

КАЛИТИН КОНСТАНТИН ЮРЬЕВИЧ

**ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПАРАГАЛОГЕНФЕНИЛ  
ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА**

**14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Волгоград - 2018**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ Волгоградский медицинский научный центр Министерства здравоохранения Волгоградской области

**Научный руководитель:** Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор **Спасов Александр Алексеевич**

**Научный консультант:** Доктор медицинских наук **Гречко Олеся Юрьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Покровский Михаил Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО Белгородского государственного национального исследовательского университета, директор НИИ Фармакологии живых систем НИУ "БелГУ".

**Шабанов Петр Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Российской Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ.

**Ведущее учреждение:** «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Адрес (индекс, город, улица, дом): 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

приёмная тел./факс: 8 (3822) 41-83-75 / факс: 8 (3822) 41-83-79

e-mail: pharm@tnimc.ru

сайт: www.pharmso.ru

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ ч. на заседании Диссертационного Совета \_\_\_\_\_ при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте [www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» 2018 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета,  
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** По данным Международной противэпилептической лиги в Западной и Центральной Европе эпилепсией страдают 6 млн. человек, в течение ближайших 20 лет предположительно будут болеть около 15 млн. Соответствующие показатели для России составляют около полумиллиона больных эпилепсией, при заболеваемости 245,4 на 100 тысяч человек по данным за 2015 год [Толмачев П. А. и др., 2017]. Противосудорожные препараты первого и второго поколений представляются эффективными только для купирования остро возникающих приступов, а также некоторых симптомов, связанных с хроническим течением болезни [Насырова Р. Ф. и др., 2017].

Кризис в создании оригинальных препаратов и признание недостаточной эффективности медикаментозной терапии рассматривается как одна из актуальных проблем [Воронина Т.А. 2016; Середенин С.Б., 2017]. Наиболее часто применяемые противосудорожные средства, определяемые ВОЗ как необходимые (вальпроат натрия, карбамазепин, фенobarбитал, этосуксимид, диазепам) вызывают серьезные побочные эффекты, которые в первую очередь связаны с воздействием на нервную систему, а также обладают прямым токсическим действием на внутренние органы [Зенков Л. Р., 2000; Glauser T. et al., 2006]. Проблема высокой токсичности остается актуальной и для препаратов второго поколения (габапентин, ламотриджин, топирамат) [Белоусов Д. Ю., 2008]. Значительная выраженность побочных эффектов и плохая переносимость напрямую отражается на качестве жизни пациентов [Петров В.И., 2016]. Особое внимание в последние годы уделяется резистентным формам заболевания, при которых даже комбинированная терапия не обеспечивает положительного результата [Литовченко Т.А., 2010].

Таким образом, широкая распространенность эпилепсии, высокий риск развития сопутствующих судорожным приступам нежелательных нейротропных осложнений наряду с высокой частотой фармакорезистентных форм этого заболевания делают актуальным поиск новых противосудорожных средств, обладающих высоким терапевтическим потенциалом [Вальдман Е.А, 2010; Аниол В. А. и др., 2011].

Активно развиваемым направлением в создании новых противосудорожных препаратов является поиск и разработка биологически активных соединений на основе гетероциклических систем. Большая часть клинически одобренных препаратов (бензодиазепины, этосуксимид, примидон и др.) относятся к гетероциклическим структурам.

Для поиска новых соединений с антиконвульсивным действием были выбраны производные бензимидазола, которые проявляют разнообразные виды биологической активности и играют важную роль в медицинской химии [Spasov A.A. et al., 1999; Bansal Y., 2012]. У производных бензимидазола выявлен аффинитет к различным видам рецепторов,

энзимов и протеиновых комплексов. Даже незначительные модификации структуры приводят к существенным изменениям их биологической активности [Boiani M., 2005].

Класс производных бензимидазола интенсивно изучается в ВолгГМУ совместно с ЮФУ. Перспективность класса имидазобензимидазола в качестве источника средств с противосудорожной активностью была показана в предварительных исследованиях [Гречко О.Ю., 2012]. Современные литературные данные подтверждают наличие антиконвульсивных свойств у различных производных бензимидазола [Narasimhan B., 2012; Sharma S. et al., 2011; Shaharyar M. et al., 2011; Siddiqui N., 2010]. Исходя из этого, представляется актуальным направленный поиск веществ с высокой противосудорожной активностью среди производных бензимидазола.

Тема диссертации утверждена Ученым Советом ВолгГМУ (протокол №9 от 11 мая 2012 г.) и включена в план НИР.

**Степень разработанности.** Высокая потребность в разработке эффективных и безопасных противосудорожных средств остается актуальной проблемой современной клинической практики и фундаментальной медицины [Насырова Р. Ф. и др., 2017]. Наряду с большой частотой фармакорезистентных случаев эпилепсии, большинство современных препаратов обладает выраженным токсическим действием. К наиболее частым побочным реакциям относятся: патологическое пристрастие, седативное действие, атаксия, нарушение координации, влияние на желудочно-кишечный тракт, а также другие проявления, свойственные каждому препарату в отдельности [Katzung B.G., 2018]. Несмотря на появление новых противосудорожных средств, задачи повышения эффективности и снижения частоты побочных реакций не решены.

Противосудорожная активность выявлена у различных производных бензимидазола [Keri R.S., 2015], однако антиконвульсивные свойства производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола остаются недостаточно изученными.

**Цель исследования.** Поиск новых соединений с противосудорожной активностью среди парагалогефенил производных имидазобензимидазола, изучение спектра и механизма антиконвульсивного действия.

**Задачи исследования.**

1. Направленный поиск веществ с противосудорожной активностью в ряду парагалогефенил производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола с помощью методов *in silico* и *in vivo*.
2. Анализ зависимости между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений с применением логико-структурных методов.
3. Исследовать острую токсичность наиболее активного соединения, рассчитать его эффективную противосудорожную дозу, протективный и терапевтический индексы.

4. Определить спектр противосудорожного действия активного соединения на моделях хемо- и электроиндуцированных судорог.
5. Исследовать воздействие перспективного соединения на электрофизиологические проявления эпилептической активности.
6. Изучить механизм противосудорожного действия наиболее активного вещества.
7. Провести анализ влияния перспективного соединения на основные нейромедиаторные системы мозга с определением возможного спектра нейротропной активности.
8. Определить возможность развития толерантности к противосудорожному эффекту, феномена «рикошета» и синдрома отмены при хроническом введении изучаемого вещества, а также вторично-подкрепляющих и авersive свойств отобранного соединения.
9. Исследовать нейротоксикологические эффекты активного соединения с помощью многотестового наблюдения по Ирвину.

**Научная новизна исследования.** В ходе исследований впервые была проведена оценка антиконвульсивной активности ряда N<sub>1</sub> и N<sub>9</sub> производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола. Впервые были выявлены закономерности между противосудорожной активностью производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола и их структурой. Впервые установлено, что вещество РУ-1205 оказывает выраженную антиконвульсивную активность на различных моделях хемо- и электроиндуцированных судорог у мышей. В ходе электрофизиологических определено угнетающее влияние соединения на эпилептиформную и фоновую активность соматосенсорных нейронов крыс. Показано, что соединение РУ-1205 по механизму действия является агонистом каппа-опиоидных рецепторов, оказывает влияние на Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup> ионные токи, модулирует ГАМК- и глутаматергическую системы. Впервые изучен спектр нейротропной активности соединения РУ-1205 и его нейротоксикологические свойства. Установлено, что после хронического введения изучаемое соединение не вызывает признаков толерантности, феномена «рикошета» и синдрома отмены. У исследуемого вещества не выявлены аддиктивные и авersive свойства.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Найденные структурные закономерности соединений могут быть использованы для направленного поиска, конструирования и синтеза новых противоэпилептических средств. Получены данные о наличии значимых противосудорожных свойств у соединения РУ-1205 на моделях судорог, вызванных максимальным электрошоком, коразолом, бикикуллином, пикротоксином, NMDA, отменой алкоголя. Выявлена противосудорожная активность на фоне хронического введения соединения РУ-1205 без признаков физической зависимости и аддикции. В совокупности это позволяет считать исследуемое вещество перспективным для расширенного доклинического изучения в качестве противосудорожного средства.

**Методология и методы исследования.** В соответствии с поставленными задачами были выбраны современные высокопродуктивные методические подходы, имеющиеся в ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ и ГБУ ВМНЦ. В качестве объектов исследования использовались нелинейные половозрелые особи мышей, крыс и кроликов породы «Шиншилла». Изучение противосудорожных свойств соединений выполнялось согласно методическим рекомендациям по доклиническому исследованию противосудорожных средств [Воронина Т.А., 2012] с использованием методов статистической обработки данных.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. N<sub>1</sub> и N<sub>9</sub> фторфенил производные имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола представляются перспективным классом для поиска и разработки новых высокоэффективных противосудорожных средств.
2. Соединение РУ-1205 проявляет выраженную противосудорожную активность, превосходит референтный препарат вальпроат натрия и равен по активности карбамазепину на острых и хронических моделях эпилептогенеза.
3. Изучаемое вещество подавляет формирование фоновой фокальной и эпилептиформной (вызванной пикротоксином или электрическими стимулами) активности нейронных колонок соматосенсорной коры крыс.
4. Механизм противосудорожного действия соединения РУ-1205 связан с активацией каппа-опиоидных рецепторов, а также угнетением натриевых и кальциевых ионных токов.
5. Для вещества РУ-1205 не характерно развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены при хроническом введении. Соединение не обладает аддитивными (вторично-подкрепляющими), аверсивными свойствами.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты о фармакологической активности парагалофенил производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола, а также анализ влияния их заместителей на уровень противосудорожной активности включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, на кафедре фармакологии КубГМУ. Полученные данные используются для планирования синтеза новых соединений в НИИ физической и органической химии ЮФУ, а также в НОЦ фармацевтики КФУ. В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, ВМНЦ применяется комплексный подход для поиска и изучения новых соединений с антиконвульсивными свойствами.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, выполненных на кроликах, крысах и мышах с использованием высокотехнологического оборудования и современных подходов, в соответствии с методическими рекомендациями по

доклиническому изучению лекарственных средств с противосудорожной активностью, а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основной материал диссертации докладывался и обсуждался на XVII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2012 г.; 70, 71, 72-й итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград 2012, 2013, 2014, 2015 гг.; IV Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств».

**Публикации.** Результаты диссертации сопровождаются 16 публикациями, в том числе 8 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получено 2 патента на изобретения.

