

АГАЦАРСКАЯ ЯНА ВЛАДИМИРОВНА

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ «Волгоградский Медицинский Научный Центр».

Научный руководитель:

СПАСОВ АЛЕКСАНДР АЛЕКСЕЕВИЧ

академик РАН, з.д.н. РФ, профессор,
д.м.н., заведующий кафедрой
фармакологии и биоинформатики
ВолГМУ

Научный консультант:

ЯКОВЛЕВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

д.м.н., доцент кафедры фармакологии и
биоинформатики ВолГМУ

Официальные оппоненты:

1. МИРЗОЯН РУБЕН СИМОНОВИЧ

з.д.н. РФ, д.м.н., профессор, заведующий
лаборатории цереброваскулярных
расстройств ФГБНУ НИИ Фармакологии
им. Закусова

2. МАНВЕЛЯН ЭЛЕОНОРА АСЛИБЕКОВНА

д. фарм. н., профессор кафедры фармации
Института живых систем ФГАОУ ВО
«Северо-Кавказский федеральный
университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Защита диссертации состоится «__»_____2019г. в _____ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 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» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1. и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «__»_____2019г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
Доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день показатели распространенности мигрени в мире, по данным ВОЗ, превышают 10%, что составляет более 750 млн человек. При этом, проблема адекватной терапии мигрени является одной из наиболее приоритетных в лечении первичных головных болей (Гусев Е.В. и др. Неврология. Национальное руководство. Краткое издание М. 2018. 880 с.; Амелин А.В. и др. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия. М. 2014. 256 с.; Osipova V.V. et al. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2018. Т. 48. № 5. С. 621-635.). Несмотря на прогресс в исследовании путей формирования мигренозных приступов, лечение мигрени, все еще остается малоэффективным и недостаточным (Амелин А.В. и др. Мигрень...2014; Osipova V.V. et al...2018). В связи с этим одним из актуальных направлений является создание и разработка новых лекарственных средств (Мирзоян Р.С. и др. Бюлл. сибирск. мед. 2006. Прил.2. С. 55-57; Петров В.И. и др. Фундаментальные и прикладные достижения ученых ВолгГМУ в области фармакологии. Волгоград, 2012).

На сегодняшний день создание новых лекарственных средств для лечения мигрени представлено несколькими направлениями: разработка более эффективных и менее токсичных агонистов 5-НТ₁ рецепторов (триптанов), разработка антагонистов CGRP-рецепторов (рецепторов кальцитонин-ген родственного пептида) и создание новых лекарственных средств – антагонистов 2А-подтипа серотониновых рецепторов. При этом, терапия триптанами остается недостаточно эффективной, рецидив мигренозной боли может возникнуть у 15–40% пациентов, а повторное введение триптанов возможно не ранее чем через 6 часов (Antonaci F. et al. Springerplus. 2016. Vol.5: P.637.). Длительное применение антагонистов CGRP-рецепторов ограничено, т. к. препараты данной группы повышает уровень печеночных трансаминаз (Edvinsson L. *CNS Drug Rev*. 2005 Vol.11. №1. P.69-76). Помимо этого, как триптаны, так и антагонисты CGRP-рецепторов оказывают влияние лишь на некоторые компоненты патогенеза мигрени, не затрагивая тромбоцитарное звено. В связи с этим, одним из наиболее приоритетных направлений остается разработка 5-НТ_{2А}-антагонистов.

Степень разработанности. Исследованием серотонинового компонента мигрени посвящен ряд работ как зарубежных авторов (Okumar H. Et al. Springerplus. 2013 Vol.29. P.573; Murphy M. et al. 1992. *Neur. Bio. Sci*. Vol. 4. P.934–958; Attanasio A. Et al. *Neurology*. Vol.54. P.1382–1385), так и отечественных исследователей (Мирзоян Р.С. и др... 2006; Амелин А.В. и др. Мигрень...2014). Было показано, что несколько подтипов серотониновых рецепторов вовлечены в патогенез мигрени, а именно 1 (Ferrari M. et al. *Lancet*. 2001 Vol.17. P. 1668-75.), 2 (Gan'shina T.S. et al. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. Vol. 50. № 1. P. 19-23.) и 7(Wang X. et al. *Headache*. 2010 Vol.50. №4. P.579-87). Тем не менее, ряд авторов выделяет именно 2А-подтип серотониновых рецепторов, как один из ключевых звеньев патогенеза мигрени (Kalkman W. et al. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1997 Vol.17. № 2. P.75-7; Herman A. et al. *Mol Pharmacol*. 2018 Vol.94. №6. P.1363-1370) вовлеченных во все существующие теории патогенеза мигрени.

В исследованиях, проводимых на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, при совместном участии сотрудников Научно-исследовательского института Физической и органической химии Южного Федерального университета, была показана перспективность класса конденсированных азолов, в качестве потенциальных биологически активных веществ (Анисимова В.А. и др. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010. Т. 44. № 3. С. 8-13.). Учитывая тот факт, что молекулы серотонина и бензимидазола являются биоизостерами, были проведены исследования по изучению возможности влияния производных бензимидазола на серотониновые рецепторы (Черников М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ. Волгоград, 2008; Анисимова В.А. и др... 2010) и проявления ими ряда фармакологических свойств (Suzdalev K.F et al. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. Vol. 47. № 3. P. 125-129.). В дальнейшем наибольший интерес уделялся группе производных имидазобензимидазолов, для которых были показаны антисеротониновые и противомигренозные свойства (Яковлев Д.С. Конденсированные азолы - новый класс лигандов серотониновых рецепторов. Волгоград, 2016)

В ряде работ посвященных исследованию свойств имидазо[1,2-а]бензимидазолов была показана активность в отношении 5-НТ_{2А}-рецепторов (Яковлев Д.С. и др. Материалы XXII съезда физиологического общества имени И.П. Павлова Тезисы докладов. Волгоград. 2013. С. 615.). Были синтезированы различные соли: 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола. Для данных соединений был показан высокий уровень 5-НТ_{2А} активности на модели изучения активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния (Мальцев Д.В. и др. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2014. № S. С. 78-79; Яковлев Д.С. Конденсированные ...2016) и проведены исследования токсических свойств. На полученные соединения был получен патент (Патент РФ № 2465901) На этапе направленного поиска было найдено соединение, РУ-476, с высокой 5-НТ_{2А}-антагонистической активностью. При дальнейшей разработке возникла необходимость в

модификации структуры, для уменьшения явления деградации при длительном хранении.

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

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

Задачи исследования.

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

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

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

Впервые был исследован антиагрегантный профиль соединения РУ-31 в условиях моделирования агрегации *in vitro*. Установлено, что для данного соединения характерна способность устранять агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами. В зависимости от типа использованного индуктора, величина антиагрегантного действия уменьшается в следующем порядке: серотонин > А23187 > АДФ > адреналин > коллаген > ристоцетин.

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

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

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

Методология и методы исследования. В связи с поставленными задачами выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. Блок электрофизиологических исследований был выполнен в лаборатории Inserm INMED U1249 г. Марсель, Франция, на основании методик, описанных в работах Хазипова Р.Н. (Juzekaeva E. european journal of clinical investigation. 2018. P. 103.). В качестве объектов исследования использованы кролики-самцы породы «Шиншилла», а также половозрелые нелинейные самцы и самки мышей и крыс. Исследование антимигренозных свойств соединения РУ-31 проведено согласно

методическим рекомендациям по доклиническому изучению противомигренозной активности лекарственных средств (Мирзоян Р.С. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ред. Миронов А.Н Ч.1. М., 2012. С.478-485) с использованием методов статистической обработки данных в ПО GraphPad Prism v.5.0.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Исходя из совокупности показателей острой токсичности, рецепторной активности и физико-химических свойств, дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (соединение РУ-31) – является наиболее перспективным для дальнейших расширенных доклинических исследований в качестве нового противомигренозного средства с 5-HT_{2A} - антагонистическим профилем и не влияет на 5-HT₃ и 5-HT₄ рецепторы.
2. Соединение РУ-31 устраняет серотонин-опосредованное изменение мозговой гемодинамики, оказывает антиромбогенные, и анальгетические эффекты.
3. Для соединения РУ-31 характерно серотонин-опосредованное ГАМК-миметическое действие в СА1 и СА3-зонах гиппокампа, умеренное М-холиноблокирующее действие.

