, а также антитромботического действия *in vivo*.

Таблица 2. Сравнительное влияние авазола, ципрогептадина и кетансерина на изученные гемодинамические показатели и свойства крови.

Вещество	Норма			Серотониновая нагрузка			Агрегация				Вязкость крови	Тромбозы	
	САД	ДАД	ЧСС	САД	ДАД	ЧСС	АДФ	Коллаген	Адреналин	Серотонин		Индукцированный хлоридом железа (III)	Индукцированный электрическим током
Авазол	0	0	0	0	0	↑↑	↓	↓↓	↓	↓↓↓	0	0	0
Ципрогептадин	↓	↓	0	0	0/↓	↑	0	↓	↓	↓↓	0	0	0
Кетансерин	↓↓	↓↓	0/↓	↓↓	0	↑↑	↓	↓	↓	↓↓↓	0	0	0

Примечания: САД/ДАД – систолическое/диастолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений, «0» – отсутствие влияния; «↓» – уменьшение эффекта/параметра; «↑» – увеличение эффекта/параметра.

В результате проведенного исследования с помощью моделирования центральных и периферических механизмов болевых реакций у авазола было выявлено выраженное анальгетическое действие. При этом было установлено, что для авазола характерно развитие анальгетического действия как при супраспинальном и спинальном уровне организации боли, так и в условиях периферической гипералгезии (Рисунок 10).

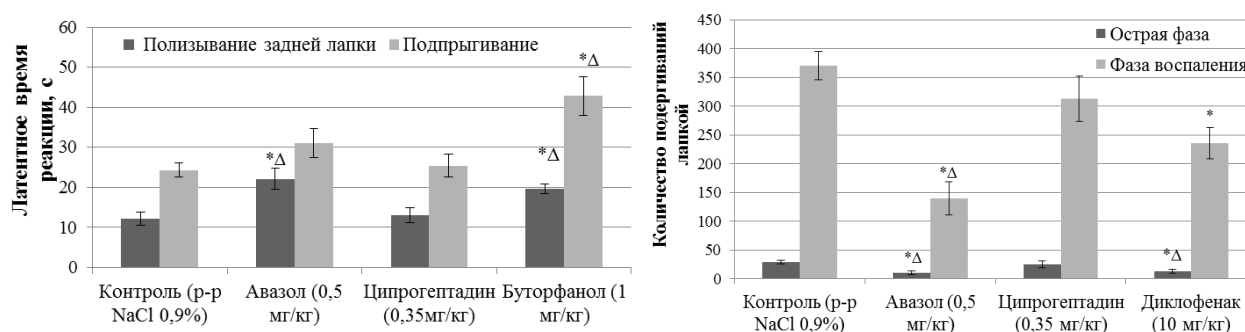


Рисунок 10. Анальгетическое действие авазола в условиях (А) теста «Горячая пластина» и (Б) «Формалиновая гипералгезия» (M±m).

Отличие статистически значимо относительно показателей группы * контроля, Δ ципрогептадина (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

При супраспинальном уровне организации болевой чувствительности (вокализация, пролонгированная вокализация, вторичные реакции в тесте «горячая пластина») для авазола отмечалось действие равное либо незначительно уступающее эффекту буторфанола и превосходящее таковой ципрогептадина в 2,4 раза.

При моделировании спинального уровня формирования болевого ответа (отдергивание хвоста) авазол не уступал по эффективности буторфанолу и превосходил ципрогептадин в 1,7 раза.

При периферической организации ноцицепции в условиях формалиновой гипералгезии авазол эффективно подавлял болевые реакции, значительно превосходил по действию ципрогептадин в среднем в 3-3,5 раза, соответствовал по уровню эффекту диклофенака в I фазе и на 40% превосходил его во II фазе ноцицептивного ответа.

Полученные данные об анальгетическом действии авазола коррелируют с представлением о проноцицептивном влиянии 5-HT_{2A}-рецепторного звена (Huang V. Sheng Li Xue Bao. 2015. №5. P.463-469 ; Supornsilpchai W. Headache. 2010).

Принимая во внимание описанное участие серотониновых 2A рецепторов в формировании тревожного поведения у животных (Benyamina A. Psychiatry Res. 2012. №2. P.307-312 ; Clinard C.T. Neuropharmacology. 2015), а также выявленное ГАМК-стимулирующее влияние авазола на уровне взаимодействия с пикротоксином, следующим направлением изучения его фармакодинамических свойств явилось исследование анксиолитического потенциала.

В результате для авазола было выявлено наличие анксиолитического действия как при остром, так и при 14-дневном курсе введения. Установлено, что для авазола характерно уменьшение выраженности тревожного поведения сопоставимое с диазепамом как в условиях конфликтного (тест Vogel), так и неконфликтного (приподнятый крестообразный лабиринт) (Рисунок 11) анксиогенеза, коррелирующего с показателями выхода в центр площадки в тесте «открытое поле».

Глава 5. На третьем этапе исследования было проведено многоэтапное изучение фармакодинамических свойств наиболее активного среди выявленных соединений с 5-HT₃-антагонистическими эффектами.

В результате расширенного дозозависимого исследования по совокупности характеристик (подавление серотонинового спазмогенного эффекта ($\Delta\%$ минус $82,8 \pm 4,8$) и IC₅₀ (0,55 мкМ) в качестве наиболее перспективного для изучения было выбрано вещество Г12 (химический шифр РУ-1276) 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола

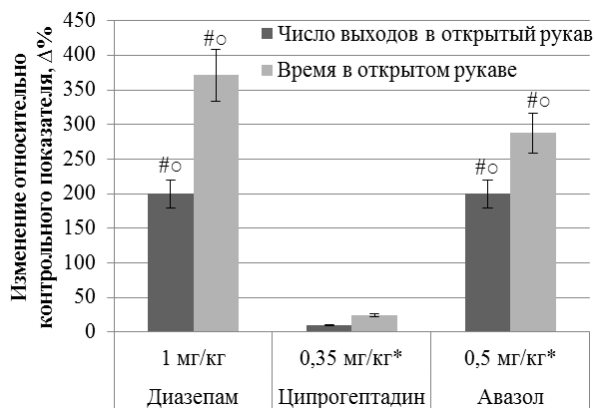


Рисунок 11. Влияние авазола в дозе 0,5 мг/кг на поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($M \pm m$).

* – доза ципрогептадина 0,35 мг/кг эквивалентна дозе 0,5 мг/кг авазола; все вещества изучены при внутрибрюшинном введении; # – отличия от показателей группы контроля, ° ципрогептадина статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

дигидрохлорид (дальнейшее рабочее название «Эметазол»).