**Личный вклад автора.** Автором проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы, посвященных изучаемой проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и механизма противосудорожного действия нового конденсированного производного бензимидазола – соединения РУ-1205: решения поставленных задач, обсуждения результатов, разработке практических рекомендаций. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

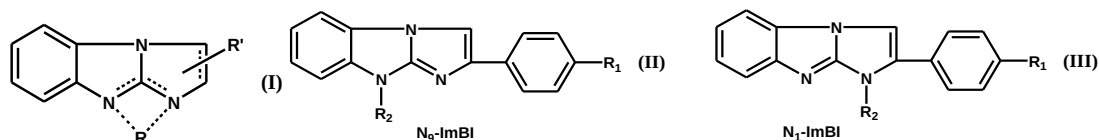
**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 194 страницах машинописного текста и состоит из введения, 7 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и перечня литературы, включающего 377 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 36 таблицами и 24 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**В первой главе** представлен анализ отечественной и зарубежной литературы на предмет перспектив поиска новых эффективных и безопасных противосудорожных средств на основе производных бензимидазола. В первом разделе описаны актуальные проблемы создания новых противоэпилептических средств. Раздел также посвящен рассмотрению механизмов действия и терапевтических точек приложения противосудорожных препаратов. Проанализированы литературные данные о современных стратегиях поиска новых противосудорожных средств. С точки зрения актуальных стратегий фармакологического поиска, учитывая наличие антиконвульсивных свойств у многих соединений бензимидазольного ряда и потенциальную возможность мультитаргетного взаимодействия с различными мишенями, можно заключить,

производные из класса бензимидазолов представляют высокий потенциал для разработки противосудорожных средств.

**Вторая глава** посвящена описанию материалов и методов исследования, использовавшихся при выполнении поставленных в диссертации задач. Из общей базы 647 соединений было изучено 15 2-(4-фенил)-производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола (рисунок 1) из них восемь N<sub>9</sub>-замещенных и семь N<sub>1</sub>-замещенных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола. Все соединения были синтезированы в НИИ физико-органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).<sup>1</sup>



**Рисунок 1.** I - общая структурная формула изучаемых производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола (пунктир означает возможное наличие связи); II - структурная формулы N<sub>9</sub> производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола; III - структурная формулы N<sub>1</sub> производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола

Исследования были выполнены на 1155 белых нелинейных половозрелых мышах массой 20-30 г, 68 белых аутбредных крысах массой 180-320 г, 15 кроликах породы «Шиншилла» массой 4-4,8 кг. Животные доставлялись из питомников: ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва), ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово), ФГУП "НИИ ГТП" ФМБА России (г. Волгоград). Всех животных содержали в виварии кафедры фармакологии ВолГМУ с натуральным световым режимом при температуре 20-25°C и относительной влажности воздуха 40-50% на полнорационной диете (ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнялись с соблюдением правил лабораторной практики, в соответствии с требованиями государственных стандартов РФ (ГОСТ Р 50258-92), Директивы Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях 2010/63/EU от 22.09.2010 г., приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и приказом Минздравсоцразвития России протокол №6 от 22.12.2012 г. Исследования были согласованы с Региональным независимым этическим комитетом при ГБУ ВМНЦ от 17.12. 2011 г, протокол № 149-2012.

Компьютерный прогноз спектра биологической активности *in silico* выполнен с помощью программы PASS (версия 10.4) на основании статистического анализа частоты встречаемости структурных фрагментов в классах активных и неактивных соединений [Поройков В.В., 2009].

Для изучения зависимости между химическим строением изучаемых соединений и их биологической активностью использовался эмпирический метод, учитывающий базовую

<sup>1</sup> Выражаем признательность ведущему научному сотруднику лаборатории синтеза биологически активных соединений, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для настоящего исследования



структуру, а также изменение положения заместителей. Среди математических способов был выбран подход Фри-Вилсона [Голендер В.Е., 1978].

Оценка противосудорожной активности соединений проводилась в тесте судорог, вызванных коразолом у мышей [Luszczyski J. J., 2008]. Изучение противосудорожной активности соединения-лидера проводили на моделях острого эпилептогенеза с определением судорожного порога, путем титрования коразола (1% раствор или 10 мг/мл) в хвостовую вену мышей со скоростью 0,1 мл/мин с помощью шприцевого дозатора (LineOmat, Германия). В качестве критериев оценки рассчитывались показатели TID<sub>50</sub> (threshold increasing dose — доза, увеличивающая порог судорог к коразолу на 50%) методом линейной регрессии. Также противосудорожная активность изучалась по методике максимального электрошока [Воронина А.Н., 2012], при этом животные получали через корнеальные электроды электрические стимулы (50 Hz, 50 mA), длительностью 0,2 с. Оценивалась способность веществ предупреждать развитие тонической экстензии у мышей в сравнении с референтным препаратом карбамазепином. Хемоиндуцированные судороги моделировались с применением блокатора ГАМК-рецепторов пикротоксина (3,5 мг/кг, и.п.), ингибитора синтеза ГАМК изониазида (250 мг/кг, и.п.), блокатора глициновых рецепторов стрихнина (2,5 мг/кг, п.к.), блокатора калиевых каналов 4-аминопиридина (13,3 мг/кг, п.к.) и агониста глутаматных рецепторов NMDA (75 мг/кг, п.к.).

Определение антиконвульсивной активности при хроническом введении проводили на моделях киндлинга с коразолом [Воронина А.Н., 2012] и киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя [Becker H. C., 1993] в сравнении с вальпроатом натрия.

Механизм каппа-рецепторного действия оценивался по способности угнетать вызванные низкочастотной электрической стимуляцией (10 Гц, амплитуда 50 В, 2 мс) сокращения изолированного семявыносящего протока кролика (СПК), эксклюзивно экспрессирующего каппа-подтип опиоидных рецепторов [Ока, Т. et al, 1980]. Для изучения влияния соединения на натриевые и кальциевые трансмембранные ионные токи использовали метод patch clamp на нейронах моллюска прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) [Вислобоков А.И. и др., 2001].<sup>2</sup>

В ходе электрофизиологических исследований<sup>3</sup> оценивалось влияние соединения на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры крыс. Для определения фокальной активности исследуемых структур мозга использовались стеклянные микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм и диаметром кончика 2-3 мкм. Регистрацию фоновой фокальной проводили на жесткий диск компьютера с помощью 16-канального АЦП L-761 (L-Card, Россия). Для исследования антиэпилептиформных свойств использовали метод искусственного генеза эпилепсии с

---

<sup>2</sup> Исследование выполнено на базе НИИ фармакологии им. А.В. Вальдмана

<sup>3</sup> Исследование выполнено на базе НИИ нейрокибернетики им. А.Б.Когана Южного федерального университета

помощью электрической стимуляции поверхности мозга (ритмическая стимуляция током с параметрами: напряжение 120 В, длительность 10 с, частота стимуляции 10 Гц). Для усиления биоэлектрической активности использовался 10-канальный усилитель УБС 1/10 (Россия). Для стимуляции использовались электростимуляторы ЭСЛ-2 (Россия), ГЭФИ-3-БУ (Россия).

Электрофизиологические исследования по изучению влияния соединения-лидера на эпилептиформную активность, вызванную блокатором ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксином и специфическим блокатором ГАМК<sub>A</sub>-р рецепторов ТРМРА выполнялись на крысах с использованием методики микроэлектродной микроаппликации растворов [Сухов А.Г., 2009].

Взаимодействие изучаемого соединения с каппа-опиоидными рецепторами *in vivo* проводилось на модели судорог, вызванных бикукуллином с предварительным введением селективного блокатора каппа-рецепторов nor-BNI [Yajima Y. et al., 2000].

Взаимодействие с бензодиазепиновым сайтом исследовалось на модели судорог, вызванных коразолом с применением блокатора бензодиазепинового сайта флумазенила (10 мг/кг). Также взаимодействие с ГАМК-рецепторным комплексом оценивалось в тестах судорог *in vivo*, вызванных пикротоксином и бикукуллином [Hosseinzadeh H., 2004].

Для оценки нейрохимического спектра действия исследуемого вещества применялись разнообразные методические приемы при сочетанном введении соединения РУ-1205 с анализаторными агентами. Влияние на моноаминергические структуры мозга изучали в тестах с фенамином (5 мг/кг, и.п.), L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.), галоперидолом (1 мг/кг, и.п.), 5-гидрокситриптофаном (300 мг/кг, и.п.), резерпином (2,5 мг/кг, и.п.); холинергическое действие определялось с учетом модуляции эффектов ареколина (25 мг/кг, п.к.), никотина (6 мг/кг, п.к.).

Влияние соединения-лидера на развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены проводилось на фоне 28 дней хронического введения вещества с определением судорожного порога с коразолом и признаков синдрома отмены.

Вторично-подкрепляющие и психодепрессивные свойства соединения изучали на модели условной реакции избегания места (УРИМ) [Bruchas M.R. et al., 2007] и в тесте принудительного плавания по Порсолту [Porsolt R.D., 1977; McLaughlin J.P., 2003].

Острая токсичность была исследована согласно требованиям и методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических средств [Арзамасцев Е.В., 2012]. Изучение нейротоксикологического действия выполняли с использованием системы многотестового наблюдения по S. Irwin [Irwin S., 1964].

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы «GraphPad Prism 7.0», Microsoft Office Excel 2017 (Microsoft, США) с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп Манна-Уитни (U-test), точного критерия Фишера для альтернативных реакций, рангового однофакторного анализа Краскела-Уоллиса с

постобработкой тестом Данна или Tukey, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных. Результаты динамических наблюдений обсчитывались с помощью двухфакторного ANOVA метода. Показатели ЭД<sub>50</sub>, ЭК<sub>50</sub>, ЛД<sub>50</sub> и ТД<sub>50</sub> рассчитывали методом наименьших квадратов и пробит-анализа, с построением нелинейных регрессионных моделей.

**В третьей главе** «направленный поиск соединений с антиконвульсивной активностью в ряду новых производных бензимидазола» представлен прогноз биологической активности 647 соединений и было показано, что в целом класс производных ИмБИ является перспективным для поиска веществ с противосудорожными свойствами, т.к. 88 % из всех проанализированных веществ, вне зависимости от положения N<sub>1</sub> и N<sub>9</sub>, содержали в прогнозируемом спектре PASS какой-либо вид активности, связанный с противосудорожным действием. При этом N<sub>9</sub>-замещенные ИмБИ имели более высокие прогнозные оценки, по сравнению с N<sub>1</sub>-замещенными ИмБИ. Для экспериментальной оценки антиконвульсивных свойств были отобраны 15 наиболее перспективных веществ с заданным порогом вероятности наличия (P<sub>a</sub>>20%) и отсутствия (P<sub>i</sub><10%) противосудорожной активности.

В ходе экспериментального изучения фармакологической активности на модели коразоловых судорог у мышей были протестированы 15 производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола. Результаты экспериментов приведены в таблице 1.

Изучаемые соединения в различной степени влияли на развитие судорожного синдрома и частоту летальных исходов. Наиболее выраженную способность блокировать клонические судороги продолжительностью более 3 секунд проявили соединения под лабораторными шифрами: РУ-1205 > РУ-285 = РУ-1204 = РУ-1203, что значительно отличалось от группы контроля (p<0,05). Соединение РУ-1205 предотвращало гибель 80% животных. Соединения РУ-67, РУ-87 и РУ-1359 сокращали летальность в равной степени с препаратом сравнения вальпроатом натрия.