Внедрение результатов исследования. Полученные данные об антисеротониновой активности новых солей имидазобензимидазола используются при синтезе новых веществ в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов на Дону). В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, ГБУ Волгоградского медицинского научного центра, кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к изучению противомигренозных свойств веществ, внедрена технология исследования активности нейроцитов головного мозга методами patch-clamp. Результаты работы включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, кафедрах фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, проведенных на кроликах, мышах и крысах, с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противомигренозной активностью, а также критериев статистической обработки данных.

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

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

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и механизма антимигренозного действия новой неорганической соли - дигидрохлорида 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – соединения РУ-31: решения поставленных задач и обсуждения результатов. Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и оформление рукописи.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста

и состоит из введения, восьми глав, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 33 таблицами. Библиографический указатель включает 119 источников, из них 43 отечественных, 76 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор отечественных и зарубежных источников литературы. В первом разделе описаны основные гипотезы патогенеза мигрени и существующие концепции при создании новых противомигренозных средств, в основе разделения которых лежат принципы доказательной медицины, включающие эффективность и побочное действие. Второй раздел посвящен потенциальным мишеням для терапии мигрени, с акцентом на 2A подтип серотониновых рецепторов. В заключительном разделе рассмотрена перспективность использования класса имидазо[1,2-а]бензимидазолов в качестве потенциальных антисеротониновых агентов и описаны основные достижения в области изучения их свойств.

Во второй главе диссертации подробно описаны материалы и методы исследования. Объектом исследования послужили 3 неорганических соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола, синтезированных в НИИ Физической и органической химии Южного Федерального университета к.х.н. О.Н. Жуковской и к.х.н. В.А. Анисимовой.

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 175 нелинейных крысах-самцах массой 250-320 г (ООО «НИЦ БМТ»), 25 нелинейных крысах-самках массой 220-240 г (ООО «НИЦ БМТ»), 70 нелинейных мышах обоего пола массой 20-30 г (ООО «НИЦ БМТ»), 12 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (ИП Бабичева Т.М.)

Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92, 1992). Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015) и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г).

Влияние соединения РУ-31 на спазмогенную активность серотонина (5-НТ_{2A}-рецепторы) изучали на препарате изолированного рога матки крыс по методике Блаттнера Р. (Блаттнер Р. и др. М.: Мир, 1983. - 208 с.) на бане для изолированных органов Ugo Basile (Италия). Индуктором сократительной активности был серотонин (0,1 нМ – 100 мкМ). Препаратом сравнения был выбран ципрогептадин. 5-НТ₃-антагонистическую активность изучали с использованием вышеуказанной методологии. В качестве тест-системы была выбрана изолированная подвздошная кишка морских свинок, а в качестве препарата сравнения – ондансетрон. 5-НТ₄-свойства изучали на изолированном пищевode крыс. В качестве индуктора сократительного ответа использовали карбохолин (1 мкМ) а расслабление пищевода вызывали серотонином (10 мкМ). Препаратом сравнения был выбран селективный 5-НТ₄ агонист - ML-10302.

Сосудистые эффекты соединения РУ-31 и ципрогептадина изучали на половозрелых крысах самцах 250-300 г., по методике изучения противомигренозного действия новых лекарственных средств (Мирзоян Р.С. и др...2012). Соединение РУ-31 и ципрогептадин исследовались в диапазоне доз от 0,5 мг/кг до 30 мг/кг в проекции средней мозговой артерии и в среднеэффективной дозе (10 и 14 мг/кг соответственно) в системе внутренней сонной артерии.

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов *in vitro* изучалось по методу в модификации Габбасова В.А. (Лаб. дело. 1989. №10. С.15-18). Соединение РУ-31, ацетилсалициловая кислота и ципрогептадин изучались в концентрациях 10 мкмоль/л. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали серотонин (Sigma, США) - 10 мкмоль/л, АДФ (Sigma, США) - 5 мкмоль/л, коллаген (Sigma, США) - 20 мкг/мл, адреналин (Sigma, США) - 1 мкмоль/л, A23187 (Sigma, США) - 3 мкмоль/л и ристоцетин (Sigma, США) - 1,25 мг/мл.

Антитромботическую активность соединения РУ-31 исследовали на моделях тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) и воздействием электрического тока. Эксперименты проводили на крысах-самцах через 1 час после внутрижелудочного введения соединения РУ-31 или ципрогептадина в дозах 10 и 14 мг/кг соответственно, согласно методам Kurz K.D. (Thromb. Res. 1990. Vol.15. P.269-280) и Guglielmi G. ((J. Neurosurg. 1991. Vol.75. P.1-7) соответственно.

Детализации нейрорецепторных механизмов действия *in vitro* проводилась в отношении Н₁ гистаминовых рецепторов, М-холинорецепторов и ГАМК-рецепторов. Влияние соединения РУ-31 на

спазмогенную активность гистамина (H_1 -гистаминорецепторы) и ацетилхолина (M-холинорецепторы) изучали на препарате изолированной подвздошной кишки морских свинок по методике Блаттнера с соавт (Блаттнер Р. и др... 1993). Для оценки гистаминблокирующих свойств, соединение РУ-31 и препарат сравнения – хлоропирамина гидрохлорид вводили в концентрации 1 мкМ. Для оценки холинблокирующих свойств соединения РУ-31 и препарат сравнения атропин вводили в концентрациях 0,01 - 10 мкМ и 1-10 мкМ соответственно.

Влияние соединения РУ-31 на нейроны гиппокампа изучали с использованием технологии локальной фиксации потенциалов на установке Axon CNS (США) с цифровым преобразователем Digidata A1440 series (Axon CNS, США), и 2 автоматическими микроманипуляторами (Axon CNS, США). Для исследования использовались белые беспородные крысы возрастом 5 – 24 дней после рождения. Исследуемые вещества: серотонин, в концентрации 5 мкМ, соединение РУ-31 и ципрогептадин в диапазоне концентраций 0,5-5 мкМ подавались в ванночку перфузионно, со скоростью 3 мл/мин. Регистрацию активности нейронов проводили в модификации whole-cell.

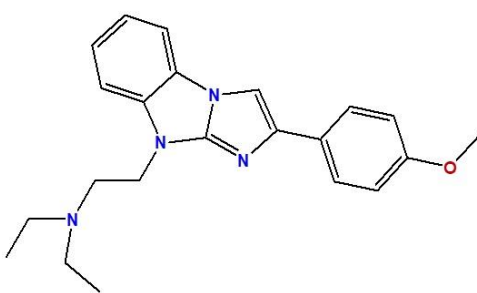
Изучение влияния веществ на основные нейромедиаторные системы мозга (серотонинергическую, адренергическую, дофаминергическую, ГАМК-ергическую, холинергическую) *in vivo* производилось по методикам, описанным в Руководстве по проведению доклинических исследований под ред. Миронова А.Н. (2012) по методике Ворониной Т.А. (Воронина Т.А. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С.264-275). Соединение РУ-31 вводилось животным за 1 час до эксперимента в среднеэффективной дозе 10 мг/кг, контрольной группе вводилась дистиллированная вода.

Статистические расчеты проводили с помощью методов дисперсионного анализа (one-way ANOVA), линейной и нелинейной регрессии с использованием соответствующих критериев (в зависимости от прохождения теста на нормальность распределения выборки) в программе Graph.Pad.Prism5.0.

В третьей главе производится сравнение антисеротониновой активности 3 неорганических солей -диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола. В ходе проведенных исследований было выявлено, что все три соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола обладают высоким уровнем антисеротониновой активности (Таблица 1). При сравнении 5-НТ_{2A}-блокирующих свойств на модели серотонин-индуцированного сокращения рога матки крыс, наибольший уровень активности был зарегистрирован для соединения РУ-31 (дигидрохлорид) а также показан обратимый тип связывания данного соединения с рецепторами, в то время, как для препарата сравнения – ципрогептадина характерен необратимый тип связывания (Рисунок 1). Помимо основных аспектов фармакологической активности, при дизайне молекулярной структуры нового соединения, принимались во внимание высокая стабильность аниона хлора к окислению, отсутствие у него существенного собственного фармакологического влияния, присущего, например бромиду иона, и более высокая стабильность гидрохлоридов, в частности, по сравнению с нитратами, склонными, например, к деградации.

На основании имеющихся данных об уровне фармакологической активности и проведенных ранее токсикологических исследованиях на мышах (Мальцев Д.В. и др... 2013) а также предполагаемых способах применения данного вещества и необходимости создания наиболее стойкой при длительном хранении субстанции, для дальнейших исследований было выбрано соединение РУ-31: дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола.