Руководствуясь аналогичной методологией изучения фармакологического действия эметазола на начальном этапе, с помощью методов рецепторного анализа *in vitro* на клеточном (трансфицированные линии клеток НЕК-293Т, тромбоциты кролика) и на тканевом уровне (препараты изолированных гладкомышечных органов крысы и морской свинки) были исследованы возможные аспекты его механизма действия (Таблица 3).

В диапазоне концентраций от 10 нМ до 10 мкМ избирательность в отношении 5-НТ₃-опосредованного действия у эметазола оставалась высокой. Для него было исключено влияние на 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₄-, D₂-, β₂-, АТ₁-, P2Y₁-рецепторы, а также на рецепторы, ассоциированные со следовыми аминокислотами 1 и 5 типа (TAAR1, TAAR5).

В более высоких концентрациях с помощью метода ацетилхолиновой стимуляции спазмогенного эффекта изолированной подвздошной кишки морской свинки было установлено, что эметазол демонстрирует М-холиноблокирующее действие (pIC₅₀=4,5).

Дополнительное представление об аспектах механизма действия эметазола

Таблица 3. Взаимодействие эметазола с различными рецепторными системами *in vitro*.

Вид активности	Наличие взаимодействия
5-НТ _{2A} -серотонинергическая активность (эффект)	отсутствует
5-НТ ₃ -серотонинергическая активность (эффект)	↓ IC ₅₀ =0,55 мкМ
5-НТ ₄ -серотонинергическая активность (эффект)	отсутствует
β-адренорецепторы (связывание, эффект)	отсутствует
D ₂ -рецепторы (связывание, эффект)	отсутствует
М-холинергическая активность (эффект)	↓ IC ₅₀ =67 мкМ
АТ ₁ -ангиотензиновая активность (эффект)	отсутствует
TAAR5 (связывание, эффект)	отсутствует
TAAR1 (связывание, эффект)	отсутствует
P2Y ₁ -пуринергическая активность (эффект)	отсутствует

Примечание: ↓ - уменьшение активности.

было получено с помощью методов нейромедиаторного фармакологического анализа *in vivo*. Уменьшение специфичности серотонинового эффекта в высоких дозах (7,5 мг/кг) было выявлено при взаимодействии эметазола с ареколином и пикротоксином. При этом в дозе 1,5 мг/кг значимых изменений регистрируемых показателей (развитие тремора, судорожного синдрома, латентное время проявления эффектов) обнаружено не было.

Также было исключено действие эметазола на N-холинергическую (взаимодействие с никотином), адренергическую (тесты взаимодействия

с клофелином, резерпином) передачу, исключено наличие MAO-ингибирующего (взаимодействие с *L*-ДОФА) и 5-HT₂-зависимого (взаимодействие с 5-ГТФ) действия.

Для известных 5-HT₃-антагонистов, как правило, характерно специфическое противорвотное действие (Navari R.M. Biochim. Biophys. Acta. 2015. №10(B). P. 2738-2746). При этом не исключается возможность параллельного влияния соединений на дофаминергическое звено пусковой зоны рвотного центра, известного, например, для метоклопрамида. В тестах взаимодействия с апоморфином в широком диапазоне доз, галоперидолом, фенамином гипотеза о возможном влиянии эметазола на дофаминергическую нейротрансмиссию не подтвердилась.

В заключение изучения возможных механизмов действия эметазола была подтверждена его 5-HT₃-антагонистическая активность в условиях целостного организма (Рисунок 12). В тесте влияния на 5-HT₃-зависимый рефлекс фон Безольда-Яриша для эметазола характерно значимое подавление действия серотонина как в дозе 1,5 мг/кг, так и 7,5 мг/кг.

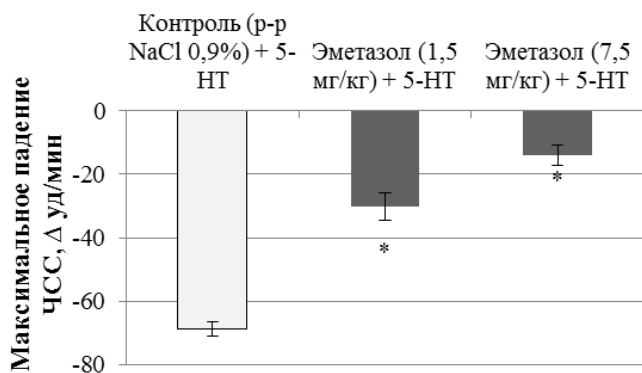


Рисунок 12. Влияние эметазола на развитие рефлекса фон Безольда-Яриша у крыс ($M \pm m$).

Эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; # - изменение относительно показателей группы контроля статистически значимо (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

(Рисунок 13). Так, при введении эметазола, равно как и ондансетрона, наблюдалось выраженное подавление (в 2,5-2,6 раза) показателей (латентность приступов рвоты, количество, продолжительность) относительно таковых в контрольной группе.

Обобщая полученные данные о противорвотном действии изученного вещества в условиях цитостатического эметогенеза, наличии выраженной 5-HT₃-антагонистической активности *in vitro* и *in vivo*, селективной в диапазоне эффективных доз, а также об отсутствии прямого дофаминергического действия,

На следующем этапе, исходя из показанного 5-HT₃-антагонистического действия эметазола, были изучены его противорвотные свойства. В исследовании с использованием модели цисплатиновой рвоты у собак по методу Fukui H.A. (Japan J. Pharmacol. 1992) было доказано, что эметазол способен устранять выраженность цитостатического эметогенного действия в области селективных доз 0,15-1,5 мг/кг

можно заключить, что эметазол демонстрирует специфическое 5-НТ₃-зависимое антиэметическое действие, не уступающее по величине ондансетрону.

Другой перспективный аспект клинического применения 5-НТ₃-антагонистов связан с подавлением серотонинозависимой стимуляции секреции и перистальтики тонкого кишечника, а также с уменьшением формирования энтероноцицептивной импульсации (Плотникова Е.Ю. Лечащий врач.

2014 ; Yu Y. Neurogastroenterol. Motil. 2015). Считается, что наибольшее специфическое подавление болевого и пропульсивного действия эндогенного медиатора целесообразно при Д-форме синдрома раздраженного кишечника, что расширяет возможности использования 5-НТ₃-блокаторов (de Greck M. Schmerz. 2014. №3. P.289-293 ; Lacy В.Е. Gastroenterol. Hepatol. (NY). 2015).

Указанные предпосылки, а также выявленные аспекты механизма действия эметазола послужили основанием для изучения противодиарейных и анальгетических свойств эметазола.