При расчете вклада заместителей и базовой структуры по методу Фри-Вилсона по совокупности параметров N<sub>9</sub>-замещенные имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолы представляются более перспективными для поиска веществ с высокой противосудорожной активностью, чем N<sub>1</sub>-замещенные. Для N<sub>9</sub>-производных существенный вклад, как в противосудорожную активность, так и в показатель выживаемости, вносит базовая структура, при одновременном наличии большей чувствительности базовой структуры к введению заместителей, повышающих противосудорожную активность соединений. Отличительной чертой высокоактивных соединений являлось наличие заместителя 4-фторфенил в положении 2 и диалкиламиноалкильного или циклоалкиламиноалкильного заместителей в положении 9 ядра имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола.

Таблица 1.

Зависимость противосудорожной активности N<sub>1</sub> и N<sub>9</sub> производных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола от их химического строения в сравнении с вальпроевой кислотой на модели судорог, вызванных коразолом

| Вещество                                                         | R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub>                                                                                  | Противосудорожная протекция, % | Выживаемость, % |
|------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Контроль (вода)                                                  |                   |                                                                                                 | 0                              | 40              |
| Вальпроевая кислота                                              |                   |                                                                                                 | 40                             | 70              |
| N <sub>9</sub> -производные имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола |                   |                                                                                                 |                                |                 |
| РУ-67                                                            | –OCH <sub>3</sub> | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                                | 20                             | 70              |
| РУ-87                                                            | –OH               | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                                | 10                             | 70              |
| РУ-273                                                           | –Cl               | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                                | 30                             | 50              |
| РУ-285                                                           | –Cl               | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                               | 40                             | 60              |
| РУ-1203                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub>                                 | 40                             | 60              |
| РУ-1204                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                                | 40                             | 60              |
| РУ-1205                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                               | 50                             | 80              |
| РУ-1359                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>                                                             | 30                             | 70              |
| N <sub>1</sub> -производные имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола |                   |                                                                                                 |                                |                 |
| РУ-598                                                           | –Cl               | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                                | 0                              | 30              |
| РУ-630                                                           | –OCH <sub>3</sub> | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub>                                 | 0                              | 20              |
| РУ-727                                                           | –Br               | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>                | 10                             | 40              |
| РУ-731                                                           | –OCH <sub>3</sub> | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O               | 0                              | 50              |
| РУ-1273                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br                                             | 20                             | 50              |
| РУ-1274                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> | 0                              | 50              |
| РУ-1277                                                          | –F                | –CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O               | 10                             | 40              |

Примечание: положение R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> заместителей указано на рисунке 1.

На модели судорог, вызванных коразолом, изучаемое соединение и референтный препарат дозозависимо снижали частоту развития генерализованных судорог у экспериментальных животных (рисунок 2).

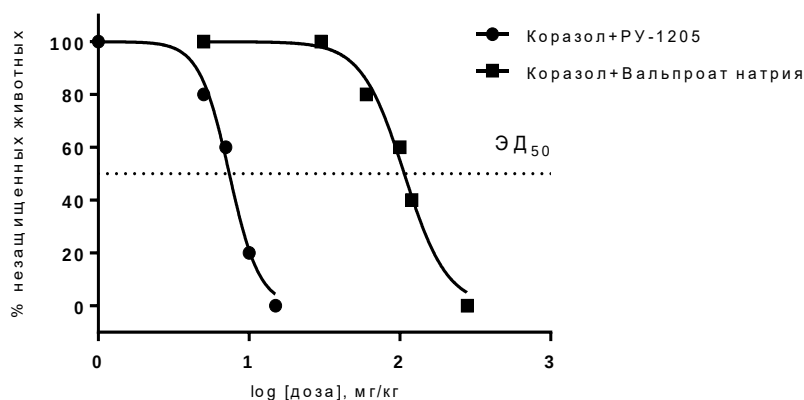


Рисунок 2. Влияние соединения РУ-1205 и вальпроата натрия в возрастающих дозах на судорожную активность мышей в тесте с коразолом (75 мг/кг, п.к.). Нелинейный регрессионный анализ выполнен по методу наименьших квадратов ( $r^2 > 0,98$ ).

Было показано, что медианная антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 ( $ЭД_{50}=8,4$  мг/кг) превышает активность вальпроата натрия ( $ЭД_{50}=107,0$  мг/кг) в 12 раз на модели хемоиндуцированных судорог (таблица 2). При оценке нейротоксического действия в тесте вращающегося стержня  $ТД_{50}$  для соединения РУ-1205 и вальпроата натрия составили 56,4 и 242,0 мг/кг соответственно. Для расчета широты безопасного действия была определена  $ЛД_{50}$  соединения РУ-1205, которая составила 309,6 мг/кг. По величине протективного индекса тестируемое соединение превосходило вальпроат натрия в 3,2 раза. ТИ изучаемого вещества был в 8,6 раз выше по сравнению с вальпроатом натрия, что свидетельствует об относительно высокой терапевтической безопасности нового соединения (таблица 2).

**Таблица 2.**

Величина антиконвульсивной активности ( $ЭД_{50}$ ), показатель острой токсичности ( $ЛД_{50}$ ), протективный индекс (ПИ) и терапевтический индекс (ТИ) соединения РУ-1205 и вальпроата натрия в тесте с коразолом (75 мг/кг, п.к.).

| Вещество         | $ЭД_{50}$ (мг/кг) | $ТД_{50}$ (мг/кг) | $ЛД_{50}$ (мг/кг) | ПИ ( $ТД_{50}/ЭД_{50}$ ) | ТИ ( $ЛД_{50}/ЭД_{50}$ ) |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| РУ-1205          | 8,4               | 56,4              | 309,6             | 6,7                      | 36,9                     |
| Вальпроат натрия | 107,0             | 242,0             | 470,0*            | 2,1                      | 4,3                      |

**Примечание:** \* - по данным Register of Toxic Effects of Chemical Substances.

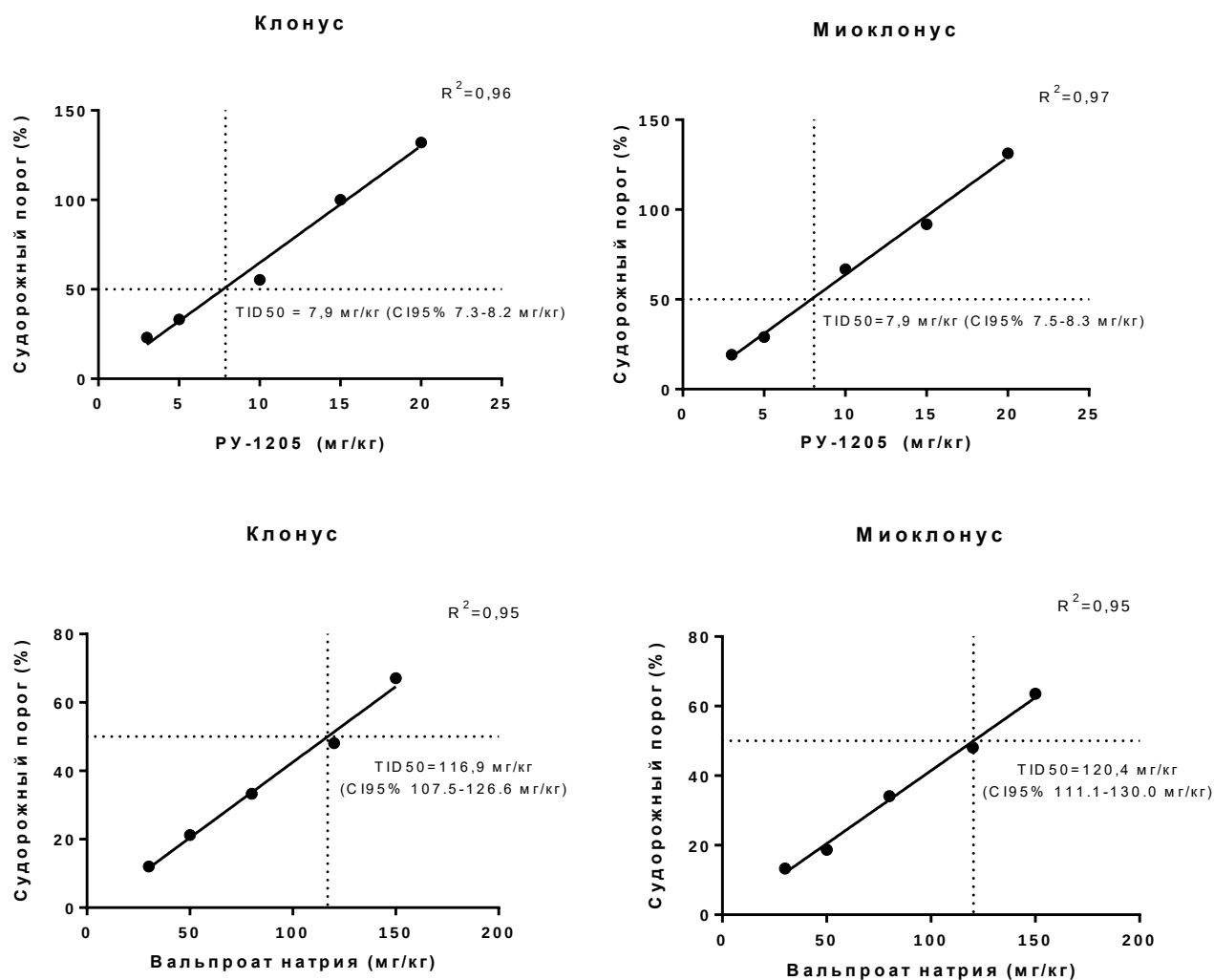
Основываясь на полученных результатах фармакологических и токсикологических исследований, соединение РУ-1205 (гидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил) имидазо[1,2- $\alpha$ ]-бензимидазола) было выбрано для дальнейшего изучения как наиболее перспективное.

**В четвертой главе** изложены результаты по изучению спектра антиконвульсивной активности соединения РУ-1205. Судорожные состояния подразделяются на отдельные формы (эпилептические синдромы), которые имеют свои электрофизиологические и клинические особенности с индивидуальными подходами в фармакотерапии [Аванцини Д., 2005]. Таким образом, для определения противосудорожного профиля нового соединения требуется изучить его активность на различных моделях эпилептогенеза, что позволит определить его возможное клиническое применение в отношении определенных типов судорожных состояний.