Таблица 1 –Полуэффективные концентрации серотонина в присутствии соединений РУ-31, РУ-476 и РУ-477, на модели серотонин-индуцированного сокращения изолированного рога матки крысы (M±m)

N п/п	Вещество	Структура	pEC ₅₀ серотонина/ серотонина в присутствии антагониста
1	серотонин	-	6,8±0,02
2	серотонин + соединение РУ-476		5,9±0,04
3	серотонин + соединение РУ-31		5,4±0,12
4	серотонин + соединение РУ-477		5,6±0,07
5	серотонин + ципрогептадин		6,0±0,04

Примечание: pEC₅₀ – отрицательный десятичный логарифм полуэффективной концентрации серотонина/ серотонина в присутствии антагониста. Статистическая обработка проводилась с использованием методов нелинейного регрессионного анализа.

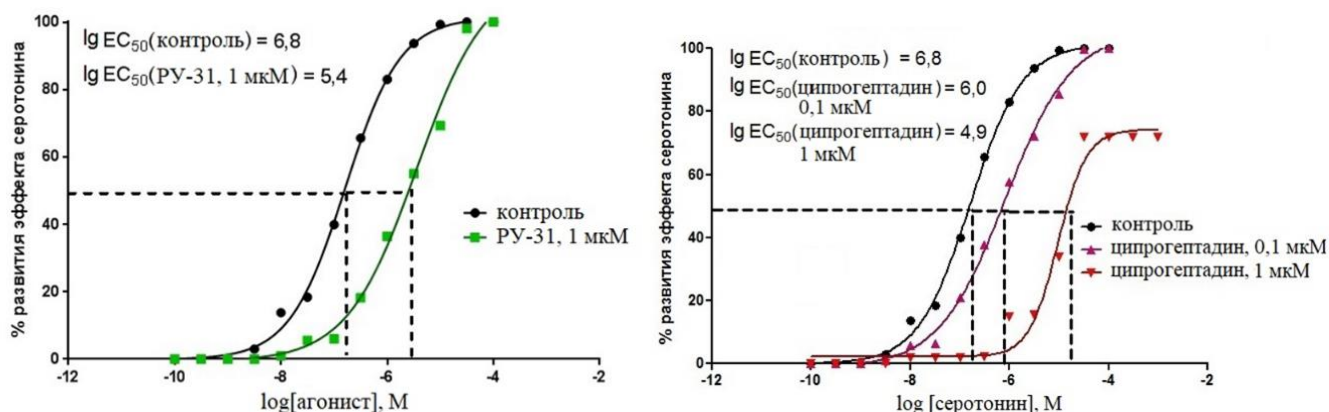


Рисунок 1. 5-НТ_{2А}-блокирующая активность соединения РУ-31 и ципрогептадина in vitro.

В четвертой главе описывается влияние соединения РУ-31 на сосудистое звено патогенеза мигрени. В бассейне церебрального микроциркуляторного русла для соединения РУ-31 характерно развитие стойкого антисеротонинового эффекта в области более низких доз (0,5 – 10 мг/кг), статистически значимо превосходящего показателя ципрогептадина (Рисунок 2). В диапазоне доз 15 – 30 мг/кг показатели серотонин-блокирующей активности соединения РУ-31 не уступают показателям препарата сравнения – ципрогептадина. На основании полученных данных с использованием методов нелинейного регрессионного анализа были рассчитаны величины полуэффективных доз, которые составили 10 мг/кг для соединения РУ-31 и 14 мг/кг для ципрогептадина, и будут использованы в дальнейшем для всех тестов in vivo.

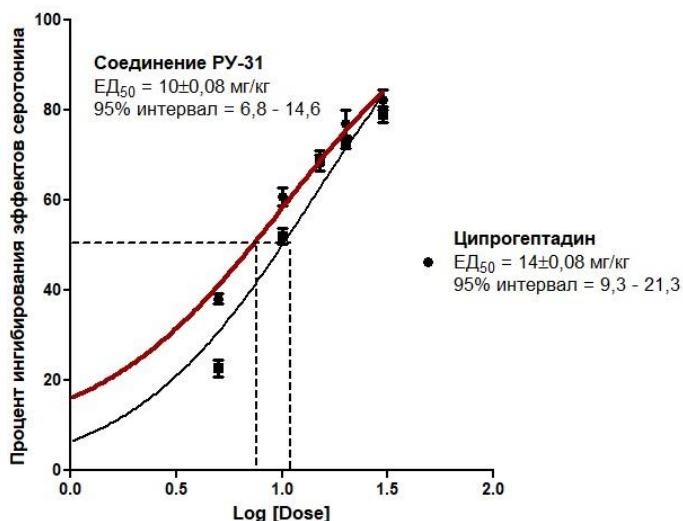


Рисунок 2. Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина на серотонин-опосредованное изменение линейной скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии.

В бассейне внутренней сонной артерии для соединения РУ-31 также был зафиксирован выраженный антисеротониновый эффект, не уступающий показателям ципрогептадина (Таблица 2).

Таблица 2 - Эффективность противомигренозного действия соединения РУ-31 и препарата сравнения - ципрогептадина в условиях серотонин-опосредованного изменения скорости кровотока в бассейне средней мозговой артерии

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

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

Пятая глава посвящена изучению влияния соединения РУ-31 на тромбоцитарные звенья патогенеза мигрени. В первой части главы исследуются антитромбоцитарные свойства соединения РУ-31.

В ходе проведенной серии экспериментов, для соединения РУ-31 выявлено наличие значимой антиагрегантной активности в условиях моделирования серотонин-индуцированной агрегации *in vitro*, превосходящей показатели препаратов сравнения: ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой. С неспецифическими индукторами: при моделировании АДФ-индуцированной агрегации и адреналин-индуцированной агрегации *in vitro*, для соединения РУ-31 была зафиксирована антиагрегантная активность в концентрациях 10-100 мкМ, при этом уступающая показателям препаратов сравнения. При моделировании коллаген-индуцированной агрегации и A23187-индуцированной агрегации, для соединения РУ-31 была зафиксирована значимая ингибирующая активность в более широком диапазоне: 1-100 мкМ, при этом в условиях коллаген-индуцированной агрегации, в концентрации 100 мкМ достоверно превышающая показатели ципрогептадина и не отличающаяся от показателей кислоты ацетилсалициловой.

При исследовании влияния соединения РУ-31 на кальциевый ток в условиях агрегации индуцированной кальциевым ионофором - A23187 показатели опытной группы не уступали показателям препаратов сравнения во всем изучаемом диапазоне, но выраженное антиагрегантное действие для всех трех групп проявляется только в высоких концентрациях, что вероятнее всего, как и в случае с неспецифическими индукторами может свидетельствовать не о прямом, а об опосредованном влиянии на процессы агрегации. На модели ристоцетин-индуцированной агрегации соединение РУ-31 не проявило значимую антиагрегантную активность что дает возможность предположить, что данное вещество не оказывает влияния на связывание фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib. По всем моделям для соединения РУ-31 были рассчитаны величины IC₅₀ (Таблица 3).

Таблица 3 - Влияние соединения РУ-31 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами

№ п/п	Индукторы агрегации тромбоцитов	Значение rC_{50} для соединения РУ-31
1.	Серотонин	5,8
2.	АДФ	5,7
3.	A23187	5,1
4.	Адреналин	4,8
5.	Коллаген	4,7
6.	Ристоцитин	4,5

Во второй части главы исследуются антитромбогенные свойства соединения РУ-31. Было показано, что при формировании тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), действие РУ-31 превосходит показатели препарата сравнения – ципрогептадина (Таблица 4), и не уступает действию ципрогептадина при моделировании тромбоза, индуцированного анодным током (Таблица 5). При этом оба изучаемых соединения статистически значимо уступают показателям препарата сравнения ацетилсалициловой кислоте в точке 50% окклюзии, на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), и во всех контрольных точках на модели тромбоза, индуцированного анодным током.

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

Таблица 4 - Влияние соединения РУ-31(10 мг/кг, перорально) и ципрогептадина (14 мг/кг, перорально) на тромбообразование, индуцированное поверхностной аппликацией хлорида железа III ($M \pm m$)

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

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

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

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

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

Таблица 5 - Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, перорально) и ципрогептадина (14 мг/кг, перорально) на показатели тромбообразования, индуцированного анодным током ($M \pm m$)

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

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

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

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

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

В шестой главе производится детализация нейротропных механизмов рецепторного действия изучаемого соединения. В ходе проведенных исследований было выявлено, что соединение РУ-31, блокатор 2А подтипа серотониновых рецепторов, в концентрации 1 мкМ не проявляет Н₁-гистаминблокирующих, 5-НТ₃-антагонистических и 5-НТ₄-агонистических свойств, при этом проявляет М-холиноблокирующую активность на модели ацетилхолин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки в концентрации в 10 раз превышающей среднеэффективную концентрацию 5-НТ_{2А}-блокирующей активности (Рисунок 3).