В результате исследования антидиарейных свойств на моделях стрессиндуцированной и серотонининдуцированной дефекации установлено, что эметазол демонстрирует антидиарейное действие, сопоставимое по эффективности с ондансетроном. При этом было показано, что наиболее высокий антидиарейный эффект эметазола наблюдается в более высоких дозах (1,5 мг/кг и выше), чем выявленная антиэметическая активность. Вероятно, это связано с вовлечением М-холиноблокирующего компонента действия эметазола в высоких дозах, способного усиливать 5-НТ₃-опосредованное антиспастическое влияние.

Наиболее выраженное уменьшение (на 57-60%) диарейного эффекта при введении эметазола наблюдается в условиях стрессиндуцированной дефекации, сопоставимое с ондансетроном в эквимольных количествах и лоперамидом в средней терапевтической дозе.

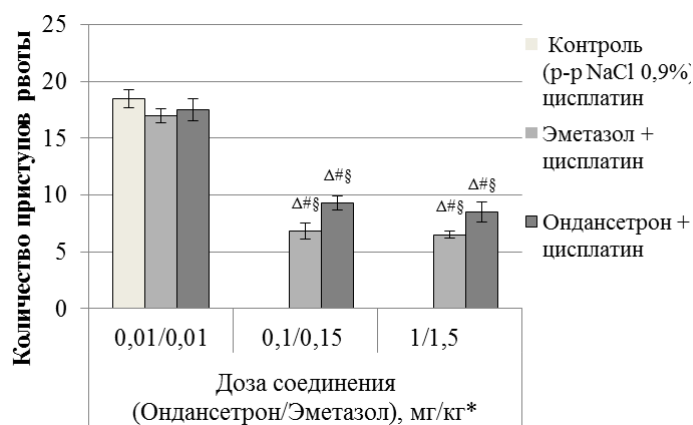


Рисунок 13. Выраженность противорвотного действия эметазола и ондансетрона в дозах 1/1,5 мг/кг* в условиях цисплатинового эметогенеза у собак (M±m).

* - эметазол и ондансетрон вводились внутривенно в эквимольных количествах; изменение относительно показателей группы ^Δконтроля, группы, получавшей [#]эметазол (0,01 мг/кг) и группы [§]ондансетрона (0,015 мг/кг) статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса, p<0,05).

При исследовании анальгетических свойств у эметазола было показано наличие выраженной активности при периферическом (формалиновая гипералгезия) и супраспинальном (вокализация, пролонгированная вокализация, горячая пластина) уровне организации ноцицептивного ответа.

По выраженности анальгетического действия в условиях формалиновой гипералгезии активность эметазола статистически значимо превосходит эффект ондансетрона и соответствует действию диклофенака во второй фазе ответной реакции. Влияние эметазола на изменение порога болевой реакции при супраспинальном уровне организации ноцицептивного ответа в 2,6-2,7 раза превосходит эффект ондансетрона, соответствует ему при гипертермическом раздражении, уступая при этом действию опиоидного анальгетика буторфанола.

Выявленные результаты дополняют представления о фармакологических свойствах эметазола и позволяют позиционировать его в качестве перспективного антиэметика, антидиарейного средства, а также 5-НТ₃-специфичного анальгетика.

В рамках данного исследования также была предпринята попытка изучения анксиолитической активности эметазола. Считается, что 5-НТ₃-антагонисты неоднородны по способности оказывать противотревожное действие, в ряде случаев отмечаются существенные видовые отличия по данному эффекту (Olivier V. et al. Eur Neuropsychopharmacol. 2000. №2. P.77-95). В результате комплексного изучения эффектов эметазола при остром и 14-дневном введении в условиях конфликтного и неконфликтного моделирования тревожного состояния у животных значимых доказательств наличия анксиолитической активности получено не было.

Высказывается предположение, что анксиолитическое действие серотонинергических средств может быть связано с прямым или опосредованным влиянием последних на ГАМК-ергические нейроны (Olivier J.D. et al. Front Pharmacol. 2013. №4. P.74). В свою очередь, выявленное отсутствие ГАМК_A-стимулирующего влияния у эметазола согласуется с отсутствием у него значимого противотревожного действия.

Глава 6. На заключительном этапе исследования были охарактеризованы острая токсичность и нейротоксикологический профиль авазола и эметазола.

Величина среднесмертельной дозы (LD₅₀) авазола (на мышах-самцах при внутрибрюшинном пути введения) составляет 77,6 мг/кг, что позволяет отнести авазол к соединениям 3 класса токсичности (ГОСТ 12.1.007–76).

Обращает на себя внимание меньшая токсичность авазола в сравнении с известными 5-НТ_{2/2A}-антагонистами. Для ципрогептадина характерна более низкая

среднесмертельная доза 15 мг/кг при внутривенном, и 43,3 мг/кг при внутрибрюшинном пути введения (Engelhardt G. *Arzneimit.-Forsch. Drug Res.* 1975. Vol.25. P.1723 ; ARZNAD Drug Research. 1951. №.1 ; RTECS URL: <http://ccinfoweb2.ccohs.ca/rtecs/records/XZ6157235.html> (дата обращения: 11.12.2015)); для вещества сравнения кетансерина – 37,1 мг/кг (при внутривенном введении) и 71,5 мг/кг (при внутрибрюшинном пути введения); для ритансерина – 28,2 мг/кг (внутривенно) (RTECS. 2015) .

Также было установлено, что в эффективных дозах (1/150 – 1/15 от LD₅₀), демонстрирующих выраженное антисеротониновое действие *in vivo*, для авазола не характерно изменение основных параметров, отражающих функционально-поведенческий статус животных (поведенческие и вегетативные реакции, нервно-мышечная возбудимость), за исключением отражающих анальгетическое и анксиолитическое действие (Таблица 4).

Минимальные значимые отличия от указанных показателей в контрольных группах отмечаются при использовании авазола в дозе 15 мг/кг (приблизительно соответствующей 1/5 от LD₅₀) и более.

Полученные данные об отсутствии значимых нейротоксических свойств у авазола в диапазоне

Таблица 4. Влияние авазола на функционально-поведенческий статус мышей при внутрибрюшинном введении.