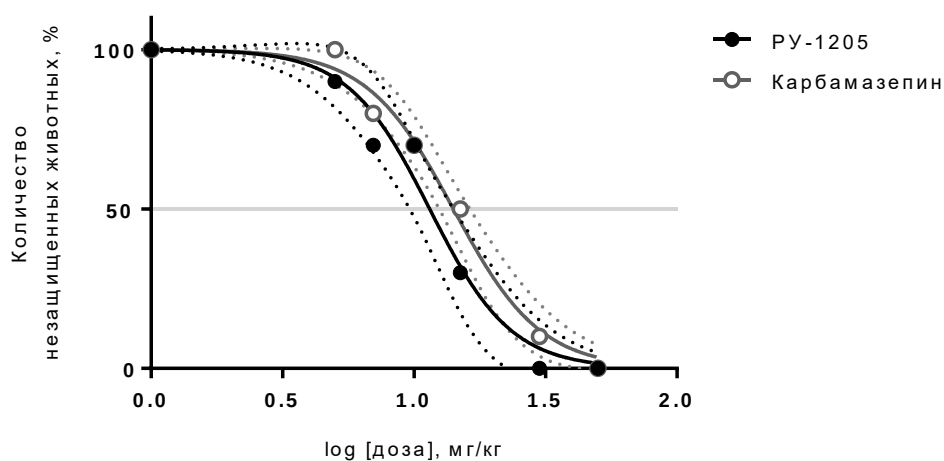
Так, в ходе изучения противосудорожной активности на острых моделях эпилептогенеза было показано, что соединение РУ-1205 и вальпроат натрия статистически значимо ( $p<0,05$ ) повышали судорожный порог для миоклонических и клонических судорог у мышей. На основе полученных данных были построены линейные регрессионные модели, отражающие процентный рост дозы коразола по сравнению с контрольными животными (рисунок 3).

$ТID_{50}$  соединения РУ-1205 для клонических и миоклонических судорог составила 7,9 мг/кг, что было в 15 раз ниже, чем у вальпроата натрия.

В тесте максимального электрошока соединение РУ-1205 и препарат сравнения карбамазепин оказывали дозозависимое противосудорожное действие (рисунок 4).



**Рисунок 3.** Влияние соединения РУ-1205 и вальпроата натрия на порог судорожной активности (миоклонические подергивания и клонические генерализованные судороги). Линейная регрессионная кривая отражает увеличение дозы коразола, вызывающей миоклонус у мышей при введении различных доз изучаемого соединения.



**Рисунок 4.** Влияние соединения РУ-1205 ( $r^2=0,97$ ) и карбамазепина ( $r^2=0,98$ ) в возрастающих дозах на судорожную активность мышей в тесте максимального электрошока.

Результаты экспериментов по определению противосудорожной активности с расчетом ЭД<sub>50</sub>, ЛД<sub>50</sub> и терапевтического индекса для соединения РУ-1205 и карбамазепина приведены в таблице 3.

**Таблица 3.**

Величина антиконвульсивной активности (ЭД<sub>50</sub>), показатель острой токсичности (ЛД<sub>50</sub>) и терапевтический индекс (ТИ=ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub>) соединения РУ-1205 и карбамазепина в тесте максимального электрошока.

| Вещество     | ЭД <sub>50</sub> (мг/кг) | ЛД <sub>50</sub> (мг/кг) | ТИ (ЛД <sub>50</sub> /ЭД <sub>50</sub> ) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| РУ-1205      | 11,4                     | 309,6                    | 27,2                                     |
| Карбамазепин | 14,1                     | 114,0*                   | 8,1                                      |

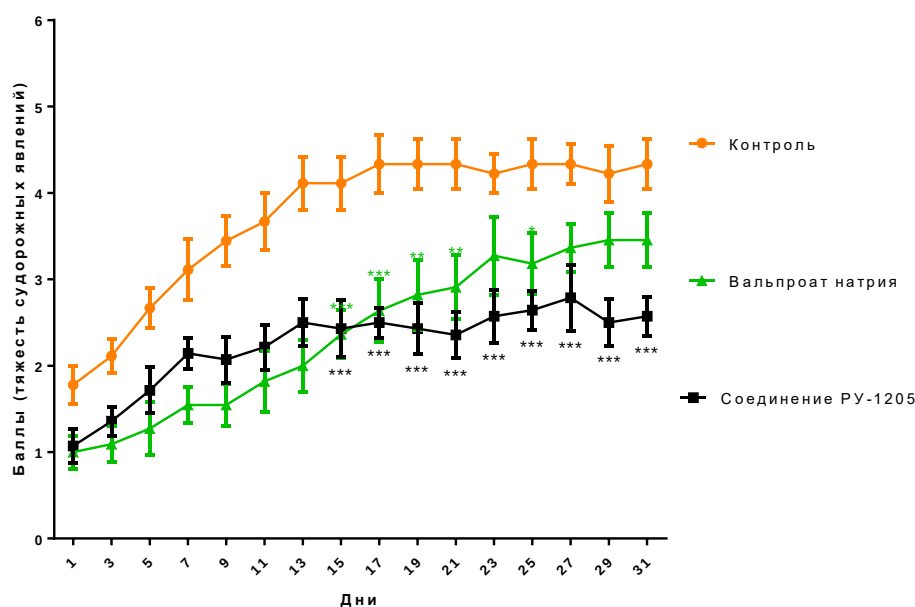
**Примечание:** \* – ЛД<sub>50</sub> карбамазепина (и.п., мыши) по данным Фармакология и токсикология. – 1990 г. - Том 53. - №4. - С.19.

В ходе проведенного исследования было установлено, что изучаемое вещество эквивалентно по уровню антиконвульсивной активности карбамазепину, и превосходит его по широте терапевтического действия в 3,4 раза.

На модели судорог, вызванных антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксином, изучаемое соединение в дозе 10 мг/кг статистически значимо сокращало продолжительность тремора в 2,5 раза, а также способствовало увеличению времени начала судорог и уменьшению числа приступов по сравнению с контролем. В дозе 20 мг/кг тестируемое вещество увеличивало латентный период тремора и клонических судорог на 18% и 39% соответственно, а также сокращало длительность тремора на 67% и снижало частоту судорожных приступов на 36% по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ).

Соединение РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.) устраняло вращательное поведение ( $p<0,05$ ), вызванное NMDA у мышей, что может говорить об участии глутаматергической системы в действии изучаемого вещества. На моделях хемоиндуцированных судорог, вызванных изониазидом, стрихнином, 4-аминопиридином соединение РУ-1205 (10 и 20 мг/кг) не проявило статистически значимого уровня противосудорожной активности.

Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 при его хроническом введении оценивалась на модели киндлинг прогрессии с коразолом. Соединение РУ-1205 статистически значимо снижало тяжесть судорожных явлений по сравнению с контрольной группой ( $p<0,05$ ), эффективно препятствуя развитию киндлинга, а также существенно предотвращало гибель животных на протяжении всего эксперимента (таблица 4). При этом общий уровень судорожной активности не превышал 2,5 баллов, что проявлялось миоклоническими подергиваниями и оживленным поведением животных. Вальпроат натрия (100 мг/кг) так же проявил высокую активность на начальных этапах эксперимента, равную с соединением РУ-1205 (статистически значимые различия отсутствовали), однако антиконвульсивное действие существенно снизилось к 21 дню, после чего статистически значимые отличия от группы контроля отсутствовали.



**Рисунок 5.** Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и вальпроата натрия (100 мг/кг и.п.) на развитие судорожного синдрома на модели киндлинг прогрессии ( $M \pm m$ ). Статистическая значимость показана в сравнении с группой контроля (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ , ANOVA для повторных измерений с *post-hoc* анализом Tuckey).

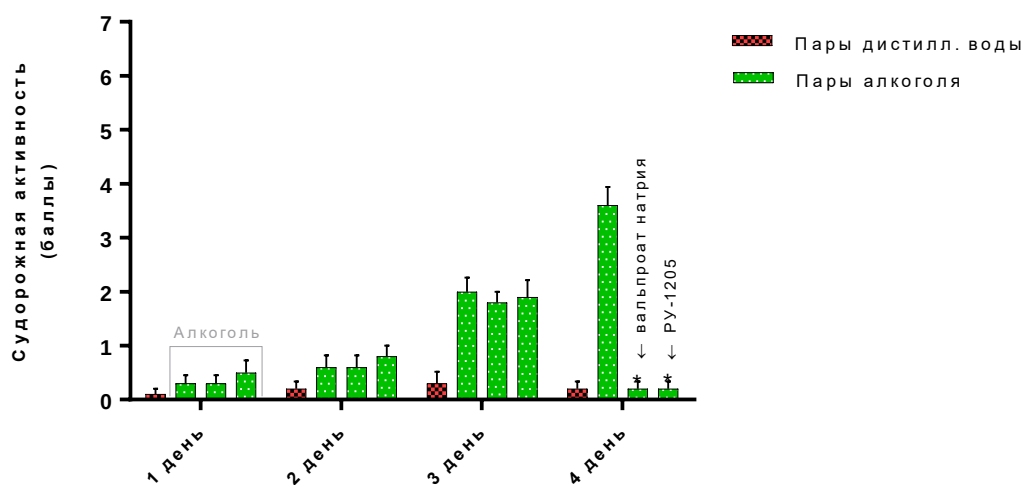
**Таблица 4.**

Влияние соединения РУ-1205 на выживаемость животных к 31 дню киндлинга.

| Вещество                   | Выживаемость (абс.) | Выживаемость % |
|----------------------------|---------------------|----------------|
| Коразол + растворитель     | 8/15                | 53             |
| Коразол + вальпроат натрия | 11/15               | 73             |
| Коразол + РУ-1205          | 14/15               | 93*            |

**Примечание:** \*  $p < 0,005$  по критерию Хи-квадрат по сравнению с контролем.

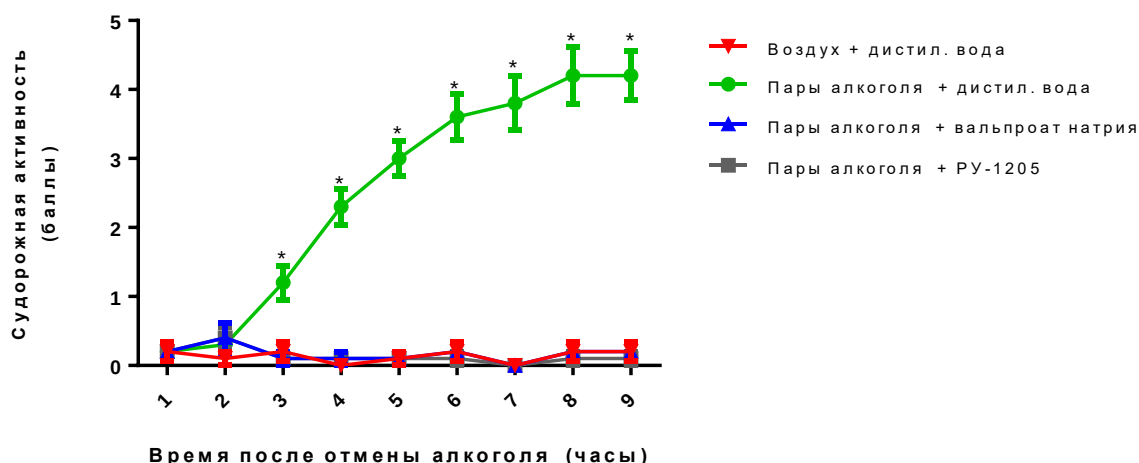
На киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя после введения вальпроата натрия (300 мг/кг) и соединения РУ-1205 (10 мг/кг) наблюдалось отсутствие судорожной активности в опытных группах 3 и 4 спустя 6 часов после отмены алкоголя, что статистически значимо отличалось от группы контроля (2) (рисунок 6 и 7).