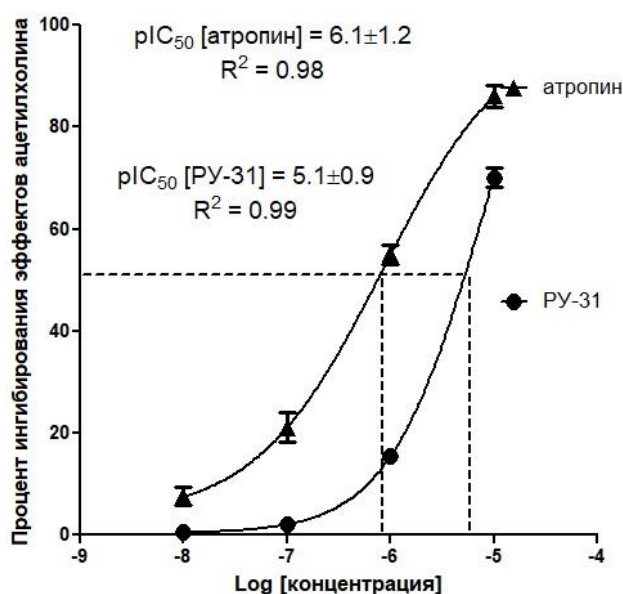


Рисунок 3. М-холиноблокирующая активность соединения РУ-31 и атропина на модели ацетилхолин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки.

Далее проводили изучение влияния соединения РУ-31 на функционированальную активность ГАМК-системы нейроцитов гиппокампа. На первом этапе методами кальциевой визуализации детектировали зоны в наибольшей степени зависимых от активности 5-НТ_{2А}-рецепторов. В ходе проведенного исследования было показано, что при добавлении в ванночку с живыми срезами гиппокампа крыс, возраста 8 дня после рождения, наблюдалось снижение флуоресценции пирамидных клеток СА1 и СА3 и интернейронов границы молекулярного и радиального слоев. При этом, добавление соединения РУ-31 в эквимольярной серотонину концентрации (5 мкМ) вызывало усиление Ca²⁺-зависимой флуоресценции данных участков, даже в присутствии серотонина, особенно в СА1 и СА3 зонах.

Таким образом в зонах СА1 и СА3 гиппокампа были выбраны в качестве тест-систем для дальнейшего исследования гиппокампаальных эффектов изучаемого вещества.

На втором этапе оценивали возможность собственного влияния соединения РУ-31 на способность генерации импульсов нейронами зоны СА3 и СА1 гиппокампа. В ходе проведенного исследования как для низкой концентрации (1 мкМ) так и для высокой концентрации (5 мкМ) статистически значимых эффектов на генерацию ГАМК-индуцированных токов выявлено не было (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние соединения РУ-31 на частоту появления ГАМК-индуцированных токов в СА1 и СА3 зонах гиппокампа (M±m)

Соединение	Концентрация	Изменение активности в СА1 зоне, Δ%	Изменение активности в СА3 зоне, Δ%
Соединение РУ-31	1 мкМ	5,2±3,1	4,7±0,9
	5 мкМ	8,1±4,4	11,2±4,7

На третьем этапе проводилось исследование влияния соединения РУ-31 и ципрогептадина на СА1 зону гиппокампа в условиях серотониновой нагрузки. При перфузионной подаче высокой концентрации серотонина (5 мкМ) в ванночку со срезами мозга крыс возрастом 5 - 15 дней после рождения, наблюдалось увеличение частоты появления ГАМК-токов, в 1,5 – 8,7 раз.

После предварительной инкубации соединения РУ-31 или ципрогептадина, регистрировалось снижение выраженности ответа на серотонин пирамидных клеток СА1 зоны гиппокампа крыс в диапазоне концентраций 0,5 – 5 мкМ. При этом значимых различий в изучаемых концентрациях между соединением РУ-31 и ципрогептадином получено не было (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние соединения РУ-31 на частоту появления ГАМК-токов в зонах СА1 и СА3 гиппокампа ($M \pm m$).

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

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

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

Таким образом, 5-НТ2А – антагонисты, соединения РУ-31 и ципрогептадин при введении, приводили к значимому снижению ответа пирамидных клеток СА1 зоны гиппокампа на действие серотонина. Различий между разными концентрациями получено не было, так как различные пирамидные клетки получают разное количество синаптических входов от интернейронов, расположенных на границе молекулярного и радиального слоев (Wyskiel D.R., 2016), на которых в большей степени экспрессированы 5-НТ2А-рецепторы и в связи с этим, вклад 5-НТ2А звена в модуляцию серотонин-опосредованного ответа на различных клетках был неоднороден.

Амплитудные эффекты серотонина в большей степени ингибировались соединением РУ-31, так как сохранялись в концентрации 1 мкМ и 0,1 мкМ. Для препарата сравнения – ципрогептадина, выраженный эффект на амплитуду ГАМК-токов индуцированных серотонином присутствовал только в концентрации 5 мкМ (Рисунок 4, Рисунок 5).

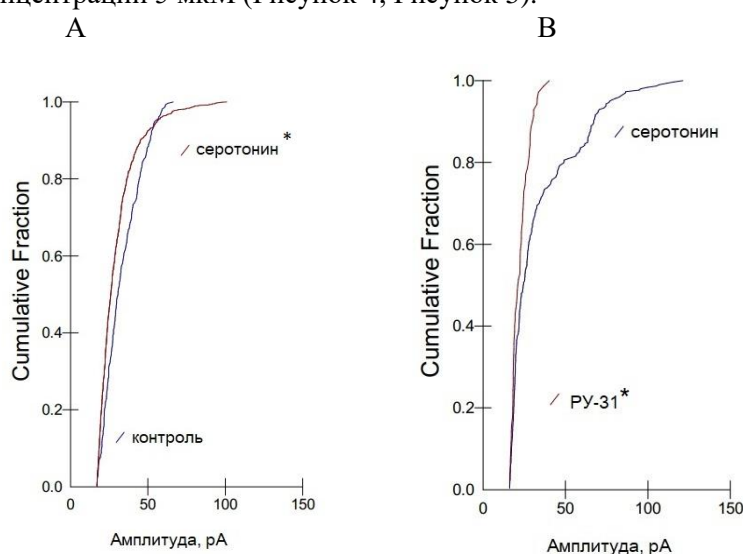


Рисунок 4. Влияние соединения РУ-31 (1 мкМ) на амплитуду вызванных серотонином ГАМК-токов.

* - различие статистически значимо относительно показателей контроля

(А) или серотонина (В) ($p < 0,05$), тест Колмогорова-Смирнова.

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

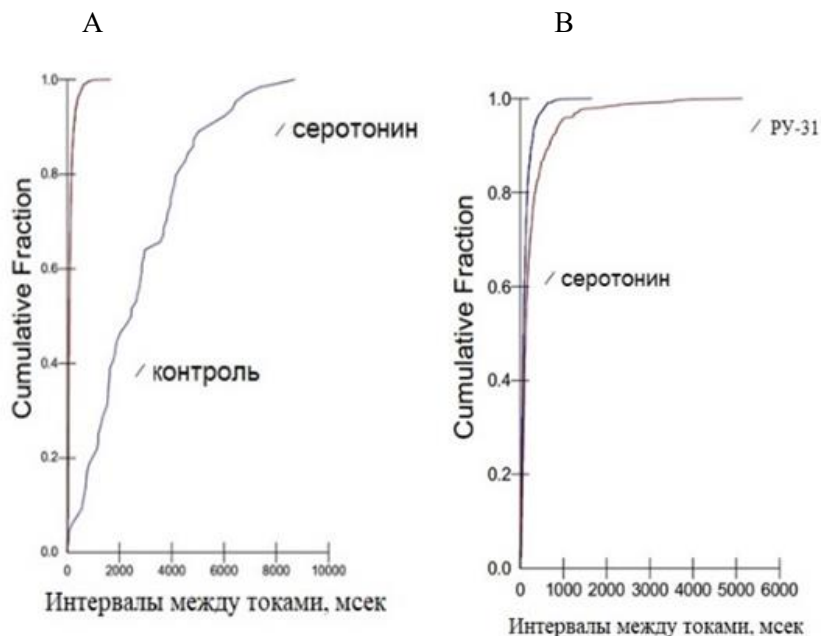


Рисунок 5. Влияние соединения РУ-31 (1 мкМ) на частоту вызванных серотонином ГАМК-токов.
 * - различие статистически значимо относительно показателей контроля (А) или ципрогептадина (В) ($p < 0,05$), тест Колмогорова-Смирнова.