Регистрируемый показатель	Доза, мг/кг					
	0,5	5	15	30	40	50
<i>Поведенческие реакции</i>						
Двигательная активность	0	0/↓	↓	↓	↓	↓
Поисковая активность	0	0/↓	↓	↓	↓	↓
Реактивность	0	0	0/↓	0	↓	↓
Вокализация при прикосновении	0	0	0	0/↑	↑	↑
Выходы в центр светлой площадки	↑	0	0	0	0	0
Агрессия	0	0	0	0	0	0
Стереотипия	0	0	0	0	0	0
Вертикализация	0	0	0	0	0	0
Груминг	0	0	0	0	0	0
<i>Нервно-мышечная возбудимость</i>						
Реакция на боль	↓	↓	0	0	↓	↓
Мышечный тонус	0	0	↓/0	↓	↓	↓
Двигательная координация	0	0	0	0/↓	↓	↓
Походка	0	0	0	-/0	-/0	-
Реакция на раздражение наружного слухового прохода	0	0	0/↓	0/↓	↓	0
Тремор	0	0	0	0/+	0/+	+
Судороги	0	0	0	0	0	+
Роговичный рефлекс	0	0	0/↓	0	0	0
Ипсилатеральный сгибательный рефлекс	0	0	0	0	0/↓	0
Реакция на стук	0	0	0	0	0	0
<i>Вегетативные эффекты</i>						
Частота дыхания	0	0	0/↓	↓	↓	↓
Блефароптоз	0	0	0	0/+	+	0/+
Саливация	0	0	0	0	0	0
Дефекация	0	0	0	0	0	0
Уринация	0	0	0	0	0	0

Примечания: 0 – отсутствие отличий от показателей группы контроля; «-» – изменение эффекта; «+» – появление эффекта; ↓ – уменьшение эффекта; ↑ – увеличение эффекта; 0/- (0/+; 0/↓; 0/↑) – слабовыраженные изменения.

эффективных для развития противомигренозного, анальгетического и анксиолитического действия доз могут свидетельствовать о низком риске возможного развития у изучаемого соединения выраженных нейротропных побочных эффектов. При этом более высокая и селективная антисеротониновая сосудистая активность изучаемого вещества в сравнении с ципрогептадином, в 1,8 раза более высокий показатель среднесмертельной дозы, позволяют позиционировать авазол как биологически активное соединение с менее выраженной токсичностью при более высоком уровне фармакологического ответа.

Все соединения, принадлежащие к классу 5-HT₃-антагонистов, относятся к высокотоксичным веществам. Это обусловлено высокой рецепторной ионотропной активностью последних и вовлеченностью 5-HT₃-звена в регуляцию большого количества физиологических процессов организма.

Несмотря на высокие абсолютные показатели острой токсичности (LD₅₀), ондансетрон (LD₅₀=10,8 мг/кг) (Yakuri Pharmacol. Ther. 1972. Vol.20. S.4. P.S995), гранисетрон (LD₅₀=17 мг/кг) (Drug future Base. <http://www.drugfuture.com/toxic/q68-q200.html> (дата обращения 03.02.2016)) зарегистрированы в качестве лекарственных препаратов и разрешены к использованию FDA, EMEA, Научным центром экспертизы средств медицинского применения Минздрава России.

В результате изучения острой токсичности эметазола (внутрибрюшинно, мыши-самцы) было установлено, что по показателю LD₅₀ последний в 3,6 раза менее токсичен, чем ондансетрон в аналогичных условиях. Величина среднесмертельной дозы эметазола составила 38,9 мг/кг (95% SD: 29,5-48,3 мг/кг).

Было установлено, что при введении животным эметазола в эффективных для антиэметического действия дозах 0,15 – 1,5 мг/кг (что соответствует 1/250 – 1/25 от LD₅₀) изменения реакций со стороны влияния на сомато-неврологический статус отсутствовали (Таблица 5). Наименьшей дозой вещества при введении которой фиксировались значимые признаки изменения сомато-неврологического статуса животных явилась доза 15 мг/кг.

Таким образом, можно заключить, что в диапазоне доз антиэметического действия (0,15-1,5 мг/кг), а также в эффективной дозе, демонстрирующей выраженное анальгетическое и антидиарейное действие (1,5 мг/кг) риск возможного развития нейротропных побочных эффектов у эметазола является минимальным.

По совокупности эффектов эметазол может быть позиционирован как перспективное биологически активное вещество с высокой 5-НТ₃-антагонистической активностью, демонстрирующее выраженное антиэметическое и антидиарейное действие, не уступающее по величине ондансетрону в эквимолярных количествах; с выраженной 5-НТ₃-специфической анальгетической активностью, превосходящей по эффекту ондансетрон и диклофенак; при этом по величине среднесмертельной дозы в 3,5 раза менее токсичное, чем ондансетрон.

В главе 7 приводится обобщение и обсуждение результатов, полученных в ходе исследования. Проводится интерпретация полученных данных с позиций селективности и мультитаргентности, сравнительной эффективности, а также статистической доказательности.

Таблица 5. Влияние эметазола на функционально-поведенческий статус мышей при внутрибрюшинном введении.

Регистрируемый показатель	Доза, мг/кг					
	1,5	3,8	7,5	15	22,5	26
<i>Поведенческие реакции</i>						
Двигательная активность	0	0	0/↓	0/↓	0/↓	↓
Поисковая активность	0	0	0	0	↓	↓
Реактивность	0	0	0	↑	↑	↑
Вокализация при прикосновении	0	0	0	0	0	0
Выходы в центр светлой площадки	0	0	0	0	0	↓
Агрессия	0	0	0	0	0	0
Стереотипия	0	0	0	0	0	0
Вертикализация	0	0	0/↓	↓	0/↓	↓
Груминг	0	0	0	0	0	↓
<i>Нервно-мышечная возбудимость</i>						
Реакция на боль	0	0/↓	0	0/↓	0	0
Двигательная координация	0	0	0	0	0/↓	↓
Походка	0	0	0	0	0	-
Мышечный тонус	0	0	0	0	↓	↓
Реакция на стук	0	0	0	0	0	0
Тремор	0	0	0	0	0	0
Судороги	0	0	0	0	0	0
Роговичный рефлекс	0	0	0	0	0	0
Реакция на раздражение наружного слухового прохода	0	0	0	0	0	↓
Ипсилатеральный сгибательный рефлекс	0	0	0	0	0	↓
<i>Вегетативные эффекты</i>						
Частота дыхания	0	0	0	0	0	↓
Блефароптоз	0	0	0	0	0	0
Саливация	0	0	0	0	0	0
Дефекация	0	0	0	0	0	0
Уринация	0	0	0	0	0	0

Примечания: 0 – отсутствие отличий от показателей группы контроля; «-» – изменение эффекта; «+» – появление эффекта; ↓ – уменьшение эффекта; ↑ – увеличение эффекта; 0/- (0/+; 0/↓; 0/↑) – слабовыраженные изменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе проведенного многоэтапного виртуального изучения различных представителей расширенного класса конденсированных азолов *in silico*, экспериментального изучения их 5-НТ_{2A/3/4}-ергических свойств *in vitro* и *in vivo*, проведенных проспективных и обобщенных с ретроспективными данными структурно-функциональных анализов позволяют с достаточно высокой степенью

вероятности утверждать, что конденсированные азолы – перспективный класс для поиска и разработки новых серотонинергически активных соединений.