**Рисунок 6.** Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и вальпроата натрия (300 мг/кг, и.п.) на уровень судорожной активности у мышей ( $M \pm m$ ).

**Примечание:** \* - статистическая значимость показана в сравнении с группой контроля №2 ( $p < 0,05$ , ANOVA для повторных измерений с *post-hoc* анализом Tuckey).

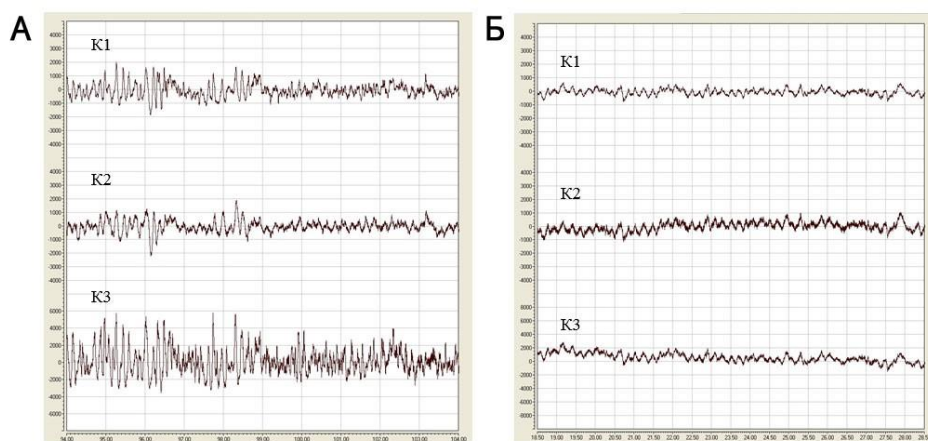




**Рисунок 7.** Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и вальпроата натрия (300 мг/кг, и.п.) на уровень судорожной активности у мышей, регистрируемый ежечасно на 4-й день отмены алкоголя ( $M \pm m$ ).

**Примечание:** \* - статистическая значимость показана в сравнении с группами №3 (вальпроат натрия 300 мг/кг, и.п.) и №4 (РУ-1205 10 мг/кг, и.п.) ( $p < 0,05$ , ANOVA для повторных измерений с *post-hoc* анализом Tuckey).

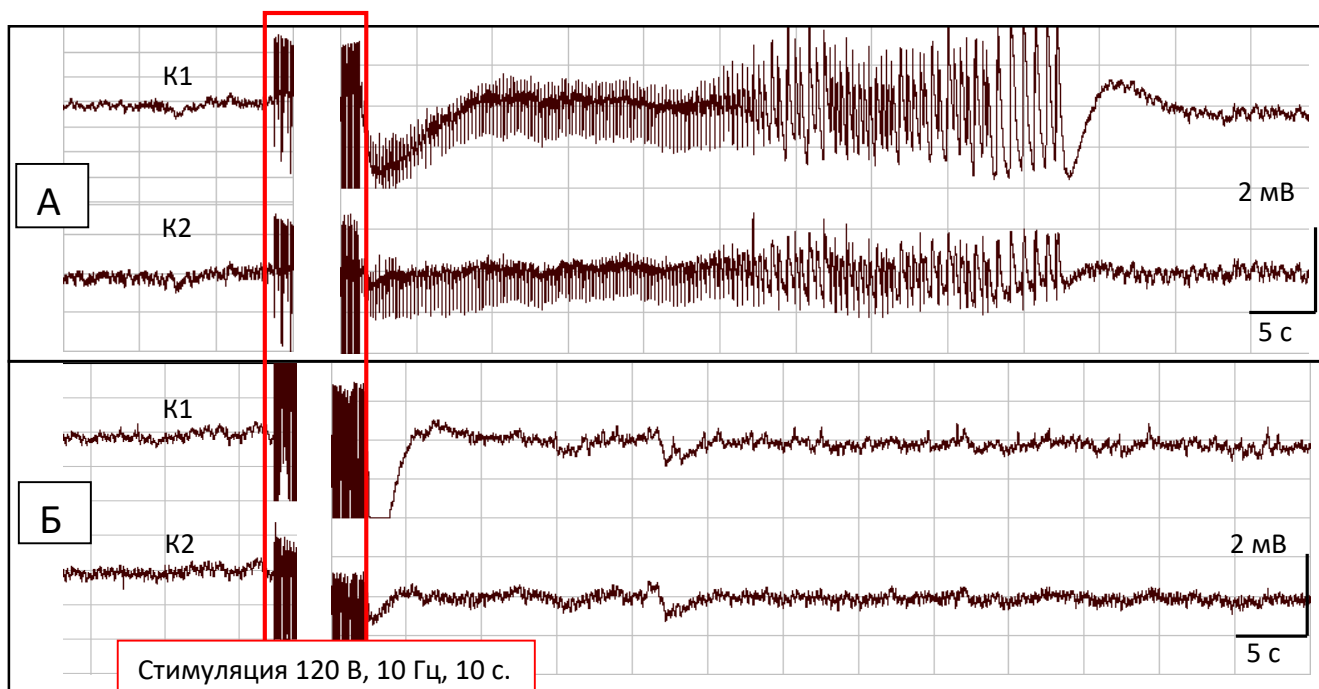
Для более детального анализа спектра действия соединения РУ-1205 была проведена серия электрофизиологических тестов. С использованием метода микроэлектродной регистрации до локальной микроаппликации раствора тестируемого соединения к нейронным колонкам регистрировалась высокоамплитудная тета-частотная (7 Гц) ритмическая активность (рисунок 8А). Площадь под кривой спектральной плотности до применения соединения РУ-1205 составляла  $0,28 \pm 0,1$  и  $0,30 \pm 0,2$   $mV^2$  на К1 и К2 соответственно в диапазоне 1-13 Гц. После введения изучаемого вещества происходило подавление амплитудных характеристик фокальной фоновой ритмики с преобладанием ведущей частоты 5 Гц (рисунок 8Б). Площадь под кривой спектральной плотности сократилась до  $0,12 \pm 0,1$  на К1 и  $0,10 \pm 0,1$   $mV^2$  на К2 ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 8.** Влияние микроаппликации соединения РУ-1205 (3,5 мкМ раствор) на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс. А - фоновая фокальная активность нейронных колонок соматосенсорной коры до применения соединения РУ-1205; Б - ритмическая активность на фоне введения соединения РУ-1205;

**Обозначения:** К1- верхние слои нейронной колонки (500 мкм глубина, погружения); К2- нижние слои той же нейронной колонки (1300 мкм); К3 – нижние слои (1300) нейронной колонки, находящейся на удалении 1000 мкм от К1 и К2.

На модели электрической стимуляции поверхности мозга крыс были получены данные, подтверждающие наличие антиэпилептиформных свойств у соединения РУ-1205 (рисунок 9).

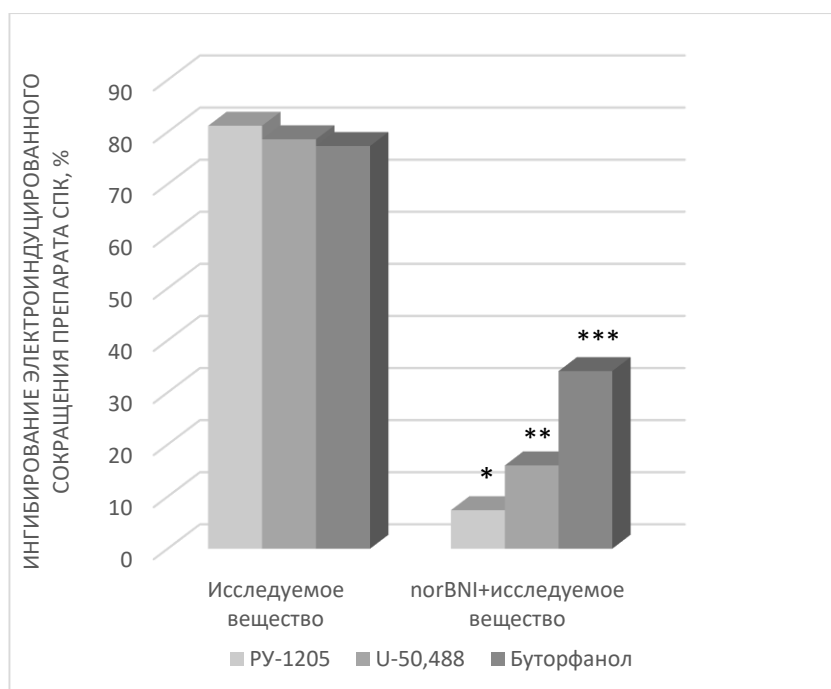


**Рисунок 9.** Влияние соединения РУ-1205 на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга. А – до микроаппликации испытуемого вещества. Б – сразу после микроаппликации соединения РУ-1205 (0,457 мМ раствор) в нейронные колонки соматосенсорной коры крыс.

**Обозначения:** K1 – верхние (500 мкм) и K2 – нижние (1300 мкм) слои соматосенсорной коры крыс.

Электрическая стимуляция верхних (K1) и нижних (K2) слоев нейронной колонки соматосенсорной коры крысы вызывала длительную (более 40 с) эпилептиформную активность как в верхних, так и нижних корковых слоях. Микроаппликация раствора соединения РУ-1205 полностью устраняла развитие эпилептиформной активности после электрической стимуляции поверхности мозга (рисунок 9Б). При этом средние величины статистически значимо отличаются от контрольных показателей ( $p < 0,05$ ).

**В 5 главе** представлены результаты изучения механизма противосудорожного действия соединения РУ-1205. На основании данных, полученных в ранее проведенных исследованиях [Spasov A.A. et al., 2013] был выполнен эксперимент на семявыносящем протоке кролика. Вещество РУ-1205 подавляло вызванные электростимуляцией сокращения в диапазоне наномолярных концентраций. По величине ЭК<sub>50</sub> соединение РУ-1205 было сопоставимо с селективным агонистом каппа-опиоидных рецепторов - U-50,488 и превосходило агонист каппа- и парциальный агонист мю-опиоидных рецепторов - буторфанол тартрат. Эффекты изучаемого вещества угнетались на 91% при введении пог-BNI (1 μM). Также норбиналторфимин блокировал эффекты U-50,488 на 79% и буторфанола на 56%.



**Рисунок 10.** Влияние Nor-BNI на эффекты соединений РУ-1205, U-50,488 и буторфанола тартрата ( $ЭЖ_{80}$ ), связанные с угнетением сокращений изолированного семявыносящего протока кролика, вызванных электростимуляциями.

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к РУ-1205-индуцированным эффектам ( $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни); \*\* - статистически значимо по отношению к U-50,488-индуцированным эффектам ( $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни); \*\*\* - статистически значимо по отношению к буторфанол-индуцированным эффектам ( $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни).