На последнем этапе оценивали влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина на полевую активность в СА3 зоне гиппокампа в условиях серотониновой нагрузки.

В ходе проведенных исследований было показано, что серотонин при ведении способен усиливать ГАМКергическую синаптическую активность, на возрастах до 13 дня после рождения и наоборот, показывает ингибирующее действие на сформированном мозге. При этом, под действием соединения РУ-31, серотонин-индуцированное увеличение нейрональной активности у развивающегося мозга снижается, а у сформированного мозга повышается, значительно выше, чем в показателях контрольных групп (Рисунок 6).

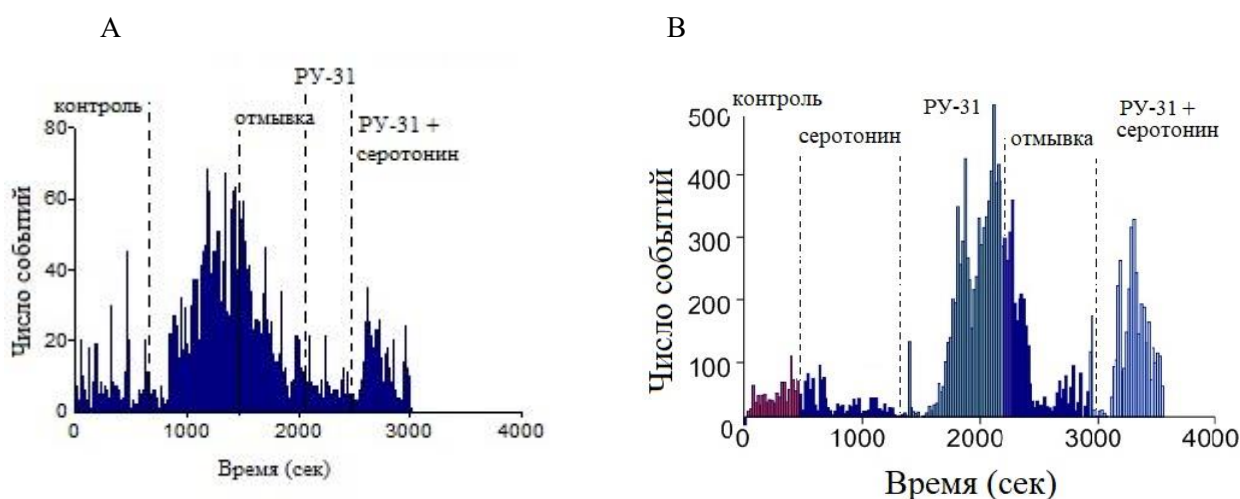


Рисунок 6. Влияние соединения РУ-31 на серотонин-опосредованное изменение активности нейронов в СА3 зоне гиппокампа развивающегося мозга (А) и сформированного мозга (В). Данные представлены в виде усредненных значений на 20-и секундном интервале.

Таким образом, на основании данных, полученных при полевой регистрации потенциалов на молодом и взрослом мозге можно предположить о различных эффектах серотонина на разных возрастах,

что, вероятнее всего, связано с различием в функционировании ГАМК системы в этих временных промежутках. Соединение РУ-31 способно устранять десинхронизирующее действие серотонина на нейроны мозга крыс и на этапе формирования мозга, и на уже сформированном мозге.

Далее проводили исследование центральных нейротропных механизмов рецепторного действия методами *in vivo*. Было подтверждено наличие у соединения РУ-31 центрального серотонинергического действия на модели «5-ГТФ – гиперкинеза» (Рисунок 7) на основании снижения количества встряхиваний головой, отражающее уровень гиперкинеза у животных получавших соединение РУ-31 и М-холиноблолирующего действия на модели ареколинового тремора, за счет значимого снижения длительности развившегося тремора (Рисунок 8).

На модели пикротоксин-индуцированных судорог для соединения РУ-31 было показано выраженное увеличение времени развития тремора и судорог, и сокращение количества судорожных эпизодов в 5 раз, в сравнении с показателями контрольных групп (Рисунок 9).

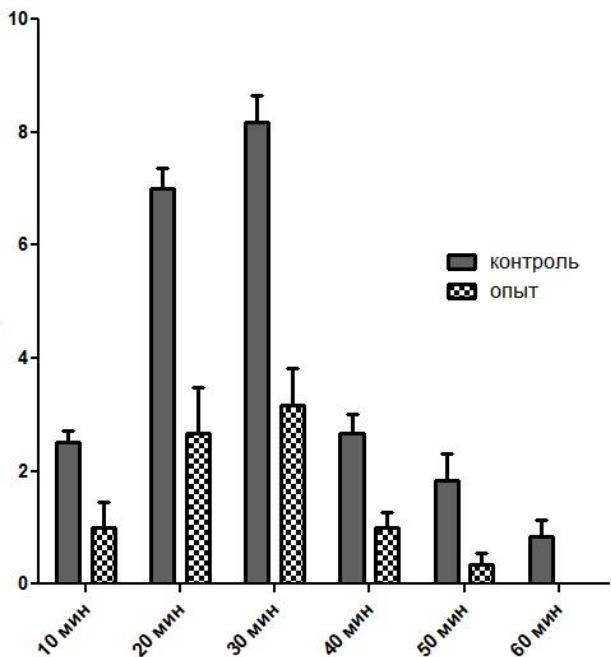


Рисунок 7. Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, внутрь) на показатели теста 5-ГТФ-гиперкинеза (300 мг/кг, 5-ГТФ внутрибрюшинно).

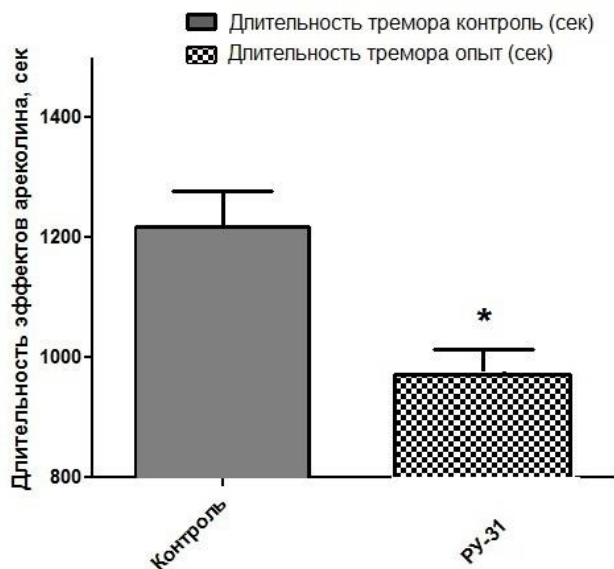
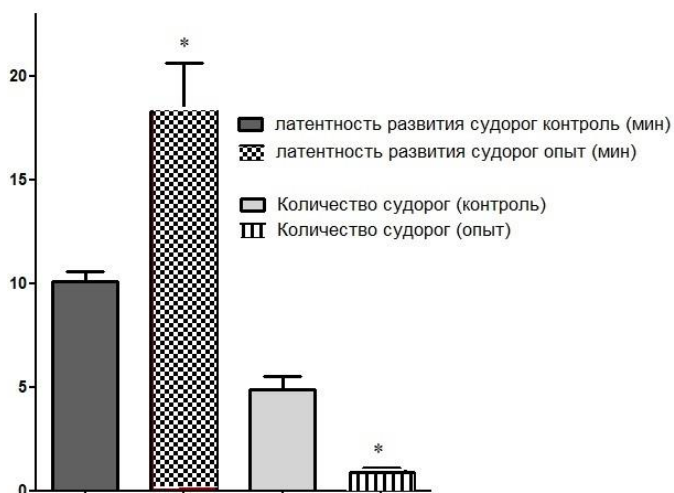


Рисунок 8. Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, внутрь) на показатели теста ареколинового тремора (15 мг/кг ареколина, внутрибрюшинно)

Рисунок 9. Влияние соединения РУ-31 (10 мг/кг, внутрь) на показатели теста пикротоксиновые судороги (2,5 мг/кг, пикротоксина внутривбрюшинно)



В седьмой главе исследовались анальгетические свойства соединения РУ-31. В ходе проведенного исследования было установлено, что в тестах, отражающих влияние на центральные звенья ноцицептивной системы (Тест «Горячая пластина» и «Отдергивание хвоста»), соединение РУ-31 проявляет анальгетические свойства, но статистически значимо уступает показателям препарата сравнения – трамадола (Таблица 8, Таблица 9).