Выявленные в результате исследования высокоактивные антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов – авазол и 5-HT₃-рецепторов – эметазол дополнительно свидетельствуют о перспективности поиска лигандов серотониновых рецепторов среди представителей указанного класса соединений.

Наличие высокого антисеротонинового эффекта в отношении 2A или 3 типа рецепторов зависит от общей химической структуры и определяется представленными, выявленными в результате многоэтапных обобщенных анализов «скаффолдами». Наличие 5-HT₄-агонистического действия среди исследованных представителей конденсированных азолов зависит от сочетания в структуре таких дескрипторов как N⁹-замещенное имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное ядро молекулы и C²-нафтильный заместитель.

Используя выявленные, определяющие 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-антагонистические свойства, «скаффолды» и, определяющие 5-HT₄-агонистические свойства, структурно-функциональные дескрипторы может быть осуществлено направленное виртуальное конструирование новых молекул с указанными фармакологическими эффектами; создание новых и расширение имеющихся комбинаторных библиотек структурных описаний молекул с предполагаемыми серотонинергическими свойствами для осуществления исследований *in silico*, а также осуществление целенаправленного синтеза и экспериментального поиска *in vitro* новых лигандов 2A, 3 и 4 типов серотониновых рецепторов.

Разработанная консенсусная методология направленного поиска новых 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-антагонистов, сочетающая многоэтапное использование элементов ретроспективного обобщения данных об активности наиболее близких по химическому строению соединений, использование методов 2D-QSAR/SAR анализа с помощью прогнозных систем определения активности неиспытанных химических веществ PASS и TestSim (надстройка ИТ Микрокосм), использование методов консенсусного обобщения результатов прогнозов активности с экспериментальными ретроспективными данными об активности соединений, а также проспективное экспериментальное тестирование новых химических соединений, может быть рекомендована для оптимизации дальнейшего поиска новых серотонинергически активных соединений.

Результаты проведенных фармакологических исследований выявленного нового 5-HT_{2A}-антагониста авазола позволяют рассматривать его как перспективную

основу для разработки и создания нового противомигренозного средства с 5-НТ_{2A}-блокирующим механизмом действия с антиагрегантными, анальгетическими и анксиолитическими свойствами, более активного, чем препарат сравнения с 5-НТ₂-антагонистическим профилем ципрогептадин.

Полученные в результате фармакологических исследований данные об активности и предварительном токсикологическом профиле нового 5-НТ₃-антагониста – эметазола позволяют рассматривать его в качестве перспективной основы для разработки нового, менее токсичного, чем эталонный препарат сравнения ондансетрон, серотонинергического антиэметика с противодиарейными и анальгетическими свойствами.

Выводы

1. Консенсусная методология поиска новых 5-НТ_{2A/3}-активных соединений (включая методы ретроспективного анализа «структура-эффект» соединений с аналогичной активностью; методы прогноза активности на основе 2D-QSAR/SAR анализа, реализованные в системах PASS и TestSim; методы консенсусного обобщения данных и методы экспериментального изучения активности веществ *in vitro*) позволяет эффективно выявлять 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-высокоактивные вещества среди представителей класса конденсированных азолов.
2. Для представителей конденсированных азолов, а именно 1,3-дизамещенных индолов, 1,2-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 1,9-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов характерна высокая 5-НТ_{2A/3}-антагонистическая и 5-НТ₄-агонистическая активность.
3. Для исследованных соединений из класса конденсированных азолов:
 - наличие высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности определяет обобщенная 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная структура с вариативными компонентами в виде С²-4-этоксифенила; N⁹-диэтиламинопропила либо N⁹-диэтиламиноэтила;
 - наличие высокого 5-НТ₃-антагонистического действия определяет обобщенная структура в виде N¹,C³-замещенной индольной либо N¹,C²-дизамещенной имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы с липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N¹-положении и фенил-замещенным фрагментом в составе С²/С³-заместителя. Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в

составе N¹-заместителя, а также фторфенил либо метоксифенил в качестве указанного фенил-замещенного фрагмента;

- наличие 5-HT₄-агонистического действия зависит от сочетания в структуре C²,N⁹-дизамещенной имидазо[1,2-а]бензимидазольной основы и *α*-нафтильного заместителя в C²-положении.

4. Динитрат 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола – авазол – является конкурентным 5-HT_{2A}-антагонистом. Влияние авазола на серотонининдуцированную активацию тромбоцитов *in vitro* в 1,7 раза превосходит эффект ципрогептадина и соответствует кетансерину.
5. Авазол эффективно устраняет вызванное серотонином изменение:
 - скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии и во внутренней сонной артерии, превышая по активности препарат сравнения ципрогептадин более чем на 20-30%;
 - частоты сердечных сокращений крыс, по уровню эффекта сопоставимо с кетансеринном и в 2 раза более выражено, чем действие ципрогептадина;
 - агрегации тромбоцитов *in vitro*, в 1,4 и в 2,5 раза превосходя действие ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой соответственно.
6. Авазол уменьшает развитие болевых реакций, вызванных термическими, электрическими, химическими стимулами. По большинству показателей аналгетическое действие авазола превосходит эффект ципрогептадина в 1,7-3,5 раза, и незначительно уступает буторфанолу. В условиях формалиновой гипералгезии авазол соответствует по уровню эффекта диклофенаку в I фазе и на 40% превышает его во II фазе ноцицептивного ответа.
7. В условиях моделирования тревожного поведения у крыс в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Наказуемое взятие воды по Vogel» авазол при остром и 14-дневном введении оказывает анксиолитическое действие, по большинству показателей превосходящее эффект ципрогептадина и соответствующее активности диазепама в дозе 1 мг/кг.
8. Дигидрохлорид 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола – эметазол – проявляет свойства антагониста 5-HT₃-рецепторов. Уровень активности эметазола в условиях спазмогенного серотонинопосредованного сокращения гладкомышечного препарата изолированного отрезка подвздошной кишки крысы в 2,5 раза превышает эффект метоклопрамида и соответствует действию ондансетрона.