Далее проводилась оценка влияния вещества на ионные токи изолированных нейронов моллюска прудовика ввиду общего принципа строения и функционирования  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  каналов нейронов моллюсков и млекопитающих [Вислобоков А.И. и др. 2010]. Результаты изменений ионных токов нейронов прудовика под действием соединения РУ-1205 в концентрации 1-1000 мкМ представлены в таблице 5.

**Таблица 5.**

Влияние соединения РУ-1205 в различных концентрациях на ионные токи нейронов моллюска прудовика (зависимости «концентрация-эффект»)

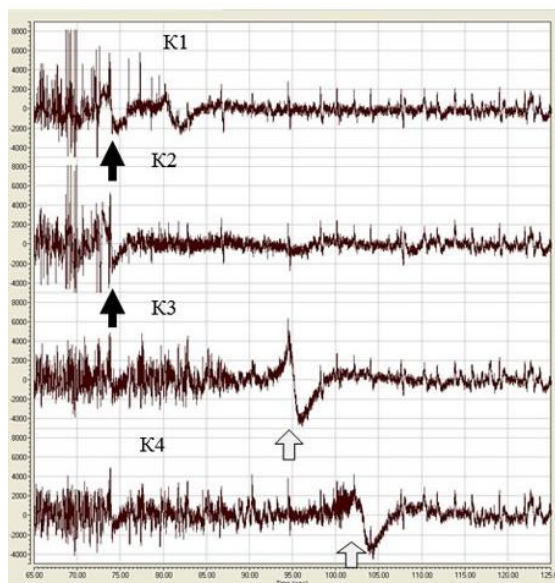
| Ионные токи, статистические параметры | Концентрации соединения РУ-1205 (мкМ) |                |                |                |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                       | 1                                     | 10             | 100            | 1000           |
| INa; $M \pm tm$ , %                   | 100,0 $\pm$ 2,2                       | 96,7 $\pm$ 5,3 | 86,5 $\pm$ 6,3 | 23,0 $\pm$ 7,2 |
| ICa; $M \pm tm$ , %                   | 100,0 $\pm$ 1,3                       | 99,5 $\pm$ 3,1 | 89,6 $\pm$ 6,7 | 41,3 $\pm$ 6,9 |

**Примечание:** INa – амплитуда натриевого тока, ICa – кальциевого, M – среднее значение величины тока (% от исходного) при действии соединения в соответствующей концентрации, tm – доверительный интервал ( $p=95\%$ ).

Соединение РУ-1205 в диапазоне концентраций 1-1000 мкМ обладает выраженным мембранотропным действием на нейроны моллюска прудовика, обратимо подавляя натриевые и кальциевые токи, снижает специфические токи утечки, что также может лежать в основе его

антиконвульсивного действия. При анализе зависимостей «концентрация-эффект» величины ЭК<sub>50</sub> для амплитуд натриевого и кальциевого тока составили 93,5 и 95,7 мкМ соответственно.

При оценке влияния соединения РУ-1205 на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксином, в результате микроаппликации раствора РУ-1205 (на фоне действия пикротоксина) высокоамплитудные эпилептиформные разряды были практически полностью подавлены. Наблюдалось уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 12 раз до  $0,15 \pm 0,1 \text{ мВ}^2$  в диапазоне 1-13 Гц на всех каналах ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 11.** Влияние микроаппликации соединения РУ-1205 (30,5 мкМ) на эпилептиформную активность нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную введением пикротоксина (75 мкМ) на каналах K1 и K2 (обозначено черными стрелками). Белыми стрелками обозначена диффузия соединения РУ-1205 от опытной нейронной колонки (K1 и K2) к контрольной (K3 и K4).

**Обозначения:** K1- верхние слои нейронной колонки (400 мкм глубина погружения); K2- нижние слои той же нейронной колонки (1200 мкм); K3 – верхние слои (400 мкм) и K4 - нижние слои (1500 мкм) нейронной колонки, находящейся на удалении 1700 мкм от K1 и K2.

Влияния микроаппликации соединения РУ-1205 (3,05 мМ) на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную предварительным введением блокатора ГАМК<sub>A</sub>-р рецепторов ТРМРА (6,23 мМ раствор), зарегистрировано не было.

В исследовании *in vivo* был изучен вклад каппа-рецепторного действия в реализацию противосудорожных эффектов соединения РУ-1205 (таблица 6).

У животных, которым вводилось соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг или U-50,488 в дозе 4,1 мг/кг латентный период клонических судорог увеличился в 1,4 и 1,3 раза соответственно, латентный период тонических судорог возрос в 1,6 и 1,4 раза соответственно по сравнению с группой, получавшей растворитель ( $p < 0,05$ ). Предварительное введение Nor-BNI устраняло описанные эффекты, при этом латентные периоды судорог статистически значимо не отличались

от групп контроля, что свидетельствует о существенном вкладе каппа-рецепторного механизма действия в развитии противосудорожных эффектов данных соединений.

**Таблица 6.**

Влияние селективного блокатора каппа-рецепторов nor-BNI (5 мг/кг, и.п.) на противосудорожную активность соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и U-50,488 (4.1 мг/кг, и.п.) на модели судорог, вызванных бикукуллином (5,5 мг/кг, и.п.), ( $M \pm m$ ).

| Группы                  | Латентный период<br>клонических судорог (с) | Латентный период<br>тонических судорог (с) |
|-------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Контроль (растворитель) | 376,2 ± 25,6                                | 632,7 ± 65,8                               |
| Nor-BNI                 | 354,6 ± 30,9                                | 612,8 ± 42,4                               |
| РУ-1205                 | 529,8 ± 47,1*                               | 976,6 ± 74,4*                              |
| Nor-BNI + РУ-1205       | 392,9 ± 24,6                                | 682,2 ± 66,2                               |
| U-50,488                | 486,9 ± 31,9*                               | 913,8 ± 49,5*                              |
| Nor-BNI + U-50,488      | 372,2 ± 29,1                                | 625,6 ± 55,0                               |

**Примечание:** \* - статистически значимые различия с группой контроля и Nor-BNI ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

В тесте судорог с блокатором бензодиазепинового сайта (таблица 7) соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг вызывало статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение латентного периода миоклонических и клонических судорог в 3 и 2,5 раза соответственно по сравнению с контрольными животными, при этом флумазенил за 5 минут до инъекции соединения РУ-1205 незначительно влиял на продолжительность латентного периода миоклонических и клонических судорог. Диазепам в дозе 1 мг/кг также пролонгировал латентный период миоклонических судорог в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) и полностью предотвращал развитие клонических судорог. Данные эффекты диазепама были практически полностью устранены предварительным введением флумазенила до уровня сопоставимого с группой контроля. Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 не взаимодействует с бензодиазепиновым сайтом ГАМК-рецепторов.

**Таблица 7.**

Влияние флумазенила (10 мг/кг, и.п.) на противосудорожную активность соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и диазепама (1 мг/кг, и.п.) на модели судорог, вызванных коразолом (75 мг/кг п.к.), ( $M \pm m$ ).

| Группы              | Латентный период<br>миоклонических судорог (с) | Латентный период<br>клонических судорог (с) |
|---------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Контроль            | 121,8 ± 12,8                                   | 478,6 ± 41,4                                |
| Флумазенил          | 126,3 ± 18,04                                  | 420,3 ± 50,7                                |
| РУ-1205             | 416,3 ± 43,4*                                  | 1280,0 ± 57,7*                              |
| Флумазенил+РУ-1205  | 398,6 ± 57,8*                                  | 1193,0 ± 68,0*                              |
| Диазепам            | 443,1 ± 61,9*                                  | -                                           |
| Флумазенил+диазепам | 136,0 ± 23,2                                   | 515,3 ± 28,2                                |

**Примечание:** \* - статистически значимые различия с группой контроля и флумазенила ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

Учитывая, что противосудорожные средства действуют на уровне различных нейромедиаторных систем мозга, целесообразным представлялось изучение влияния нового соединения на эффекты ряда нейромедиаторных анализаторов [Воронина Т.А., 2012]. В

исследованиях с использованием различных анализаторных веществ, селективно влияющих на отдельные нейромедиаторные системы, было установлено, что соединение РУ-1205 реализует свои эффекты с вовлечением моноаминергической и ГАМК-ергической нейромедиаторных систем. Исследуемое вещество в дозе 10 и 30 мг/кг, и.п. снижает фенаминовую гиперактивность мышей и устраняет гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном.

**В шестой главе** приведены результаты изучения сопутствующих, нежелательных и общетоксических эффектов соединения РУ-1205. Одной из главных проблем в применении многих антиконвульсивных средств является развитие толерантности к противосудорожному эффекту, феномен «рикошета» и синдром отмены [Beghi E. et al., 2013]. Большинство противосудорожных препаратов имеют узкую широту терапевтического действия и обладают выраженными токсическими свойствами, поэтому изучение токсического действия и характера изменений, приводящих к гибели животных, является важным этапом фармакологического исследования новых соединений [Арзамасцев Е.В., 2012].

На данном этапе исследования была проведена оценка развития толерантности и синдрома «рикошета» при хроническом введении соединения РУ-1205 и препарата сравнения диазепама. Результаты эксперимента представлены в таблице 8.

**Таблица 8.**

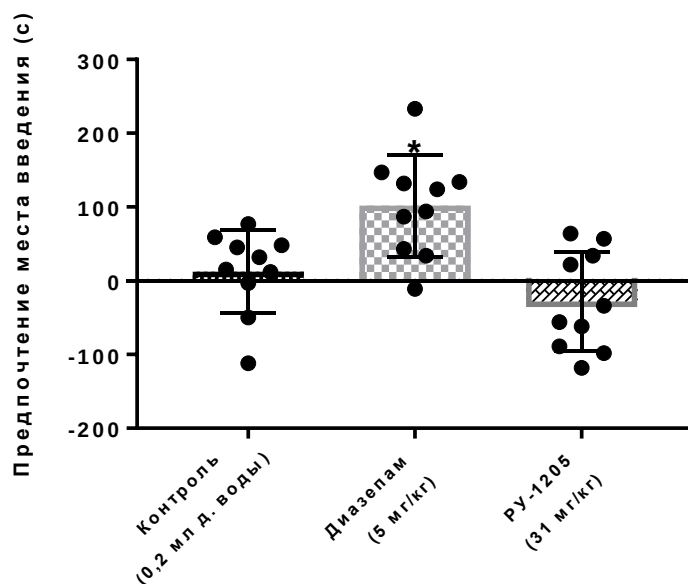
Влияние соединения РУ-1205 (31 мг/кг, и.п.) и диазепама (5 мг/кг, и.п.) на уровень судорожного порога в эквиваленте коразола (мг/кг) за день до хронического введения изучаемых соединений, на 1, 7 и 14 день хронического введения, на 2, 4 и 7 дни после отмены хронического введения противосудорожных веществ ( $M \pm m$ ).

| Группы      | Исходный уровень порога | Уровень порога на фоне хронического ведения изучаемых веществ или растворителя |            |            | Уровень порога после отмены |           |          |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------------------------|-----------|----------|
|             |                         | 1                                                                              | 14         | 28         | 2                           | 4         | 7        |
| 1. Контроль | 29,2±6,2                | 30,1±5,2                                                                       | 29,6±5,0   | 29,1±5,5   | 28,9±4,8                    | 28,7±5,3  | 28,1±6,0 |
| 2. РУ-1205  | 29,5±6,2                | 87±5,0*                                                                        | 84,0±4,9*  | 83,5±6,7*  | 26,3±5,9                    | 26,4±3,6  | 27,2±4,3 |
| 3. Диазепам | 30,7±4,6                | 93,4±5,4*                                                                      | 73,8±5,1*# | 61,6±5,0*# | 23,0±4,5*                   | 23,4±4,5* | 24,6±5,0 |

**Примечание:** \* – статистически значимые различия по сравнению с группой контроля в тот же день ( $p \leq 0,05$ , критерий Манна-Уитни); # – статистически значимые различия по сравнению с первым днем введения ( $p \leq 0,05$ , тест Вилкоксона для зависимых выборок).

В результате проведенного исследования было установлено, что антиконвульсивный эффект соединения РУ-1205 в дозе 31 мг/кг не снижается при хроническом применении и отсутствуют признаки синдрома отмены после прекращения введения, в отличие от препарата сравнения диазепама, у которого в дозе 5 мг/кг наблюдалось выраженное развитие толерантности к противосудорожному эффекту и синдром «рикошета», проявляющийся снижением судорожного порога по сравнению с контрольными животными.

Методика формирования условного рефлекса предпочтения или избегания места направлена на выявление аддиктивной или аверсивной активности веществ соответственно [Terashvili M. et al., 2008]. После 4 дней обучения, в ходе заключительного тестирования было установлено, что вещество РУ-1205 в дозе 31 мг/кг и.п. не вызывало статистически значимого предпочтения/избегания какого-либо из отсеков камеры, что соответствовало результатам контрольной группы животных (рисунок 12).



**Рисунок 12.** Влияние соединения РУ-1205 (31 мг/кг, и.п.) на время нахождения мышей в отсеках установки для исследования реакции предпочтения места ( $M \pm SD$ ).

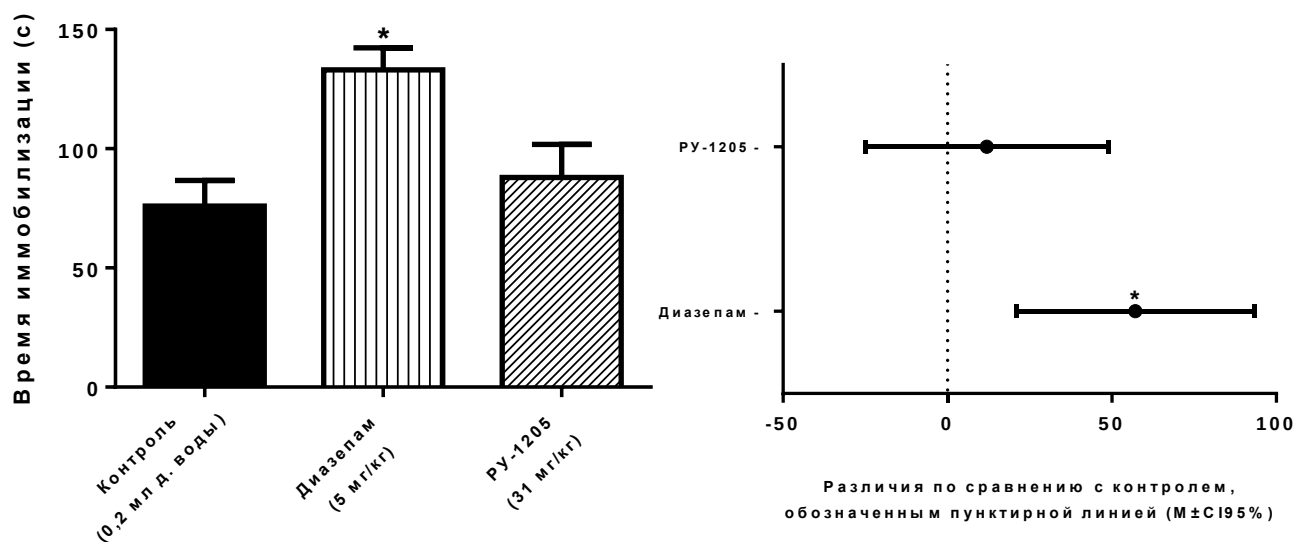
**Примечание:** \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

Опытные животные проводили на  $101,7 \pm 68,9$  секунд больше времени ( $p \leq 0,05$ ) в отсеке, ассоциированным с введением диазепама (5 мг/кг, и.п.), что является предиктором формирования патологического влечения к данному веществу.

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение РУ-1205, в отличие от диазепама, не проявляет активность на модели изучения вторично-подкрепляющего действия.

Тест форсированного неизбежного плавания позволяет сделать предположение о наличии психодепрессивной или антидепрессивной активности веществ [Porsolt R.D., 1979]. Принудительное плавание в контрольной группе животных вызывало реакцию иммобилизации, продолжительность которой составляла  $75,9 \pm 10,8$  секунд, что соответствовало 25% от общей продолжительности сессии.

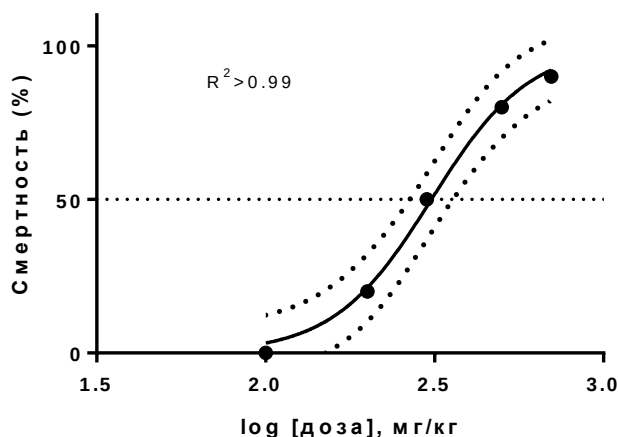
Диазепам в дозе 5 мг/кг и.п. вызывал выраженную седацию и статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) повышал время иммобилизации до  $133,1 \pm 9,6$  секунд, что согласуется с литературными данными [El Zahaf N. A., 2014]. Среднее время иммобилизации у животных, получавших соединение в дозе 31 мг/кг и.п. составило  $87,9 \pm 13,9$  секунд и статистически не отличалось от группы негативного контроля (рисунок 13).



**Рисунок 13.** Влияние соединения РУ-1205 и диазепама (при и.п. введении) на длительность иммобилизации у мышей (n=10) в эксперименте «форсированное неизбежное плавание» ( $M \pm m$ ).

**Примечание:** \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Данна).

Исследование острой токсичности были выполнены на мышах. На рисунке 14 представлена зависимость количества погибших животных (в %) от логарифма дозы вещества РУ-1205 выраженной в мг/кг через 14 суток после интраперитонеального введения.



**Рисунок 14.** Гибель мышей самцов через 14 суток после однократного интраперитонеального введения вещества РУ-1205 в возрастающих дозах.

**Примечание:** Пунктирными линиями вдоль кривой обозначены предсказательные интервалы 95%.

Результат изучения острой токсичности вещества РУ-1205 позволяет отнести его к классу малотоксичных соединений, что в свою очередь существенно повышает его терапевтический потенциал, поскольку большинство противосудорожных препаратов обладают высокой токсичностью и имеют узкий терапевтический коридор [Johannessen S. I. et al., 2003].

В ходе изучения нейротоксикологических свойств вещества РУ-1205 с использованием системы многотестового наблюдения по Ирвину было установлено, что изучаемое соединение при однократном интраперитонеальном введении в дозах до 50 мг/кг не вызывает существенных изменений функционального состояния вегетативной нервной системы и эмоционального



статуса экспериментальных животных. При этом незначительное угнетение ипсилатерального и слухового рефлексов, снижение ректальной температуры, снижение длительности удержания на вращающемся стержне, горизонтальной и вертикальной двигательной активности наблюдалось только после введения соединения РУ-1205 в дозах, превышающих эффективные противосудорожные дозы.

**Седьмая глава** посвящена обсуждению полученных результатов. В ходе работы было установлено, что производные N<sub>9</sub>-замещённые имидазо[1,2-α]бензимидазола являются перспективным классом веществ с точки зрения поиска новых противосудорожных средств, что согласуется с литературными данными [Shingalapur R. V., 2010; Jain P., 2010; Rajak H., 2015].

Принимая во внимание полученные результаты, в качестве объектов исследования на модели судорог, вызванных коразолом были выбраны 15 наиболее перспективных веществ, имеющих высокие прогнозные оценки в отношении противосудорожной активности ( $P_a > 20$ ,  $P_i < 10\%$ ). По итогам экспериментального исследования *in vivo* изученные соединения проявили различный уровень антиконвульсивной активности, среди них у 40% животных блокировали клонические судороги продолжительностью более 3 сек соединения под лабораторными шифрами РУ-285, РУ-1204 и РУ-1203 в дозе 10 мг/кг, и.п. Вещество РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) предотвращало судороги у 50% опытных животных, при этом препарат сравнения вальпроат натрия показал сопоставимый уровень противосудорожной активности в дозе 130 мг/кг, и.п.

По результатам направленного поиска было выбрано наиболее перспективное соединение РУ-1205, которое вызывало дозозависимое противосудорожное действие на модели судорог с коразолом, превосходя препарат сравнения вальпроат натрия по активности в 12,7 раз, а также по величине протективного и терапевтического индекса в 3,2 и 8,6 раз соответственно.

Новое соединение обладало высоким уровнем противосудорожной активности на острых и хронических моделях эпилептогенеза (таблица 9).

**Таблица 9.**

Эффективность соединения РУ-1205 на различных моделях эпилептогенеза

| Модель                                   | Эффективность |
|------------------------------------------|---------------|
| <i><b>Острые модели</b></i>              |               |
| Судороги, вызванные коразолом            | +             |
| Максимальный электрошок                  | +             |
| Судороги, вызванные пикротоксином        | +             |
| Судороги, вызванные бикикуллином         | +             |
| Судороги, вызванные изониазидом          | —             |
| Судороги, вызванные стрихнином           | —             |
| Судороги, вызванные 4-аминопиридином     | —             |
| Судороги, вызванные N-метил-D-аспартатом | +             |
| <i><b>Хронические модели</b></i>         |               |
| Киндлинг прогрессия с коразолом          | +             |
| Судороги, вызванные отменой алкоголя     | +             |

Аналогичные результаты на моделях коразоловых судорог и максимального электрошока были получены в отношении схожего производного имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1203 [Гречко О.Ю., 2012].

При изучении механизма действия, в согласии с ранее проведенными исследованиями [Spasov A. A. et al., 2012], соединение проявляло каппа-рецепторный профиль биологической активности. Наряду с этим установлено взаимодействие с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами и угнетение кальциевых и натриевых токов, что является важными точками приложения в лечении судорожных состояний [Porter R. J. et al., 2012]. Изучаемое соединение не вызывало выраженных токсических эффектов, не проявляло вторично-подкрепляющих и психодепрессивных свойств в диапазоне эффективных доз, а также не индуцировало развитие синдрома отмены и «фрикошета» после прекращения введения, что благоприятно отражается на его терапевтическом потенциале.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компьютерный анализ биологической активности и результаты направленного поиска *in vivo* позволяют заключить, что производные имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола являются перспективным классом веществ для поиска новых противосудорожных средств. В ходе исследований было установлено, что наиболее активное соединение РУ-1205 проявляет широкий спектр противосудорожной активности на различных моделях электроиндуцированных и хемоиндуцированных судорог. Было показано, что в тесте с коразолом соединение РУ-1205 превышает по показателям терапевтического и протективного индекса препарат сравнения вальпроат натрия, а на модели максимального электрошока изучаемое вещество было сопоставимо по активности с карбамазепином. Электрофизиологические методы позволили установить депримирующее влияние соединения РУ-1205 на нейроны соматосенсорной коры крыс. В отношении механизма действия на модели судорог, вызванных бикукуллином, с применением специфического блокатора каппа-опиодных рецепторов *por*-BNI и препаратах семявыносящего протока кролика, было выявлено взаимодействие с каппа-опиоидными рецепторами. Исследование биологической активности на моделях *in vivo* с использованием анализаторов нейромедиаторных систем позволило установить способность вещества РУ-1205 модулировать моноаминергические системы. Влияние на кальциевые и натриевые токи было выявлено с применением метода *patch clamp* на нейронах моллюска прудовика большого. Нейротоксикологические исследования показали, что тестируемое соединение относится к классу малотоксичных веществ, не вызывает развития привыкания, аверсии, депрессии, толерантности, эффекта «фрикошета» и признаков синдрома отмены после прекращения хронического введения.

## ВЫВОДЫ

1. N<sub>1</sub>, N<sub>9</sub>-замещенные 2-галогенофенилимидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолы являются перспективным классом химических соединений для поиска структурно новых веществ с противосудорожной активностью.

2. Наиболее важный вклад в противосудорожное действие исследуемых веществ вносит скаффолд имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола, а также морфолино- и пирролидиноэтильные заместители в положении N<sub>9</sub> и 4-галогенфенильный фрагмент у 2 атома углерода гетероциклического ядра.

3. Соединение РУ-1205 при интраперитонеальном введении белым нелинейным мышам оказывает выраженное дозозависимое противосудорожное действие и превосходит по эффективности, показателям терапевтической широты, протективного индекса препарат сравнения вальпроат натрия в 12,7; 8,6 и 3,2 раза соответственно в тесте антагонизма с коразолом. На модели максимального электрошока исследуемое вещество равно по уровню антиконвульсивной активности карбамазепину и превосходит референтный препарат по величине терапевтического индекса в 3,4 раза.

4. Изучаемое соединение проявляет широкий спектр антиконвульсивной активности, эффективно устраняет судорожные явления на различных острых: индуцированных коразолом (TID<sub>50</sub>=7,9 мг/кг внутривенно и превосходит по этому показателю референтный препарат вальпроат натрия в 15 раз), бикикуллином (в дозе 10 мг/кг интраперитонеально пролонгирует латентный период клонических и тонических судорог на 41; 60% соответственно); пикротоксином (дозозависимо уменьшает продолжительность тремора, увеличивает латентный период тремора и клонических судорог, снижает частоту судорог, максимально в дозе 20 мг/кг интраперитонеально в 3; 1,2; 1,4 и 1,6 раза соответственно) и NMDA (дозозависимо устраняет вращательное поведение животных, максимально на 38% по сравнению с контрольными значениями), а также хронических моделях эпилептогенеза: киндлинг прогрессии с коразолом (в дозе 10 мг/кг интраперитонеально в 1,8 раза уменьшает тяжесть судорожных явлений и сокращает гибель животных на 40%) и судороги, вызванные отменой алкоголя (в дозе 10 мг/кг при интраперитонеальном введении подавляет судорожную активность до 0,2 баллов по шкале НИС, при 4,2 балла в контроле).

5. В электрофизиологических тестах соединение РУ-1205 после локальной внутрикорковой микроаппликации (в концентрациях 3,5; 30,5 и 0,457 мкМ соответственно) оказывает депримирующее воздействие на формирование фоновой фокальной активности нейронных колонок соматосенсорной коры крыс (уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 2,3 и 3 раза в диапазоне 1-13 Гц в верхних (K<sub>1</sub>) и нижних (K<sub>2</sub>) корковых слоях соответственно), а также эпилептиформных спайков, вызванных пикротоксином

(уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 12 раз в диапазоне 1-13 Гц на  $K_1$   $K_2$  каналах) или электрической стимуляцией (120 В, 10 Гц, 10 с) поверхности мозга крыс (полное восстановление амплитудно-частотных параметров осцилляций фокального потенциала).

6. Противосудорожное действие соединения РУ-1205 реализуется за счет каппа-опиоидных рецепторных механизмов: концентрационнозависимо и  $\mu$ orBNI-обратимо предотвращает электроиндуцированные сокращения изолированного семявыносящего протока кролика ( $ЭК_{50}=2$  нМ); а также  $\mu$ orBNI-обратимо ингибирует судороги, вызванные бикикуллином; модулирует активность ГАМК- и глутаматергической систем, подавляет трансмембранные ионные токи натрия ( $ЭК_{50} = 93,5$  мкМ) и кальция ( $ЭК_{50} = 95,7$  мкМ).

7. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 1-31 мг/кг интраперитонеально подавляет фенаминовую гиперактивность, 5-гидрокситриптофановый гиперкинез у мышей, максимально на 57,8 и 65,2% соответственно. Исследуемое вещество не влияет на эффекты L-ДОФА, галоперидола, резерпина, ареколина и никотина.

8. В отличие от диазепама (5 мг/кг интраперитонеально), в исследованиях по изучению порога коразоловых судорог, соединение РУ-1205 ( $ТID_{200}=31$  мг/кг интраперитонеально) при хроническом введении (28 дней) не вызывает толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и признаков абстиненции. В тестах условной реакции предпочтения/избегания места, а также неизбежного форсированного плавания не проявляет вторично-подкрепляющих и психодепрессивных свойств.

9. В соответствии с классификацией по И.В. Саноцкому (1975) соединение РУ-1205 относится к классу малотоксичных ( $ЛД_{50}=309,6$  мг/кг интраперитонеально).

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С учетом выраженности противосудорожного действия и низкой токсичности соединения РУ-1205 - гидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола, целесообразно дальнейшее расширенное доклиническое его изучение в качестве потенциального антиконвульсанта.

2. Рекомендуется продолжить поиск новых соединений с противосудорожными свойствами в ряду галогенфенил замещенных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Спасов, А. А. Изучение взаимодействия соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем / А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, Д. М. Штарёва, А. И. Ращенко, **К. Ю. Калитин**, Р. А. Литвинов // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №2 (50). – С. 120

2. Спасов, А. А. Противозепилептическая активность нового производного бензимидазола РУ-1205 / А.А. Спасов, **К.Ю. Калитин**, О.Ю. Гречко, В.А. Анисимова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – №. 9. – С. 320.

3. Калитин, К.Ю. Противосудорожная активность соединения РУ-1205 на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя / **К.Ю. Калитин**, О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – №. 4. – С. 3-5.

4. Васильев, П.М. Направленный поиск соединений с противосудорожной активностью в ряду производных бензимидазола / П.М. Васильев, **К.Ю. Калитин**, А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, В.В. Поройков, Д.А. Филимонов, В.А. Анисимова // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – №. 12. – С. 3-8.

5. Гречко, О.Ю. Судорожный порог, феномен «отдачи» и развитие толерантности к противосудорожному эффекту соединения РУ-1205 и диазепама / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, **К.Ю. Калитин**, О.Н. Жуковская, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79. – №. 12. – С. 3-6.

6. Калитин, К.Ю. ГАМКергический механизм противосудорожного эффекта соединения РУ-1205 / **К.Ю. Калитин**, А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, А. Г. Сухов, А. И. Вислобоков, В.А. Анисимова, А.Е. Матухно // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – №. 11. – С. 582-588.

7. Калитин, К.Ю. Противосудорожная и мембранотропная активность соединения РУ-1205 / **К.Ю. Калитин**, А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, А. Г. Сухов, А. И. Вислобоков, В.А. Анисимова, А.Е. Матухно // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т80. – №9. – С.28-34.

8. Спасов, А. А. Рецептор-зависимые механизмы противосудорожного действия производного бензимидазола РУ-1205 в сравнении с диазепамом и U-50,488 / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, **К.Ю. Калитин**, В.А. Анисимова//Экспериментальная и клиническая фармакология.–2018–Т81– №2– С3-6.

*Статьи в журналах и сборниках материалов конференций*

1. Поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных бензимидазола / **К.Ю. Калитин** // Тезисы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». – Волгоград, 2012. – С. 179.

2. Противозипелептическая активность новых производных бензимидазола / **К.Ю. Калитин** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 71-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 244.

3. Изучение противосудорожного действия нового производного бензимидазола РУ-1205 на модели генерализованных судорог, вызванных бикикуллином / **К.Ю. Калитин**, Р. А. Литвинов // XVIII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 20.

4. Острое влияние на дыхание и хроническая анальгетическая толерантность при интраперитонеальном введении нового каппа-агониста РУ-1205 и буторфанола / Р. А. Литвинов, **К.Ю. Калитин** // XVIII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 24.

5. Влияние нового производного бензимидазола РУ-1205 на латентный период судорог с бикикуллином / **К.Ю. Калитин** // Материалы V Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH 2013. - Москва, РУДН. 2013. – С. 158.

6. Изучение влияния нового производного бензимидазола (РУ-1205) на N-метил-D-аспартат-индуцированные судороги / **К.Ю. Калитин** // Вестник ВолгГМУ. Приложение: Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств». – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – С. 74.

7. Противосудорожные свойства нового производного бензимидазола РУ-1205 на модели судорог, вызванных стрихнином / **К.Ю. Калитин** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – С 25-26.

8. Влияние нового производного бензимидазола (соединение - 05) на вращательное поведение мышей, N-метил-D-аспартатом / **К.Ю. Калитин** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. - Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. - С. 319-320.

**КАЛИТИН КОНСТАНТИН ЮРЬЕВИЧ**

**ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПАРАГАЛОГЕНФЕНИЛ  
ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА**

**14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Подписано в печать \_\_\_\_\_ г. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.  
Печать трафаретная. Печ. Л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ №\_\_\_\_.

Отпечатано в типографии издательства «ВолгГМУ»  
400006, г. Волгоград, ул. Дзержинского, 45