Таблица 8 - Анальгетическая активность соединения РУ-31 (10 мг/кг, перорально), ципрогептадина и трамадола в тесте «Горячая пластина» у крыс (M±m)

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

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

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

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

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

Таблица 9 - Анальгетическая активность соединения РУ-31 (10 мг/кг, перорально), ципрогептадина и трамадола в тесте «Отдергивания хвоста» у крыс (M±m)

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

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

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

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

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

В тесте «Формалиновая гипералгезия», отражающем влияние на воспалительные звенья ноцицептивной системы, соединение РУ-31 проявляет анальгетическую активность, сопоставимую с показателями препарата сравнения - диклофенака и превосходящую показатели известного 5-НТ2 – антагониста - ципрогептадина (Рисунок 10). При этом, для соединения РУ-31 характерно влияние как на острую фазу воспаления (с 0 по 10 мин), так и на хроническую фазу воспаления (с 10 по 60 мин).

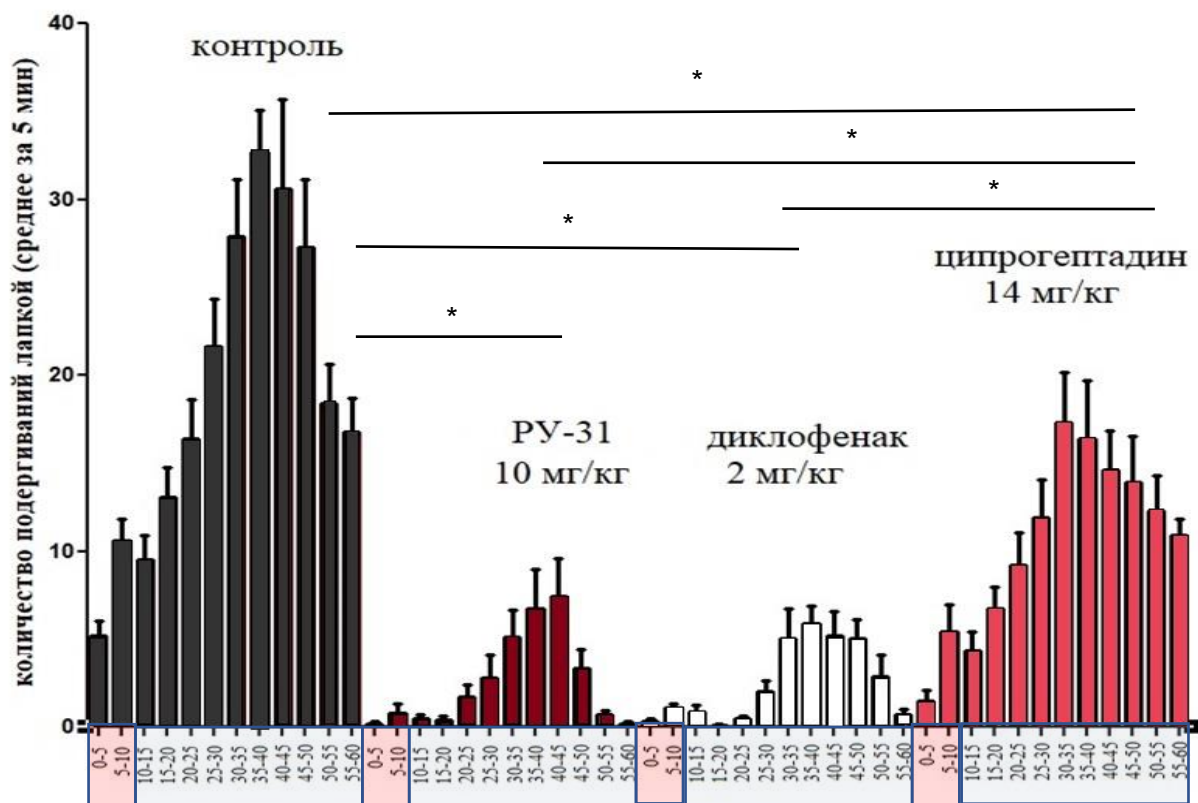


Рисунок 10. Влияние соединения РУ-31, ципрогептадина и диклофенака на показатели теста «Формалиновая гиперальгезия».

В восьмой главе приводится обсуждение результатов проведенного исследования.

Мигрень с учетом возникающих осложнений отнесена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к самым инвалидизирующим среди всех неврологических расстройств (Goadsby P. J, *Physiol. Rev.*, 2017, Vol. 97, no. 2, P. 553–622.). На сегодняшний день основная терапия заболевания направлена на лечение острого приступа: уменьшение интенсивности, длительности болевого эпизода и сопутствующих симптомов, а также на улучшение общего состояния пациента. Для купирования приступа используются анальгетики и/или НПВС (предпочтительно не комбинированные), триптаны, реже эрготаминсодержащие препараты (Osipova V.V. et al...2018). Однако для представленных групп препаратов характерно наличие ряда побочных эффектов и невозможность длительного применения (Vaena S. et al. *Med J.* 2017. Vol.135. №1. P.42-49; Antonaci F. et al...2016). Учитывая разнородность теорий патогенеза мигрени и отсутствие высокоэффективных лекарственных препаратов для купирования приступов, а также возможность длительного применения существующих препаратов в целях профилактики, создание и разработка новых соединений является актуальным направлением современной нейрофармакологии (Osipova V.V. et al...2018). При этом одной из наиболее перспективных мишеней для новых потенциальных кандидатов в противомигренозные препараты считают 2 подтип серотониновых рецепторов (Mason B.N. *Neurosci.*, 2018. - V. 12. P. 1 - 10).

Учитывая опыт предыдущих исследований, проводимых на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, совместно с НИИ ФОХ ЮФУ, наиболее перспективным классом соединений, потенциальных антисеротониновых агентов, являются имидазобензимидазолы (Спасов А.А. *Фармация и фармакология.* 2015. № S1. С. 106-107; Черников М.В. *Производные* 2008; Яковлев Д.С. *Конденсированные...* 2016). Было выделено 3 соединения: дигидрохлорид, дигидронитрат и дигидробромид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (Мальцев Д.В. *5-НТ2А-антагонисты в ряду новых производных бензимидазола и изучение их фармакологического действия.* Волгоград: 2014). Для данных соединений была предварительно изучена острая токсичность и наличие антисеротониновых свойств, а также показана целесообразность дальнейшей их разработки, по совокупности данных свойств. В связи с чем возникла необходимость выбора наиболее активной из указанных солей и расширенное исследование ее фармакологических свойств, что легло в основу настоящего исследования.

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

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

В связи с этим, помимо основных аспектов фармакологической активности, при дизайне молекулярной структуры нового соединения, в том, что касалось выбора противоиона, принимались во внимание высокая стабильность аниона хлора к окислению, отсутствие у него существенного собственного фармакологического влияния, присущего, например, иону бромида, и, в целом, более высокая стабильность гидрохлоридов, в частности, по сравнению с нитратами, склонными, например, к фотодеградации (Wu F. et al. Chem., Int. Ed. 2006. Vol.45 P.947–950). Таким образом, по совокупности данных о химической структуре, токсикологическом профиле и 5-HT_{2A}-активности, для дальнейших исследований было выбрано соединение РУ-31: дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола.

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

На 2 этапе оценивали влияние изучаемого соединения на тромбоцитарные звенья периферического уровня патогенеза мигрени. Учитывая наличие изменений в активности тромбоцитарного звена у пациентов с мигренью, в частности снижение содержания гранул серотонина в период атак (Изати-Зааде. Новости медицины и фармации. 2007. Т.10. С.214), а также данные о том, что самопроизвольное высвобождение гранул серотонина из тромбоцитов приводит к активации ими 5-HT_{2A}-рецепторов, расположенных на мембране тромбоцитов (Sarchielli P. Et al. J Headache Pain. 2001. Vol.2 S.1 P.61) и, в дальнейшем, к активации тромбоцитов и высвобождению из них целого ряда индукторов агрегации, которые в дальнейшем усиливают процессы активации-агрегации, делает необходимым комплексное исследование антиагрегантных свойств для прогнозирования эффективности нового кандидата в ЛП. Для соединения РУ-31 было выявлено наличие значимой антиагрегантной активности в условиях моделирования серотонин-индуцированной агрегации *in vitro*, превосходящей показатели препаратов сравнения: ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой. С неспецифическими индукторами: при моделировании АДФ-индуцированной агрегации и адреналин-индуцированной агрегации *in vitro*, для соединения РУ-31 была зафиксирована антиагрегантная активность в концентрациях 10-100 мкМ, при этом уступающая показателям препаратов сравнения.