9. В условиях экспериментальной патологии *in vivo* эметазол демонстрирует выраженные антиэметические и противодиарейные свойства, соответствующие по величине ондансетрону; анальгетические свойства, по большинству показателей превосходящие активность ондансетрона до 2,7 раз и не уступающие диклофенаку. Для эметазола не характерно наличие значимого анксиолитического действия.
10. По показателю среднесмертельной дозы: авазол является в 1,8 раза менее токсичными, чем ципрогептадин; эметазол – в 3,6 раза менее токсичными, чем ондансетрон. Для авазола и эметазола не характерно влияние на соматоневрологический статус животных в дозах, демонстрирующих специфическое фармакологическое действие.

Практические рекомендации

Разработанная методология поиска веществ с 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-антагонистическими свойствами может быть использована для выявления новых соединений с указанными видами активности.

Накопленные данные о структуре соединений, демонстрирующих эффекты 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₃-антагонистов и 5-НТ₄-агонистов, а также уровне указанных видов активности, могут быть использованы для расширения базы данных эталонов при информационных прогнозах соответствующих видов активности у новых, в том числе планируемых к синтезу веществ.

Выявленные обобщенные признаки высокого уровня 5-НТ_{2А/3}-антагонистической и 5-НТ₄-агонистической активности рекомендуется использовать для направленного синтеза соединений с данными видами активности.

Для наиболее активных соединений авазола и эметазола целесообразно проведение дальнейшего расширенного доклинического изучения для разработки на их основе новых средств с 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-блокирующими механизмами действия соответственно.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)

5-ГТФ – 5-гидрокситриптафан

ДАД – диастолическое артериальное давление

Д-форма СРК – диарейная форма синдрома раздраженного кишечника

МАО – моноаминоксидаза

ОКС – общий коэффициент сходства

САД – систолическое артериальное давление

СРК – синдром раздраженного кишечника

ТМ – трансмембранный домен рецептора

ЕМЕА – Европейское агентство лекарственных средств (*European Medicines Agency*)

EPAC – *ц*АМФ (циклический аденозинмонофосфат)-активируемый биосенсор (*exchange protein activated by cAMP*)

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (*Food and Drug Administration*)

LogP – показатель липофильности в виде логарифма коэффициента распределения в системе «октанол-вода»

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин

MR – молекулярная рефракция

QSAR/SAR – количественное/качественное соотношение структура-свойство (*Quantitative Structure-Property Relationship/Structure-Activity Relationship*)

SD – доверительный интервал

TAAR1/5 – рецепторы к следовым аминокислотам 1/5 типа

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Спасов, А.А. Механизмы подавления ангиотензин II-индуцированного сосудистого спазма изолированной портальной вены крыс *in vitro* [Текст] / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, А.А. Бригадирова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т.102.– №2. – С. 167-175.
2. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность карботиофенил- и карботиоалкиламидов 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / В.А. Анисимова, О.Н. Жуковская, А.А. Спасов, В.А. Кузнецова, В.А. Косолапов, Д.С. Яковлев, О.А. Соловьева, Д.В. Сороцкий, А.А. Бригадирова, Е.С. Воробьев // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49.– № 10. – С. 11-14.
3. Яковлев, Д.С. Антиэметические свойства 5-НТ₃-антагониста соединения РУ-1276 [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т.78.– №5. – С.28-32.
4. Sukhanov, I. TAAR1-dependent effects of apomorphine in mice [Text] / I. Sukhanov, S. Espinoza, D.S. Yakovlev [et al.] // International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2014.– Vol.17. – N.10. – P.1683–1693.
5. Яковлев, Д.С. Влияние 5-НТ_{2A}-антагонистов на кровоток в сосудах каротидной системы в условиях повышенного уровня серотонина [Текст] / Яковлев Д.С., Спасов А.А., Мальцев Д.В., Анисимова В.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2014. - Т.157. - № 3. - С. 328-330.
6. Яковлев, Д.С. Антитромботическая активность производного индола соединения sbt-119 на экспериментальных моделях тромбозов [Текст] / Д.С. Яковлев, А.А. Спасов, Т.М. Букатина, К.Ф. Суздаев // Бюллетень экспериментальной фармакологии и медицины. – 2014. – Т.157. – №7. – С.6-63.
7. Спасов, А.А. 5-НТ₃-рецепторы – мишень для воздействия биологически активных соединений (обзор) [Текст] / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47.– № 8. – С. 3-8.
8. Суздаев, К.Ф. Синтез и фармакологическая активность аминспиртов ряда индола [Текст] / К.Ф. Суздаев, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т.47.– №3. – С. 3-7.
9. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(N,N-дизамещенных)ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия [Текст] / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, И.Е. Толпыгин, Л.В. Ельцова, А.Ф. Кучерявенко, Л.В. Науменко, Н.А. Гурова, К.В. Ленская, Д.С.Яковлев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46.– №9. – С.6-10.
10. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность амидов 2,3-дигидроимидазо-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолил-N-уксусных кислот [Текст] / В.А.

- Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, И.Е. Толпыгин, Е.В. Тибирькова, О.А. Салазникова, В.А. Кузнецова, Н.А. Гурова, К.В. Ленская, **Д.С. Яковлев** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46.– №11. – С. 15-20.
11. Спасов, А.А. Синтез и фармакологическая активность амидов 2-амино-3-индолилакриловой кислоты [Текст] / А.А. Спасов, **Д.С. Яковлев**, К.Ф. Суздаев, [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46.– №10. – С. 8-13.
12. Спасов, А.А. P2Y₁-рецепторы и их влияние на процессы агрегации тромбоцитов [Текст] / А.А. Спасов, **Д.С. Яковлев**, Т.М. Букатина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т.43.– №3. – С.4-11.
13. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов, **Д.С. Яковлев** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012.– Т.46. – №6.– С.3-8.
14. Zefirova, O.N. Synthesis and biological testing of conformationally restricted serotonin analogues with bridgehead moieties [Текст] / O.N. Zefirova, T.Yu. Baranova, K.A. Lyssenko, N.A. Zefirov, N.V. Zyk, P.M. Vassiliev, **D.S. Yakovlev** [et al.] // Mendeleev Communications. – 2012. – Vol.22.– №2. – P.75-77.
15. Митина, Т.М. Антиагрегантная и антитромботическая активности нового P2Y₁-антагониста – соединения SBT-119 ex и in vivo [Текст] / Т.М. Митина, **Д.С. Яковлев**, К.Ф. Суздаев, А.А. Спасов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – Т.40. – №4.– С.19-21.
16. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 1-диалкил(алкил)аминоэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, М.В. Черников, **Д.С. Яковлев** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т.44 – №5.– 2010. – С.9-12.
17. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенил[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин, В.Н. Минкин, М.В. Черников, **Д.С. Яковлев** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т.44.– №7. – С.7-13.