При моделировании коллаген-индуцированной агрегации и А23187-индуцированной агрегации, для соединения РУ-31 была зафиксирована ингибирующая активность в более широком диапазоне: 1-100

мкМ ($p < 0,05$), при этом в условиях коллаген-индуцированной агрегации, в концентрации 100 мкМ достоверно превышающая показатели ципрогептадина и не отличающаяся от показателей кислоты ацетилсалициловой. При исследовании влияния соединения РУ-31 на кальциевый ток в условиях агрегации индуцированной кальциевым ионофором - А23187 показатели опытной группы не уступали показателям препаратов сравнения во всем изучаемом диапазоне, но выраженное антиагрегантное действие для всех трех групп проявляется только в высоких концентрациях, что вероятнее всего, как и в случае с неспецифическими индукторами может свидетельствовать не о прямом, а об опосредованном влиянии на процессы агрегации. На модели ристоцетин-индуцированной агрегации соединение РУ-31 не проявило значимую антиагрегантную активность, что дает возможность предположить, что данное вещество не оказывает влияния на связывание фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib. Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что соединение РУ-31 оказывает выраженное и поликомпонентное антиагрегантное действие, в большей степени опосредуемое серотином и, вероятнее всего способно изменять содержание внутриклеточного кальция в тромбоцитах. Это позволяет предположить эффективность разрабатываемой субстанции в условиях реальной мигренозной патологии, на фоне увеличения вязкости крови высокими концентрациями серотонина, что сопоставимо с литературными данными для ципрогептадина и пизотифена, для которых было показано снижение АДФ-индуцированной агрегации и внутриклеточных уровней кальция в тромбоцитах, в присутствии серотонина *in vitro* и *ex vivo* (Lin O. A. Et al. PLoS One. 2014. Vol. 9. – №1. P. 7026-64). Таким образом, антиагрегантная активность соединения РУ-31 на изученных моделях агрегации, по величине полуингибирующей концентрации располагается в следующем порядке: серотонин (Log IC₅₀ = -5,8) > АДФ (Log IC₅₀ = -5,7) > А23187 (Log IC₅₀ = -5,1) > адреналин (Log IC₅₀ = -4,8) > коллаген (Log IC₅₀ = -4,7) > ристоцетин (Log IC₅₀ = -4,5).

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

Несмотря на то, что на сегодняшний день актуальным направлением является создание и разработка новых лекарственных средств из ряда 5-HT_{2A}-антагонистов, в связи с эффективностью применения с целью лечения и профилактики мигренозных приступов препаратов, имеющих данный механизм действия (Krasaelar A. Pediatric Annals. 2017 Vol.46 №.3 P.120-125), рядом исследований было показано, наибольшую эффективность демонстрируют препараты с мультирецепторным профилем. В частности, ципрогептадин и пизотифен являлись более эффективными при лечении мигрени, чем высокоселективный 5-HT_{2A}-антагонист – кетансерин (Mylecharane E.J. J Neurol. 1991 Vol.238 S.1 P.45-52). Однако наличие ряда рецепторных эффектов, в частности α -адреноблокирующего или H₁-гистаминблокирующего, может лечь в основу ряда побочных эффектов, таких как гипотензия, кардиотоксичность, седация и ульцерогенность, тем самым ограничив возможность длительного применения данных ЛС. В связи с этим, детальное изучение рецепторных аспектов механизма действия, является необходимым фактором, для прогнозирования возможного спектра побочного действия нового кандидата в лекарственные препараты.

В связи с этим, на 3 этапе проводилось изучение рецепторного профиля соединения РУ-31 методами *in vivo* и *in vitro*. Исследование показало, что в концентрации 1 мкМ соединение РУ-31 обладает H₁-гистаминблокирующей активностью, что выгодно отличает его от препарата сравнения – ципрогептадина, для которого характерны седативный, ульцерогенный и кардиотоксический эффекты,

опосредованные гистамином (reference.medscape.com). Помимо этого, было показано отсутствие влияния соединения РУ-31 на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов, что может свидетельствовать о селективности антисеротонинового действия. На *in vitro* модели ацетилхолин-индуцированного спазма изолированной подвздошной кишки и *in vivo* модели ареколинового тремора, соединение РУ-31 оказывает ингибирующий эффект. Учитывая вовлеченность парасимпатической системы в формирование приступов мигрени (Амелин А.В. и др. Мигрень... 2014) и эффективность ряда препаратов из группы атропина (Shelukhina I. et al. Front Neurol. 2017), наличие данного компонента в рецепторном профиле нового соединения будет усиливать его антимигренозное действие.

Помимо этого, соединение РУ-31 может подавлять активность ГАМК-блокатора – пикротоксина *in vivo*, значительно увеличивая время развития судорог и снижая количество судорожных эпизодов. Учитывая важность регуляции функциональной активности нервной системы во время приступов мигрени на надсегментарном уровне, а также имеющиеся данные о возможности регуляции серотонином активности пресинаптических NMDA-рецепторов и постсинаптических ГАМК-рецепторов посредством 2А- подтипа рецепторов, при разработке новых антисеротониновых агентов необходимо уделять внимание возможности прямой или опосредованной регуляции активности данных систем. С этой целью в настоящем исследовании, с использованием patch-clamp технологий были проведены эксперименты на переживающих нейронах крыс возраста P4 – P25. Почти все подтипы рецепторов серотонина экспрессируются в гиппокампе, локализуясь как аутоинаптически, пресинаптически и постсинаптически, так и колокализуясь в одной и той же клетке, и формируя сложную модулирующую систему. Учитывая вовлеченность гиппокампальной формации в патогенез мигренозного процесса (Liu H.Y. et.al. Curr Pain Headache. 2018 . Vol. 5. №2), а также вовлеченность ГАМК системы в регуляцию сосудистого тонуса мозга и формирование приступов головных болей (Мирзоян Р.С. и др. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2018. Т. 12. № 1. С. 31-37.) изучение ГАМК-ергических компонентов действия новых противомигренозных агентов целесообразно проводить в гиппокампальной формации. В экспериментах *in vitro* собственного влияния на ГАМК-систему для изучаемого соединения выявлено не было, как в СА1 зоне, так и в СА3 зоне. При этом введение высоких концентраций серотонина приводило к увеличению нейрональной активности в СА1 и СА3 зонах, как внутриклеточно, так и при системной фиксации потенциалов (Shen R.Y. et.al. Molecular Psychiatry. 2000. №5. P. 673-677). На фоне серотонин-опосредованной гиперактивации интернейронов на границе зон лучистого слоя (stratum radiatum) и молекулярного слоя (stratum locunosum moleculare), увеличивалась активность ГАМК-ергической системы. Однако по данным ряда источников, гиперстимуляция нейронов может привести к депрессии нейрональной активности и спровоцировать явление РКД. Введение соединения РУ-31 в диапазоне концентраций 0,1 мкМ – 5 мкМ значительно снижало выраженность эффектов серотонина, как системных, так и регистрируемых внутриклеточно. При этом наблюдались различия в действии серотонина на срезы, полученные из тканей мозга молодых крыс (до 12 дня после рождения) и на срезы мозга 23-25 дня после рождения, который соответствует активности уже взрослой особи. На развивающемся мозге, где ГАМК играет возбуждающую роль (Valeeva G. R. Neurosci. Behav. Physiol. 2013. Vol.43. №5. P. 656-660), введение серотонина увеличивает системную активность и вызывает десинхронизацию нейрональных ответов. На сформированном мозге наблюдался обратный эффект: введение серотонина снижало нейрональную активность СА3 зоны гиппокампа и приводило к «депрессии» нейронов. И в том и в другом случае, соединение РУ-31 устраняло эффекты высокой концентрации серотонина, что может иметь ключевое значение в терапии неврологических симптомов мигрени. Таким образом, в ходе проведенных исследований было выявлено, что оказываемые соединением РУ-31 эффекты на гиппокампальную формацию, проявлявшиеся ГАМК-миметическим действием на моделях *in vivo*, были опосредованы через серотониновую систему.

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

воспалительном «супе», являющимся ключевым компонентом мигренозного приступа, наличие собственной анальгетической активности, при том как на центральном, так и на периферическом уровне, будет являться существенным плюсом для данного соединения и делает его перспективным кандидатом для дальнейшей разработки.

Заключение.

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

Выводы

1. Неорганические соли 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола по уровню 5-НТ_{2А}-блокирующей активности *in vitro* располагаются в следующем порядке: дигидрохлорид (соединение РУ-31) > дигидробромид (соединение РУ-477) > дигидронитрат (соединение РУ-476).
2. Соединение РУ-31 способно устранять серотонин-индуцированный спазм в бассейне средней мозговой артерии (ED₅₀ = 10 мг/кг), и в системе внутренней сонной артерии, демонстрируя равную активность с ципрогептадином.
3. Для соединения РУ-31 характерны антиагрегантные свойства, наиболее выраженные в условиях индукции агрегации серотонином (IC₅₀=1 мкМ). На моделях агрегации индуцированной коллагеном, АДФ, адреналином и ионофором А23187 антиагрегантная активность значительно ниже и наиболее выражена в диапазоне концентраций 10 – 100 мкМ. В условиях ристоцетин-индуцированной агрегации значимой активности выявлено не было.
4. Соединение РУ-31 проявляет антитромбогенную активность на модели тромбоза, индуцированного хлоридом железа, в дозе 10 мг/кг на 30% увеличивая время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, превосходя показатели ципрогептадина и проявляя активность равную кислоте ацетилсалициловой. На модели сосудистого повреждения анодным током, соединение РУ-31 на 40% на увеличивало время полной окклюзии сосуда в сравнении с показателями группы контроля, в 2 раза превосходило показатели ципрогептадина, но в 1,8 раза уступало показателям кислоты ацетилсалициловой.
5. Соединение РУ-31 оказывает влияние на функциональную активность нейроцитов срезов гиппокампа, снижая амплитуду и частоту серотонин-индуцированных ГАМК-индуцированных токов в гиппокампальной формации мозга крыс в равной степени с препаратом сравнения – ципрогептадином.
6. Для соединения РУ-31 характерна блокирующая активность в отношении М-холинорецепторов на модели ацетилхолин-индуцированного сокращения подвздошной кишки *in vitro* (pIC₅₀ = 5,12 ± 0,9), и *in vivo*, в дозе 10 мг/кг (сокращение длительности ареколинового тремора в 1,3 раза). Соединение РУ-31 в 3 раза увеличивает латентность и снижает длительность пикротоксин-индуцированных судорог, а также в 5,4 раза и потенцирует длительность стереотипного поведения, индуцированного фенамином в 3 раза. Влияния на 3 и 4 подтипы серотониновых рецепторов выявлено не было.
7. Соединение РУ-31 оказывает анальгетический эффект в тестах «Горячая пластина» и «Отдергивание хвоста», превышая активность ципрогептадина на 25% и 53% соответственно. В

условиях формалиновой гипералгезии соединение РУ-31 превосходит показатели ципрогептадина на 85% и 57,2% в соответствующих фазах и не уступает диклофенаку.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Поиск соединений, блокирующих 5-НТ2А-рецепторы, в качестве потенциальных средств для коррекции мигренозных состояний является перспективным.
2. Рекомендуется использовать результаты, полученные в ходе настоящего исследования, для планирования завершающей стадии расширенного доклинического исследования специфической фармакологической активности нового противомигренозного средства.
3. Полученные результаты рекомендуется использовать для формирования брошюры исследователя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ:

1. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а] бензимидазола/ Агацарская Я.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.С., Семенова Ю.В., Салихов Д.А., Султанова К.Т., Анисимова В.А.//Вестник ВолгГМУ, 2019. № 1 (69). С. 120-124.
2. Novel Approaches to the Development of Antimigraine Drugs: A Focus on 5-НТ2А Receptor Antagonists/ A. Spasova, D. S. Yakovlev, A. A. Brigadirova, D. V. Maltseva, and Y. V. Agatsarskaya//Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2019, Vol. 45, No. 2, pp. 76–88.
3. Анксиолитические свойства соединения РУ-31/ Султанова К.Т., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., Морковина Я.В., Анисимова В.А., Морковник А.С.// Вестник ВолгГМУ, 2018. № 3 (67). С. 28-32.
4. The search for pharmacologically active compounds among the 2-dialkylaminobenzimidazoles/ Zhukovskaya O.N., Anisimova V.A., Spasov A.A., Yakovlev D.S., Gurova N.A., Kucheryavenko A.F., Salaznikova O.A., Kuznetsova V.A., Maltsev D.V., Brigadirova A.A., Soloveva O.A., Gurova V.V., Reznikov E.V., Morkovina Y.V.// Pharmaceutical Chemistry Journal. 2017. Т. 51. № 3. PP. 182-186.
5. Адренергическая и серотонинергическая активность нового соединения с антимигренозными свойствами/ Морковина Я.В., Семенова Ю.В., Салихов Д.А., Мальцев Д.В., Яковлев Д.С.// Волгоградский научно-медицинский журнал. 2017. № 1 (53). С. 27-30.
6. Производные имидазо[1,2-а]бензимидазола как антагонисты 5-НТ2-рецепторов / Спасов А.А., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Жуковская О.Н., Анисимова В.А., Ковалев Г.И., Зимин И.А., Морковина Я.В. //Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. № 4. С. 440.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. Влияние нового 5-НТ2а-антагониста, соединения РУ-31, на агрегацию тромбоцитов *in vitro* / Морковина Я.В., Семенова Ю.В., Салихов Д.А., Яковлев Д.С. //Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. Т. 81. № 5. С. 163.
2. Влияние нового 5-НТ2А-антагониста на кровоток в области средней мозговой артерии в условиях ишемии / Султанова К.Т., Бригадирова А.А., Морковина Я.В., Мальцев Д.В., Яковлев Д.С., Семенова Ю.В.// Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. Т. 81. № 5. С. 235.
3. Мишень-ориентированный подход к разработке лекарственных средств для лечения мигрени / Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Морковина Я.В., Султанова К.Т., Мирошников М.В., Бригадирова А.А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. Т. 81. № 5. С. 278.
4. Анальгетический эффект ципрогептадина в эксперименте / Морковина Я.В., Салихов Д.А., Семенова Ю.В.// Материалы X Международной конференции Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. Волгоград, 2018. С. 378-379.
5. Исследование антиагрегантных свойств нового 5-НТ –антагониста / Семенова Ю.В., Морковина Я.В., Салихов Д.А.// Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина "Достижения современной фармакологической науки" Под ред. Е.Н. Якушевой. 2018. С. 92-93.
6. Метод изучения аденозиновой активности биологически-активных веществ *in vitro* /Морковина Я.В. //Материалы 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием. 2017. С. 425-426.
7. Изучение 5-НТ2А-антагонистической активности нового соединения из ряда конденсированных азолов /Агацарская Я.В.// Материалы XX Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области Тезисы докладов. Под общей редакцией В.И. Петрова. 2016.

8. Механизм противомигренозного действия нового производного из ряда конденсированных азолов /Морковина Я.В. //Материалы 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием. Под редакцией В.И. Петрова. 2016. С. 275. 0
9. Детализация механизма спазмолитической активности соединения РУ-31/ Салихов Д.А., Семенова Ю.В., Морковина Я.В.// Материалы 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием. Под редакцией В.И. Петрова. 2016. С. 276.
10. Изучение токсичности и антисеротониновых свойств соединений РУ-31 И РУ-476 /Морковина Я.В., Мальцев Д.В.//Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, посвященной 80-летию ВолгГМУ. 2015. С. 328-329. 1
11. 5-НТ2А-антагонистическая активность с2,п9-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов / Яковлев Д.С., Спасов А.А., Мальцев Д.В., Васильев П.М., Анисимова В.А., Морковина Я.В.// Материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета 2015. С. 54-56. 6
12. Сравнительный анализ влияния соединения РУ-476 и ИЗВЕСТНЫХ 5-НТ2А антагонистов на скорость кровотока в средней мозговой артерии / Спасов А.А., Мальцев Д.В., Яковлев Д.С., Морковина Я.В. // Материалы 1 научно-практической конференции «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции» Фармация и фармакология. 2015. № S1. С. 106-107.
13. Метод фармацевтической альтернативы при разработке нового 5-НТ2А-антагониста / Морковина Я.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Салихов Д.А.// Материалы 1 научно-практической конференции «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции» Фармация и фармакология. 2015. № S1. С. 76-77.
14. Метод фармацевтической альтернативы при разработке нового 5-НТ2А-антагониста / Морковина Я.В. // Материалы 1 научно-практической конференции «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции» Фармация и фармакология. 2015. Т. 3. С. 1.