Патенты

1. Средство, проявляющее свойства антагониста серотониновых 5-НТ₃-рецепторов [Текст] : пат. 2438669 Рос.Федерация : А61Р43, А61Р25/22, А61Р1/08, А61К31/454, А61К31/4188 / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Д.С. Яковлев** [и др.] ; заявители и патентообладатели: Фед. гос. авт. образоват. уч-е высш. проф. образ-ния "Юж. фед. унив.", гос. бюджет. образ-ное учрежд. высш. проф. образ-ния "Волгогр. гос. мед. унив." Минздрава и соц. развит. РФ - №2010144474 ; заявл. 07.02.11; опубл. 20.08.12, Бюл. – № 23. – 11 с.
2. Средства, проявляющие свойства антагонистов серотониновых 5-НТ_{2А}-рецепторов [Текст] : пат. 2465901 Рос.Федерация : А61Р43, А61К31/4188 / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Д.С. Яковлев**, В.И. Петров, В.И. Минкин; заявители и патентообладатели: Гос. образ-ное учрежд. высш. проф. образ-ия Волгогр. гос. мед. унив. Фед. агент-а по здрав. и соц. развит. РФ - № ; заявл. 07.02.11; опубл. 10.11.12, Бюл. – №31. – 9 с.

Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференций

1. Яковлев, Д.С. 5-НТ_{2А}-антагонистическая активность С², N⁹-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / Д.С. Яковлев, А.А. Спасов, Д.В. Мальцев [и др.] // Конф. проф.-препод. колл. посвящ. 80-летию Волгогр. гос. мед. унив. Сб. тр. науч.-практич. конф.: тез. конф. / под ред. В.И. Петрова. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. – С. 54-56.
2. Спасов А.А. Сравнительный анализ влияния соединения РУ-476 и известных 5-НТ_{2А} антагонистов на скорость кровотока в средней мозговой артерии [Текст] / А.А. Спасов, Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, Я.В. Морковина // Фармация и фармакология. – 2015. – №5s.– С. 106-107.

3. Бригадирова, А.А. Изучение АТ₁-антагонистической активности новых производных азола и индола [Текст] / А.А. Бригадирова, Д.С. Яковлев, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // «Белорусские лекарства» : мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Минск, Изд-во: Белорусский дом печати, 2014. – С. 31-32.
4. Мальцев, Д.В. Конденсированные производные азолов как блокаторы 5-НТ_{2А}-рецепторов [Текст] / Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Мат. юбил. 70-й отк. науч.-практ. конф. молод. ученых и студ-в с междунар. уч-ем - Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. – С. 332.
5. Vassiliev, P.M. Computational prediction of synergistic pharmacological effects for complex molecular systems [Text] / P.M. Vassiliev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, L.V. Naumenko, N.A. Gurova, N.I. Chepljaeva, V.A. Kuznetsova, D.S. Yakovlev, A.S. Taran, D.V. Sorotsky, V.A. Anisimova // 20 EuroQSAR Understanding Chemical-Biological Interaction: Abstract book– St-Peterburg, 2014. – P.218.
6. Мальцев, Д.В. Структурно-функциональная зависимость производных бензимидазола и индола в развитии 5-НТ_{2А}-ергического действия [Текст] / Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, П.М. Васильев [и др.] // Вестник волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – Приложение. – С. 78-79.
7. Maltsev, D.V. Anxiolytic action of a new 5-НТ_{2А} antagonist RU-476 [Text] / D.V. Maltsev, D.S. Yakovlev, D.G. Matokhin [et al.] // European Neuropsychopharmacology. - 2013. – Vol.23. – Supp.2.– P.S519-S520.
8. Васильев, П.М. Консенсусный подход в поиске in silico новых лекарственных веществ [Текст] / П.М. Васильев, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, О.Ю. Гречко, А.Ф. Кучерявенко, Л.В. Наumenko, Н.А. Гурова, Н.И. Чепляева, В.А. Кузнецова, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Перв. Рос. конф. по мед. хим. (MedChem Russia-2013) с междунар. уч-ем.: сб. тр. науч.-практич. конф.: тез. конф. – М.: РБР-Принт, 2013. – С. 281.
9. Суздальев, К.Ф. Синтез и фармакологическая активность 1,2-аминоспиртов ряда 3-винилиндола [Текст] / К.Ф. Суздальев, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев [и др.] // Перв. Рос. конф. по мед. хим. (MedChem Russia-2013) с междунар. уч-ем.: сб. тр. науч.-практич. конф.: тез. конф. – М.: РБР-Принт, 2013. – С. 151.
10. Спасов, А.А. Комбинаторная библиотека амидов 2-амино-3-индолилакриловой кислоты. Синтез и фармакологическая активность. [Текст] / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, К.Ф. Суздальев [и др.] // Перв. Рос. конф. по мед. хим. (MedChem Russia-2013) с междунар. уч-ем.: сб. тр. науч.-практич. конф.: тез. конф. – М.: РБР-Принт, 2013. – С. 148.
11. Яковлев, Д.С. 5-НТ_{2А}-антагонистическая активность производных бензимидазола [Текст] / Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев, А.А. Спасов // Перв. Рос. конф. по мед. хим. (MedChem Russia-2013) с междунар. уч-ем.: сб. тр. науч.-практич. конф.: тез. конф., – М.: РБР-Принт, 2013. – С. 284.
12. Яковлев, Д.С. Изучение анксиолитической активности соединения с 5-НТ_{2А} антагонистической активностью РУ-476 [Текст] / Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев // Проблемы разработки новых лекарственных средств: мат. Перв. Всерос. науч.-практ. конф. мол. уч-х / Фед. гос. бюдж. уч-ние «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». – Москва, 2013. – С. 64.
13. Яковлев, Д.С. 5-НТ_{2А}-опосредованная регуляция сосудистого тонуса [Текст] / Д.С. Яковлев, А.А. Спасов, Д.В. Мальцев // XXII съезд Физиологического общества имени И. П. Павлова: тез. док-ов / Волгг. гос. мед. унив. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 215.
14. Матохин, Д.Г. Изучение анальгетической активности соединения с 5-НТ_{2А} антагонистической активностью РУ-476 [Текст] / Д.Г. Матохин, Я.В. Самсоник, Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев // Современные наукоемкие технологии. - 2013. - №9. – С.56-57.
15. Васильев, П.М. Консенсусный поиск in silico производных конденсированных азолов с высокой 5-НТ_{2А}-антисеротониновой активностью [Текст] / П.М. Васильев, А.А. Спасов,

- Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Юбилейный XX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. мат. конгр. – Москва, 2013. – С. 307.
16. Яковлев, Д.С. Производные имидазобензимидазола как антагонисты 5-НТ_{2A}-рецепторов [Текст] / Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев, В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин // Совр. пробл. мед. хим. Направ. поиск лек. ср-в : мат. IV Всерос. науч.-практ. сем. мол. уч-х с междунар. уч-ем // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – Приложение. – С.139-140.
 17. Мальцев, Д.В. Изучение 5-НТ₂-серотонинергической активности N⁹, C²-дизамещенных имидазобензимидазола [Текст] / Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев // XVII Рег. конф. мол. исс-лей Волгг. обл.: тез. док-ов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. – С.49-50.
 18. Яковлев, Д.С. Поиск новых антагонистов в ряду конденсированных азолов и изучение их антиэметических свойств [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, В.А. Анисимова // 4 Съезд фармакол-ов Рос. «Иннов. в совр. фармакол.» : мат. съезда – М.: Фолиум, 2012. – С. 206.
 19. Мальцев, Д.В. Поиск 5-НТ_{2A}-антагонистов в ряду производных конденсированных азолов [Текст] / Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // 4 Съезд фармакол-ов Рос. «Иннов. в совр. фармакол.» : мат. съезда – М.: Фолиум, 2012. – С.126-127.
 20. Колобродова, Н.А. Метод изучения 5-НТ₄-серотонинергической активности *in vitro* [Текст] / Н.А. Колобродова, Д.С. Яковлев // Методолог. асп. эксп. и клин. фармакол.: мат. III Всерос. науч.-практ. семин. для мол. уч-х./ Вестник ВолгГМУ. – 2011. – Приложение. – С. 101.
 21. Колобродова, Н.А. Новый 5-НТ₃-блокатор: изучение аспектов нейротропной активности [Текст] / Н.А. Колобродова, Д.С. Яковлев // Методолог. асп. эксп. и клин. фармакол.: мат. III Всерос. науч.-практ. сем. для мол. уч-х / Вестник ВолгГМУ. – 2011. – Приложение. – С.40-41.
 22. Мальцев, Д.В. Влияние производных хлорид 3-(N,N-дизамещенных ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия на 2 тип серотониновых рецепторов тромбоцитов [Текст] / Д.В. Мальцев, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин // Методолог. асп. эксп. и клин. фармакол.: мат. III Всерос. науч.-практ. сем. для мол. уч-х / Вестник ВолгГМУ. – 2011. – Приложение. – С.13-14.
 23. Митина Т.М. Изучение P2Y₁ – антагонистической активности новых хлорид-3-(N,N-дизамещенных) ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия [Текст] / Т.М. Митина, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин // Методолог. асп. эксп. и клин. фармакол.: мат. III Всерос. науч.-практ. сем. для мол. уч-х / Вестник ВолгГМУ. – 2011.– Приложение. – С.14-15.
 24. Яковлев, Д.С. Новый антагонист 5-НТ₃-рецепторов: изучение анксиолитических свойств [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Биолог. осн-ы индивид. чувств. к псих-ным ср-вам: мат. 5-й междунар. конф. / Эксп. и клин. фармакол. - 2010. – Приложение. – С.76-77, 98.
 25. Спасов, А.А. Скрининг *in silico* производных конденсированных азолов с высокой фармакологической активностью [Текст] / А.А. Спасов, П.М. Васильев, О.Ю. Гречко, А.Ф. Кучерявенко, Д.С. Яковлев [и др.] // ЕвразияБио-2010: Сб. тез. 2-го Международ. конгр. / Под ред. Р.Г. Василова, – М.: «Копиринг», 2010. – С.176-177.
 26. Спасов, А.А. Изучение рецепторных свойств имидазо- и пиримидо[1,2-а]бензимидазолов [Текст] / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, Д.С. Яковлев [и др.] // ЕвразияБио-2010: Сб. тез. 2-го Международ. конгр. / Под ред. Р.Г. Василова, – М.: «Копиринг», 2010. – С. 175.
 27. Чикун, Д.М. Изучение зависимости «доза–эффект» у нового соединения с 5-НТ₂-антагонистическими свойствами [Текст] / Д.М. Чикун, А.И. Ращенко, Д.С. Яковлев // Вестник РГМУ. – 2010. – Специальный вып. № 2. – С 570-571.
 28. Яковлев, Д.С. Изучение условного терапевтического индекса нового соединения с 5-НТ₃-антагонистическими свойствами [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, А.А.

- Спасов, В.А. Анисимова // XVII Национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. матер. конгресса. - М., 2010. – С.751.
29. Яковлев, Д.С. Новые соединения с 5-НТ₂ и 5-НТ₃-антагонистическим действием: изучение на моделях *in vitro* [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, В.А. Анисимова // Инновац. достиж. фунд. и прикл. мед. иссл-ий в разв. Здрав. Волгоград. обл.: сб. науч. труд. 56 регион. науч.-практич. конф. проф.-преподавательского коллектива ВолГМУ Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2009. – С. 300-301.
30. Васильев, П.М. Направленный поиск *in silico* производных конденсированных азолов с высокой 5-НТ₃-антисеротониновой активностью [Текст] / П.М. Васильев, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев [и др.] // Химия и медицина, ОРХИМЕД-2009: тез.докл. VII Всерос. конф. с Молодеж. науч. шк. – Уфа: Гилем, 2009. – С.144-145.
31. Спасов, А.А. Изучение серотонинергической активности 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола [Текст] / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, В.А. Анисимова // Химия и медицина, ОРХИМЕД-2009: тез.докл. VII Всерос. конф. с Молодеж. науч. шк. – Уфа: Гилем, 2009.– С.328-329.
32. Колобродова Н.А. Поиск новых антагонистов 5-НТ₃-рецепторов, основанный на 2D-QSAR прогнозе [Текст] / Н.А. Колобродова, Д.С. Яковлев // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: мат. 67й откр. Науч.-практ. конф. мол. уч-х и студ. с междунар. уч-ем. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2009. – С.174-175.
33. Яковлев, Д.С. Изучение 5-НТ₃-антагонистической активности новых производных N-аминокарбонилиндола [Текст] / Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, А.А. Спасов, К.Ф. Суздалев // XVI Нац. конгр. «Человек и лекарство» (Москва 6-10 апреля): сб. мат. конгр. - М., 2009. – С. 566.

Яковлев Дмитрий Сергеевич

**КОНДЕНСИРОВАННЫЕ АЗОЛЫ – НОВЫЙ КЛАСС ЛИГАНДОВ
СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология