

ГБОУ ВПО ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГБУ ВОЛГОГРАДСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

На правах рукописи

Яковлев Дмитрий Сергеевич

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
академик РАН, З.д.н. РФ,
профессор, доктор медицинских наук,
А.А. Спасов

Волгоград, 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1 СЕРТОНИНОВЫЕ (5-НТ) РЕЦЕПТОРЫ 2 (А), 3 И 4 ТИПА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	19
1.1 Серотониновые рецепторы	19
1.1.1 Локализация, строение и функции 5-НТ _{2А} -рецепторов.....	20
1.1.2 Особенности строения и функциональные аспекты 5- НТ ₃ -рецепторов	24
1.1.3 5-НТ ₄ -рецепторы.....	29
1.2 Фармакологические свойства и клинический потенциал использования лигандов 5-НТ_{2А/3/4}-рецепторов.....	32
1.3 Перспективы поиска серотонинергически активных соединений среди конденсированных азолов.	35
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1 Материалы	40
2.1.1 Материалы и оборудование, использованные для исследований <i>in silico</i>	40
2.1.2 Материалы и оборудование, использованные для экспериментальных фармакологических исследований	42
2.2 Методы <i>in silico</i>	45
2.2.1 Обработка данных для информационных исследований.....	45
2.2.2 Методы компьютерного прогноза серотонинергической активности новых конденсированных азолов.....	45
2.2.3 Метод 3D-докинга наиболее активных соединений в активный сайт связывания 5-НТ _{2А/4} -рецептора	48
2.2.4 Анализ влияния химической структуры на серотонинергические свойства соединений (подструктурный анализ).....	49

2.2.5	Анализ влияния физико-химических свойств на 5-НТ _{2A/3/4} -серотонинергические свойства соединений.....	52
2.3	Методы in vitro и in vivo.....	54
2.3.1	Методы экспериментального фармакологического скрининга 5-НТ _{2A} -, 5-НТ ₃ - и 5-НТ ₄ -активности соединений.....	54
2.3.2	Методы исследования рецепторной активности соединений-лидеров in vitro	56
2.3.3	Методы изучения взаимодействия соединений с агонистами/антагонистами основных нейромедиаторных систем in vivo.....	60
2.3.4	Методы исследования скорости мозгового кровотока и системной гемодинамики у крыс	66
2.3.5	Методы изучения тромбогенных и вязкостных свойств крови	68
2.3.6	Метод изучения антиэметического действия соединений на собаках	70
2.3.7	Методы изучения противодиарейного действия соединений.....	70
2.3.8	Методы изучения анальгетической активности соединений.....	71
2.3.9	Методы изучения анксиолитической активности соединений.....	73
2.3.10	Методы изучения острой токсичности и нейротоксикологического профиля соединений.....	74
2.4	Методы статистической обработки данных.....	75
3	НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК АНТАГОНИСТОВ 5-НТ_{2A}- И 5-НТ₃-РЕЦЕПТОРОВ И АГОНИСТОВ 5-НТ₄-РЕЦЕПТОРОВ СРЕДИ КОНДЕНСИРОВАННЫХ АЗОЛОВ.....	77

3.1 Поиск новых 5-НТ_{2А}-блокаторов в рядах производных азола.....	79
3.1.1 Система консенсусного информационного прогноза <i>in silico</i> 5-НТ _{2А} -активности новых химических соединений.....	79
3.1.2 Экспериментальный поиск 5-НТ _{2А} -антагонистов среди синтезированных производных азола.....	84
3.1.3 Анализ зависимости уровня 5-НТ _{2А} -антагонистической активности от химической структуры и физико-химических свойств соединений.....	88
3.1.4 Выявление наиболее перспективного соединения с 5-НТ _{2А} -антагонистическими свойствами для стартового доклинического изучения	97
3.2 Направленный поиск новых высокоактивных 5-НТ₃-антагонистов среди конденсированных производных азола.....	101
3.2.1 Консенсусный прогноз <i>in silico</i> 5-НТ ₃ -активности новых химических соединений	102
3.2.2 Экспериментальное изучение 5-НТ ₃ -активности новых химических соединений <i>in vitro</i>	104
3.2.3 Зависимость уровня 5-НТ ₃ -эффекта от химической структуры и физико-химических свойств изученных соединений.....	107
3.2.4 Определение наиболее перспективного соединения с 5-НТ ₃ -антагонистическими свойствами.....	113
3.3 Поиск новых 5-НТ₄-агонистов в рядах производных азола	115
3.3.1 Прогноз вероятности встречаемости 5-НТ ₄ -агонистов среди новых производных азола с помощью систем PASS и TestSim.	115

3.3.2	Экспериментальный поиск соединений с 5-HT ₄ -агонистической активностью и анализ ее зависимости от свойств соединений в ряду конденсированных азолов	117
3.4	Заключение.....	121
4	ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО 5-HT_{2A}-АНТАГОНИСТА АВАЗОЛА	124
4.1	Механизм действия авазола.....	124
4.1.1	Влияние на различные рецепторные системы <i>in vitro</i>	124
4.1.2	Взаимодействие с основными агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем <i>in vivo</i>	130
4.2	Специфические фармакологические свойства авазола в условиях моделирования патологии <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	136
4.2.1	Влияние на цереброваскулярный кровоток	136
4.2.2	Влияние на системный кровоток, антиагрегантные, вязкостные и тромбогенные свойства крови	145
4.2.3	Анальгетическое действие.....	154
4.2.4	Анксиолитическое действие.....	159
5	ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭМЕТАЗОЛА - НОВОГО 5-HT₃-АНТАГОНИСТА	166
5.1	Детализация механизма действия эметазола	166
5.1.1	Влияние на различные рецепторные системы <i>in vitro</i>	166
5.1.2	Взаимодействие с основными агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем <i>in vivo</i>	171
5.2	Эффекты эметазола при моделировании экспериментальной патологии <i>in vivo</i>	178
5.2.1	Противорвотное действие в условиях цисплатинового эметогенеза у собак.....	178
5.2.2	Противодиарейные свойства эметазола	181

5.2.3	Анальгетическое действие.....	183
5.2.4	Анксиолитическое действие.....	190
6	ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ.....	196
6.1	Токсикологические свойства авазола.....	196
6.1.1	Острая токсичность при внутрибрюшинном введении у мышей-самцов.....	196
6.1.2	Общий нейротоксикологический профиль по Ирвину.....	198
6.1.3	Заключение.....	200
6.2	Токсикологические свойства эметазола	202
6.2.1	Острая токсичность при внутрибрюшинном введении у мышей-самцов.....	202
6.2.2	Нейротоксикологический профиль эметазола по Ирвину.....	204
6.2.3	Заключение.....	207
7	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	209
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	234
	ВЫВОДЫ	237
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	240
	ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	241
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	243
	ПРИЛОЖЕНИЕ А (информационное). Химическая структура изученных конденсированных производных азола	275
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б (информационное). Дополнения и уточнения к результатам исследования	289

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Поиск новых биологически активных соединений, разработка и создание на их основе эффективных лекарственных средств остается одной из главных задач фармакологии [Шимановский Н.Л., 2009; Галенко-Ярошевский П.А., 2011; Петров В.И., 2012 ; Середенин С.Б., 2013].

К настоящему времени накоплено достаточно данных о причастности нарушений обмена серотонина (5-гидрокситриптамина, 5-НТ) к развитию многих заболеваний и патологических состояний [Andrews P., 1993; Nagatomo T., 2004; Crowell M.D., 2004; Мирзоян Р.С., 2006; Bardin L., 2011; Амелин А.В., 2011; Thompson A.J., 2013; Надеев А.Д., 2014; Belkind-Gerson J., 2015].

За 25 лет с момента наиболее детальной идентификации 7 семейств серотониновых рецепторов (5-НТ₁₋₇), было выявлено значительное количество химических веществ, способных взаимодействовать с их отдельными представителями [Hoyer D. J., 1991; Miyata K., 1991; Сергеев В.П., 1999; Зефирова О.Н., 2001; Анисимова В.А., 2006; Спасов А.А., 2006; Черников М.В., 2008; Косточка Л.М., 2010].

И если для первого среди четырех наиболее детально и длительно исследованных семейств 5-НТ-рецепторов уже разработано и внедрено несколько поколений «триптанов» – 5-НТ_{1B/D}-агонистов, то для оставшихся продолжает сохраняться дефицит эффективных препаратов с 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₃-антагонистическими, 5-НТ₄-агонистическими механизмами действия [Diener H.C., 2015; Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: <http://www.rlsnet.ru>].

В этой связи не ослабевает востребованность к исследованиям по созданию новых лигандов 5-НТ_{2A/3/4}-рецепторов, способных корригировать патологические состояния, связанные с дизрегуляцией серотонинергической

системы [Yang Y., 2016]. Сохраняется повышенный интерес к изучению фундаментальной зависимости биологической активности от структуры химических соединений [Blaazer A.R., 2008; Cappelli A., 2010; Bureau R., 2010; Черников М.В., 2013; Иващенко А.В., 2013; Nirogi R., 2015].

Обзор литературных данных позволяет выделить конденсированный азольный фрагмент в базовой структуре отдельных представителей серотонинергически активных соединений, часто сопряженный с электроположительными заместителями [Yang Z., 2010; Manesh R., 2011; Nayat F., 2015]. Принимая это во внимание, а также руководствуясь предварительно проведенными исследованиями, можно предполагать, что производные конденсированных азолов, содержащие в своей структуре полярные заместители, могут являться перспективным классом химических веществ для поиска лигандов 2(A), 3, 4 типов серотониновых рецепторов.

Степень научной разработанности проблемы

С момента обнаружения серотонина в головном мозге и изучения опосредованных им эффектов в значительной мере сформировалось представление о разнообразии серотониновых рецепторов [Alexander S.P., 2013]. Расшифрована их полипептидная структура определена топология [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS. URL: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=1>] Существенно детализировались представления об этиологии и патогенезе многих заболеваний, появилась научная база, приближающая к пониманию роли серотонинергической нейротрансмиссии в развитии дисциркуляторных состояний сосудов головного мозга [Мирзоян Р.С., 2012; Амелин А.В., 2011], депрессивного и тревожного синдромов, в регуляции обучения и памяти [Branes N., 1999; Fedotova J.O., 2004; Воронина Т.А., 2012; Bell R., 2014], синдрома раздраженного кишечника, серотониновой тошноты, рвоты и др. [Andrews P., 1993; Плотникова Е.Ю., 2014].

В дополнение к известным фактам о вовлеченности 5-HT₂-антагонистов в процессы регуляции тонуса сосудов головного мозга [Мирзоян Р.С., 2006], функционального состояния тромбоцитов широко обсуждается возможность их использования при различных психических нарушениях – тревожных состояниях, шизофрении [Mestre T.A., 2013; Clinard C.T., 2015]. Антагонисты 3 типа серотониновых рецепторов зарекомендовали себя как противорвотные средства для коррекции побочного действия химиотерапевтических средств, применяемых в онкологической практике, использование которых позволяет существенно повысить качество жизни пациентов и тем самым усилить противоопухолевую терапию [Абрамов М.Е., 2014]. Появляется доказательная база об анальгетической активности [Liang D.Y., 2011; Kumar B., 2012], характерной для некоторых блокаторов 5-HT₃-рецепторов, что, несомненно, расширяет их клинический потенциал.

Агонисты 5-HT₄-рецепторов, также как и 5-HT₃-блокаторы в настоящее время интенсивно изучаются в качестве агентов, способных уменьшать проявления синдрома раздраженного кишечника, гастроэзофагеального рефлюкса, уменьшая кинетику ЖКТ [Camilleri M., 2014; Lacy В.Е., 2015; Yu Y., 2015].

К настоящему времени получено значительное количество веществ, способных взаимодействовать с различными типами серотониновых рецепторов [Анисимова В.А, 2005; Спасов А.А., 2006; Черников М.В., 2008; 5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS; Иващенко А.В., 2013]. В то же время существует дефицит соединений с избирательным действием либо веществ с новыми, из числа потенциально перспективных для клинического применения 5-HT_{2A/3/4}-лигандов, свойствами (анксиолитическое, противомигренозное, анальгетическое, противодиарейное), проявляющих при этом меньшее побочное и токсическое действие. Этот вопрос становится еще более значимым, если учитывать полное отсутствие оригинальных отечественных препаратов с подобными механизмами действия на российском фармацевтическом рынке и крайне малое количество возможных

зарубежных аналогов (ондансетрон, трописетрон, ципрогептадин), использование которых весьма осложняется фармакоэкономическими аспектами.

Цель

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

Задачи исследования

1. Разработка методологии целенаправленного поиска высокоактивных соединений - антагонистов 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-рецепторов с использованием информационных технологий компьютерного прогноза биологической активности химических соединений в ряду новых конденсированных азолов.
2. Проведение направленного поиска новых антагонистов 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-рецепторов, а также стартового поиска новых агонистов 5-НТ₄-рецепторов среди производных конденсированных азолов *in vitro*.
3. Выявление и обобщение закономерностей между 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₃- и 5-НТ₄-активностью изученных представителей конденсированных азолов, их химической структурой и физико-химическими свойствами.
4. Изучение аспектов механизма действия наиболее активных среди выявленных антагонистов серотониновых рецепторов 2А и 3 типа на рецепторном и нейромедиаторном уровне.
5. Изучение специфического фармакологического действия (влияние на цереброваскулярный кровоток, анальгетическое, анксиолитическое действие) соединения, демонстрирующего наиболее выраженные 5-НТ_{2А}-антагонистические свойства.

6. Изучение специфической фармакологической активности наиболее перспективного соединения со свойствами 5-НТ₃-антагониста (антиэметическое, анальгетическое, антидиарейное, анксиолитическое действие).
7. Изучение острой токсичности и нейротоксикологических свойств наиболее активных соединений.
8. Разработка рекомендаций по использованию результатов работы с целью создания основы для создания новых оригинальных препаратов с серотонинергическими механизмами действия для лечения заболеваний ЖКТ, нервно-психических заболеваний, мигрени, уменьшения негативных эметических эффектов антибластомных средств.

Научная новизна

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

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

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

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

Изучены аспекты механизма действия, а также специфические фармакологические эффекты выявленного высокоактивного 5-НТ_{2A}-

антагониста авазола на моделях, отражающих противомигренозные, анальгетические и анксиолитические свойства.

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

Научно-практическая значимость

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

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

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

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

Методология и методы исследования

В исследовании использован мишень-ориентированный подход к поиску новых биологически активных соединений, разработана и использована консенсусная методология направленного поиска лигандов 5-HT_{2A/3}-рецепторов с применением современных методов *in silico*: системы PASS [Филимонов Д.А., 2006], TestSim ИТ Микрокосм, количественный подструктурный и частотный анализы [Васильев П.М., 2009], а также валидированных методов тестирования активности соединений *in vitro* [Деркачев Э.Ф., 1998; Yoshida S., 2007].

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противомигренозной, анальгетической, анксиолитической активностью [Мирзоян Р.С., 2012; Воронина Т.А., 2012б,г], а также в соответствии с общепринятыми и используемыми в современной мировой фармакологии подходами к изучению механизмов действия, специфических и токсикологических свойств [Irwin S., 1964; Арзамасцев Е.В., 2012; Espinoza S., 2013]. В исследовании использована методическая база НИИ фармакологии, кафедры фармакологии, кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, отдела нейронауки и исследований мозга Итальянского института технологий (NBT Istituto Italiano di Tecnologia).

Использованы рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов [Сергиенко В.И., 2012].

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

Реализация результатов исследования

Данные об обобщенных признаках высокого уровня 5-HT_{2A/3}-антагонистической и 5-HT₄-агонистической активности используются при синтезе новых соединений в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Для представителей конденсированных азолов, а именно 1,3-дизамещенных индолов, 1,2-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов характерна высокая 5-НТ_{2A/3}-антагонистическая и 5-НТ₄-агонистическая активность.
2. Для исследованных соединений из класса конденсированных азолов:
 - а. наличие высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности определяет обобщенная 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная структура с вариативными компонентами в виде С²-4-этоксифенила; N⁹-диэтиламинопропила либо N⁹-диэтиламиноэтила;
 - б. наличие высокого 5-НТ₃-антагонистического действия определяет обобщенная структура в виде N¹,C³-дизамещенной индольной либо N¹,C²-дизамещенной-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы с липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N¹-положении и фенил-замещенным фрагментом в составе С²/С³- заместителя. Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в составе N¹-заместителя, а также фторфенил либо метоксифенил в качестве указанного фенил-замещенного фрагмента;
 - в. наличие 5-НТ₄-агонистического действия зависит от сочетания в структуре С²,N⁹-дизамещенной имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы и *a*-нафтильного заместителя в С²-положении.
3. Вещество 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазол – авазол – является конкурентным 5-НТ_{2A}-антагонистом и проявляет выраженные анксиолитические, противомигренозные и анальгетические эффекты.

4. Вещество 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазол – эметазол – демонстрирует свойства высокоактивного антагониста 5-НТ₃-рецепторов, оказывает выраженное противорвотное, антидиарейное и анальгетическое действие.

Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на перевиваемых линиях почечных эмбриональных клеток человека (НЕК-293Т), нелинейных половозрелых мышах, крысах обоего пола, собаках, морских свинках, кроликах породы «Шиншилла»; с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологичного оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противомигренозной, анальгетической, анксиолитической, антиэметической активностью [Мирзоян Р.С., 2012; Воронина Т.А., 2012а-г], а также применением рекомендованных методов статистической обработки данных [Сергиенко В.И., 2012]. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета (Волгоград, 10-14 сентября 2015); международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 27-28 ноября 2014); VII международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, ноябрь 2014); юбилейной 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014); XIX региональной конференции

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

Публикации

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

Объем и структура диссертации

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

Личный вклад автора

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

1 СЕРОТОНИНОВЫЕ (5-НТ) РЕЦЕПТОРЫ 2 (А), 3 И 4 ТИПА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Серотониновые рецепторы

Серотониновые рецепторы (5-НТ-рецепторы согласно номенклатуре Международного сообщества фундаментальной и клинической фармакологии – IUPHAR) принадлежат к семейству G-белок сопряженных рецепторов за исключением рецепторов третьего типа (5-НТ₃), являющихся представителями семейства *цис*-петлевых лиганд-зависимых ионных каналов [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS; Alexander S.P., 2013].

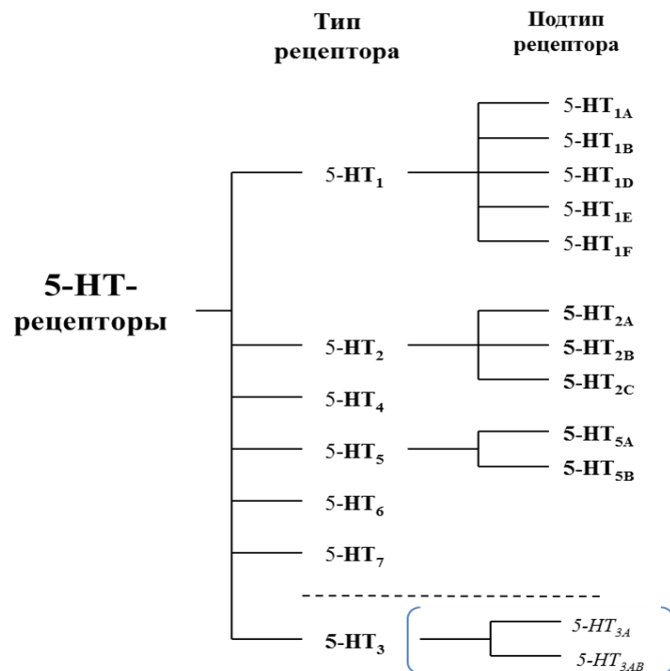


Рисунок 1. Классификация серотониновых рецепторов.

Примечание: 5-НТ₃-рецепторы могут различаться по составу субъединиц в пентамерной структуре канала.

К настоящему времени достоверно известно о существовании как минимум 18 генетических участков млекопитающих, кодирующих 14

типов/подтипов различных серотониновых рецепторов. 5-НТ₃-рецепторы являются представителем III семейства, остальные 13 типов/подтипов формируют оставшиеся шесть семейств. Также известно о существовании отдельных сплайсинг-вариантов для многих представителей рецепторов (например, для 2С, 7 подтипов, субъединиц 3 типа рецепторов) не классифицируемых в отдельные группы [Branes M., 2011].

1.1.1 Локализация, строение и функции 5-НТ_{2А}-рецепторов

5-НТ_{2А}-рецепторы являются первым из трех (А, В и С) подтипом из семейства 5-НТ₂-рецепторов (Таблица 1). Их наибольшая плотность отмечается в переднем мозге, особенно корковом слое, в том числе перифронтальном кортексе [Mengod G., 2015], интернейронах и пирамидных нейронах, а также парагиппокампальной извилине, зубчатой извилине гиппокампа, обонятельной луковице, задних рогах спинного мозга. Кроме того высокая плотность рецепторов встречается за пределами центральной нервной системы: в седалищном нерве, шванновских клетках, предсердиях, коронарных артериях, сосудах мозга, тромбоцитах [Alexander S.P., 2013].

Принципиальное строение 2А подтипа рецептора соответствует классическому представлению о структуре семидоменного трансмембранного G-белок связанного рецептора [McCorvy J.D., 2015].

Для 5-НТ_{2А} рецептора описаны несколько основных точек связывания с лигандами: сайт А задействует ряд аминокислот III, IV, V и VI трансмембранных доменов (ТМ); сайт Б – ТМ I, II, III и VII [Lin X., 2012]. Общим для них является именно 3 трансмембранный сегмент. Существующие антагонисты проявляют различную степень сродства к указанным участкам связывания, отмечается способность взаимодействовать как с обоими, для кетансерина, так и только с одним (сайт А), для ципрогептадина. В связи с чем, первый сайт связывания (А) приобретает особый интерес. Так, выделяется участие фенилаланина в положениях 339 и

Таблица 1. Основные характеристики 5-HT_{2A}-рецептора [Branes M., 2011; 5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS; Wischhof L., 2016].

Неноменклатурные и устаревшие названия		D рецептор (до 1991 г.), 5Ht-2, серотониновый 5HT-2 рецептор, серотониновый рецептор 2A
Хромосомная локализация	человек	13q14-q21
	мышь	14 D2
	крыса	15q11
Вторичная сигнальная система	G_{q/11}	↑Фосфолипаза C
	G_{i/o}	↓Аденилатциклаза
Основные агонисты		DOI (1-(4-йодо-2,5-диметоксифенил)пропан-2-амин), DOB (1-(4-бromo-2,5-диметоксифенил)пропан-2-амин), LSD ((+)-лизергиновой кислоты диэтиламид), метилергоновин, бромамфетамин, эрготамин, S16924, 2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этиламин
Основные антагонисты		Кетансерин, анансерин, ципрогептадин, AC90179, сертиндол, рisperидон, MDL 100907
Нейромедиаторные взаимодействия		↑Глутамат ↑Дофамин

340 образующего связь по типу π - π взаимодействия с арильными кольцами аспарагина (Asn343) [Braden M.R., 2006], двух остатков серина в положениях 239 и 242 [Barden M.R., 2007; Isberg V., 2013], а так же треонина (Thr160).

Спиральный (винтовой) карман, предназначенный для связывания лиганда с 5-HT_{2A}-рецептором, содержит остаток аспарагиновой аминокислоты (Asp155). Как и у иных моноаминергических G-белок связанных рецепторов Asp (155) образует солевой мостик с аминогруппой лигандов [Braden M.R., 2006]. Рядом с аспарагиновой кислотой в положении 155 в III трансмембранном домене располагается серин (Ser159), с которым связываются лиганды. Вероятно, III ТМ не является единственным при построении связей с антагонистами [Gandhimathi A., 2015]. Однако,

считается, что он занимает ключевое значение из всех семи трансмембранных сегментов.

Основными пострецепторными каскадами, активируемыми 5-HT_{2A}-рецепторами, являются фосфолипаза C- и фосфолипаза A₂-зависимые [Branes M., 2011]. Вторичным каскадом, реализуемым через G_{i/o}-белок, является аденилатциклазный путь. В ряде исследований на культурах клеток было показано, что для одних и тех же 5-HT_{2A}-агонистов в одних и тех же культуральных условиях может быть характерна различная по величине активация и, как следствие, превалирование одного из указанных каскадов [Berg K.A., 2005].

Интересной особенностью 5-HT_{2A}-рецепторов является относительно низкая, в сравнении с представителями остальных семейств, аффинность к нему эндогенного лиганда серотонина с величиной K_d микромолярного порядка.

Наиболее значимые физиологические эффекты 5-HT_{2A}-рецепторов связаны с регуляцией функции тромбоцитов, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. В тромбоцитах активация 5-HT_{2A}-рецепторов приводит к увеличению свободного внутриклеточного кальция и проагрегантному действию. Аналогичный вторичный сигнальный механизм способствует повышению сократительной активности гладких миоцитов в коронарных сосудах, сосудах головного мозга. Отмечается влияние 5-HT_{2A}-рецепторов на усиление сократительной активности сердца [Watts S.W., 2012]. Считается, что наиболее значимое изменение уровня кальция на пострецепторном уровне при стимуляции 2A серотониновых рецепторов связано не только с активацией протеинкиназы C, но и Rho-киназы, внеклеточной сигнал-регулирующей киназы, а также c-Src тирозинкиназы [Lu R., 2008].

Со стороны центральной нервной системы 5-HT_{2A}-рецепторы вовлечены в формирование поведенческих реакций, когнитивных процессов, памяти [Preston A. R., 2013; Meneses A., 2013; Zhang G., 2015]. Отмечается

влияние 5-HT_{2A}-рецепторов на развитие тревоги, страха, панических атак [Zangrossi H. Jr., 2014]. Некоторые данные свидетельствуют о том, что активация 5-HT_{2A}-рецепторов может способствовать развитию психостимулирующего эффекта, зрительных галлюцинаций за счет повышения возбудимости корковых нейронов [Kometer M., 2013]. Частично это отражает исторически наиболее ранние исследования D-рецепторов (устаревшее название 5-HT_{2A}-рецепторов), связанные с выявлением галлюциногенного действия диэтиламида лизергиновой кислоты (LSD), бромо-, йододиметоксифенилпропанамина (DOB, DOI), являющихся неселективными 5-HT₂-агонистами. С другой стороны в настоящее время выдвигается гипотеза, что такое психотическое действие LSD, DOB, DOI может быть результатом повышения чувствительности лиганд-распознающего участка дофаминовых (2) рецепторов, а также образования активных гетерорецепторных D₂/5-HT_{2A}-комплексов [Borrito-Escuela D.O., 2014].

Хроническая стимуляция 5-HT_{2A}-рецепторов также приводит к активации 5-HT системы мозга. В тоже время обнаружена 5-HT_{2A}-зависимая регуляция экспрессии ключевых генов в серотониновой системе мозга, в конечном счете, направленная на минимизацию поведенческих отклонений при хронической активации 5-HT_{2A}-рецепторов [Науменко В.С., 2012; Цыбко А.С., 2013].

Отмечается участие 5-HT_{2A}-рецепторов в системной терморегуляции у мышей. Интересно, что ни агонисты (DOI), ни антагонисты (кетансерин) при моноведении у интактных животных не способны изменять температуру тела. При этом в условиях воспалительной реакции, предположительно за счет опосредованного уменьшения активности NO-синтазы, кетансерин вызывает гипотермический эффект [Voronova I.P., 2015].

1.1.2 Особенности строения и функциональные аспекты 5-HT₃-рецепторов

Третий тип серотониновых рецепторов принадлежит к суперсемейству *цис*-петлевых лиганд-активируемых ионных каналов, включающему также цинк-активируемые каналы, никотиновые холинорецепторы, ГАМК_A- и стрихнин-чувствительные глициновые рецепторы [Barnes N.M., 2014].

5-HT₃-рецепторы очень широко представлены в ЦНС. Наиболее высокая плотность их наблюдается в таких областях продолговатого мозга как ядра солитарного тракта, задние двигательные ядра блуждающего нерва, тройничного нерва, ядра спинного мозга [Branes N., 1999]. Кроме того, 5-HT₃-рецепторы были найдены в некоторых отделах коры (грушевидной извилине и энторинальной коре), лимбической системе (гиппокампе, миндалевидном теле, перегородке), подкорковых областях (прилежащем ядре и гипоталамусе) и спинном мозге (в задних рогах), однако, концентрация их в этих областях была несколько ниже [Laporte A.M., 1992]. Физиологически активные 5-HT₃-рецепторы были обнаружены в корзинчатых нейронах зубчатой извилины [Kawa K., 1994], радиальном слое CA1 области гиппокампа [McMahon L.L., 1997], интранейронах неокортекса [Ferezou I., 2002].

Кроме того, и-РНК была выявлена в стриатуме, зрительном бугорке и передних рогах спинного мозга. В тоже время, в таких областях высоких концентраций 5-HT₃-рецепторов, как ядра солитарного тракта, задние двигательные нейроны блуждающего нерва и пограничная зона, и-РНК не идентифицировалась. Tecott L. и соавторы предположили, что дефект и-РНК в этих областях может быть вызван пресинаптической локализацией 5-HT₃-рецепторов в периферических афферентных волокнах дорсального комплекса блуждающего нерва [Tecott L.H., 1993]. Это предположение подтверждается методиками перерезки и экспериментами *in vitro* и *in vivo*. Локализация 5-HT₃-рецепторов в волокнах дорсального комплекса блуждающего нерва

согласуется с антиэметическими свойствами антагонистов данных рецепторов во время химиотерапии рака [Andrews P., 1993; Abenhardt W., 2006; Jordan K., 2007].

На периферии 5-HT₃-рецепторы локализованы на миелиновых Аδ-афферентах, а также С-волокнах, состоящих из пептидергических (субстанция Р) и непептидергических субпопуляций [Fozard J.R., 1984; Zeitz K.P., 2002], эфферентных пре- и постганглионарных волокнах, а также в нервном сплетении тонкого и толстого кишечника (мезентериальное и подслизистое сплетение) [Wolf H., 2000].

Считается, что 5-HT₃-рецептор по аналогии с представителями *цис*-петлевого семейства представляет собой пентамерный комплекс размерами 8 нм × 12,5 нм, пять белковых субъединиц которого, соединяясь друг с другом, образуют в центре канал диаметром 3 нм [Boess F.G., 1995; Unwin N., 2003]. Вероятно, этот комплекс может быть сформирован шестью обнаруженными *in vitro* субъединицами (5-HT_{3A-Ea}), но к настоящему времени детально изучены только первые две (А и В). Для остальных субъединиц (С-Ea) данные об их экспрессии *in vivo* отсутствуют [Barnes N.M., 2014].

Для 5-HT_{3A}-субъединицы известно о существовании как минимум 4 сплайсинг-вариантов, образующихся при удалении интронов из пре-м-РНК при ее посттранскрипционном процессинге [Bruess M., 2000]. Два из них, воспроизводимые в культуре нейробластомных-глиомных клеток (NCB-20, NG 108-15) и нативных тканях крыс, детально описаны Hoyer D. – они способны образовывать гомомерный 5-HT_{3A}-рецептор с аналогичными нативным 5-HT₃-рецепторам фармакологическими и электрофизиологическими свойствами [Hoyer D., 2002; Hannon J., 2008]. В то же время 5-HT_{3B}-субъединица, выявленная и клонированная в 1999 г. при формировании гомомерного 5-HT_{3B}-рецептора, полностью лишает его биофизических свойств, из-за «неполноценности» области (TM2 – второй трансмембранный домен), формирующей ионный канал [Dubin A.E., 1999; Boyd G.W., 2003]. Однако, совместная экспрессия А и В субъединиц может

приводить к формированию гетеромерного 5-HT_{3A/B}-рецептора с идентичными функциональными свойствами (за исключением несколько большей пропускной способности для ионов кальция) как и у экспрессированных гомомерных 5-HT_{3A}, так и нативных – 5-HT₃-рецепторов [Davies P.A., 1999; Brady C., 2001]. Было показано, что рекомбинантная экспрессия и 5-HT_{3A}, и 5-HT_{3B}-субъединиц возможна в одних и тех же тканях и нейронных областях мозга, что позволяет предполагать A/B-гетеромерное строение естественных 5-HT₃-рецепторов. В то же время известен факт клонирования еще как минимум 4 субъединиц (5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, 5-HT_{3E} и 5-HT_{3Ea}), неспособных формировать функционально значимых гомопентамеров, но образующих в экспериментальных условиях *in vitro* работоспособный канал совместно с A субъединицей [Hannon J., 2008]. При этом, несмотря на существующее представление о возможном полигетеромерном строении 5-HT₃-рецептора убедительных доказательств различного влияния на них 5-HT₃-лигандов к настоящему времени не описано.

Каждая из 5 образующих рецептор субъединиц состоит из длинной внеклеточной N-концевой последовательности, содержащей высокую долю заряженных и полярных аминокислотных остатков, короткой внеклеточной C-терминали, в которой сосредоточены 4 участка, содержащие преимущественно остатки аминокислот с гидрофобными боковыми цепями (Phe, Val, Leu, Ile, Trp и др.) и четырех трансмембранных доменов (TM1-TM4). Гидрофильные сегменты полипептидной цепи между TM1 и TM2 образуют короткую внутриклеточную петлю, а между TM3 и TM4 – длинную, имеющую 2 потенциальных сайта для фосфорилирования [Reeves D., 2002].

Второй трансмембранный домен каждой субъединицы принимает участие в формировании поры, где его гидрофобным радикалам, а также аргининовым радикалам в структуре TM3-TM4-петли [Kelley S., 2003]

принадлежит ключевая роль в регуляции селективности и величины ионной проводимости канала.

Характерной особенностью N-концевой цепи является наличие петли, содержащей 8 постоянных аминокислот для любых субъединиц, образуемой дисульфидной связью между двумя остатками цистеина, что и явилось основанием выделения суперсемейства *цис*-петлевых ионотропных рецепторов. При этом функциональная роль N-концевого сегмента, по всей видимости, заключается в формировании участка взаимодействия с агонистом [Peters J.A., 2005].

На примере селективного 5-HT₃-блокатора гранисетрона, были описаны возможные точки взаимодействия агониста/антагониста с 5-HT₃-рецепторным карманом: электроотрицательный радикал (ароматическое кольцо гранисетрона) располагается между Trp-183 и Tyr-234, а бициклическое ядро – между Trp-90 Phe-226 [Thompson A., 2005]. Считается, что сайт связывания с 5-HT₃-рецептором состоит из 6 петель (A-F) и локализован в «туннеле», образованном N-концами двух субъединиц, длиной 8 Å и выступающим над поверхностью цитоплазматической мембраны на 20 Å. Интересен факт того, что «стенки» этого «туннеля», не являясь активными центрами рецептора, посредством гидрофильных водородных связей могут удерживать лиганд на выходе из рецепторного кармана – около мембраны и замедлять его повторное проникновение к участку связывания [Thompson A., 2006].

Основная функция лиганд-зависимого катионного канала – 5-HT₃-рецептора – связана с быстрой деполяризацией мембраны клетки при его возбуждении в результате быстрого повышения Na⁺ и Ca²⁺ в цитозоле, за счет их притока извне, а также выхода ионов K⁺ из клетки. В условиях *in vitro* также получены доказательства о проводимости канала для ионов лития, рубидия, цезия и, в меньшей степени, магния [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS]. При этом, возникший электрический импульс приводит к формированию конечных центральных либо периферических эффектов.

Таблица 2. Основные характеристики 5-HT₃-рецепторов [Branes M., 2011; Alexander S.P., 2013].

<i>Основные субъединицы</i>			
Обозначение		А	В
Хромосомная локализация	человек	11q23.1	11q23.1
	мышь	9 A5.3	9 В
	крыса	8q23	8q23
Формируемые комплексы		5-HT _{3AB} , 5-HT _{3A}	5-HT _{3AB}
<i>Рецепторные пентамеры</i>			
Рецептор		5-HT _{3A}	5-HT _{3AB}
Неноменклатурные и устаревшие названия		5-HT _{3R} , 5-HT ₃ рецептор, 5-гидрокситриптаминный рецептор 3A, serotonin-gated ion channel receptor (серотонинозависимый рецепторный ионный канал)	5-HT _{3A/B} , серотониновый рецептор 3B
Ионная проницаемость		Rb ⁺ = Cs ⁺ = Li ⁺ > Na ⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺	Na ⁺ = K ⁺ = Cs ⁺ > Ca ²⁺ -
Основные агонисты		Квиразин, мета-хлорфенилбигуанид, 1-фенилбигуанид, 2-метил-5-гидрокситриптамиин	
Основные антагонисты		Гранисетрон, закоприд, ондансетрон, азасетрон, метоклопрамид	
Неспецифические блокаторы канала		Пикротоксинин, пикротоксин, билобалид, гинкголид В, дилтиазем, ТМВ-8	Пикротоксинин, пикротоксин, билобалид, гинкголид В
Алlostерические модуляторы		Этанол, Mg ²⁺ , 5-гидроксииндол, трихлорэтанол, Ca ²⁺ , Zn ²⁺	Трихлорэтанол
Нейромедиаторные взаимодействия		↑5-гидрокситриптамиин ↑Дофамин ↓Ацетилхолин	

Центральные 5-HT₃-рецепторы вовлечены в механизмы высвобождения различных нейромедиаторов. Активация данного вида рецепторов облегчает выделение серотонина из отдельных участков гипоталамуса, лобной доли и гиппокампа у морских свинок и крыс, а также вызывает снижение высвобождения норадреналина. Это в свою очередь может оказывать

влияние на развитие тревожной, депрессивной симптоматики [Rajkumar R., 2010].

Активация 5-HT₃-рецепторов повышает выделение дофамина *in vitro* (у крыс – в клетках полосатого тела и черной субстанции) и *in vivo* (у крыс – в прилегающем ядре). Вероятно, эти эффекты возможны благодаря влиянию на переносчики дофамина или вовлечению в процесс холецистокинина, который выделяется при стимуляции 5-HT₃-рецепторов [Raiteri M., 1993].

Описано участие центральных 5-HT₃-рецепторов в эметогенезе, регуляции симпатических и парасимпатических влияний, в проведении ноцицептивных и антиноцицептивных сигналов, а также в восприятии болевых ощущений [Fukui H., 1993; Färber L., 2004; Nakamura H., 2015; Hall J.D., 2015]. Участие периферических 5-HT₃-рецепторов в ноцицепции подтверждается экспериментальными данными о снижении 5-HT₃-блокаторами порога болевой чувствительности у крыс и мышей при остром и хроническом воспалении [Giordano J., 1989; Kesim M., 2005], а также клиническими исследованиями уменьшения нейропатической боли, фибромиалгии при приеме 5-HT₃-антагонистов [Spath M., 2004; Vergne-Salle P., 2011].

Абдоминальные 5-HT₃-рецепторы афферентов блуждающего нерва вызывают аномальную импульсацию в волокнах *n. vagus*, проецирующихся в пограничную зону, что объясняет периферический компонент в развитии тошноты и рвоты, вызванной цитостатиками, способными увеличивать содержание серотонина в энтерохромаффинных клетках [Andrews P., 1993; Abenhardt W., 2006].

1.1.3 5-HT₄-рецепторы

Серотониновые рецепторы 4 типа, как и большинство представителей 5-HT группы, относятся к G-белок сопряженным и кодируются одним генетическим участком (Таблица 3).

Таблица 3. Основные характеристики 5-HT₄-рецептора [Branes M., 2011; Alexander S.P., 2013].

Неноменклатурные и устаревшие названия		Серотониновый рецептор 4
Хромосомная локализация	человек	5q31-q33
	мышь	18 D3
	крыса	18q12.1
Вторичная сигнальная система	G _s	↑Аденилатциклаза
	G _{12/13}	↑Фосфолипаза C ↑Фосфолипаза D
Основные агонисты		RS57539, ML10302, реленоприд, тегасерод, TD8954, прукалоприд, велусетраг, BIMU1 (33-этил-N-[(5S)-8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-yl]-2-оксобензимидазол-1-карбоксамид)
Основные антагонисты		SB207710, GR113808, RS57639, пибосерод, SDZ 20557
Нейромедиаторные взаимодействия		↑Ацетилхолин ↑Дофамин ↑Серотонин

Вместе с тем для него описано множество сплайсинг вариантов, образующих не менее десяти изоформ рецептора – 5-HT_{4(a-g)}, 5-HT_{4(hb)}, 5-HT_{4(i)}, 5-HT_{4(n)} за счет альтернативного соединения во внеклеточном регионе между IV и V трансмембранными доменами, либо С-терминали. По всей вероятности, принципиальное отличие указанных вариантов заключается во внутриклеточной организации и взаимодействии с субструктурами клетки при активации рецептора, но не аффинностью участка, ответственного за связывание с лигандами [Branes M., 2011].

5-HT₄-рецепторы (в том числе сплайсинг варианты) обнаружены в тканях головного мозга, желудочно-кишечном тракте, сердце [там же]. В ЦНС отмечается преимущественная локализация рецепторов на постсинаптических мембранах в базальных ганглиях, включая черную субстанцию, бледное ядро, хвостатое ядро, скорлупу, прилежащее ядро, гиппокамп, а также в двигательной коре, красном ядре, вентральных рогах

спинного мозга [Varnas K., 2003; Suwa B., 2014]. Отмечается экспрессия всех изоформ в толстой кишке человека [Yaakob N.S., 2015], мочевом пузыре и мочевыводящих путях [Imamura T., 2015].

С помощью комбинации методов молекулярного моделирования, радиолигандного связывания и точечного мутагенеза при экспрессии 5-HT₄-рецептора были выявлены наиболее значимые участки его связывания с лигандами на примере GR113808, серотонина [Mialet J., 2000; Padayatti P.S., 2013]. Пролин 149 (Pro149) несет ответственность за фиксацию молекулы в IV петле; а триптофан (Trp146) в ТМ IV, фенилаланин (Phe275-276) и аспарагин (Asp279) в ТМ VI образуют гидрофобный карман, принимающий участие в формировании гидрофобных связей с участком лиганда. Отмечается вклад карбоксильной группы аспарагина (Asp100) в III ТМ в образование ионного взаимодействия и формирование водородных связей с основным азотом в структуре лигандов.

Главным пострецепторным сигнальным каскадом для 5-HT₄-рецепторов является Gs-зависимый аденилатциклазный путь, приводящий, в частности, к увеличению повышения возбудимости нейронов. Также отмечается возможность непосредственного вовлечения ионных каналов (Ca²⁺) клетки в ответ на активацию 5-HT₄-рецептора. Вторым сигнальным каскадом, известным для 4 типа серотониновых рецепторов является фосфолипаза C-зависимый [Alexander S.P., 2013]. Вероятно, конечное повышение ионов кальция в результате такого ответа может усиливать цАМФ-опосредованную активность 5-HT₄-ергических нейронов.

Считается, что 5-HT₄-рецепторы вовлечены в процессы обучения и памяти. В ряде исследований отмечается способность 5-HT₄-рецепторов при активации в условиях различных поведенческих парадигм улучшать когнитивные функции животных. Эффект 5-HT₄-рецепторов в ЦНС может быть связан со стимуляцией последними выброса ацетилхолина [Branes M., 2011].

Также отмечается вовлеченность 5-НТ₄-звена в регуляцию метаболизма предшественника амилоида. 5-НТ₄-рецепторы активируют секрецию белка - предшественника амилоида- α (sAPP α) – нейропротекторного пептида, способствующего улучшению процессов памяти, а также уменьшающего гиперглутаматергическую нейротоксичность [Cachard-Chastel M., 2007].

5-НТ₄-рецепторы могут принимать участие в формировании тревожного поведения у животных. Для некоторых 5-НТ₄-агонистов (RS67333) отмечается наличие анксиолитического действия [Mendez-David I., 2014; Bell R., 2014], а в исследованиях, проводимых на 5-НТ₄-нокаутных мышцах, отмечается уменьшение реакции на стресс и изменение механизмов формирования длительного следа памяти [Comran V., 2004; Segu L., 2010].

Периферические 5-НТ₄-рецепторы принимают участие в формировании гастроэнтеро-прокинетиического эффекта. При их стимуляции отмечается увеличение числа функциональных энтеронейронов в мышечной оболочке кишечника [Belkind-Gerson J., 2015], приводящих к повышенной секреции и пропульсивной активности [Camilleri M., 2014].

1.2 Фармакологические свойства и клинический потенциал использования лигандов 5-НТ_{2A/3/4}-рецепторов

Лиганды 5-НТ_{2A/3/4}-рецепторов демонстрирует многочисленные варианты рецепторной активности от полного до частичного агонистического действия, а также от нейтрального антагонистического до инверсного агонистического влияния [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS].

Вместе с тем, учитывая имеющиеся на сегодняшний день представления о физиологической и патофизиологической роли 5-НТ_{2A/3/4}-рецепторов в организме, наиболее востребованными для практического использования в клинической медицине являются 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-блокаторы, а также 5-НТ₄-стимуляторы.

Перспективное клиническое направление использования 5-HT_{2A}-антагонистов связано с вовлеченностью серотониновых рецепторов 2-го А-типа в патогенез развития мигрени и формирование при этом спазма мозговых артерий в первой фазе приступа. Считается, что, 5-HT₂-рецепторы ответственны за ноцицептивный эффект серотонина [Bardin L., 2011], а ряд агонистов этих рецепторов способен провоцировать приступы головной боли как у пациентов с хронической формой мигрени, так и у здоровых лиц. Предполагается, что частая активация 5-HT_{2A}-рецепторов способствует выделению провоспалительных факторов из первичных афферентных окончаний тройничного нерва, а увеличение числа этих рецепторов может быть фактором хронизации головной боли [Амелин А.В., 2011].

Получены данные об анксиолитическом потенциале 5-HT_{2A}-антагонистов. В частности показано, что 14-дневное введение кетансерина овариэктомированным пренатально стрессированным самкам оказывает анксиолитический эффект [Федотова Ю.О., 2012].

В последнее время более активно появляются данные об атипичном антипсихотическом [Oyamada Y., 2015; Chłóń-Rzepa G., 2015], а также гипнотическом эффекте некоторых 5-HT_{2A}-блокаторов. На стадии клинических исследований находится инверсный 5-HT_{2A}-агонист пимавансерин, демонстрирующий антипсихотический потенциал у пациентов с психотическим проявлением болезни Паркинсона [Cummings J., 2014].

Антагонисты 5-HT₃-рецепторов (ондансетрон, трописетрон, гранисетрон) зарекомендовали себя как эффективные центральные противорвотные средства, используемые для купирования эметогенного побочного действия противоопухолевых препаратов [Thompson A.J., 2013; Navari R.M., 2015; Nakamura H., 2015].

В то же время, несмотря на эффективность, а также безопасность применения блокаторов третьего типа серотониновых рецепторов при цитотоксической рвоте, подтвержденную в ходе метаанализа 120

клинических исследований [Tricco A.C., 2015], у пациентов все же отмечаются приступы рвоты в первый день после приема цисплатина, а спустя 24 часа эффективность 5-HT₃-антагонистов существенно не отличается от других противорвотных средств [Tavorath R., 1996]. Некоторые тенденции к повышению эффективности отмечаются у новых 5-HT₃-антагонистов (палоносетрон) [Абрамов М.Е., 2014], либо при комбинации их с глюкокортикостероидами. Комбинация с D₂-антагонистами (метоклопрамид, ализаприд, метопимазин) также может увеличивать их эффективность, но в меньшей степени [Oechsle K., 2006].

Блокаторы 5-HT₃-рецепторов в настоящее время интенсивно изучаются и внедряются в практическую медицину в качестве селективных агентов, способных уменьшить проявления синдрома раздраженного кишечника [Camilleri M., 2014]. Отмечается их способность уменьшения перистальтики, чувствительности к механическому раздражению, торможению илеоцекального рефлекса.

Другое направление исследований связано с анальгетическим потенциалом 5-HT₃-антагонистов. Отмечается, что ондансетрон уменьшает выраженность нейропатической боли [McCleane G.J., 2003]. Трописетрон проявляет высокую антиноцицептивную активность у больных с фибромиалгией [Spath M., 2004]. Рамосетрон – при диарейной форме синдрома раздраженной кишки [Min Y.W., 2015].

Следует отметить, что сегодня известно об антиноцицептивной активности серотонина, опосредованной центральными 5-HT₃-рецепторами [Okamoto K., 2005]. В то же время, ряд исследований указывает на отсутствие инверсии антиноцицептивного эффекта морфина при предварительном введении 5-HT₃-блокатора ондансетрона и LY-278,584 [Yoon M., 2006], и, напротив, о положительном влиянии 5-HT₃-рецепторов на развитие феномена опиоидиндуцированной гипералгезии [Liang D.Y., 2011].

Агонисты 4 типа серотониновых рецепторов в настоящее время находят применение как средства для купирования Д-формы синдрома

раздраженного кишечника, а также гастроэзофагеального рефлюкса [Camilleri M., 2014].

Вместе с тем появляются многочисленные данные о перспективности исследования и разработки на их основе препаратов для лечения болезни Альцгеймера, улучшения процессов обучения и памяти [Voskaert J., 2011].

Другим направлением является изучение 5-НТ₄-потенциала для лечения нарушений аппетита. Было показано, что в отдельных случаях стимуляторы 5-НТ₄-рецепторов демонстрируют анорексигенное действие [Francis H.M., 2011]. Это частично обосновывает наблюдаемые у 5-НТ₄-нокаутных мышей расстройства потребления пищи, особенно после стрессового воздействия. Вероятно механизмы, лежащие в основе этого нарушения, связаны с меньшей эффективностью 5-НТ (в гипоталамусе, прилежащем ядре) [Compan V., 2004].

1.3 Перспективы поиска серотонинергически активных соединений среди конденсированных азолов.

Наиболее известные 5-НТ-лиганды имеют в своей основе гетероциклические структуры (Рисунок 2, Рисунок 3, Рисунок 4).

Так, в частности, ондансетрон является производным карбазола, трописетрон – эфиром индолкарбоновой кислоты, гранисетрон – индазолкарбоксамидом, цилансетрон – пиридокарбазолом. Анализ работ, посвящённых поиску и изучению новых 5-НТ₂, 5-НТ₃-антагонистов и 5-НТ₄-агонистов, обнаруживает соединения, содержащие различные азольные фрагменты. Так, например, вещество DAU 6215 – эндо-N-(8-метил-8-азабицикло-[3.2.1.]-окто-3-ил)-2,3-дигидро-2-оксо-1Н-бензимидазол-1-карбоксамид гидрохлорид; соединения YM 060, (R)-5-[(1-метил-1Н-индол-3-ил)карбонил]-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-бензимидазола моногидрат,

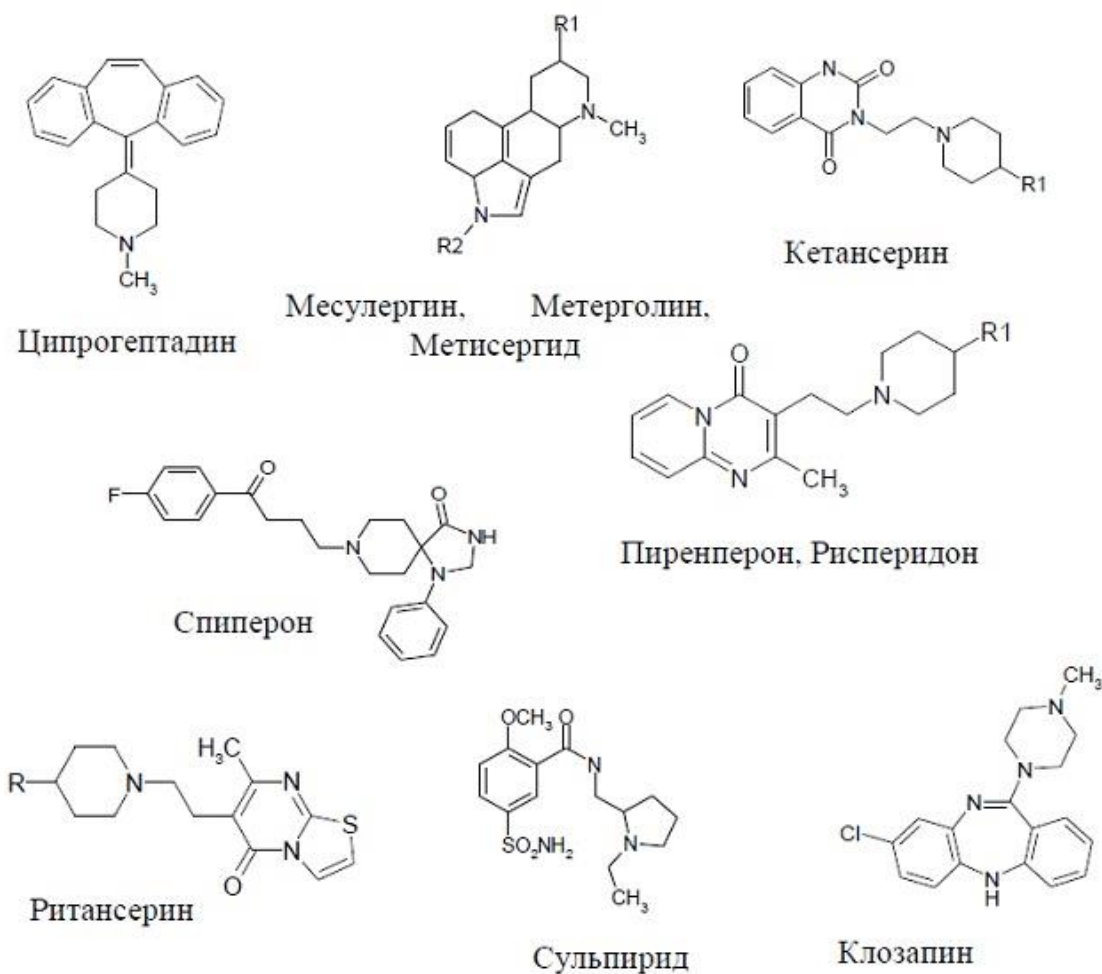


Рисунок 2. Химические структуры некоторых 5-НТ_{2А}-антагонистов.

и УМ 114, (R)-5-[(1-индолил)карбонил]-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-бензимидазола моногидрат; вещество KB-R6933, 6-амино-5-хлоро-1-изопропил-2-(4-метил-1-пиперазинил)-бензимидазола малеат; лерисетрон – 1-фенил-метил-2-пиперазинил-1Н-бензимидазола гидрохлорид [Sagrada A., 1991; Miyata K., 1991; Yamano M., 1995; Ozaki A., 1999].

В настоящее время ведётся поиск новых эффективных 5-НТ₃-блокаторов среди производных 3-этоксихиноксалин-2-карбоксамида и 2-замещенных бензоксазол карбоксамида [Yang Z., 2010; Manesh R., 2011], 5-НТ_{2А}-антагонистов – среди производных 4-нитроиндола [Hayat F., 2015], тетрагидропиридоиндолы [Иващенко А.В., 2013]. Отмечается 5-НТ₄-агонистический потенциал имидазо[1,5-а]пиридинов [Nirogi R., 2015].

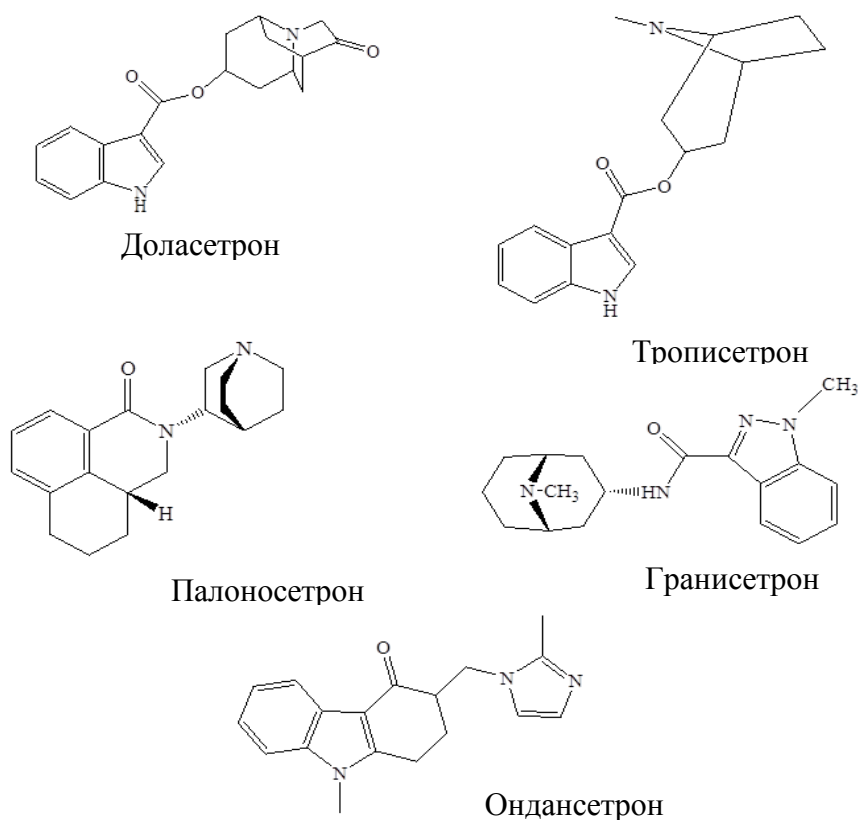


Рисунок 3. Химические структуры некоторых 5-HT₃-антагонистов.

В отечественных исследованиях описано конструирование новых 5-HT-лигандов путем модификации триптаминовых, метоклопрамидных и арилпиперазиновых производных [Зефирова О.Н., 2001]. Находится в фазе клинических исследований соединение с противомигреновым действием, производное тропанона тропоксин с 5-HT₂-антагонистической активностью [Середенин С.Б., 1998].

Согласно описанным фармакофорам для 5-HT₂- и 5-HT₃-антагонистов [Hibert M.F., 1990; Venkataraman P., 2002] и агонистов 5-HT₄-рецепторов [Iskander M.N., 2006], лиганды включают следующие структурные элементы: электрополярный/положительно заряженный фрагмент, в роли которого часто выступает атом азота; жёсткую ароматическую или гетероароматическую систему и электроотрицательный радикал.

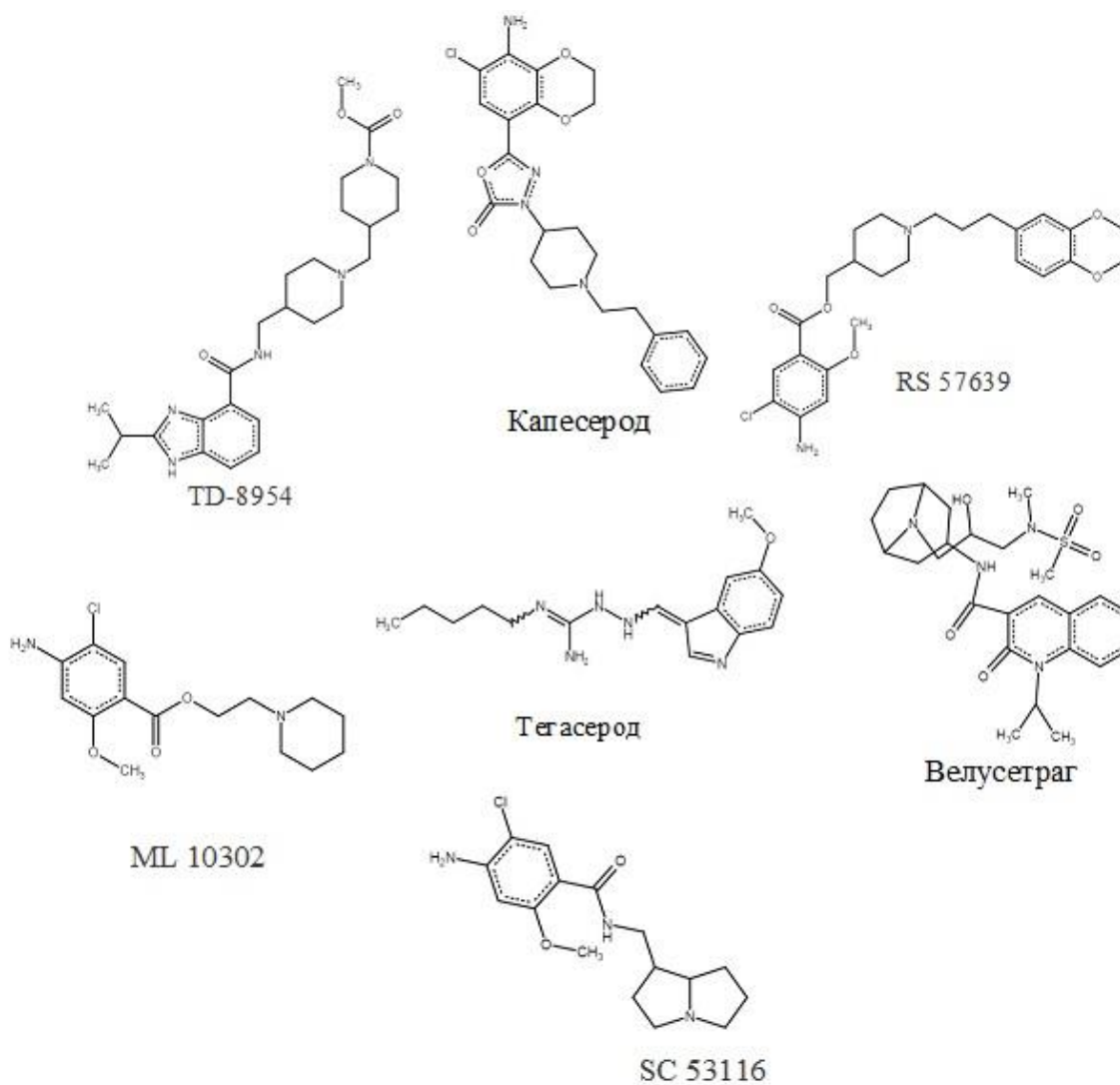


Рисунок 4. Химические структуры некоторых 5-HT₄-агонистов.

С другой стороны, принимая во внимание концепцию о привилегированных структурах, определяющих наличие биологической активности у веществ [DeSimone R.W., 2004], представляется актуальным поиск новых соединений с серотонинергическим действием среди молекул с привилегированными свойствами, что не противоречит фармакофорной гипотезе.

По всей вероятности, целесообразным можно считать поиск серотонинергически активных соединений среди веществ, содержащих описанные выше функционально-значимые фармакофоры, а также имеющих

в своей основе привилегированный «компонент». К таким соединениям можно отнести производные конденсированных азолов с полярными заместителями.

О перспективности поиска внутри данного класса также свидетельствуют ранее проведенные исследования в Волгоградском государственном медицинском университете [Киабия С.Т., 2003; Спасов А.А., 2006; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008; Горягин И.И., 2008].

Показано, что потенциальной активностью по отношению к различным серотониновым рецепторам 2 и 3 типа обладают такие производные азола, как 9-R-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, 4-R-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы, а общими фрагментами, ответственными за взаимодействие последних с H_1 -, H_2 -, 5-HT₂- и 5-HT₃- рецепторами являются третичная амино- или иминогруппа [Черников М.В., 2008]. Выявлены активные 5-HT₂- (РУ-17) и 5-HT₃-антагонисты (РУ-64, РУ-1204), также являющиеся структурно азолосодержащими веществами.

Принимая во внимание принцип гомологичности между различными семействами 5-HT-рецепторов, и как следствие, близкое структурное сходство лигандов, селективных в отношении отдельных типов/подтипов, а также обобщая проанализированные данные можно предполагать, что представители расширенного химического класса конденсированных азолов могут обладать способностью к взаимодействию не только с 5-HT_{2/3}-, но и 5-HT_{2A}-, 5-HT₄-рецепторами.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Материалы и оборудование, использованные для исследований *in silico*

В настоящем исследовании использовались структурные описания 1532 новых производных конденсированных азолов, синтезированных в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, кафедры химии природных и высокомолекулярных соединений Южного федерального университета, химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова принадлежащих к различным подклассам: индолы (1,3-дизамещенные индолы; индолы, сопряженных с бицикло[3.3.1]нонановыми и бицикло[3.2.1]октановыми каркасами); N¹-бензимидазолы; пиримидо[1,2-а]бензимидазолы; пиазоло[1,2-а]бензимидазолы; 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы; N⁹-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы; N¹-1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы (Рисунок 5).

Использовались биоинформационные описания базы данных UnitProtKB [Knowledgebase Universal Protein. URL: <http://www.uniprot.org>] о структуре 5-HT_{2A}- и 5-HT₄-рецептора сервера Швейцарского института биоинформатики ExPASy [ExPASy: Bioinformatics Resource Portal of Swiss Institute of Bioinformatics. URL: <http://www.expasy.org>]. Информацию о точках связывания лигандов с активным центром 5-HT_{2A}-рецептора заимствовали из работ D.E. Nichols, M.R. Braden и S. Ponnala [Barden M.R., 2007; Nichols D.E., 2012; Ponnalaa S. et al., 2014]; 5-HT₄-рецептора – из работ Mialet J. и соавт. [Mialet J., 2000].

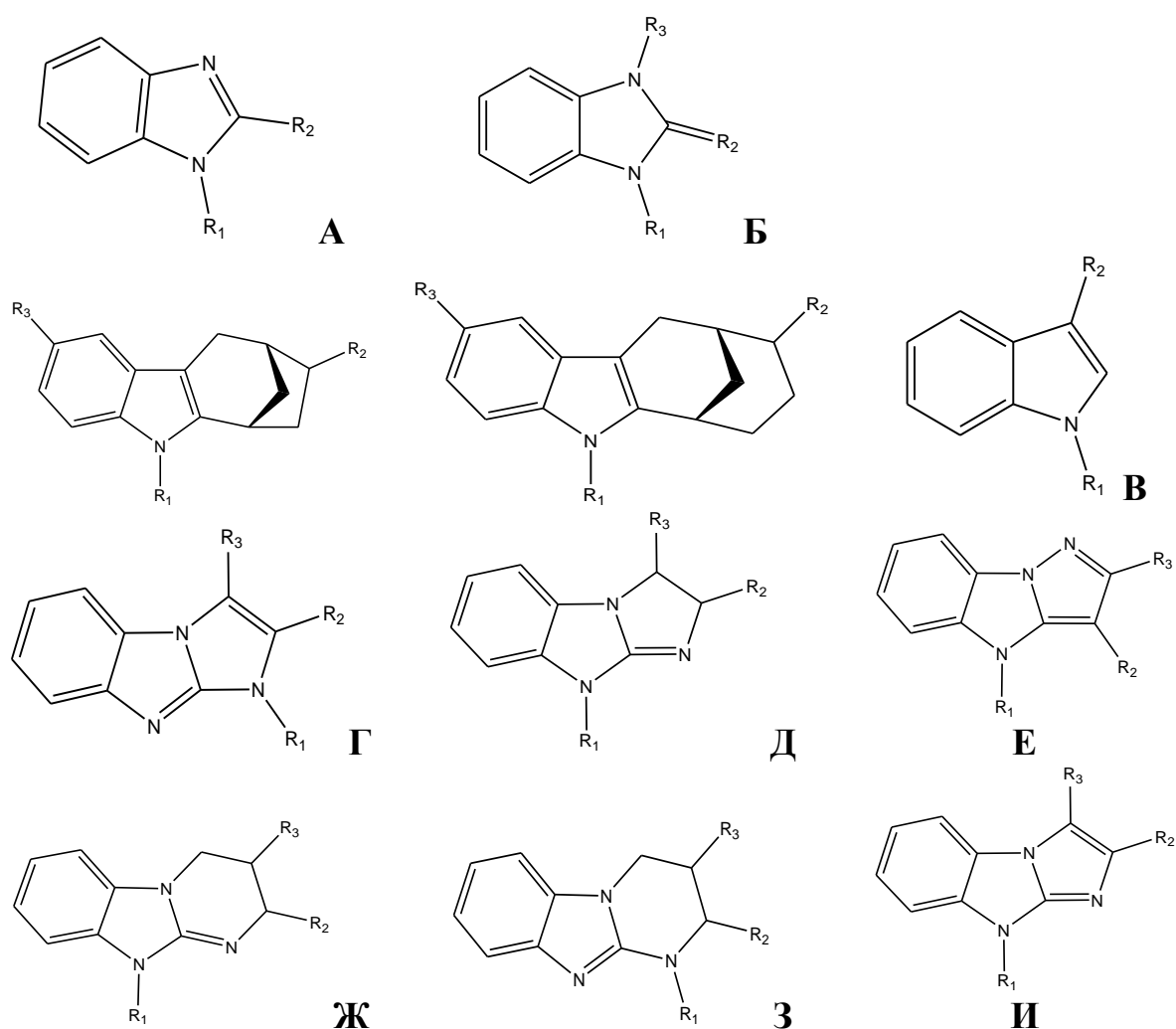


Рисунок 5. Общие структуры изученных классов конденсированных азолов.

А – N^1 -бензимидазолы; Б – 2,3-дигидро- N^1 -бензимидазолы; В – индолы (1,3-дизамещенные индолы; индолы, сопряженные с бицикло[3.3.1]нонановыми и бицикло[3.2.1]октановыми каркасами); Г – N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазолы; Д – N^9 -дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; Е – N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазолы; Ж – пиридино[1,2-а]бензимидазолы; З – N^1 -1,2,3,4-тетрагидропиридино[1,2-а]бензимидазолы; И – пиразоло[1,2-а]бензимидазолы.

В работе использовалось следующее программное обеспечение CS Chem3D 8.0; MDL ISIS / Draw 2.5 Standalone [MDL ISIS/Draw 2.5]; программный пакет AutoDock Vina 1.1.1 в комплекте с дополнительными инструментами AutoDock Tools и PyMol [Trott, 2011], для подготовки электронного описания молекулярных структур соединений использовали программы HyperChem 7.1 Evaluation Copy 2002 [HyperCube Inc. URL:

<http://www.hyper.com>] и MOPAC2009 [Stewart J.J.P., 2011]. Статистическую обработку выполняли с использованием программы GgraphPad Prism 5.0, а также пакета программ MS Office 2010.

Наиболее высокопроизводительные вычисления выполняли с использованием 64-х ядерного персонального суперкомпьютера (*Supermicro*, США) общей производительностью 2,3 Тфлопс.

2.1.2 Материалы и оборудование, использованные для экспериментальных фармакологических исследований

В исследовании использованы субстанции 240 веществ, синтезированных в лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, кафедры фармакологии Южного федерального университета, химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Приложение А)¹.

В качестве фармакологических реактивов, препаратов и веществ сравнения использованы: 5-гидрокситриптамин (субстанция, *Sigma*, США), кетансерин (субстанция, *Sigma*, США), ципрогептадин (субстанция, *Sigma*, США), ондансетрон (раствор 0,2% во флаконах по 2 мл; *Ленс-Фарм*, Россия), ML10302 (субстанция, *Sigma-Aldrich*, США), SZD205557 (субстанция, *Sigma-Aldrich*, США), реагент Lipofectamin 2000 (раствор, *Invitrogen*, *Life Technologies*, США), Coelenterasine h (раствор, *Promega*, США), 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) (*Sigma*, США), фенилэтиламин (субстанция, *Sigma*, США), 3-метиламином (субстанция, *Sigma*, США), изопротеринол (субстанция, *Sigma*, США), квинпирол (субстанция, *Sigma*, США),

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

ангиотензин II (субстанция, *Sigma*, США), валсартан (субстанция, *Sigma*, США), MRS1279 (субстанция, *Sigma*, США), верапамил (раствор в ампулах 2,5мг/мл, *Мосхимфармпрепараты*, Россия), динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (субстанция, *Sigma*, США), ацетилхолин йодистый (субстанция, *Sigma*, США), атропина сульфат (субстанция, Россия), карбохолин (субстанция, *Sigma*, США), галоперидол (раствор в ампулах 5 мг/мл, *Мосхимфармпрепараты*, Россия), апоморфин (субстанция, *Sigma*, США), фенамин (субстанция, *Sigma*, США), L-диоксифенилаланин (субстанция, *Sigma*, США), 5-гидрокситриптофан (субстанция, *Sigma*, США), ареколин (субстанция, Россия), никотин (раствор, *Sigma*, США), клофелин (раствор в ампулах, Россия), резерпин (субстанция, *Sigma*, США), пикротоксин (субстанция, *Sigma*, США), ритансерин (субстанция, *Sigma*, США), метисергид (субстанция, *Sigma*, США), хлоралгидрат (субстанция, *Panreak*, Испания), клопидогрель (субстанция, *Sanofi-syntelabo*, Франция) и тиклопидин (субстанция, *Sanofi-syntelabo*, Франция), адреналина гидрохлорид (*Ренам*, Венгрия), коллаген (*Ренам*, Венгрия), формалин (раствор, *Агат-мед*, Россия), адьювант Фрейнда (суспензия, *Grand Island Biol. Company*, США), буторфанола тартрат (раствор в ампулах, *Московская фармацевтическая фабрика*, Россия), диклофенак натрия (раствор в ампулах, *Хемофарм*, Сербия), лоперамид (*Верофарм*, Россия), диазепам (Реланиум, раствор в ампулах, *Польфа*, Польша).

Для исследований использованы реактивы: D-глюкоза (ХЧ субстанция, Германия); трис-(гидроксиметил)аминометан (ХЧ субстанция, *Serva Feinbiochemica*, Германия); натрия хлорид, калия хлорид, калия дигидрофосфат, магния сульфат, кальция хлорид, натрия гидрокарбонат (ХЧ субстанция, *Агат-мед*, Россия); натрия цитрат (ХЧ субстанция, Реахим, Россия).

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: неинбредных крысах обоего пола (питомник РАМТН, Москва; питомник РАППОЛОВО, Ленинградская обл.); неинбредных мышах обоего

пола (питомник РАМТН, Москва); 12 беспородных собак, массой 9-12 кг (питомник РАМТН, Москва); 12 кроликов породы Шиншилла; морских свинок (питомник РАППОЛОВО, Ленинградская обл.).

Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом на полнорационнoй сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных [ГОСТ Р 50258-92] с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ [ГОСТ Р 51000.3-96].

Экспериментальные исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 00049000 (OHRP)) и проводились согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ протокол № 154-2012 от 12.03.2012.

Для исследований использовано следующее оборудование: лазерный анализатор частиц «ЛАСКА-1К» (*Люмекс*, Россия), полифункциональный ридер Infinite F500 (*Tecan*, Швейцария), термометр («OMRON», Германия), доплерограф Допплер-К (*Минимакс*, Россия) с датчиком диаметром 2 мм, оборудование для работы с изолированными органами и тканями: изотонический датчик 7006, регистрирующий модуль Data Capsul Evo и самописец Unirecord, одиночная камера для работы с изолированными органами и тканями 4000 (*UGO Basile*, Италия), лазерный анализатор агрегации тромбоцитов Биола 220 LA (Россия), компьютерный гемодинамический анализатор на базе программы BEAT (Москва, Россия), центрифуга MultiCentrifuge CM 6M (*Elmi*, Латвия), анализатор крови реологический АКР-2 (Россия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (*OHAUS Europe*, Швейцария), весы Scout Pro SPU601 (*OHAUS*, США),

электрокардиограф Поли-Спектр-8/В (Нейрософт, Россия), электростимулятор лабораторный ЭСЛ-2 (Россия), установка для проведения теста «Горячая пластина», рН-метр рН213 (Hanna, Германия).

2.2 Методы *in silico*

2.2.1 *Обработка данных для информационных исследований*

Информация о химическом строении изучаемых соединений обрабатывалась химическим редактором MDL ISIS / Draw 2.5 Standalone [MDL ISIS/Draw 2.5] и сохранялась в виде файлов с расширением *.skc и *.mol. Каждую химическую структуру проверяли на отсутствие ошибок при вводе с помощью расчета и сравнения с исходными для нее брутто-формулой и молекулярным весом.

2.2.2 *Методы компьютерного прогноза серотонинергической активности новых конденсированных азолов*

Для разработки методологической системы направленного поиска 5-НТ_{2A/3/4}-активных соединений в настоящем исследовании использовалась стратегия разработки консенсусного компьютерного прогноза активности с использованием различных методов прогнозной оценки фармакологического действия химических соединений (Рисунок 6): система «PASS» [Филимонов Д.А., 2006]²; метод сходства с эталонами и ранее изученными соединениями сходных химических классов [Васильев П.М., 2009; Васильев П.М., 2013], реализованный в модуле «TestSim» программного комплекса ИТ

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

«Микрокосм»³; ретроспективный подструктурный анализ значимости классов и подклассов химических соединений [Васильев П.М., 2014].

Прогноз в системе PASS осуществлялся по базе данных PASS10.SAR объемом 313 344 биологически активных соединений. В качестве прогностического критерия проявления активности соединением использовали отношение вероятности проявления активности к вероятности ее отсутствия (P_a/P_i). Критерию включения соединения в прогнозный список проявления активности по PASS соответствовало значение отношения P_a/P_i превышающее 1,0. При этом относительно низкий уровень значимости прогнозной оценки принимался ввиду исключения ложноотрицательных показателей прогноза, а также для возможности более детального консенсусного анализа прогнозных оценок в совокупности с оценками альтернативных методов.

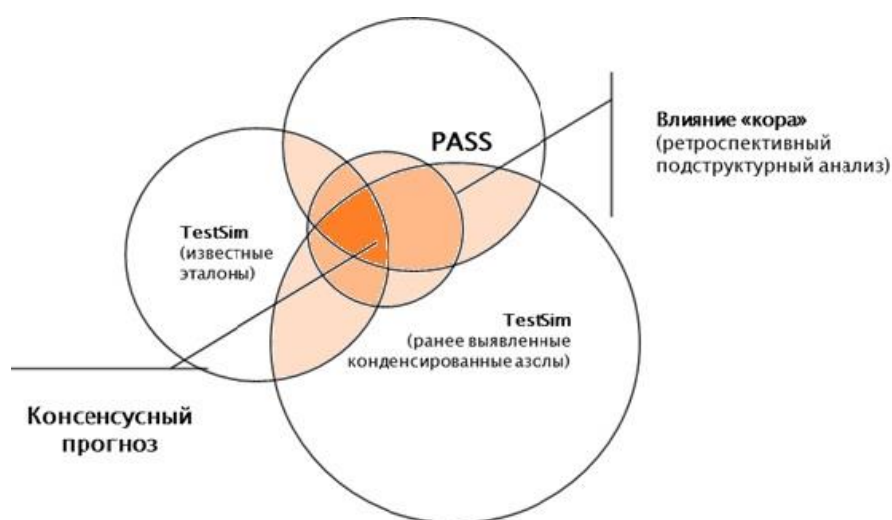


Рисунок 6. Итоговая стратегия консенсусного прогноза 5-НТ_{2A/3}-антагонистической активности новых конденсированных производных азола.

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

Метод сходства к эталонам основан на расчете средних значений коэффициента сходства Танимото к эталонным структурам. Общие коэффициенты сходства (ОКС) рассчитывались среди эталонов самих к себе и выделялись диапазоны ОКС: 1) больше самого высокого среди коэффициентов сходства; 2) меньше либо равно самому высокому, но больше среднего; 3) меньше либо равно среднему, но больше самого низкого; 4) меньше либо равно самому низкому. При этом в зависимости от величины ОКС каждого прогнозируемого соединения, последнему присваивалась прогнозная оценка от 3 до 0 баллов в зависимости от соответствия диапазонам ОКС 1-4 соответственно. Для прогноза 5-НТ_{2A/3}-антагонистической активности проводилось исследование сходства новых конденсированных азолов по отношению к 2 группам эталонов: известным веществам с данным видом активности [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS] и ранее выявленным активным веществам среди представителей бензимидазола [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008]. В случае прогноза 5-НТ₄-активности соединений использовался метод сходства только с группой известных эталонов [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS].

В качестве дополнительного критерия прогнозной оценки (1 балл) 5-НТ_{2A/3}-активности использовалось соответствие структуры ядра молекулы («кóра») (здесь – химического класса/подкласса) прогнозируемого соединения функциональным дескрипторам с учетом статистической значимости влияния, выявленным при ретроспективном подструктурном анализе (подробнее см. в разделе Анализ влияния химической структуры на серотонинергические свойства соединений (подструктурный анализ)).

Интегральной оценкой перспективности соединения в целом служила величина, вычисленная как сумма оценок полученных в результате прогнозов в системе PASS, ИТ «Микрокосм» и анализа значимости классов и подклассов соединений в ходе ретроспективных подструктурных анализов. При этом для прогноза 5-НТ₄-активности применялись лишь два метода:

PASS и метод сходства к известным эталонам в виду детального исследования указанной активности у соединений изучаемых классов впервые и отсутствии данных для сравнения с близкими по структуре соединениями.

2.2.3 Метод 3D-докинга наиболее активных соединений в активный сайт связывания 5-HT_{2A/4}-рецептора

3D-докинг выполняли для наиболее активных соединений, продемонстрировавших 5-HT_{2A}-антагонистическую и 5-HT₄-агонистическую активность, выявленных в результате направленного информационного и экспериментального поиска. Необходимые для последующих расчетов молекулярные модели соединений были построены по структурным формулам соединений в три этапа: методами молекулярной геометрии были построены первичные трехмерные модели соединений. На следующем этапе методом молекулярной механики с использованием силового поля MM2 была произведена первичная оптимизация конформационного состояния химических структур за счет вращения фрагментов молекул вокруг конформационно подвижных связей с минимизацией на каждом шаге стерической энергии методом градиентного спуска [Burkert U., 1982]. В заключение была выполнена оптимизация построенных 3D-моделей с использованием двух полуэмпирических квантово-химических методов AM1 и PM6 путем минимизации общей энергии молекулы [Минкин В.И., 1997]. Все расчеты выполнены с помощью программ HyperChem 7.1 и MORAC2009.

Для проведения докинга 3D-модель 5-HT_{2A}-рецептора была отобрана среди найденных 18 3D-моделей 5-HT_{2A}-рецепторов на момент обращения [ExPASy: Bioinformatics Resource Portal of Swiss Institute of Bioinformatics] как наиболее соответствующая оценкам качества построения, длины и соответствия моделируемого фрагмента полипептидной цепи, согласно сравнительным данным базы данных [там же]. Выбранная 3D-модель 5-HT_{2A}-

рецептора человека построена по гомологии на базе экспериментальной 3D-модели кристаллического родопсина кальмара (код PDB – 2Z1Y) и получена из базы данных ModBase Калифорнийского университета в Сан-Франциско (США), код модели в базе данных ModBase – 5d6b98e9e00432ae919177b2b38d636c [Database of Comparative Protein Structure Models University of California].

Докинг соединений в сайт связывания 5-HT_{2A}-рецептора осуществлялся с помощью программы AutoDock Vina⁴. В результате докирования выполнялся расчет и выбор наиболее выгодных энергетических конформаций комплекса лиганд-рецептор с помощью генетического алгоритма [Morris G.M., 2009]. Рассчитанная энергия связывания для изучаемых соединений сравнивалась с аналогичной для вещества сравнения кетансерина.

Для выполнения докинга наиболее активных соединений в активный центр 5-HT₄-рецептора использовался аналогичный методический подход. Модель 5-HT₄-рецептора человека (код модели в базе данных ModBase – 2953ef59371fbeeсbaafcb8c1757с6cd) была отобрана из 19 полученных 3D-моделей рецептора на момент обращения [ExPASy: Bioinformatics Resource Portal of Swiss Institute of Bioinformatics] по аналогичным признакам.

2.2.4 Анализ влияния химической структуры на серотонинергические свойства соединений (подструктурный анализ)

Для выявления закономерностей между химической структурой соединений и уровнем их 5-HT_{2A/3/4}-активности использовался метод подструктурного анализа [Васильев П.М., 2009].

⁴ Программа выполняет гибкий докинг низкомолекулярного лиганда в гибкий сайт связывания белка-биомшени. Позиционирование лиганда и расчет энергии его взаимодействия с сайтом связывания производится методом молекулярной механики с использованием специально разработанного силового поля [цит. по: Спасов А.А., 2015].

Метод основан на использовании принципа QSAR-анализа, где в основе лежит представление химической структуры изученного соединения в виде набора структурных характеристик (дескрипторов, подструктур), присутствие или отсутствие которых коррелируют с уровнем фармакологической активности. Оценка значимости функциональных дескрипторов проводилась в несколько этапов.

На первом этапе формировались рабочие базы данных по химической структуре и уровню 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-антагонистической активности изученных веществ.

На следующем этапе проводился кластерный анализ данных об активности веществ для выявления границы класса высокоактивных соединений. Кластеризация осуществлялась вероятностным методом гистограмм и геометрическим методом расстояний [Мандель И.Д., 1988].

На третьем этапе производилось описание химической структуры соединений с помощью фрагментарных дескрипторов. В качестве подструктурных признаков описания принимались тип ароматического ядра («кóра») или тип заместителей R₁, R₂ и R₃ в соответствующих положениях кóра (См. Приложение А).

На заключительном этапе оценивалась статистическая значимость признаков способом, описанным Васильевым П.М. и соавт. [Васильев П.М., 2014]: общее число признака i подсчитывалось в классе активности h (высокоактивные) и nh (невысокоактивные) ($K_{ih,nh}$) по формуле 1.

$$K_{ih,nh} = \sum_{j=1}^{N_{h,nh}} K_{ij}, \quad i = 1 \dots M, \quad (1)$$

где $N_{h,nh}$ – число соединений в классе h или nh ;

K_{ij} – число признака вида i в соединении j ;

M – число видов признаков.

Число выполнений для каждого M признака подсчитывалось в каждом классе, деленное на вес класса – находилось общее число признака i в классе h и nh ($S_{ih,nh}$), исправленное на размер класса (формула 2).

$$S_{ih,nh} = \frac{K_{ih,nh}}{N_{h,nh}} \times \frac{(N_h + N_{nh})}{2}, \quad i = 1 \dots M. \quad (2)$$

По формуле 3 вычислялась Байесовская вероятность встречаемости признака i в классе h и nh ($P_{ih,nh}$).

$$P_{ih,nh} = \frac{S_{ih,nh} + 1}{S_{ih} + S_{inh} + 2}, \quad i = 1 \dots M. \quad (3)$$

Различия в частоте встречаемости признака i в классах h и nh определялись по формуле 4 по биномиальному критерию Z_i .

$$Z_i = \frac{|P_{ih} - P_{inh}| - \frac{1}{4 \times (S_{ih} + S_{inh})}}{\sqrt{\frac{0,5}{(S_{ih} + S_{inh})}}}, \quad i = 1 \dots M. \quad (4)$$

По величине биномиального критерия Z_i определялась значимость влияния признака i на наличие или отсутствие высокой биологической активности Pr_i (формула 5).

$$Pr_i = 1 - N(Z_i), \quad (5)$$

где N – функция, возвращающая стандартное нормальное распределение.

В заключение вычислялся общий индекс значимости P (Ind) влияния признака i на выраженность антисеротонинового эффекта. В зависимости от величины Ind , выделялось 6 степеней влияния: (0 – отсутствие влияния; 1 – тенденция; 2 – слабое; 3 – выраженное статистически достоверное; 4 – сильное; 5 – очень сильное; «+» - положительное; «-» - отрицательное).

В настоящем исследовании были использованы несколько смысловых видов подструктурного анализа.

Первый – «ретроспективный подструктурный анализ» – на этапе планирования настоящего исследования в рамках консенсусного прогноза 5-

НТ_{2A}- и 5-НТ₃-антагонистической активности новых конденсированных азолов. Ретроспективный анализ был проведен на основе ранее полученных данных о 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-активности представителей бензимидазолов [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008] путем обобщения независимых данных, детализации и статистического обоснования значимости типа ядра молекулы для развития указанных видов активности. Выявленные закономерности были использованы как один из элементов прогнозной оценки активности новых конденсированных азолов.

Второй этап – «обобщенный подструктурный анализ» – проводился после экспериментального изучения новых конденсированных азолов в настоящем исследовании с учетом новых полученных данных. В ходе обобщенного подструктурного анализа результаты о 5-НТ_{2A/3}-активности соединений были обобщены с данными ретроспективного анализа с выявлением более значимых общих закономерностей. Для анализа зависимости 5-НТ₄-агонистической активности от наличия функциональных дескрипторов анализ выполнялся полностью на основе полученных в настоящем исследовании экспериментальных данных.

Обобщенный подструктурный анализ, в свою очередь, проводился в два этапа: на первом – в качестве дескрипторов для оценки значимости использовалась структура «кóра», а на втором – химическая структура заместителей R₁, R₂ и R₃ (См. Приложение А).

2.2.5 Анализ влияния физико-химических свойств на 5-НТ_{2A/3/4}-серотонинергические свойства соединений

В исследовании проводился анализ влияния молекулярной рефракции, липофильности соединений и их отдельных заместителей R₁, R₂ и R₃ (См. Приложение А) на развитие 5-НТ_{2A/3/4}-серотонинергических эффектов с использованием методов частотного анализа [Голендер В.Е., 1978; Васильев П.М., 1983]. При этом, как и при обобщенном подструктурном анализе для

выявления общих, статистически обоснованных зависимостей использовался метод обобщения собственных данных об активности и физико-химических свойствах соединений, полученных в ходе экспериментальной части настоящего исследования, с ранее опубликованными данными об активности представителей бензимидазолов [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008].

Вычисление показателей липофильности (LogP)⁵ и молекулярной рефракции (MR)⁶ проводили с помощью различных схем фрагментарного приближения и классической аддитивной схемы для липофильности и молекулярной рефракции, соответственно, реализованных в программном обеспечении CS Chem3D 8.0.

В ходе выполнения обобщенных частотных анализов диапазоны значений каждого признака, описывающего структуру соединений, разбивались на 4 интервала. Статистическая значимость признаков рассчитывалась приведенным в предыдущем разделе способом (формулы 1-5). В зависимости от величины значимости P (Ind), также выделялось 6 степеней влияния: (0 – отсутствие влияния; 1 – тенденция; 2 – слабое; 3 – выраженное статистически достоверное; 4 – сильное; 5 – очень сильное; «+» - положительное; «-» - отрицательное).

По результатам анализа зависимости изучаемой активности от химической структуры и физико-химических свойств методом обобщения наиболее статистически значимых дескрипторов формировался обобщенный «сафлор» для рядов с высокой серотонинергической активностью.

⁵ LogP – показатель липофильности вещества или его структурных фрагментов в виде логарифма коэффициента распределения в системе «октанол-вода».

⁶ MR – молекулярная рефракция – мера поляризуемости – подвижности зарядов под влиянием внешнего электрического поля атомов молекулы или ее структурных фрагментов.

2.3 Методы *in vitro* и *in vivo*

В настоящее время большинство экспериментальных фармакологических исследований проводится с использованием общепризнанных авторитетными фармакологическими сообществами валидированных методов, а также с использованием методов *in vitro* и *in vivo*, специально рекомендованных для проведения доклинических исследований.

2.3.1 Методы экспериментального фармакологического скрининга 5-HT_{2A}-, 5-HT₃- и 5-HT₄-активности соединений

Изучение 5-HT_{2A}-антагонистической активности in vitro

Исследование антагонистической активности по отношению к серотониновым 5-HT₂-рецепторам проводили на модели активации тромбоцитов [Сакаев М.Р., 2000] *in vitro* методом малоуглового светорассеяния [Деркачев Э.Ф., 1998] в модификации. Исследование проводили на тромбоцитах кролика с использованием *трис*-аминометанового буфера (140 мМ NaCl, 10 мМ *трис*-HCl, pH=7,4). Для изучения 5-HT₂-антагонистического действия в качестве индуктора активации тромбоцитов использовали 5-гидрокситриптамиин в концентрации 1 мкМ. При этом изучаемые соединения исследовались в концентрации 1 мкМ. Используются вещества сравнения: 5-HT₂-антагонист - кетансерин, ципрогептадин. Регистрацию малоуглового рассеяния проводили датчиком с угловыми координатами 12 градусов на приборе «ЛАСКА-1К». О величине антагонистической активности веществ судили по изменению степени светорассеяния, вызванного активацией тромбоцитов (в %) по отношению к контрольному значению.

Исследование 5-HT₃-антагонистического действия in vitro

Исследование антагонистической активности по отношению к серотониновым 5-HT₃-рецепторам проводили по методу Yoshida [Yoshida S., 2007]. Действие веществ оценивали по их влиянию на степень выраженности серотонин-индуцированного спазмогенного эффекта изолированной подвздошной кишки морской свинки (буферный раствор Кребса, pH 7,4; t 37°C). Спазмогенный эффект вызывали 5-гидрокситриптамином в концентрации 3 мкМ. Все вещества исследовались в эквимольной концентрации. В качестве препарата сравнения использовался ондансетрон. О степени 5-HT₃-серотонинергической активности судили по изменению спазмогенного эффекта в контрольном и опытном измерениях. Регистрацию сокращения проводили изотоническим датчиком 7006, регистрирующим модулем Data Capsul Evo либо самописцем Unirecord в одиночной камере для работы с изолированными органами и тканями 4000.

Изучение 5-HT₄-агонистического действия in vitro

Исследование 5-HT₄-агонистического действия соединений проводили на изолированном препарате пищевода крысы по методу [Miyata K., 1995] в модификации [Колобродова Н.А., 2011] с использованием буферного раствора Кребса, pH 7,4; при постоянной аэрации и термостатировании при 37°C. Об уровне эффекта судили по выраженности 5-HT₄-опосредованного подавления карбохолин-индуцированного (3 мкмоль/л) гладкомышечного спазма в сравнении с селективным 5-HT₄-агонистом ML10302 и серотонином. Все соединения исследовались в эквимольной концентрации 10 мкмоль/л. Для подтверждения специфичности 5-HT₄-агонистического действия проводили тесты с антагонистом 5-HT₄-рецепторов SZD205557. Регистрацию данных выполняли с помощью аналогичного оборудования как и при исследовании 5-HT₃-антагонистического действия *in vitro*.

2.3.2 Методы исследования рецепторной активности соединений-лидеров *in vitro*

Метод радиолигандного анализа взаимодействия соединений с 5-HT_{2A}-рецепторами

Способность связываться с 5-HT_{2A}-рецепторами изучалась⁷ для наиболее активного соединения методом радиорецепторного анализа с использованием кетансерина меченого по тритию [Ковалев Г.И., 2012]. О взаимодействии вещества с рецепторами судили по способности конкурентного вытеснения [³H]кетансерина из рецепторов гомогената тканей лобной доли коры больших полушарий крыс. Действие вещества изучали в диапазоне концентраций от 1 мМ до 1 нМ с последующим расчетом показателя pIC₅₀.

Исследование взаимодействия с TAAR1-рецепторами человека

Для изучения применялся метод измерения билюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) активируемый α АМФ с помощью α АМФ-биосенсора [Barak L.S., 2008; Espinoza S., 2013]. Эксперименты проводились на клеточной культуре НЕК-293Т. Экспрессия TAAR1-рецепторов совместно с α АМФ-биосенсором достигалась с помощью липосомной трансфекции плазмид, содержащих α ДНК, кодирующие TAAR1 рецептор человека (Университет Миссури-Рола, США) и α АМФ-биосенсор соответственно.

Культура клеток содержалась в среде Dulbecco's Modified Eagle's medium с добавлением объемных 10% фетальной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамина и 0,05 мг/мл гентамицина при 37°C, аэрации с содержанием 5%

⁷ Исследование выполнено в лаборатории радиоизотопных методов исследования ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» под руководством д.м.н., проф. Г.И Ковалева, за что выражаем глубокую благодарность.

CO₂. Экспериментальное исследование проводили через 48 ч после трансфекции, выполненной с использованием реагента Lipofectamin 2000 по стандартному протоколу производителя. Для регистрации BRET экспрессирующие соответствующие белки клетки через 24 ч после трансфекции помещали в 96 луночный микропланшет, обработанный поли-D-лизином из расчета 80000 клеток в лунке (среда Minimum Essential Medium без фенолового красного с содержанием 2% фетальной бычьей сыворотки, 10мМ буфера Хепеса, 2 мМ L-глутамин). Непосредственно перед экспериментом питательная среда заменялась на Ca²⁺-, Mg²⁺-содержащий фосфатный буфер.

Для BRET-детекции изменения уровня μ АМФ производилась инициация биолюминесценции с помощью 10 мкл реагента Coelenterazine h субстрата для Renilla-люциферазы (Rluc) μ АМФ-биосенсора в конечной концентрации 5 мкМ и в присутствии 200 мкМ ингибитора фосфодиэстеразы IBMX. Исследуемые соединения (10 мкл в конечной концентрации 10 мкМ) вводили через 10 мин после добавления Rluc субстрата. Регистрацию BRET проводили динамически в течение 25-30 мин после введения исследуемых соединений с помощью ридера Infinite F500 с оптическими фильтрами 465-505 нм и 515-555 нм.

Об агонистической активности исследуемых соединений судили по изменению уровня μ АМФ после стимуляции рецептора. В качестве вещества сравнения использовали фенилэтиламин. Об антагонистической активности соединений судили по изменению агонистического эффекта фенилэтиламина при совместном добавлении с исследуемым веществом. Возможное прямое пострецепторное влияние исследуемых соединений исключали в контроле с клетками, подвергавшимися трансфекции только μ АМФ-биосенсором.

Исследование взаимодействия с TAAR5-рецепторами человека in vitro

Изучение проводили методом, как и для TAAR1-рецепторного взаимодействия (См. глава 2.3.2.2) в модификации.

Для достижения экспрессии TAAR5-рецепторов использовали плазмидную *цДНК*, кодирующую TAAR5 человека. Эффект сравнивали с 3-метиламином (10 мкМ). Антагонистическое действие выявляли по способности уменьшать 3-метиламинопосредованное (10 мкМ) изменение *цАМФ*. При выявлении антагонистического действия изучаемого вещества в концентрации 10 мкМ проводилось дозозависимое исследование в диапазоне 1 нМ-100 мкМ.

Исследование взаимодействия с β_2 -рецепторами человека

Изучение проводили методом, как и для TAAR1-рецепторного взаимодействия (См. глава 2.3.2.2) в модификации: о взаимодействии изучаемых соединений (10 мкМ) с нативными β_2 -рецепторами линии клеток судили по изменению количества *цАМФ* в сравнении с концентрационнозависимым (10 нМ - 1 мкМ) эффектом изопротеренола.

Для изучения β_2 -антагонистического действия исследуемые вещества в концентрации 10 мкМ инкубировали с культурой клеток в течение 5 мин до введения квинпиrolа в полуэффективной концентрации 10 нМ. О β_2 -влиянии судили по изменению эффекта последнего.

Исследование взаимодействия с D_2 -рецепторами человека

Изучение проводили аналогичным способом, как и для TAAR1-рецепторного взаимодействия (См. глава 2.3.2.2) в модификации. Экспрессия D_2 -рецепторов достигалась с помощью аналогичной липосомной трансфекции плазмид, содержащих *цДНК*, кодирующих D_2 рецептор человека (Университет Миссури-Рола, США). Учитывая основное пострецепторное звено D_2 -рецептора, связанного с активацией G_i -белка, и, как следствие, уменьшения количества *цАМФ* при возбуждении рецептора, использовали обратный подход. В контрольном («+» D_2 -трансфекцированная линия) измерении повышали уровень *цАМФ* средней эффективной концентрацией изопротеренола 10 нМ (взаимодействие с β_2 -рецепторами wild-типа клеток

НЕК-293Т). О возможном D₂-взаимодействии и уровне активности изучаемых соединений (10мкМ) судили по изменению эффекта изопротеренола при их совместном введении в сравнении с контрольной культурой клеток без D₂-трансфекции. В качестве вещества сравнения для позитивного контроля использовали D₂-агонист квинпирол в эквимолярной концентрации.

Изучение антиангиотензинового (AT₁) действия

Исследование антагонистической активности изучаемых соединений по отношению к ангиотензиновым AT₁-рецепторам проводили по предварительно разработанному и валидированному методу [Спасов А.А., 2014]. Действие веществ оценивали по степени подавления ангиотензин II-индуцированного спазмогенного эффекта (0,01 мкМ) изолированной портальной вены крыс *in vitro*. Вещества исследовались в концентрации 10 и 0,1 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали AT₁-антагонист – валсартан.

Метод изучения P2Y₁-активности

P2Y₁-антагонистическую активность изучаемых соединений исследовали методом малоуглового светорассеяния [Сакаев М.Р., 2000]. P2Y₁-активность соединений в концентрации 1 мкМ оценивалась по их способности вызывать/подавлять в бескальциевой буферной среде активацию тромбоцитов кролика под действием АДФ (70 нМ). В качестве вещества сравнения использовали селективный P2Y₁-антагонист MRS1279.

Изучение кальциевого ионного тока

Исследование направлено на изучение функциональной активности KCl-активируемых кальциевых каналов гладких миоцитов изолированной портальной вены крысы и выявление возможного антагонистического влияния соединений на кальциевый ионный ток. Гиперкалиевую контрактуру

вызывали раствором KCl в концентрации 80 мМ. Избыточное количество ионов K^+ приводит к деполяризации мембраны гладкого миоцита, активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме [Ratz P.H., 2005]. О влиянии исследуемого соединения (10 мкМ) на ионный ток судили по изменению выраженности спазмогенного эффекта в сравнении с верапамилом.

Изучение М-холинергического действия

Исследование проводилось *in vitro* на изолированном продольном гладкомышечном препарате подвздошной кишки морской свинки по методу Gathers C. [Gathers C., 1993]. Условия эксперимента соответствовали изложенным в главе 2.3.1.2.

О наличии М-холинергического действия судили по способности исследуемого соединения (10 мкМ) вызывать спазмогенный эффект (исключаемый/уменьшаемый предварительным введением атропина в эквимолярной концентрации) либо изменять выраженность спазмогенного действия ацетилхолина (концентрация 0,3 мкМ) на изолированный гладкомышечный препарат.

При выявлении антихолинергического эффекта для дальнейшей детализации М-холиноблокирующего действия исследуемое соединение изучали дозозависимо (1 мкМ – 100 мкМ) и рассчитывали показатель pIC_{50} .

2.3.3 Методы изучения взаимодействия соединений с агонистами/антагонистами основных нейромедиаторных систем *in vivo*

Методы использованы согласно рекомендациям руководств по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Воронина Т.А., 2012а-г]; Островская Р.У., 2012; Мирзоян Р.С., 2012; Андреева Н.И., 2005] и основаны на выявлении изменения специфических

фармакологических свойств агонистов/антагонистов (анализаторов) различных нейромедиаторных систем.

Изучаемые соединения вводили животным опытных групп (n=6-8) в средних и высоких эффективных дозах (соединение E75: 0,5 и 5 мг/кг; соединение: Г12 1,5 и 7,5 мг/кг; внутривбрюшинно) до введения соответствующего анализатора (с учетом ориентировочного времени развития эффекта изучаемых соединений: E75 за 30 мин; Г12 за 60 мин). Группы контроля вместо опытного соединения получали изотонический раствор натрия хлорида в аналогичном объеме.

Исследование взаимодействия соединений с апоморфином и галоперидолом

Изучение взаимодействия с апоморфином и галоперидолом позволяет оценить возможное влияние соединений на дофаминергическую нейротрансмиссию [Островская Р.У., 2012].

О взаимодействии с галоперидолом (3 мг/кг, внутривбрюшинно) судили по способности изменять выраженность каталептогенного действия D₂-антагониста в опытных группах по отношению к контрольным в течение 2 часов. Уровень каталепсии оценивали по балльной шкале С. Morpurgo (1 балл – передняя лапа слегка отводится и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см) [цит. по: Воронина Т.А., 2012а].

Взаимодействие с апоморфином изучали в условиях внутривбрюшинного введения последнего в различных дозах. При этом возможное изменение гипотермического действия исследовали в тесте с апоморфином в дозе 15 мг/кг; изменение выраженности стереотипии в баллах (где 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное прихвачивание; 2 – непродолжительно

длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 – постоянная и интенсивная стереотипия) изучали с использованием апоморфина в дозе 1 мг/кг. Изменение эффекта «зевательных движений» – в дозе 0,1 мг/кг [Островская Р.У., 2012].

Результаты оценивали в сравнении с эффектами соответствующих групп контроля.

Изучение взаимодействия с фенамином

В основе метода лежит способность фенамина усиливать двигательную активность животных, предположительно за счет норадренергической передачи, и вызывать стереотипное поведение за счёт усиления дофаминергической нейротрансмиссии, предположительно в мезолимбической и nigrostriарной области [там же].

В качестве анализатора животным вводился фенамин (5 мг/кг, внутривентриально, схема введения изучаемых соединений изложена в начале главы 2.3.3). Наблюдение за животными продолжали до исчезновения симптомов стереотипного поведения. Выраженность последнего оценивали способом, как и для апоморфиновой стереотипии.

О взаимодействии судили по изменению длительности латентного периода, периода повышенной горизонтальной локомоторной активности, выраженности и длительности периода стереотипии в опытных группах в сравнении с группой контроля.

Влияние на эффекты L-ДОФА

Как правило, данный тест применяется для выявления у соединения ингибирующего действия в отношении моноаминоксидазы (МАО). Учитывая, что большие дозы L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) приводят к появлению у животных стереотипного поведения, повышения двигательной активности и других реакций, а при введении малых доз описанных эффектов, как правило, не наблюдается, применение ингибиторов МАО

способно потенцировать действие низких доз L-ДОФА с развитием характерного для высоких доз симптомокомплекса [Андреева Н.И., 2005].

Схема введения исследуемых веществ соответствовала общей схеме, изложенной в начале главы 2.3.3. L-ДОФА вводили внутривентриально: контрольная группа 1 получала L-ДОФА в дозе 500 мг/кг, контрольная группа 2 – в дозе 100 мг/кг, опытные группы – изучаемое соединение и L-ДОФА в дозе 100 мг/кг. Развитие стереотипного поведения оценивали в течение 1,5 часа каждые 30 мин по описанной выше балльной системе (См. Исследование взаимодействия соединений с апоморфином и галоперидолом). О наличии MAO-ингибирующего действия у соединений судили по возникновению значимых отличий поведения животных в опытных группах относительно группы контроля 2.

Тест взаимодействия с 5-гидрокситриптофаном

В тесте использована способность предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ) вызывать развитие специфического гиперкинеза резкого встряхивания головой у животных. Развитие последнего связывают с возбуждением 5-HT₂-рецепторов [Pranzatelli M.R., 1989].

В качестве анализатора использовали 5-ГТФ (300 мг/кг, внутривентриально; субстанция). Общая схема введения соединений соответствовала изложенной в начале главы 2.3.3.

Влияние на эффекты 5-ГТФ оценивали по способности изменять количество гиперкинезов резких встряхиваний головой в течение 1 часа [Островская Р.У., 2012].

Взаимодействие с ареколином и никотином

В данном тесте использована способность M-холиномиметика ареколина и N-холиномиметика никотина вызывать развитие тремора/судорожного синдрома.

При изучении взаимодействия с ареколином (15 мг/кг, внутривбрюшинно; общая схема введения соединений и анализатора изложена в начале главы 2.3.3) в качестве критерия оценки эффекта использовали продолжительность периода тремора, развивающегося после введения ареколина, и длительность латентного периода до его развития [Воронина Т.А., 2012в].

Взаимодействие с никотином оценивали по возможному изменению латентного периода до развития тремора у животных, а также по способности повышать судорожную готовность при введении максимальных субпороговых доз никотина (2 мг/кг, внутривбрюшинно), либо ослаблять судорожное действие минимальных пороговых доз никотина (4 мг/кг, внутривбрюшинно) [Damaј M.I. et all., 1999].

Тест взаимодействия с клофелином

Для выявления возможного фармакологического взаимодействия с клофелином изучалась способность соединений изменять α_2 -обусловленное гипотермическое действие последнего согласно рекомендациям по проведению доклинических исследований [Андреева Н.И., 2005].

Исследование выполняли на крысах-самцах, разделенных на группу интактного контроля 1, группу контроля 2, получавшую клофелин (0,1 мг/кг, внутривбрюшинно) и опытные группы (изучаемое соединение и клофелин). Схема введения изучаемых соединений изложена в начале главы 2.3.3. Термометрию (термометр «OMRON») животных осуществляли ректально каждые 30 мин в течение 2 часов.

О взаимодействии соединений с клофелином судили по изменению эффектов относительно групп контроля.

Влияние на эффекты резерпина

В основе теста лежит способность резерпина оказывать симпатолитическое действие, вызывая при этом общую гипотермию, блефароптоз и др. [Воронина Т.А., 2012г].

Исследование проводилось на мышах-самцах разделенных на группы (группа интактного контроля 1; группа контроля 2, получавшая резерпин, и опытные группы) по 6 животных в каждой. Учитывая длительность развития фиксируемых эффектов резерпина (3,5-4 часа) в данном исследовании в отличие от остальных использованных тестов по изучению взаимодействия с анализаторами нейромедиаторных систем, исследуемые соединения вводились в аналогичных дозах и внутрибрюшинно введения через 4 часа после введения резерпина (2,5 мг/кг, внутрибрюшинно). Наблюдение за животными осуществляли через 30 мин и 60 мин в зависимости от предполагаемого развития эффекта исследуемых соединений E75 и Г12 соответственно. Термометрию осуществляли аналогичным способом, как и при клофелиновой гипотермии. Оценка блефароптоза проводили по бальной шкале: 3 балла – полное закрытие глаз, 2 балла – глазная щель до 1 мм, 1 балл – глазная щель до 2 мм, 0 баллов – глаза открыты полностью. Эффекты сравнивали с группами контроля.

Взаимодействие с пикротоксином

В основе метода использована способность антагониста ГАМК_A-рецепторов пикротоксина оказывать центральное возбуждающее действие, проявляющееся развитием тремора и клоническими судорогами [Воронина Т.А., 2012в].

Всем животным пикротоксин вводили внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг. Опытные группы предварительно получали изучаемое соединение (схема введения изложена в начале главы 2.3.3). В ходе исследования фиксировали длительность латентного периода до развития тремора,

судорог, а также количество последних в течение всего эксперимента. Эффект сравнивали с таковым в группе контроля.

Метод исследования рефлекса фон Безольда-Яриша у крыс

В основе развития рефлекса фон Безольда-Яриша лежит способность 5-HT₃-рецепторов усиливать холинергические влияния на ритм сердца у различных видов млекопитающих [Yamano M., 1995]. Исследование выполняли на неинбредных крысах-самцах по методу Yamano M. [там же].

Исследование проводилось на крысах-самцах разделенных на группы (группа контроля, получавшая только серотонин, и опытные группы) по 6 животных в каждой.

Изучаемое соединение вводили опытным группам внутривенно за 30 мин до исследования. Рефлекс моделировали серотонином (40 мкг/кг) при болюсном внутривенном введении у анестезированных хлоралгидратом (400 мг/кг) животных. Регистрацию сердечного ритма осуществляли электрокардиографически.

2.3.4 Методы исследования скорости мозгового кровотока и системной гемодинамики у крыс

Изучение скорости кровотока в области средней мозговой артерии

Исследование проводили на неинбредных крысах-самцах массой 250-280 г. Опытные группы получали изучаемые вещества внутривенно в эквимолярных средней эффективной для ципрогептадина дозах: 0,5 мг/кг; 0,55 мг/кг; 0,45 мг/кг; 0,35 мг/кг; 0,6 мг/кг для соединения E75, кетансерина, метисергида, ципрогептадина и ритансерина соответственно. Контрольная – 0,9% раствор натрия хлорида.

Для детализации действия и уточнения эффективной дозы соединения E75, последнее и ципрогептадин изучали в дополнительных эквимолярных

дозах 5 мг/кг; 0,05 мг/кг и 3,5 мг/кг; 0,035 мг/кг, для соединения E75 и ципрогептадина, соответственно.

Для изучения скорости кровотока у наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) животных осуществляли трепанационный доступ в теменной области к бассейну средней мозговой артерии. В ходе эксперимента регистрировали исходный уровень кровотока, скорость кровотока в течение 20 минут после внутривенного (бедренная вена) введения изучаемых веществ.

Для изучения скорости кровотока в условиях серотониновой нагрузки через 20 мин после введения изучаемых соединений моделировали серотониновый спазм внутривенным введением серотонина гидрохлорида (20 мкг/кг в 0,2 мл изотонического раствора). Моделирование повторяли трехкратно с интервалом в 20 минут. Скорость кровотока измеряли с помощью ультразвукового доплерографа «Допплер-К» с датчиком диаметром 2 мм.

При изучении скорости кровотока в условиях ишемии головного мозга исследованию предшествовало формирование аналогичных групп животных с воспроизведением глобальной неполной ишемии головного мозга путем билатеральной перевязки общих сонных артерий [Мирзоян Р.С., 2012]. Через 3 дня у выживших животных осуществлялся операционный доступ к бассейну средней мозговой артерии и проводилось исследование скорости мозгового кровотока по описанной выше схеме.

Изучения скорости кровотока во внутренней сонной артерии крыс

Изучение действия соединений на кровотоки в каротидной системе проводили по методу, разработанному под руководством Мирзояна Р.С. [Горбунов А.А., 2010] в модификации. Опыты проводились на анестезированных хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно) белых неинбредных крысах-самцах массой 250-300 г. Для введения веществ предварительно катетеризировалась бедренная вена. Повышенное

содержание серотонина моделировали описанным выше способом. Изучаемые 5-НТ_{2А}-антагонисты вводились внутривенно за 20 мин до моделирования серотонинового спазма в эквимолярной дозировке: ципрогептадин 0,35 мг/кг, кетансерин 0,55 мг/кг, ритансерин и E75 – 0,5 мг/кг. Животным группы контроля вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме.

Динамику кровотока изучали во внутренней сонной артерии, для чего производили измерение линейной скорости кровотока на общей сонной артерии с предварительной перевязкой наружной сонной артерии. Регистрацию показателей производили с помощью ультразвукового доплерографа «Допплер-К» и датчика диаметром 2 мм.

Изучение основных гемодинамических показателей

Исследование проводили на неинбредных крысах-самцах в условиях нормы, а также при серотониновой нагрузке, моделированной описанным выше способом. Систолическое (САД) и диастолическое (ДАД) артериальное давление, а также частоту сердечных сокращений (ЧСС) регистрировали электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт. ст.) с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Москва, Россия) по методике описанной Спасовым А.А. с соавторами [Спасов А.А., 2012].

2.3.5 Методы изучения тромбогенных и вязкостных свойств крови

Методы изучения антиагрегантной активности соединений in vitro

Антиагрегантную активность веществ исследовали по методу Born G. [Born G.V.R., 1962] в модификации Габбасова В.А. [Габбасов З.А., 1989] на тромбоцитах кроликов с использованием двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 220 LA». Забор образцов крови осуществляли из краевой ушной вены, стабилизировали 3,8% цитратом

натрия (1:9). Соединение E75 и препараты сравнения кетансерин и ципрогептадин изучались в эквимольной концентрации 1 мкМ, кислота ацетилсалициловая – в средней эффективной концентрации 100 мкМ. Обогащённую тромбоцитами плазму получали по методу Люсова В.А. и Белоусова Ю.Б [Люсов В.А., 1975]. В качестве индукторов агрегации использовались АДФ (в конечной концентрации 5 мкМ), адреналин (10 мкМ), 5-гидрокситриптамиин (1 мкМ) и коллаген (50 мкг/мл). Выраженность агрегации оценивался по изменению уровня светопропускания в кювете в течение 5 мин.

Методы изучения антитромбогенных свойств соединений in vivo

Исследование антитромботической активности соединений проводили на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией на наружную сонную артерию 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990], а также модели тромбоза в сонной артерии, вызванного постоянным электрическим током (12 В, 10 мА), по методу Guglielmi G. [Guglielmi G., 1991] в модификации при наркотизации хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно).

Изучаемые вещества вводили внутривенно в средних эффективных при исследовании скорости мозгового кровообращения дозах эквимольно с кетансерином (0,5 и 0,55 мг/кг соответственно). В качестве дополнительных препаратов с доказанным антитромботическим действием сравнения использовали тиклопедин (6 мг/кг) и клопидогрель (7,3 мг/кг).

Данные регистрировались с помощью доплерографа «Допплер-К». Об антитромботической активности судили по длительности развития 50%, 95% и 99,9% снижения кровотока.

Методы изучения вязкостных характеристик крови in vitro

Изучение влияния соединений на вязкость цельной крови кролика при стандартизированном гематокрите (45%) оценивали вискозиметрическим

методом [Добровольский Н.А., 1998]. Забор венозной крови проводили из краевой ушной вены кроликов в пластиковые пробирки с 3,8% раствором натрия цитрата (1:9). Для стандартизации образцов крови по единому гематокриту 45% в пробирке смешивали 0,55 мл физиологического раствора с 0,45 мл осажденных эритроцитов. Действие соединения E75 и препаратов сравнения ципрогептадина и кетансерина оценивали в концентрации 1 мкМ. Исследование проводили на анализаторе крови реологическом АКР-2 (Россия) при скоростях сдвига от сдвига от 300 с^{-1} до 10 с^{-1} .

2.3.6 Метод изучения антиэметического действия соединений на собаках

Для оценки антиэметического действия веществ использовалась методика цисплатин-индуцированной рвоты у собак [Fukui H.A., 1992]. Животным в опытных группах за 30 минут до инъекции цисплатина (3 мг/кг, внутривенно) внутривенно вводили соединение Г12 в диапазоне доз 0,015-1,5 мг/кг, либо препарат сравнения - ондансетрон в эквимолярных количествах. В течение 5-и часов регистрировался латентный период возникновения приступов рвоты и всех случаев их развития. Критерием оценки антиэметического действия являлось удлинение латентного периода и уменьшение числа рвотных приступов.

2.3.7 Методы изучения противодиарейного действия соединений

При исследовании противодиарейных свойств были выбраны методы, отражающие участие серотонинергической нейротрансмиссии в развитии Д (диарейной)-формы синдрома раздражённого кишечника (СРК) [Miyata K., 1992; Crowell M.D., 2004; Плотникова Е.Ю., 2014].

Метод серотонин-индуцированной дефекации

Исследование проводилось на неинбредных мышах-самцах по методу, описанному Miyata K. и соавт. [Miyata K., 1992]. Соединение Г12 изучали в диапазоне доз 0,015-7,5 мг/кг при внутрибрюшинном введении. В качестве препаратов сравнения использовали ондансетрон в эквимолярных количествах и лоперамид в эффективной дозе (2 мг/кг). Д-форму СРК моделировали введением серотонина (3 мг/кг, внутрибрюшинно) через 30 мин после изучаемых соединений. Об антидиарейном действии судили по частоте возникновения дефекаций в группах.

Метод стресс-индуцированной дефекации

Исследование выполнено на неинбредных крысах-самцах по методу, предложенному К. Miyata и соавт. [там же] в условиях стресса, вызванного ограничением жизненного пространства в тесных индивидуальных камерах (55×50×200).

Соединение Г12 и препараты сравнения вводили по схеме описанной выше. СРК моделировали через 30 мин после введения последних. Оценку антидиарейных свойств соединений проводили по числу болюсов в течение 1 часа в сравнении с ондансетроном и лоперамидом.

2.3.8 Методы изучения анальгетической активности соединений

При изучении анальгетической активности соединений использовались основные методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Воронина Т.А., 2012б].

Исследуемые соединения изучали в эффективных дозах (Е75 – 0,5 мг/кг; Г12 – 0,15; 1,5 и 7,5 мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении. В качестве препаратов сравнения со сходным механизмом действия использованы ципрогептадин либо ондансетрон в эквимолярных соотношениях.

Метод электрической стимуляции корня хвоста

Исследование выполнено на 80 неинбредных крысах-самцах [Carrol N.M., 1960]. В качестве препарата сравнения с анальгетическим действием использован буторфанол (1 мг/кг).

Раздражение корня хвоста осуществляли пакетами прямоугольных импульсов (10 мс, 100 Гц, длительность 1 с) через подкожные электроды с нарастающим напряжением. В качестве оценки использовали порог напряжения развития реакций отдергивания хвоста, вокализации и пролонгированной вокализации.

Тест «горячая пластина»

Исследование выполняли на неинбредных мышах-самцах по методу Ohlsson L. в модификации Ворониной Т.А. и соавт. [Ohlsson L., 1953; Воронина Т.А., 2012б]. В качестве дополнительного препарата сравнения с центральным механизмом анальгетического действия использован буторфанол (1 мг/кг). Болевую реакцию моделировали с помощью установки «Горячая пластина» при температуре 55°C. Поведение животных (облизывание лап, подпрыгивания) оценивали в течение 60 с.

Метод формалиновой гипералгезии

Исследование выполняли на неинбредных мышах-самцах при интраплатантарном введении формалина (0,5%; 0,05 мл) по Ворониной Т.А. и соавт. [Воронина Т.А., 2012б]. В качестве дополнительного препарата сравнения использовали диклофенак натрия (10 мг/кг). Анальгетическое действие соединений оценивали по поведению животных в I и II фазы реакции.

2.3.9 Методы изучения анксиолитической активности соединений

Для выявления анксиолитического действия у исследуемых соединений использовались базисные поведенческие тесты, моделирующие конфликтные (конфликтная ситуация по Vogel) и неконфликтные ситуации (методика приподнятого крестообразного лабиринта, темной/светлой камеры) [Воронина Т.А., 2012г].

Соединения изучались при однократном и 14-дневном введении в эффективных для специфического серотонинергического действия дозах (E75 – 0,5 мг/кг; Г12 – 1,5 мг/кг). Для детализации анксиолитического действия соединение Г12 также было изучено в более широком диапазоне: 0,15 мг/кг и 7,5 мг/кг при однократном введении внутривентрикулярно. В качестве препаратов сравнения использовали ципрогептадин и ондансетрон в эквимолярных количествах, а также диазепам в дозе 1 мг/кг.

Конфликтная ситуация по Vogel

Исследование проводили на неинбредных крысах-самцах. Количество наказуемых подходов (латентность наказания 10 с, напряжение тока 50 В) к поилке изучали на 3 сутки приучения в течение 5 мин. При 14-дневном введении соединений приучение к поилке и водную депривацию начинали за 3 суток до окончания схемы введения веществ.

Методика приподнятого крестообразного лабиринта

Эксперименты проводили на неинбредных крысах-самцах в установке крестообразного лабиринта по описанной выше схеме. Поведение животных регистрировали в течение 3 минут, при этом фиксировали число выходов и выглядываний в светлые рукава, время пребывания в них, а также общее количество переходов между рукавами, время нахождения на центральной площадке, количество болюсов и уринаций.

Методика темной/светлой камеры

Исследование проводили на неинбредных крысах-самцах в установке «Темная/светлая камера». Период адаптации животных к камере составлял 5 мин, период наблюдения за поведенческими реакциями при включенном освещении – 5 мин. При этом регистрировали число выглядываний и выходов в светлый отсек.

2.3.10 Методы изучения острой токсичности и нейротоксикологического профиля соединений

Изучение острой токсичности

В настоящем исследовании проводилось частичное изучение острой токсичности соединений с расчетом показателя LD₅₀ у неинбредных мышей-самцов при однократном внутрибрюшинном введении.

Исследование проводили согласно общим рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Арзамасцев Е.В., 2012].

Расчет показателя LD₅₀ проводили с помощью линейного и нелинейного однофакторного регрессионного анализа с определением доверительных интервалов для среднего значения.

Методы изучения нейротоксикологических свойств соединений

Нейротоксическое действие соединений оценивали при помощи набора тестов по Irwin S. [Irwin S., 1964].

Исследования проводили на неинбредных мышях-самцах. Изучаемые соединения вводились внутрибрюшинно в нарастающих дозах до минимальных летальных: E75 – 0,5-50 мг/кг; Г12 – 1,5-26 мг/кг.

При этом оценивали поведенческие реакции животных (двигательную активность, реактивность, возникновение вокализации при прикосновении,

поведение в тесте «открытое поле», появление стереотипного поведения), нервно-мышечную возбудимость (реакцию на боль, стук, мышечный тонус, двигательную координацию, походку, реакцию на раздражение наружного слухового прохода, роговичный и ипсилатеральный сгибательный рефлекс, наличие тремора и судорог) и вегетативные эффекты (частоту дыхания, наличие и выраженность блефароптоза, саливации, дефекации, уринации).

В ходе исследования отмечали минимальные дозы веществ, демонстрирующие изменение регистрируемых параметров по сравнению с показателями группы контроля.

2.4 Методы статистической обработки данных

Методы статистической обработки данных полученных на этапе компьютерного прогноза активности соединений и анализа зависимости активности от химической структуры и физико-химических свойств представлены выше в соответствующих разделах (главы 2.2.2-2.2.5).

Для обработки экспериментальных фармакологических исследований использовались методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сергиенко В.И., 2012], реализованные в пакете программ GraphPad Prism 5.0 и MS Excel 2010: распределение выборки на нормальность проверялось по Колмогорову-Смирнову с критерием значимости Даллал-Уилкинсона-Лиллиефора. В качестве параметрических критериев использован t-критерий Стьюдента, для множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой по Ньюману-Кеулсу. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Мана-Уитни, критерий Краскела-Уолиса с посттестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного

регрессионного анализом. Качественные параметры оценивались с помощью *Хи*-квадрат теста.

3 НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК АНТАГОНИСТОВ 5-НТ_{2А}- И 5-НТ₃-РЕЦЕПТОРОВ И АГОНИСТОВ 5-НТ₄-РЕЦЕПТОРОВ СРЕДИ КОНДЕНСИРОВАННЫХ АЗОЛОВ

К настоящему времени накоплено множество данных о причастности нарушений обмена серотонина к развитию многих заболеваний и патологических состояний [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS IUPHAR/BPS]. При этом существует острая проблема отсутствия высокоэффективных лекарственных средств, способных устранять эти нарушения.

Наиболее частыми последствиями таких изменений являются развитие острого и хронического нарушения мозгового кровообращения, часто приводящего к инвалидизации пациентов, а также летальным исходам; развитие мигрени и иной цефалгии (по данным Национальной службы здоровья в США за 10 лет наблюдается увеличение превалентности мигрени на 60%, с 25,8 на 1000 населения до 41/1000 населения). В желудочно-кишечном тракте описаны негативные 5-НТ₄-опосредованные влияния, вызывающие развитие синдрома раздраженного кишечника [Ласу В.Е., 2015]. Другой вид нарушения метаболизма серотонина связан с использованием химиотерапии, как единственного наиболее эффективного фармакотерапевтического метода лечения онкологических заболеваний. При этом, как известно, очень часто развивается эметогенная 5-НТ₃-опосредованная непереносимость, что снижает эффективность проводимого противоопухолевого лечения.

На сегодняшний день в Российской Федерации нет ни одного препарата, влияющего преимущественно на 5-НТ_{2А}-рецепторы. А используемые зарубежные аналоги 5-НТ₃-антагонистов (ондансетрон, трописетрон) и 5-НТ₄-агонистов (тегасерод) проявляют недостаточную эффективность и избирательность действия.

Решению проблемы коррекции состояний, связанных с нарушением обмена серотонина, будет способствовать разработка новых высокоэффективных лекарственных средств с антагонистическими свойствами по отношению к серотониновым 5-HT_{2A}-, 5-HT₃-рецепторам и 5-HT₄-рецепторам.

Немаловажную роль в постановке указанной проблемы играет весьма устойчивая тенденция к уменьшению числа открытия новых высокоактивных соединений при существенно возрастающих расходах на исследования в фармацевтической индустрии всех стран. В то же время по средним оценкам на настоящий момент получено свыше 35 млн различных химических соединений. По вполне понятным причинам совершенно невозможно протестировать все имеющиеся соединения на интересующий вид фармакологической активности. Постоянное совершенствование вычислительной техники позволяет создавать и внедрять новые и оптимизировать ранее созданные биоинформационные технологии для решения фундаментальной проблемы взаимосвязи химической структуры и биологической активности.

В настоящее время существует немалое количество информационных технологий, направленных на осуществление компьютерного прогноза различной фармакологической активности новых соединений. Вместе с тем все такие технологии имеют весьма существенный уровень ошибок прогноза. Во многом это объясняется отсутствием тесного координационного взаимодействия между созданием информационной технологии и экспериментальным фармакологическим тестированием ее эффективности. Вместе с тем в результате такого комбинированного перспективного информационно-экспериментального подхода возможна существенная детализация и коррекция прогнозных правил, позволяющая оптимизировать как сам прогноз, так и повысить результативность поиска новых лекарственных веществ, существенно сократив при этом временные и экономические затраты на разработку новых лекарственных препаратов.

3.1 Поиск новых 5-HT_{2A}-блокаторов в рядах производных азола

Настоящее исследование было сфокусировано на изучении серотонинергических свойств представителей расширенного класса конденсированных азолов (см. глава 2.1.1). В основу предположения о наличии 5-HT_{2A}-активности у соединений указанного класса легли теоретические предпосылки о принадлежности эндогенного медиатора 5-гидрокситрипрамина к обобщенному классу конденсированных азолов, подтвержденные обнаружением антисеротониновой активности у некоторых производных азолов, а именно бензимидазола в ранее проводимых исследованиях [Спасов А.А., 2006; Черников М.В., 2008; Горягин И.И., 2008].

3.1.1 Система консенсусного информационного прогноза in silico 5-HT_{2A}-активности новых химических соединений

При исследовании была выдвинута гипотеза о возможном повышении эффективности поиска новых серотонинергически активных соединений при использовании методологии консенсусного компьютерного прогноза активности новых лекарственных веществ на основе информационных технологий PASS, TestSim (надстройка ИТ «Микрокосм») с одновременным снижением «жесткости» критериев включения по каждой из систем в отдельности; а также интегрирования в этот прогноз результатов математического анализа данных о зависимости 5-HT_{2A}-эффекта от базовой химической структуры ранее исследованных наиболее близких по строению к изучаемым соединениям (материалы и методы представлены в главе 2).

Расчет вероятности встречаемости высокоактивных 5-HT_{2A}-антагонистов среди новых производных азола с помощью системы PASS

При анализе имеющихся 1532 структурных описаний производных азола по системе PASS установлено, что для 15,7% соединений отношение

вероятностей P_a/P_i было больше 1,0 (Рисунок 7) и расценивалось как прогностически относительно благоприятное для возможного наличия 5-HT_{2A}-антагонистического действия. При этом, безусловно, уровень критерия $P_a/P_i=1$ не позволяет отрицать наличие ложноположительных оценок активности.

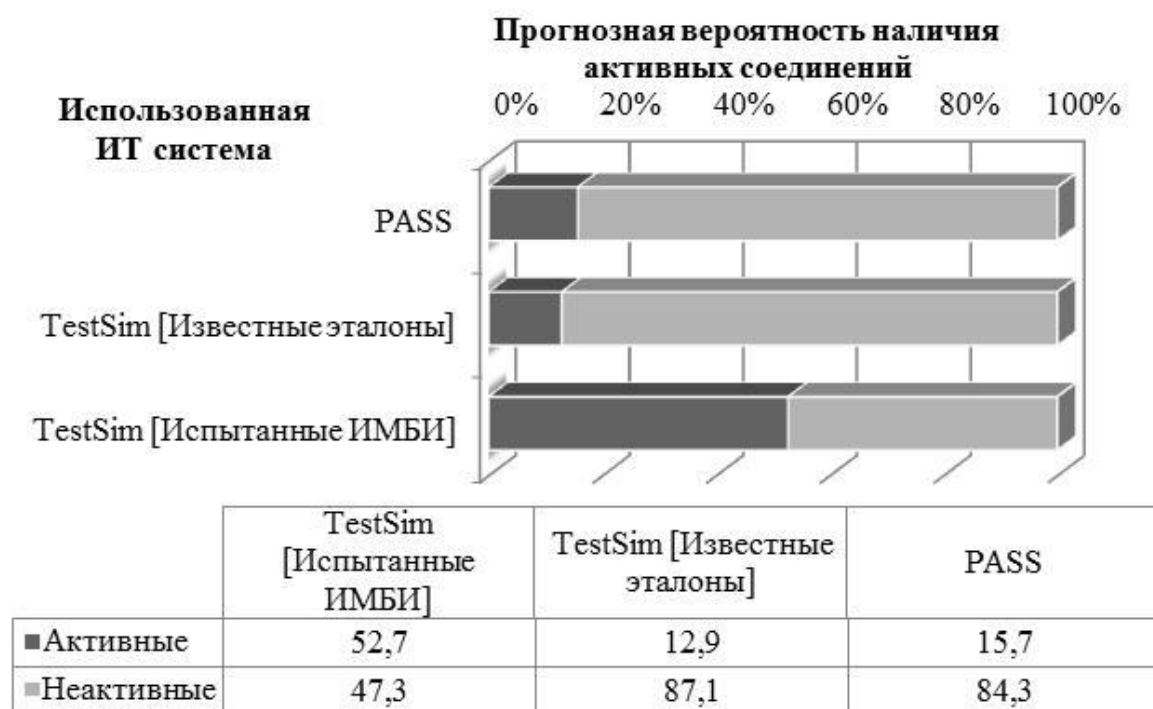


Рисунок 7. Вероятность встречаемости 5-HT_{2A}-активных соединений среди изучаемых представителей конденсированных азолов.

Примечания: реализована стратегия комбинированного предварительного прогноза активности класса конденсированных азолов с применением PASS и ИТ Микрокосм (настройка TestSim) и использованием в качестве эталонов веществ мирового ассортимента с доказанным 5-HT_{2A}-антагонистическим действием [5-Hydroxytryptamine receptors: PUPHAR/BPS] либо веществ, производных бензимидазола, с ранее выявленной 5-HT_{2A}-антагонистической активностью [Черников М.В., 2008].

При повышении уровня отношения вероятностей P_a/P_i , как критерия включения наблюдалось резкое ограничение числа прогностически благоприятных соединений, вплоть до полного их отсутствия. Вероятно, это обусловлено дефицитом эталонов с высокими 5-HT_{2A}-антагонистическими

свойствами в базе данных используемой системы прогноза со структурно близкими к изучаемым соединениям дескрипторами.

По всей видимости, использование системы PASS (с высоким уровнем «жесткости» критерия включения P_a/P_i) в качестве инструмента для монопрогноза 5-HT_{2A}-активности у изучаемых классов соединений приводит к практически полному исключению предсказаний у них 5-HT_{2A}-эффекта. При этом логичным продолжением увеличения значения P_a/P_i является и повышение вероятности ложноотрицательных оценок.

С другой стороны, снижение «жесткости» критерия P_a/P_i повышает степень предсказаний активных соединений, в том числе ложноположительных, и требует уточнения прогноза. Это отражает предлагаемую гипотезу и подтверждает целесообразность разработки методологии консенсусного прогноза активности с помощью различных информационных систем для уменьшения числа прогнозных ошибок.

Таким образом, на первом этапе разработки полного консенсуса с помощью системы PASS из 1532 было отобрано 241 соединение с возможными 5-HT_{2A}-антагонистическими свойствами.

Расчет вероятности встречаемости высокоактивных 5-HT_{2A}-антагонистов среди новых производных азола с помощью системы TestSim

Прогнозную оценку 5-HT_{2A}-антагонистической активности всех изучаемых 1532 конденсированных азолов с помощью системы TestSim проводили двумя способами: с использованием в качестве эталонов известных соединений с высокой 5-HT_{2A}-антагонистической активностью и с использованием ранее выявленных высокоактивных соединения среди класса бензимидазолов (см. глава 2.2.2).

При исследовании пороговые уровни общего коэффициента сходства (ОКС) составили: 0,399; 0,308 и 0,226 для максимального, среднего и минимального ОКС для эталонной выборки соответственно. В результате было установлено, что в целом для 12,9% соединений характерно наличие

вероятности развития указанного антисеротонинового эффекта, что было ранжировано от 1 до 3 баллов.

На втором этапе при оценке сходства с использованием в качестве эталонов ранее выявленных 5-НТ_{2А}-активных производных бензимидазола получены более высокие ОКС: 0,620; 0,462 и 0,309, для максимального, среднего и минимального ОКС относительно автотестирования эталонов соответственно. При этом процент прогностически активных соединений составил 52,7% от общего числа изучаемых соединений (Рисунок 7), что объясняется более высоким сходством строения соединений внутри класса.

Таким образом, в результате применения двух подходов при прогнозе 5-НТ_{2А}-антагонистического действия с использованием системы TestSim (компонента ИТ Микрокосм) было отобрано 807 и 197 соединений с различной степенью вероятности наличия изучаемого признака, с возможным частичным совпадением результатов. Полученные данные составили два независимых дополнительных прогнозных суждения в общем полном консенсусе прогноза.

Ретроспективный подструктурный анализ значимости ядра молекулы для ранее изученных соединений

После формирования базы данных ранее изученных бензимидазолов (метод изучения активности аналогичен описанному в главе 2.3.1), была проведена их кластеризация (см. глава 2.2.4) по уровню 5-НТ_{2А}-антагонистического эффекта и определены границы классов активности соединений. В результате к классу относительно высокоактивных были отнесены соединения с уровнем антисеротонинового действия (в концентрации 0,1 мкМ) в диапазоне от 30% и выше относительно контрольных. К классу умеренноактивных – от 29,9% до 19%. Остальные – к низкоактивным и неактивным соединениям.

Исходя из рассчитанных диапазонов для выявления наиболее значимого базового ядра молекулы – «кóра», определяющего высокую частоту встречаемости высокоактивных 5-НТ_{2А}-антагонистов, в ходе ретроспективного

подструктурного анализа использовали границу активности минус 30%. При этом было установлено, что наибольшая статистическая значимость (Ind 5) в развитии 5-HT_{2A}-активности принадлежала подклассу индолов (Таблица 4).

Таблица 4. Ретроспективный подструктурный анализ влияния типа «кóра» на высокий⁸ уровень 5-HT_{2A}-антагонистической активности конденсированных производных азола.

№ п/п	Химический класс	n	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
1	N ¹ -бензимидазолы	10	0,41	0,59	0,69	2,4×10 ⁻¹	0
2	N ⁹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	26	0,58	0,42	1,14	1,3×10 ⁻¹	1
3	N ¹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	12	0,11	0,89	3,19	7,1×10 ⁻⁴	-5
4	2,3-дигидро-N ¹ -бензимидазолы	13	0,10	0,90	3,36	3,9×10 ⁻⁴	-5
5	N ⁹ -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	1	0,39	0,61	0,30	3,8×10 ⁻¹	0
6	Пиримидо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	3	0,27	0,73	1,10	1,4×10 ⁻¹	-1
7	Индолы	2	0,89	0,11	3,13	8,7×10 ⁻²	5

Примечания:

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

Для «кóра» N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов была выявлена положительная тенденция (Ind 1) наличия указанной активности. В то же время для базовых структур N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и N¹-бензимидазолов статистически значимых обоснований получить не удалось в виду малого количества анализируемых соединений и/или высокой частоты

⁸ Подавление эффектов серотонина более, чем на 30,0% в концентрации 0,1 мкМ (согласно результатам кластерного анализа).

встречаемости не только высокоактивных, но и низкоактивных/неактивных соединений. Кроме того, в результате анализа были выявлены базовые структуры, демонстрирующие выраженный отрицательный вклад в развитие 5-HT_{2A}-антагонистической активности: N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы и 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы (Ind минус 5).

Безусловно, полученные данные не могут носить абсолютного решающего значения, особенно без привязки к заместителям в различных положениях циклической основы. Тем не менее, согласно выдвинутой гипотезе, они способны повысить значимость итогового 5-HT_{2A}-прогноза для новых соединений среди аналогичных классов.

На заключительном этапе все четыре прогнозных суждения были объединены с помощью полного взвешенного консенсуса (фрагмент представлен в Приложении Б Таблица Б.1). В результате из 1532 структурных описаний соединений для экспериментального изучения 5-HT_{2A}-антагонистической активности были рекомендованы 162.

3.1.2 Экспериментальный поиск 5-HT_{2A}-антагонистов среди синтезированных производных азола

Исследование проводили *in vitro* с помощью метода серотонин-индуцированной активации тромбоцитов (подробнее см. глава 2.3.1). Тестированию были подвергнуты 154 субстанции из числа рекомендованных в ходе компьютерного прогноза с учетом соответствия их физико-химических свойств (стабильность, растворимость) возможностям фармакологического исследования. Результаты представлены в таблице (Таблица 5).

Таблица 5. Влияние конденсированных азолов на выраженность 5-НТ_{2A}-опосредованной активации тромбоцитов.

Соединение	Изменение серотонин-индуцированной активации тромбоцитов (M±m), Δ%*	Соединение	Изменение серотонин-индуцированной активации тромбоцитов (M±m), Δ%*
1	2	1	2
N¹-бензимидазолы			
A4	-59,0±8,0 [#]	A15	-35,2±3,5 [#]
A2	-48,1±8,6 [#]	A5	-33,5±8,0 [#]
A12	-43,9±4,0 [#]	A6	-6,2±3,8
A3	-36,4±4,0 [#]	A1	-1,1±9,0
A7	-36,4±8,6 [#]		
2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы			
B2	-47,1±7,3 [#]	B13	-20,9±8,6 [#]
B17	-43,5±10,7 [#]	B9	-17,9±6,5 [#]
B10	-38,7±9,1 [#]	B6	-17,6±4,5 [#]
B19	-36,2±4,4 [#]	B3	-16,4±9,7
B20	-28,9±4,9 [#]	B15	-12,7±9,4
B16	-28,4±9,6 [#]	B23	-6,3±4,2
B21	-27,3±5,9 [#]	B4	-5,4±10,4
B1	-25,4±2,7 [#]	B12	-5,2±1,5
B7	-24,0±10,1 [#]	B22	-2,9±7,6
B8	-23,0±4,4 [#]	B14	1,8±7,9
B5	-22,9±9,1 [#]	B18	2,7±9,6
Индолы			
B14	-46,4±4,6 [#]	B12	-11,5±6,0
B19	-43,4±7,7 [#]	B7	-8,8±3,0 [#]
B9	-30,8±3,0 [#]	B5	-8,6±2,9 [#]
B15	-28,2±1,9 [#]	B17	-7,9±4,0
B16	-26,4±11,0 [#]	B8	-5,4±11,3
B10	-22,2±10,5	B18	-3,8±2,5
B11	-17,9±11,4	B20	-2,5±22,6

Таблица 5 (продолжение)

1	2	1	2
N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Г4	-34,2±3,3 [#]	Г12	-9,3±5,2
Г2	-29,2±3,0 [#]	Г10	-7,3±2,4 [#]
Г8	-15,7±1,5 [#]	Г13	-4,3±8,5
Г5	-13,4±7,4	Г14	0,4±3,1
N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Д9	-56,7±4,6 [#]	Д4	-23,9±2,8 [#]
Д11	-41,6±1,5 [#]	Д15	-23,7±5,4 [#]
Д13	-32,2±5,9 [#]	Д14	-20,3±4,6 [#]
Д1	-32,0±8,9 [#]	Д12	-17,8±10,8
Д16	-30,9±11,7 [#]	Д5	-12,1±10,5
Д2	-27,9±2,5 [#]	Д3	-9,7±9,2
Д8	-27,1±8,5 [#]	Д7	0,0±2,1
Д19	-26,5±2,6 [#]	Д10	0,0±3,0
N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Е56	-85,0±3,5 [#]	Е94	-30,1±21,2
Е75	-84,9±4,4 [#]	Е64	-29,0±6,1 [#]
Е92	-79,2±5,4 [#]	Е6	-27,5±10,4 [#]
Е36	-75,5±8,3 [#]	Е46	-27,0±10,9 [#]
Е53	-70,5±7,1 [#]	Е86	-26,5±8,3 [#]
Е21	-66,4±6,4 [#]	Е54	-26,2±1,8 [#]
Е98	-63,7±12,2 [#]	Е20	-25,7±5,0 [#]
Е89	-60,9±9,0 [#]	Е99	-30,4±0,2 [#]
Е24	-59,8±8,4 [#]	Е1	-23,3±14,5
Е95	-59,1±13,4 [#]	Е65	-21,3±5,6 [#]
Е66	-58,1±10,0 [#]	Е76	-19,7±10,0
Е78	-53,3±5,2 [#]	Е9	-16,3±1,4 [#]
Е60	-52,6±6,0 [#]	Е30	-15,9±2,6 [#]
Е85	-51,1±8,3 [#]	Е19	-12,8±6,0
Е93	-50,4±31,5	Е108	-11,9±3,6 [#]
Е77	-49,0±3,3 [#]	Е4	-10,7±9,5
Е27	-47,4±7,2 [#]	Е74	-8,1±7,9
Е48	-47,1±4,4 [#]	Е14	-6,6±27,5
Е32	-46,9±4,5 [#]	Е8	-6,2±13,5

Таблица 5 (окончание)

1	2	1	2
E3	-44,0±0,9 [#]	E15	-5,9±7,2
E7	-41,4±4,0 [#]	E68	-5,4±5,3
E12	-38,7±4,8 [#]	E58	-4,9±9,3
E80	-37,1±10,4 [#]	E16	-4,5±7,3
E22	-37,0±0,2 [#]	E72	-4,2±4,0
E100	-36,3±11,5 [#]	E35	-3,6±2,1
E40	-35,6±6,1 [#]	E70	0,0±1,9
E73	-34,9±5,9 [#]	E84	0,0±2,0
E45	-34,8±6,4 [#]	E90	2,0±11,3
E51	-34,3±9,0 [#]	E2	12,0±3,4 [#]
E103	-33,8±4,1 [#]	E102	14,9±2,7 [#]
E82	-32,9±17,5	E81	56,4±8,6 [#]
Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы			
Ж2	-33,3±7,5 [#]	Ж13	-6,7±5,8
Ж11	-31,2±1,7 [#]	Ж10	-6,0±1,1 [#]
Ж7	-28,1±4,3 [#]	Ж9	-4,1±5,8
Ж4	-23,2±9,6 [#]	Ж5	-0,1±10,6
Ж15	-22,1±5,9 [#]	Ж3	2,4±9,7
Ж16	-21,6±10,1	Ж1	13,1±10,9
Ж8	-17,4±5,6 [#]		
Вещества сравнения			
Кетансерин			-77,3±4,1 [#]
Ципрогептадин			-51,3±2,5 [#]

Примечания:

* - изменение относительно величины серотонининдуцированной активации (контроля), все соединения изучены в концентрации 1 мкМ; [#] - отличие относительно показателя контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Даннета).

Для 61% веществ было отмечено наличие значимого эффекта, достоверно отличающегося от показателей контрольных измерений. Из них 17 соединений соответствовали по уровню активности препарату сравнения ципрогептадину. Кроме того, были выявлены соединения (E56, E75, E92, E36) статистически значимо превосходящие его по уровню 5-НТ_{2А}-антагонистических свойств, а также не уступающие эффекту кетансерина.

В заключении был проведен многоэтапный корреляционный анализ прогнозируемых и экспериментальных оценок активности исследованных соединений для определения адекватности предложенной системы

комбинированного информационно-экспериментального поиска новых 5-HT_{2A}-антагонистов в ряду конденсированных азолов. При этом установлена закономерность повышения коэффициента корреляции R_G от 0,2 при использовании моноподхода прогноза по одной из использованных систем (PASS или TestSim) до 0,8 при применении предложенной консенсусной методологии.

Таким образом, в настоящем исследовании был разработан новый информационно-экспериментальный консенсусный методологический подход направленного поиска новых соединений с 5-HT_{2A}-антагонистическим действием среди конденсированных азолов и подтверждена гипотеза о целесообразности обобщения прогнозных оценок активности соединений в системах PASS, ИТ Микрокосм (надстройка TestSim) с данными ретроспективного подструктурного анализа влияния «кóра» при одновременном снижении порога прогнозной значимости каждой из использованных систем.

3.1.3 Анализ зависимости уровня 5-HT_{2A}-антагонистической активности от химической структуры и физико-химических свойств соединений

Для более детального выявления и/или уточнения структурно-функциональной зависимости конденсированных азолов был выполнен многоэтапный расширенный подструктурный анализ (методы представлены в главе 2.2.4).

На первом этапе была проведена повторная кластеризация всех, в том числе ранее изученных соединений, по уровню эффекта с определением границ активности классов. В результате выявления высокоактивных веществ с 5-HT_{2A}-антагонистическим действием в настоящем исследовании порог активности каждого из классов оказался выше, чем при

ретроспективном анализе: так к классу высокоактивных были отнесены соединений с уровнем антисеротонинового действия, превышающим 39,8%.

На следующем этапе в результате расширенного подструктурного анализа влияния базовых структур на выраженность 5-НТ_{2A}-антагонистического действия было выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) влияние (Ind 5) «кóра» имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с заместителями в 9 положении. То же время уровень значимости общей структуры индолов, равно как и N¹-замещенных бензимидазолов, в развитии указанного эффекта напротив оказался статистически недостоверным, что связано с высоким числом малоактивных/неактивных соединений среди изученных указанных классов.

Кроме того были выявлены «кóры» с высокой вероятностью влияющие на отсутствие высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности (Ind минус 5): N¹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 2,3-дигидро-N¹-замещенные-бензимидазолы, а также пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы (Рисунок 8).

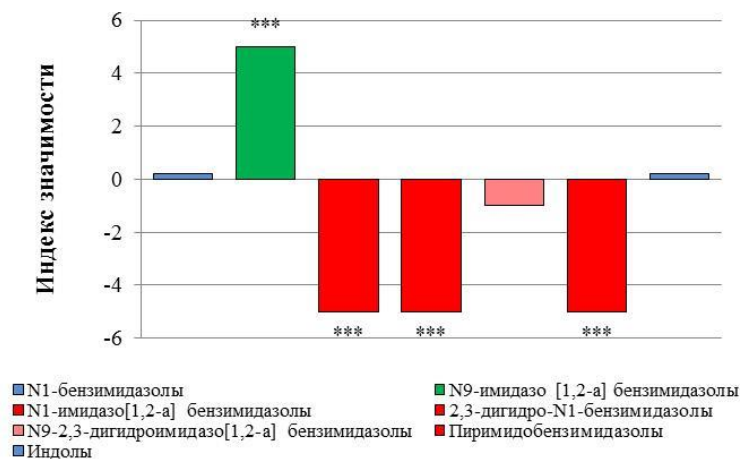


Рисунок 8. Расширенный подструктурный анализ зависимости наличия высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности от общей структуры (кóра) изученных производных азола.

Примечания: статистическая значимость признака $***p < 0,001$; высокий положительный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности развития 5-НТ_{2A}-антагонистического эффекта; высокий отрицательный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности отсутствия эффекта; низкий индекс значимости свидетельствуют о незначимой структурно-функциональной зависимости.

Слабая отрицательная тенденция была отмечена и для N⁹-2,3-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, что, однако, имело статистически незначимый характер.

Таким образом, установлено, что наибольшее значение в развитие 5-HT_{2A}-антагонистического действия среди всех изученных общих структур конденсированных азолов вносит N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольный «кóр».

На следующем этапе была детализирована изучаемая структурно-функциональная зависимость наиболее значимого подкласса N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов с учетом заместителей в 2,3,9- положениях ядра молекулы.

Наиболее значимыми (Ind больше либо равен 3) для проявления высокого 5-HT_{2A}-антагонистического действия в C² положении оказались 4-метоксифенильный, 2-тиенильный и *трет*-бутильный заместители (Таблица б). В то же время для метильного, 4-гидроксифенильного и 3,4-дигидроксифенильного заместителей было выявлено статистически значимое отрицательное влияние на возможность наличия высокого 2A антисеротонинового действия. Слабая отрицательная тенденция (p=0.1) также отмечалась для таких заместителей как бензо[*d*][1,3]диоксол-5-ил, 4-хлорфенил и 4-фторфенил. Для остальных изученных R₂-заместителей (структуры представлены в Приложении А) определить существенное влияние на развитие 5-HT_{2A}-антагонистической активности не удалось.

В положении N⁹ наиболее высокую значимость (Ind больше либо равен 3) приобрели диметиламинопропильный и диэтиламиноэтильный заместители. Также отмечалась положительная тенденция (Ind=2) в развитии 5-HT_{2A}-антисеротонинового эффекта для близкого по строению к указанным диметиламиноэтильного заместителя. Статистически значимое отрицательное значение было выявлено для пиперидиноэтильного и морфолиноэтильного заместителей. Для остальных изученных радикалов в N⁹-положении (Приложение А) уровень значимости (Ind) варьировал от

минус 1 до 1 и не позволил выявить существенного влияния на 5-HT_{2A}-эффект.

Таблица 6. Подструктурный анализ влияния типа заместителя⁹ на развитие высокого¹⁰ уровня 5-HT_{2A}-антагонистической активности производных N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов.

№ п/п	Признак	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
C²(R₂)						
1	-C ₄ H ₉ S; 2-тиенил	0,72	0,28	1,65	4,9×10⁻²	3
2	-CH ₃ ; метил	0,12	0,88	3,00	1,4×10 ⁻³	-4
3	-C(CH ₃) ₃ ; трет-бутил	0,76	0,24	3,27	5,4×10⁻⁴	5
4	-4-C ₆ H ₄ Cl; 4-хлорфенил; п-хлорфенил	0,24	0,76	1,31	9,6×10 ⁻²	-2
5	-4-C ₆ H ₄ F; 4-фторфенил; п-фторфенил	0,24	0,76	1,31	9,6×10 ⁻²	-2
6	-4-C ₆ H ₄ OH; 4-гидроксифенил; п-гидроксифенил	0,13	0,87	2,77	2,8×10 ⁻³	-4
7	-3,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂ ; 3,4-дигидроксифенил	0,21	0,79	1,66	4,8×10 ⁻²	-3
8	-4-C₆H₄OCH₃; 4-метоксифенил; п-метоксифенил	0,75	0,25	2,42	7,7×10⁻³	4
9	-3,4-C ₆ H ₃ O ₂ CH ₂ ; бензо[d][1,3]диоксол-5-ил	0,24	0,76	1,31	9,6×10 ⁻²	-2
N⁹(R₁)						
1	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂ ; диметиламиноэтил	0,72	0,28	1,39	8,2×10 ⁻²	2
2	-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; диэтиламиноэтил	0,67	0,33	2,94	1,6×10⁻³	4
3	-(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; пиперидиноэтил	0,30	0,70	2,79	2,6×10 ⁻³	-4
4	-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,22	0,78	2,66	3,9×10 ⁻³	-4
5	-(CH₂)₃N(CH₃)₂; диметиламинопропил	0,81	0,19	1,91	2,8×10⁻²	3

Примечания:

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

При подструктурном анализе значимости изученных R₃-заместителей в C³ положении (Приложении А) наличия достоверного влияния последних выявлено не было (p>0,1). При этом степень вероятности развития высокого

⁹ Представлены наиболее значимые заместители.

¹⁰ Подавление эффекта серотонина более, чем на 39,8% в концентрации 1 мкМ.

5-НТ_{2А}-антагонистического действия не отличалась от таковой при наличии в качестве R₃-радикала атома водорода.

На следующем этапе методами частотного анализа (см. глава 2.2.5) проводилось изучение зависимости наличия высокой 5-НТ_{2А}-активности от физико-химических свойств соединений, содержащих N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазольный «кóр». Результаты представлены в таблицах (Таблица 7, Таблица 8).

Установлено, что наиболее существенное влияние в развитие высокого эффекта вносят заместители в положении 2 с показателем липофильности LogP большим либо равным 1,86; но меньшим 2,37. Среди изученных такими заместителями явились 4-метоксифенил, 4-этоксифенил, *трет*-бутил, фенил и 4-фторфенил. Напротив, для R₂-заместителей с уровнем показателя LogP от 0,82 до 1,86 было выявлено выраженное отрицательное влияние на возможность наличия высокой 2А антисеротониновой активности.

При анализе липофильных свойств R₁-заместителей в N⁹-положении установлено, что наибольшее положительное значение в развитие эффекта вносят диметиламинопропильный, диэтиламиноэтильный, метильный, пирролидиноэтильный радикалы с показателем LogP большим либо равным 0,88, но меньшим 1,35. При более низком значении липофильности заместителей (LogP от 0,18 до 0,41) отмечается статистически значимое ($p < 0,0001$) отрицательное влияние на возможность развития изучаемой активности, что характерно для пиперидиноэтильного и морфолиноэтильного радикалов.

Ввиду вариабельности эффектов либо ограниченности выборки для заместителей в C₃-положении и для остальных радикалов в положениях 2 и 9 статистически значимого влияния на возможность развития высокого 5-НТ_{2А}-антагонистического действия выявлено не было.

Таблица 7. Частотный анализ влияния липофильности заместителей¹¹ на развитие высокого уровня 5-НТ_{2А}-антагонистической активности производных N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола.

№ п/п	Липофильность (LogP)	Заместитель	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
<i>R₂(C²)</i>							
1	0,82 ≤ Log P < 1,34	-CH ₃ ; метил -3,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂ ;	0,09	0,91	3,79	7,6×10 ⁻⁵	-5,0
2	1,34 ≤ Log P < 1,86	-3,4-C ₆ H ₃ O ₂ CH ₂ ; -C ₆ H ₄ OH -C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂ -C ₄ H ₃ O; -C ₄ H ₃ S;	0,35	0,65	1,94	2,6×10 ⁻²	-3,0
3	1,86 ≤ Log P < 2,37	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃ ; -4-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅ ; -C(CH ₃) ₃ ; -C ₆ H ₅ ; -C ₆ H ₄ F	0,67	0,33	3,27	5,5×10⁻⁴	5,0
<i>R₁(N⁹)</i>							
1	0,18 ≤ Log P < 0,41	-(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; -(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O	0,26	0,74	3,97	3,6×10 ⁻⁵	-5,0
2	0,41 ≤ Log P < 0,88	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	0,72	0,28	1,39	8,2×10 ⁻²	2,0
3	0,88 ≤ Log P < 1,35	-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; -(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂ ; -CH ₃ ; -(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈	0,68	0,32	3,43	3,0×10⁻⁴	5,0

Примечания:

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

При изучении зависимости указанного эффекта от молекулярной рефракции соединений и их отдельных радикалов установлено, что наиболее весомый вклад в развитие активности вносят вещества, имеющие R₂-

¹¹ Представлены наиболее значимые заместители.

Таблица 8. Частотный анализ влияния молекулярной рефракции заместителей¹² на развитие высокого уровня 5-НТ_{2А}-антагонистической активности производных N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

№ п/п	Молекулярная рефракция (MR)	Заместитель	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
<i>R</i> ₂ (C ²)							
1	MR < 10,44	-CH ₃ ; метил	0,12	0,88	3,00	1,4×10 ⁻³	-4,0
2	17,55 ≤ MR < 24,67	-C ₄ H ₃ O; -C ₄ H ₃ S	0,74	0,26	3,61	1,5×10 ⁻⁴	5,0
3	24,67 ≤ MR < 31,78	-C ₆ H ₅ ; -4-C ₆ H ₄ Cl; -4-C ₆ H ₄ F; -C ₆ H ₄ OH; -C ₆ H ₃ (OH) ₂ ; -4-C ₆ H ₄ CH ₃	0,30	0,70	3,16	8,0×10 ⁻⁴	-5,0
4	31,78 ≤ MR < 42,45	-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂ ; -3,4-C ₆ H ₃ Cl ₂ ; -3,4-C ₆ H ₃ O ₂ CH ₂ ; -4-C ₆ H ₄ OCH ₃ ; -4-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅ ; -α-C ₁₀ H ₇	0,60	0,40	1,37	8,6×10 ⁻²	2,0

Примечания:

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

заместители в положении C² с величиной MR от 17,55 до 24,67 (Ind 5) – 2-фурил, 2-тиенил; а также в диапазоне от 31,78 до 42,45 (Ind 2) – 4-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 3,4-дихлорфенил, α-нафтил и бензо[1,3]диоксол-5-ил. Остальные заместители вносили отрицательный вклад либо не оказывали существенного.

¹² Представлены наиболее значимые заместители.

На заключительном этапе анализа зависимости 5-HT_{2A}-активности от химической структуры и физико-химических свойств соединений были обобщены все выявленные закономерности и построен интегральный «скаффолд», ответственный за развитие высокого 5-HT_{2A}-антагонистического действия (Рисунок 9).

Основная часть «скаффолда» была сформирована 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом. Вариативная часть, при которой сохранялась высокая антисеротониновая активность, определилась добавлением метильных групп на концах заместителей в N⁹ и C² положениях, а также возможностью удлинения этильного фрагмента N⁹-диметиламиноэтильного радикала. Не исключенным оказался и возможный заместитель в C³ положении, роль которого предстоит выяснить в будущих исследованиях.

Таким образом, в ходе анализа фундаментальной структурно-функциональной зависимости изученных конденсированных азолов установлено, что наибольший вклад в развитие 5-HT_{2A}-антагонистического эффекта вносит N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная обобщенная структура, диметиламиноэтильный фрагмент N⁹-заместителя, а также 4-метоксифенильный фрагмент заместителя в C² положении.

Значимость «кóра»			Значимость признаков R ₂ (C ²)		
			Строение заместителя (подструктура)*	LogP	MR
					-1
			1		
			0		-5
			-2		-5
			0	-3	
				-3	
			-4	Строение заместителя (подструктура)*	Значимость признаков R ₁ (N ⁹)
			-CH₃	LogP	
1	0	0	0	MR	

Рисунок 9. Построение интегрального «скаффолда», ответственного за развитие высокого 5-HT_{2A}-антагонистического действия.

Примечания: цифрами указана значимость (Ind) соответствующего признака, рассчитанная в результате обобщенного *подструктурного и частотного анализов влияния химического подкласса веществ и основных заместителей; красным обозначен основной «скаффолд», синим – вариативная часть.

3.1.4 Выявление наиболее перспективного соединения с 5-HT_{2A}-антагонистическими свойствами для стартового доклинического изучения

На следующем этапе решения задачи поиска и разработки нового лекарственного вещества с 5-HT_{2A}-антагонистическим действием для определения соединения-лидера¹³ была проведена сравнительная оценка фармакологических свойств *in vitro* наиболее активных среди выявленных соединений, а также выполнено сравнительное молекулярное моделирование *in silico* взаимодействия последних с участком связывания 5-HT_{2A}-рецептора человека (материалы и методы представлены в главах 2.1, 2.2.3 и 2.2.5).

Зависимость 5-HT_{2A}-свойств наиболее активных соединений от концентрации in vitro.

Было установлено, что для соединений E75 и E56 характерна минимальная полуингибирующая эффекты серотонина концентрация 38 нМ и 44 нМ, соответственно, при сопоставимом уровне показателя LD₅₀. При этом оба вещества по уровню 5-HT_{2A}-антагонистического эффекта превосходили препарат сравнения ципрогептадин и не уступали кетансерину. Для остальных соединений (E92, E36 и E53) выраженность антисеротонинового действия была в 1,8-3,9 раза ниже (Таблица 9).

¹³ Соединение-лидер – ведущее соединение, пригодное для разработки лекарственных средств на его основе [Палюлин В.А., 2013].

Таблица 9. Показатели 5-НТ_{2A}-блокирующей активности (в концентрации 1 мкМ), IC₅₀ и LD₅₀ наиболее активных соединений препаратов сравнения ципрогептадина и кетансерина.

Вещество	5-НТ _{2A} - блокирующая активность, Δ%* (M±m)	IC ₅₀ , моль/л (SD)	LD ₅₀ , мг/кг (SD)
E75	-84,7±4,4 [#]	3,8×10 ⁻⁸ (8,2×10 ⁻⁹ -1,9×10 ⁻⁷)	77,6 (68,6-87,9)
E56	-82,7±3,3 [#]	4,4×10 ⁻⁸ (3,7×10 ⁻⁹ -5,1×10 ⁻⁷)	92,6 (81,5-105,2)
E92	-79,2±5,4 [#]	8,6×10 ⁻⁸ (2,4×10 ⁻⁸ -3,1×10 ⁻⁷)	114,2 (99,7-130,8)
E36	-72,7±6,4 [#]	1,5×10 ⁻⁷ (2,3×10 ⁻⁹ -1,0×10 ⁻⁵)	66,0 (60,8-71,7)
E53	-70,5±7,1 [#]	6,9×10 ⁻⁸ (1,7×10 ⁻⁸ -2,8×10 ⁻⁷)	77,0 (70,2-84,4)
Кетансерин	-77,3±4,1 [#]	4,3×10 ⁻⁸ (6,7×10 ⁻⁹ -4,1×10 ⁻⁷)	71,5**
Ципрогептадин	-51,3±2,6	4,1×10 ⁻⁷ (5,01×10 ⁻⁸ -8,8×10 ⁻⁷)	43,3**

Примечания:

* - изменение относительно контрольного измерения; # - отличие от показателя ципрогептадина статистически значимо (p<0,05; критерий Манна-Уитни); SD – доверительный интервал; ** - по данным ARZNAD и Drug future Base [Engelhardt G., 1975; Ketanserin: Drug future Base].

Расчет энергии связывания наиболее активных соединений и вещества сравнения методом виртуального 3D-докинга

В результате молекулярного моделирования взаимодействия веществ с сайтом связывания 5-НТ_{2A}-рецептора установлено, что все из изучаемых соединений способны докириваться с достаточно низким уровнем энергии связывания, сопоставимым с показателем для конкурентного 5-НТ_{2A}-антагониста кетансерина с поправкой на выявленный уровень биологического эффекта, что предварительно подтверждает фармакологический механизм действия соединений. При этом минимальную энергию связывания минус 8,1 ккал/моль демонстрирует соединение E75 (Таблица 10).

Таблица 10. Результаты докирования молекулы кетансерина и наиболее активных соединений в специфический сайт связывания 5-HT_{2A}-рецептора человека.

Соединение	Энергия докинга, ккал/моль
E75	-8,1
E92	-8,0
E56	-8,0
E36	-7,7
E53	-8,0
Кетансерин	-9,0

Примечания:

докинг выполнен с использованием с применением программы AutoDock Vina; конформационная обработка 3D-структур докируемых соединений выполнена в программной среде ChemOffice 9.0 с использованием метода молекулярной механики и MM2 и оптимизирована методом квантовой химии AM1.

Учитывая полученные данные, а также строение изученных производных 9-диэтиламиноэтил-2-имидазо[1,2-а]бензимидазола и вещества E75, в частности, возможно предположить, что немаловажным при взаимодействии с активным участком рецептора, описанным для 5-HT_{2A}-лигандов [Nichols D.E., 2012; Varden M.R., 2007; Ponnalaa S., 2014], является высокая электронная избыточность характерная для конденсированных азолов, по всей вероятности усиливающаяся присутствующей в трициклической структуре имидазо[1,2-а]бензимидазолов гуанидиновой группировкой. По-видимому, благодаря указанному трициклическому фрагменту может образовываться π-π взаимодействие с фенилаланином (Phe339, Phe340), которое также усиливается за счет заместителя в C² положении для соединения E75 (Рисунок 10).

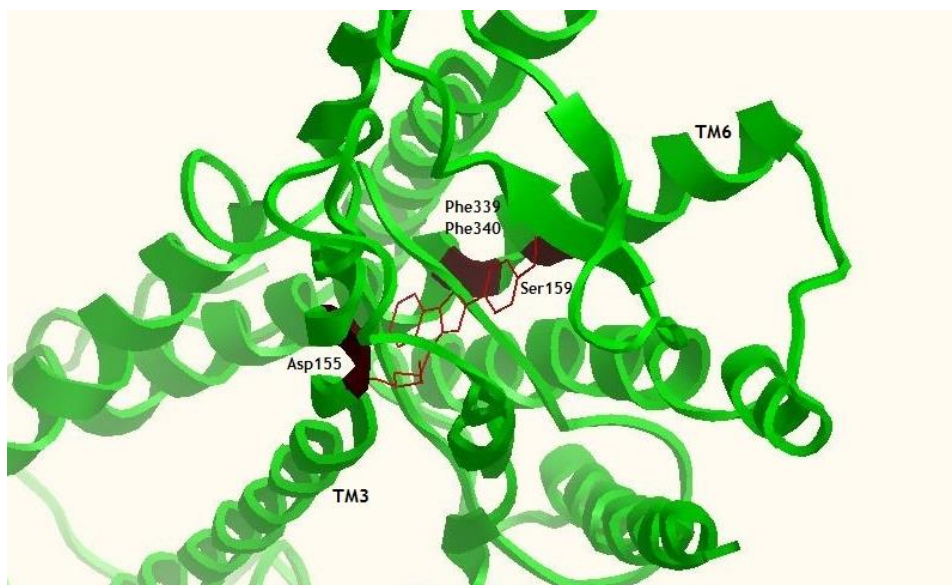


Рисунок 10. Модель сайта связывания 5-НТ_{2А}-рецептора с докированной молекулой соединения E75 *in silico*.

ТМ – трансмембранные домены рецептора.

Также вероятна способность образования ионного мостика между протонированной аминогруппой N⁹-радикалов лигандов и COO⁻ группой аспарагиновой кислоты (Asp155). При этом гидрофобные этильные/метильные группы способны образовывать дополнительные связи, стабилизируя уже образовавшееся ионное взаимодействие. Наличие серина (Ser159) в рецепторном кармане, по всей вероятности, указывает на образование достаточно прочной водородной связи за счет OH⁻ группы аминокислоты и алкоксильного кислорода веществ.

Принимая во внимание наличие возможности взаимодействия всех выявленных высокоактивных соединений с активным центром 5-НТ_{2А}-рецептора, предварительно подтверждающей механизм их действия, а также данные об уровне активности, полученные *in vitro* и рассчитанные *in silico*, в качестве соединения-лидера для расширенного фармакологического изучения было выбрано соединение – E75 (Рисунок 11), превосходящее по совокупности эффектов остальные высокоактивные соединения-кандидаты.

На выявленное соединение получен патент РФ № 2465901 (2012).

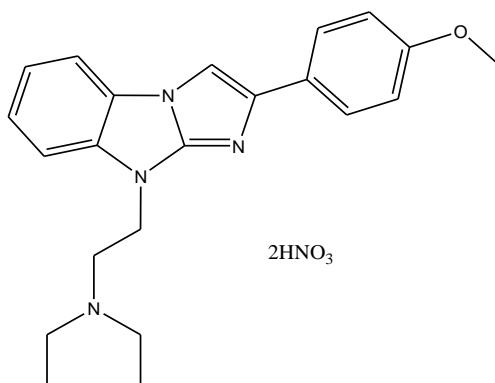


Рисунок 11. Динитрат 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (E75, RU-476) – соединение-лидер антагонист 5-НТ_{2A}-рецепторов.

3.2 Направленный поиск новых высокоактивных 5-НТ₃-антагонистов среди конденсированных производных азола

Особенностью структуры 5-гидрокситриптамина, а также уже известных на сегодняшний день антагонистов серотонина третьего подтипа является сходство с производными конденсированных азолов либо близкими к ним гетероциклическими соединениями.

Литературные данные, опубликованные в последние годы, также говорят о наличии в структуре потенциального 5-НТ₃-антагониста ароматического/гетероароматического ядра и, возможно, радикала с дефицитом электронной плотности [Thompson A.J., 2013]. Также определены основные критерии привилегированности некоторых молекул перед другими, определяющие их взаимодействие с биологическими мишенями, в том числе и рецепторными комплексами, что играет немаловажную роль при поиске новых высокоактивных соединений [Bywater R.P., 2006; Duarte C.D., 2007]. Ввиду этого весьма обоснованным представляется поиск серотониноблокирующих

веществ среди соединений, содержащих в своей структуре указанные дескрипторы.

Конденсированные производные азола, а именно: индолы, бензимидазолы, имидазобензимидазолы, дигидроимидазобензимидазолы - относятся именно к таким веществам. Кроме того, данные теоретические предпосылки подтверждаются обнаружением антисеротониновой активности у некоторых производных бензимидазола [Спасов А.А., 2006].

Серотонин, активируя 5-НТ₃-рецепторы, может модулировать функции многих систем организма. В центральной нервной системе 5-НТ₃-рецепторы участвуют в регуляции рвотных рефлексов, процессов восприятия, поведенческих актов. Известные на сегодняшний день препараты, проявляющие 5-НТ₃-антагонистическую активность (ондансетрон, палонсетрон и другие), внедрены в медицинскую практику как антиэметические средства и средства для лечения Д-формы синдрома раздражённого кишечника. Направленный поиск новых активных веществ с 5-НТ₃-блокирующими свойствами среди конденсированных производных азола может послужить базисом для создания нового класса эффективных средств с противорвотной активностью.

3.2.1 Консенсусный прогноз in silico 5-НТ₃-активности новых химических соединений

В настоящем исследовании направленный поиск новых соединений с 5-НТ₃-антагонистическим действием проводили с использованием предложенной методологии комбинированного консенсусного информационно-экспериментального поиска.

На этапе прогноза 5-НТ₃-активности новых конденсированных азолов за эталонную основу для выполнения ретроспективного анализа и анализа методом сходства к наиболее близкому классу химических соединений с

помощью системы TestSim (ИТ Микрокосм) были приняты данные о 5-НТ₃-антагонистической активности производных бензимидазола и бензимидазолина из работ М.В. Черникова, С.Т. Киабия и ранее проводимых собственных исследований [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008].

В результате выполнения прогнозной оценки 5-НТ₃-антагонистической активности изучаемой в настоящем исследовании выборки 1532 соединений производных азолов по системе PASS, было установлено, что 27,8% соединений демонстрируют уровень вероятности P_a/P_i больше 1 и удовлетворяют установленному критерию включения (Рисунок 12).



Рисунок 12. Вероятность встречаемости 5-НТ₃-активных соединений среди изучаемых представителей конденсированных азолов.

Примечания: реализована стратегия комбинированного предварительного прогноза активности класса конденсированных азолов с применением PASS и ИТ Микрокосм (настройка TestSim) и использованием в качестве эталонов веществ мирового ассортимента с доказанным 5-НТ₃-антагонистическим действием [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS] либо веществ, производных бензимидазола и бензимидазолина, с ранее выявленной 5-НТ₃-антагонистической активностью [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008].

Прогноз по сходству к известным 5-НТ₃-антагонистам различных химических классов [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS] позволил определить в качестве рекомендуемых к экспериментальному исследованию

225 соединений из всей изучаемой выборки, продемонстрировавших уровни общего коэффициента сходства (ОКС) более 0,243. При использовании в качестве эталонов высокоактивных соединений - представителей класса бензимидазолов - перспективными были определены 7,9% соединений с уровнем ОКС большим, чем 0,595. При этом пороговый уровень ОКС в обоих случаях выявлялся по результатам автотестирования сходства группы эталонов «самим к себе».

На заключительном этапе подготовки прогнозных суждений для консенсусного прогноза, как и в случае с исследованием 5-HT_{2A}-антагонистической активности, был выполнен ретроспективный подструктурный анализ влияния «кóра» на возможность проявления высокого 5-HT₃-антагонистического действия. При этом исследованию предшествовал кластерный анализ ретроспективных данных с определением порога антисеротонинового действия для класса высокоактивных соединений на уровне 33% и более по отношению к контрольному измерению в концентрации 1 мкМ. Так было установлено, что наиболее значимыми «кóрами» оказались N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол и N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол (Ind 5 и 2 соответственно). Более подробно результаты представлены в Приложении Б (Таблица Б. 2).

В результате сложения прогнозных оценок и формирования общего взвешенного консенсуса к исследованиям *in vitro* были рекомендованы 128 из 1532 соединений с наиболее высокими суммарными прогнозными индексами.

3.2.2 Экспериментальное изучение 5-HT₃-активности новых химических соединений *in vitro*

В ходе тестирования всех рекомендованных соединений (методы исследования представлены в главе 2.3.1 и 2.3.2) было выявлено 49 веществ, статистически значимо подавляющих 5-HT₃-опосредованные эффекты серотонина. При этом 4 соединения (Г8, Г12, Г10, Г21) превосходили по

уровню активности метоклопрамид, 3 из которых (Г8, Г12, Г10) не уступали по величине антисеротонинового эффекта ондансетрону. Еще 6 соединений (В11, Г20, Г6, Г4, Е63, Е91) продемонстрировали уровень активности сопоставимый с метоклопрамидом, но уступающий ондансетрону (Таблица 11).

Таблица 11. 5-НТ₃-антагонистические свойства конденсированных азолов на модели серотонининдуцированного спазма изолированного участка подвздошной кишки морской свинки.

Соединение	Изменение спазмогенного эффекта серотонина (M±m), Δ%*	Соединение	Изменение спазмогенного эффекта серотонина (M±m), Δ%*
1	2	1	2
N¹-бензимидазолы			
А8	-14,1±4,3 [#]	А2	4,6±2,6
А6	3,9±3,5		
2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы			
В24	-24,2±1,2 [#]	В21	-9,4±3,6 [#]
В20	-12,7±5,5 [#]	В19	-1,5±2,1
В17	-10,3±6,2		
Индолы			
В11	-31,6±7,2 [#]	В14	-13,5±7,3
В18	-27,1±2,2 [#]	В15	-11,0±3,1 [#]
В4	-25,8±3,2 [#]	В23	-7,6±3,4
В5	-25,6±6,5 [#]	В13	-6,8±2,6 [#]
В6	-24,1±1,9 [#]	В8	-6,7±6,1
В7	-23,6±8,9 [#]	В19	-5,6±3,5
В3	-22,3±10,9 [#]	В9	-4,7±1,9 [#]
В1	-21,1±2,4 [#]	В24	-4,4±1,8
В12	-20,9±2,3 [#]	В17	-3,3±2,4
В16	-19,7±0,9 [#]	В21	0,0±0,0
В10	-19,1±3,2 [#]	В22	0,0±0,0
В2	-14,7±10,2	В20	5,2±7,3
N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Г8	-85,1±3,8 [#]	Г15	-8,0±3,4 [#]
Г12	-82,8±5,5 [#]	Г7	-5,9±11,5
Г10	-63,5±7,9 [#]	Г1	-5,8±2,2 [#]
Г21	-46,6±7,3 [#]	Г16	-4,4±1,1
Г20	-34,0±6,4 [#]	Г26	-4,2±6,0
Г6	-29,4±8,9 [#]	Г3	-4,1±2,1

Таблица 11 (продолжение)

1	2	1	2
Г4	-27,2±11,7 [#]	Г25	-3,4±2,2
Г9	-13,3±9,4	Г23	-2,7±1,1
Г11	-13,3±1,4 [#]	Г22	-2,5±1,7
Г19	-11,7±14,5	Г5	-2,4±3,4
Г24	-10,2±8,0	Г17	-0,2±6,4
Г18	-8,6±5,1		
№⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Д13	-19,3±8,1 [#]	Д12	-2,0±2,9
Д4	-15,6±6,3 [#]	Д11	-1,1±1,5
Д1	-11,9±6,0	Д20	-0,7±1,0
Д18	-6,8±9,6	Д6	-0,6±0,7
Д8	-5,1±4,1	Д15	-0,3±5,5
Д5	-2,8±1,0	Д14	5,8±8,2
Д17	-2,6±1,7	Д3	6,2±6,1
№⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Е63	-33,5±14,0 [#]	Е44	-12,3±6,2
Е91	-31,1±3,5 [#]	Е42	-12,1±7,2
Е27	-30,3±1,8 [#]	Е24	-11,4±5,8 [#]
Е86	-28,6±1,4 [#]	Е104	-10,8±10,7
Е35	-25,7±3,5 [#]	Е75	-10,8±0,1 [#]
Е98	-24,8±10,8	Е36	-9,6±6,9
Е66	-24,7±3,7 [#]	Е95	-9,3±11,0
Е48	-23,8±4,8 [#]	Е59	-8,6±6,7
Е92	-22,7±2,4 [#]	Е9	-8,2±2,2 [#]
Е94	-22,5±11,0	Е47	-7,8±11,0
Е56	-22,5±2,2 [#]	Е87	-7,5±4,6
Е30	-21,0±7,7 [#]	Е49	-6,1±3,5
Е99	-20,8±10,3	Е101	-5,7±2,9
Е57	-20,8±5,9 [#]	Е73	-5,5±10,1
Е62	-20,3±1,5 [#]	Е105	-5,0±3,5
Е64	-20,8±0,6 [#]	Е97	-4,1±5,0
Е88	-19,1±0,8 [#]	Е32	-3,5±1,8
Е93	-17,2±2,3 [#]	Е3	2,9±4,2
Е71	-16,8±2,7 [#]	Е41	3,7±5,2

Таблица 11 (окончание)

1	2	1	2
E53	-16,3±6,3 [#]	E31	9,2±5,2
E88	-13,5±8,6	E103	16,8±12,6
E74	-12,5±9,0		
Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы			
Ж13	-20,1±11,7	Ж4	-4,5±3,3
Ж9	-15,8±7,0 [#]	Ж7	-1,1±1,5
Ж11	-12,2±8,7	Ж3	-0,6±7,6
Ж10	-9,9±7,7	Ж2	0,4±6,8
Ж5	-9,0±9,8	Ж15	1,1±1,6
Ж6	-8,5±4,9	Ж14	1,9±2,6
Ж8	-7,5±4,6	Ж12	3,9±3,5
Ж16	-5,0±4,0	Ж1	4,9±9,4
Вещества сравнения			
Ондансетрон			-80,1±2,1 [#]
Метоклопрамид			-35,1±0,3 [#]

Примечания:

* - изменение относительно величины серотонининдуцированного спазма (контроля), все соединения исследованы в концентрации 1 мкМ; [#] - отличие относительно показателя контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Даннета).

При этом обращает на себя внимание принадлежность всех наиболее активных соединений (Г8, Г12, Г10, Г21) к одному подклассу N¹-замещенных-имидазо[1,2-а]бензимидазолов и их существенное превосходство над остальными статистически значимо активными соединениями.

3.2.3 Зависимость уровня 5-НТ₃-эффекта от химической структуры и физико-химических свойств изученных соединений

Для выявления более детальной и статистически обоснованной зависимости 5-НТ₃-антагонистического действия конденсированного азола от свойств соединений был проведен комплекс подструктурных и частотных анализов (подробнее см. главы 2.2.4 и 2.2.5), в том числе расширенный подструктурный анализ, в котором были обобщены полученные в настоящем экспериментальном исследовании данные об активности соединений с ранее

описанными показателями активности производных бензимидазола и бензимидазолина [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008].

Расширенный подструктурный анализ влияния гетероциклического ядра конденсированных азолов на выраженность 5-HT₃-антагонистических свойств

Было показано, что наибольший вклад в развитие высокой 5-HT₃-антагонистической активности вносят две подструктуры: N¹-замещенное-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное (Ind 4) и индольное (Ind 3) основания. С другой стороны для пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов и N⁹-замещенных-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов было показано статистически значимое отрицательное влияние на развитие высокого 5-HT₃-антагонистического действия с максимальным уровнем значимости (Ind минус 5).

Для N⁹-замещенных-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного; 2,3-дигидро-N¹-замещенного-бензимидазольного и N¹-замещенного-бензимидазольного общего ядра статистически значимого влияния выявлено не было. Более детально результаты представлены в Приложении Б (Таблица Б. 3).

Таким образом, выявлено, что наиболее значимыми химическими подклассами конденсированных азолов для развития высокого 5-HT₃-антагонистического действия являются индолы и N¹-замещенные-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, в то время как для N⁹-замещенных-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и N¹-замещенных-бензимидазолов статистически значимой положительной, равно как и отрицательной зависимости не наблюдается.

Подструктурный анализ влияния заместителей на уровень 5-HT₃-эффекта среди наиболее значимых химических классов соединений

Учитывая наличие двух выявленных наиболее значимых химических подклассов азолов: бициклических индолов и трициклических N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолов, а также различное расположение заместителей в базовых структурах, подструктурный анализ для каждого их классов проводился отдельно.

При анализе C³- и N¹-заместителей в классе индолов первоначально статистической значимости выявить не удалось, что математически было обусловлено малыми выборками соединений с повторяющимися радикалами (Приложение Б, Таблица Б. 4). Но при анализе повторяемых подструктурных дескрипторов заместителей была выявлена значимая закономерность наличия общего фрагмента, представленного (Z)-1-(R-фенил)-3-R-пент-3-ен-1-оном в положении C³ индольного ядра. Аналогичным способом выявлен общий диэтиламиноэтильный фрагмент в составе N¹-заместителя (Рисунок 13).

Для соединений, относящихся к N¹-замещенным-имидазо[1,2-а]бензимидазолам, было выявлено выраженное влияние R₁- и R₂-заместителей. Наибольшую значимость в развитии высокого 5-HT₃-антагонистического действия оказывали 4-фторфенильный радикал в положении C² (Ind 3). Для еще двух: фенильного и *трет*-бутильного – отмечалась положительная тенденция (Ind 2) во влиянии на указанный эффект. В положении N¹ наиболее существенную положительную роль оказывали пиперидинопропильный (Ind 5) и диэтиламинопропильный (Ind 3) заместители, в то время как для морфолиноэтильного, морфолинопропильного и метильного радикалов отмечалось отрицательное влияние с индексами значимости минус 3 для первого и минус 2 для двух последующих (Приложение Б, Таблица Б. 5).

Для остальных заместителей в положении N¹, C² и C³ имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного ядра статистически значимого влияния на развитие 5-HT₃-антагонистических средств выявлено не было.

Зависимость 5-HT₃-антагонистического действия изученных соединений от их физико-химических свойств

При анализе влияния показателей липофильности (LogP) соединений с N¹-замещенным-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольным «кóром» в целом и их отдельных структурных фрагментов (заместителей в положениях 1, 2 и 3) установлено, что наибольшее влияние на вероятность развития высокого 5-HT₃-антагонистического действия имеет показатель липофильности радикала в N¹-положении (приложение Б, Таблица Б. 6). При этом наибольшее положительное статистически значимое влияние оказывают заместители с диапазоном показателя LogP от 0,74 до 1,17 (Ind 4): диэтиламинопропил, пиперидинопропил и пиперидиноэтил. Существенное отрицательное значение (Ind минус 4 и минус 3) оказывает показатель LogP от минус 0,28 до минус 0,14 (морфолиноэтильный и 2-гидроксиэтильный заместители) и от минус 0,14 до 0,16 (морфолинопропил) соответственно. Менее значимое отрицательное влияние выявлено для R₁-заместителей с диапазоном показателя LogP от 0,16 до 0,45 – метильного, пиперидинопропильного и пиперидиноэтильного (Ind 2).

Исследование влияния показателя молекулярной рефракции на выраженность 5-HT₃-антагонистического эффекта N¹-замещенных-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и их отдельных радикалов не позволило выявить статистически значимых зависимостей, но при этом были показаны положительные и отрицательные тенденции (уровень достоверности P_r от 0,06 до 0,09) влияния молекулярной рефракции R₁-заместителей на изучаемый признак. Так, положительное влияние оказывал показатель молекулярной рефракции MR от 29,21 до менее, чем 39,59; а отрицательное – диапазон MR от 5,0 до 8,46 (более подробно см. приложение Б, Таблица Б. 7).

Для соединений класса индолов ввиду малого количества соединений с повторяемыми радикалами проводить частотные анализы зависимости активности от показателей липофильности и молекулярной рефракции не представлялось целесообразным.

Построение интегрального «скаффолда» для 5-HT₃-антагонистов

Выявленные при частотных анализах закономерности и тенденции совместно с результатами подструктурных анализов позволили сформировать комплекс функционально значимых групп, ответственных за 5-HT₃-антагонистическое действие (Рисунок 13).

В результате обобщения полученных данных установлено, что наибольшую вероятность проявления высокого 5-HT₃-блокирующего действия среди изученных конденсированных азолов обуславливает наличие у соединений имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного или индольного гетероциклического ядра с умеренно липофильным диэтиламинопропильным заместителем в положении N¹ и фенил-замещенным радикалом в положении C² в случае имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного «кóра» либо фенил-замещенной группой в составе C³-радикала индольного ядра на некотором удалении (приблизительно равном 3 углеродным связям) от последнего.

В качестве вариативной части показана возможность наличия пиперидиновой группы в составе N₁-заместителя, а также уменьшения пропильного фрагмента до этильного. В качестве указанного фенил-замещенного фрагмента C²/C³-радикала без существенной потери активности может выступать фторфенил либо метоксифенил. Также не исключается наличие C³-заместителя у имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной базовой структуры, существенную роль которого в рамках данного исследования выявить не удалось.

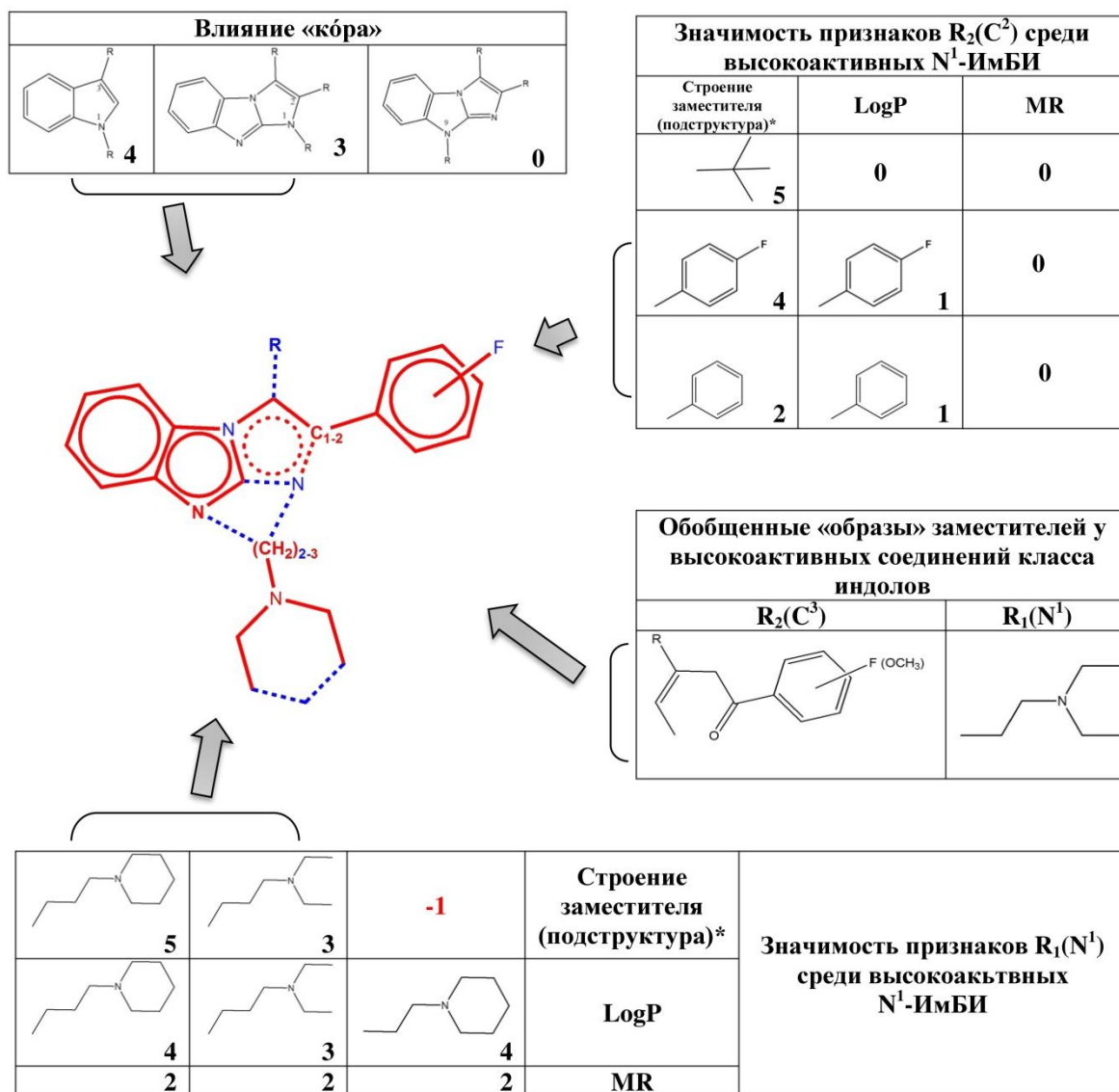


Рисунок 13. Построение интегрального «скаффолда», ответственного за развитие высокого 5-НТ₃-антагонистического действия.

Примечания: цифрами указана значимость соответствующего признака, рассчитанная в результате обобщенного *подструктурного и частотного анализ влияния химического подкласса веществ и основных заместителей.

Таким образом, в результате комплекса проведенных анализов зависимости 5-НТ₃-антагонистического действия изученных конденсированных азола от химических и физико-химических свойств соединений были выявлены новые и расширяющие ранее известные закономерности, а именно наиболее значимое влияние на развитие высокого 5-НТ₃-блокирующего действия индольного либо имидазо[1,2-

а) бензимидазольного ядра молекулы, умерено липофильного фенил-замещенного фрагмента в составе C^2/C^3 -радикала и диэтиламинопропильного заместителя в положении 1 указанных базовых структур.

3.2.4 Определение наиболее перспективного соединения с 5-HT₃-антагонистическими свойствами

На следующем этапе исследования было проведено расширенное дозозависимое изучение *in vitro* наиболее активных среди выявленных в ходе направленного поиска соединений (Г8, Г10, Г12, Г21). Результаты представлены в таблице (Таблица 12).

Таблица 12. Уровень 5-HT₃-антагонистической активности, IC₅₀ и LD₅₀ наиболее активных соединений и препаратов сравнения ондансетрона и метоклопрамида.

Вещество	5-HT ₃ -блокирующее действие (1 мкмоль/л), Δ% ^α (M±m)	IC ₅₀ , моль/л (SD)	LD ₅₀ , мг/кг (SD)
Г8	-85,1±3,4 [#]	$5,9 \times 10^{-7}$ ($4,4 \times 10^{-7}$ - $7,4 \times 10^{-7}$)	27,8 (16,6-39,0)
Г12	-82,8±4,8 [#]	$5,5 \times 10^{-7}$ ($3,5 \times 10^{-7}$ - $7,4 \times 10^{-7}$)	38,9 (29,5-48,3)
Г10	-63,5±6,2 [#]	$7,8 \times 10^{-7}$ ($5,2 \times 10^{-7}$ - $1,1 \times 10^{-6}$)	24,6 (16,6-32,6)
Г21	-46,3±6,3 [#]	$6,2 \times 10^{-6}$ ($5,2 \times 10^{-5}$ - $7,2 \times 10^{-7}$)	...
Ондансетрон	-80,1±2,9 [#]	$6,0 \times 10^{-7}$ ($4,7 \times 10^{-7}$ - $7,3 \times 10^{-7}$)	10,8*
Метоклопрамид	-32,9±2,2	$>1 \times 10^{-4}$	96,0**

Примечания:

^α - изменение относительно контрольного измерения; [#] - отличие от показателя метоклопрамида статистически значимо (p<0,05; критерий Манна-Уитни); SD – доверительный интервал 95%; ... - не изучалось; * - по данным Yakuri [Yakuri L.,1972]; ** - по данным Drugs in Japan [Metoclopramide. URL: <http://www.lookchem.com/Metoclopramide>].

Максимальная 5-HT₃-антисеротониновая активность была выявлена для соединений Г8 и Г12. При этом уровень активности последних в 2,5 раза превосходил эффект метоклопрамида (в концентрации 1 мкМ) и не уступал по величине IC₅₀ действию ондансетрона. Вместе с тем установлено, что для соединения Г12 характерен более высокий показатель острой токсичности LD₅₀, что явилось ключевым фактором для выбора его в качестве вещества-лидера для дальнейших расширенных фармакологических исследований (Рисунок 14).

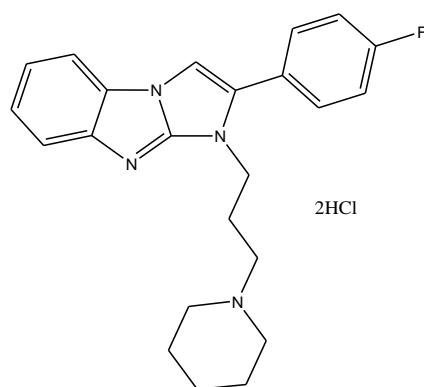


Рисунок 14. Дигидрохлорид 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола (соединение Г12, РУ-1276) – соединение-лидер антагонист 5-HT₃-рецепторов.

Таким образом, в результате направленного информационно-экспериментального консенсусного поиска новых 5-HT₃-антагонистов среди конденсированных азолов было выявлено наиболее перспективное соединение Г12 – дигидрохлорид 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола, существенно превосходящее по активности метоклопрамид, сопоставимое по эффекту, но в 3,5 раза менее токсичное по величине показателя LD₅₀, чем ондансетрон.

На выявленное соединение получен патент РФ № 2438669 (2012).

3.3 Поиск новых 5-НТ₄-агонистов в рядах производных азола

Серотониновые рецепторы четвертого типа (5-НТ₄-рецепторы) имеют широкое распространение в организме, локализуясь как в пределах ЦНС, так и на клетках периферических тканей и органов [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS]. На периферии они модулируют функциональную активность мочевого пузыря, сердца, надпочечников и, особенно, различных отделов желудочно-кишечного тракта, влияя на тонус гладкой мускулатуры кишечника, перистальтику и секрецию электролитов [Yu Y., 2015], принимая, таким образом, непосредственное участие в патогенезе такого распространенного и в то же время трудно поддающегося фармакологической коррекции состояния как синдром раздраженного кишечника (СРК) [Ласу В.Е., 2015]. В настоящее время в практическую медицину внедрен ряд препаратов с 5-НТ₄-серотонинергическим механизмом действия, однако их широкое применение ограничено побочными эффектами и фармакоэкономическими аспектами. В связи с этим актуален поиск новых высокоэффективных и селективных 5-НТ₄-лигандов, на основе которых в дальнейшем возможно создание новых лекарственных препаратов для лечения СРК.

3.3.1 Прогноз вероятности встречаемости 5-НТ₄-агонистов среди новых производных азола с помощью систем PASS и TestSim.

Учитывая впервые проводимый поиск 5-НТ₄-агонистов среди изучаемых подклассов конденсированных азолов и отсутствие данных о 5-НТ₄-активности наиболее близких по структуре к изучаемым соединений, использовать представленную методологию поиска (главы 3.1.1-3.1.2) не представлялось возможным. В этой связи оценку перспективности конденсированных азолов, как источника 5-НТ₄-агонистов, проводили только с помощью двух систем: PASS и TestSim, при этом была использована только

одна эталонная выборка веществ с различными химическими структурами и доказанной активностью по данным IUPHAR [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS].

В результате анализа структурных описаний изучаемых соединений по системе PASS было выявлено, что только 1,5% из 1532 соединений удовлетворяют критерию включения P_a/P_i (Рисунок 15) для 5-HT₄-агонистической активности.



Рисунок 15. Вероятность встречаемости 5-HT₄-активных соединений среди изучаемых представителей конденсированных азолов.

Примечания: предварительный прогноз активности класса конденсированных азолов с применением PASS и ИТ Микрокосм (настройка TestSim) и использованием в качестве эталонов веществ мирового ассортимента с доказанным 5-HT₄-агонистическим действием [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS].

С помощью метода сходства к эталонам в ИТ Микрокосм было выявлено 16,6% соединений, превосходящих пороговый ОКС 0,227. При этом все прогнозируемые соединения оказались в самом низком по значимости диапазоне полученных при автотестировании эталонов ОКС (прогнозная оценка 1 балл).

Таким образом, обобщая результаты прогнозных оценок представителей конденсированных азолов, можно заключить, что для данного химического класса характерна возможность наличия 5-HT₄-агонистической активности. При этом средняя прогнозная частота встречаемости активных соединений с учетом только аналогичных прогнозных подходов в 2 раза ниже, чем для 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-антагонистического действия.

Используя полученные прогнозные оценки, а также руководствуясь эмпирическим подходом к зависимости 5-HT₄-агонистической активности от химической структуры, для экспериментального исследования *in vitro* из 1532 были отобраны 103 вещества.

3.3.2 Экспериментальный поиск соединений с 5-HT₄-агонистической активностью и анализ ее зависимости от свойств соединений в ряду конденсированных азолов

В ходе фармакологического тестирования было выявлено 6 соединений с уровнем 5-HT₄-опосредованного антиспастического эффекта от $31,5 \pm 2,5$ до $13,1 \pm 1,7\%$. При этом наибольшую активность продемонстрировали соединения E107 и E17 (Рисунок 16), уступая по эффекту серотонину. При этом уровень активности вещества сравнения ML10302 составил $45,6 \pm 6,9$. Также было установлено, что выявленные эффекты полностью устранялись предварительным введением 5-HT₄-антагониста SDZ-205.557, что подтверждает 5-HT₄-опосредованный механизм действия выявленных соединений. Более подробно результаты исследования представлены в приложении Б (Таблица Б. 8).

При дальнейшем анализе зависимости наличия 5-HT₄-активности от химической структуры были выявлены закономерности влияния общей базовой структуры (Рисунок 17). При этом, принимая во внимание малое

количество выявленных активных соединений, наиболее статистически обоснованные зависимости были получены для отрицательного влияния на изучаемый признак.

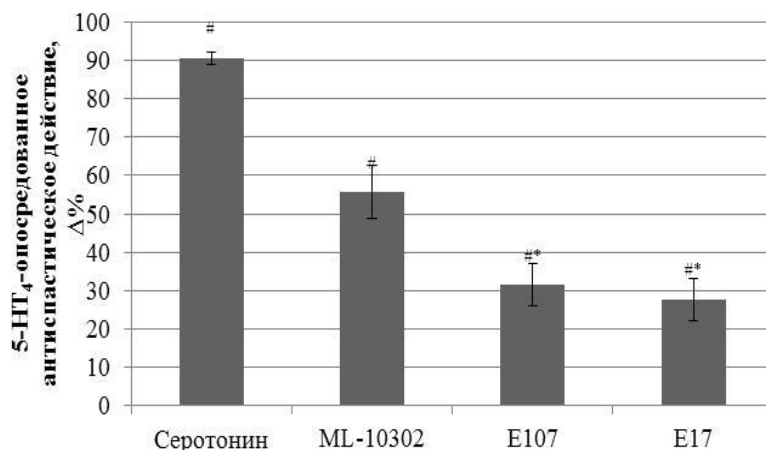


Рисунок 16. Выраженность 5-НТ₄-агонистической активности наиболее активных соединений¹⁴ и веществ сравнения серотонина и ML10302 в концентрации 1 мкМ.

Примечания: отличие относительно показателя [#]контроля и ^{*}серотонина статистически значимо ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ, постобработка тестом Даннета); исследование выполнено *in vitro* на модели карбахолининдуцированного спазма изолированного пищевода крысы, селективность 5-НТ₄-эффекта подтверждалась подавлением последнего 5-НТ₄-антагонистом SDZ-205.557.

Установлено, что отрицательный вклад в развитие 5-НТ₄-агонистического действия среди изученных конденсированных азолов вносят N¹-замещенное-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное и N¹,C³-замещенное индольное ядро, а также N⁹- и N¹-замещенное-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазольные и N¹-бензимидазольные гетероциклические основы, тогда как положительное влияние оказывает N⁹-замещенная-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная базовая структура (Ind 5).

¹⁴ Уровни 5-НТ₄-активности всех изученных соединений представлены в приложении Б (Таблица Б. 8).

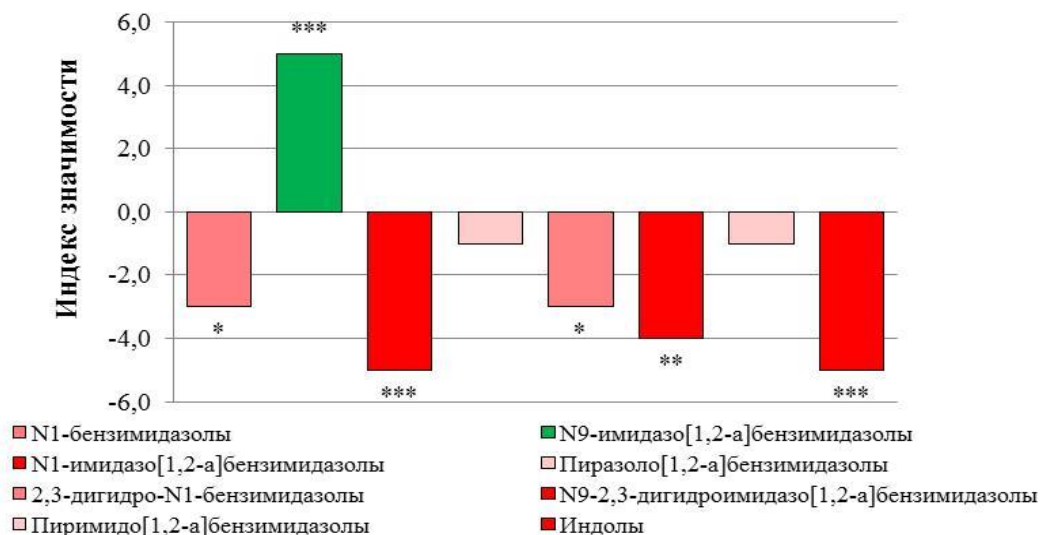


Рисунок 17. Зависимость наличия¹⁵ 5-НТ₄-агонистической активности от структурного подкласса изученных производных азола (результаты подструктурного анализа).

Примечания: статистическая значимость признака * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; высокий положительный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности развития 5-НТ₄-агонистического эффекта; высокий отрицательный индекс значимости свидетельствует о высокой вероятности отсутствия эффекта; низкий индекс значимости свидетельствуют о незначимой структурно-функциональной зависимости.

При более детальном подструктурном анализе заместителей среди активных и неактивных соединений было выявлено, что наибольшее значение (Ind 3) имеет сочетание таких признаков как N⁹-замещенное-имидазо[1,2-а]бензимидазольное ядро молекулы и *α*-нафтильный заместитель в положении С². Интересно, что отрицательная тенденция (Ind минус 2) была показана для 4-метоксифенильного заместителя в том же положении, что является обратной закономерностью для ранее выявленных 5-НТ_{2А}- и 5-НТ₃-антагонистических активностей. Остальные зависимости не имели статистически обоснованного характера (см. Приложение Б, Таблица Б. 9).

¹⁵ Наличие статистически значимого ($p < 0,05$) 5-НТ₄-агонистического эффекта.

Таблица 13. Подструктурный анализ влияния типа заместителя на развитие 5-НТ₄-антагонистической активности изученных производных азола

№ п/п	Признак	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
C²(R₂)						
1	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃ ; 4-метоксифенил; п-метоксифенил	0,23	0,77	1,46	7,2×10 ⁻²	-2
2	-α-C ₁₀ H ₇ ; α-нафтил	0,79	0,21	1,66	4,8×10⁻²	3

Примечания:

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

На заключительном этапе для математического обоснования прямого рецепторного механизма действия наиболее активных соединений (E107, E17) был выполнен виртуальный 3D-докинг структур в активный центр 5-НТ₄-рецептора [Mialet J., 2000] и рассчитана энергия взаимодействия (Рисунок 18).

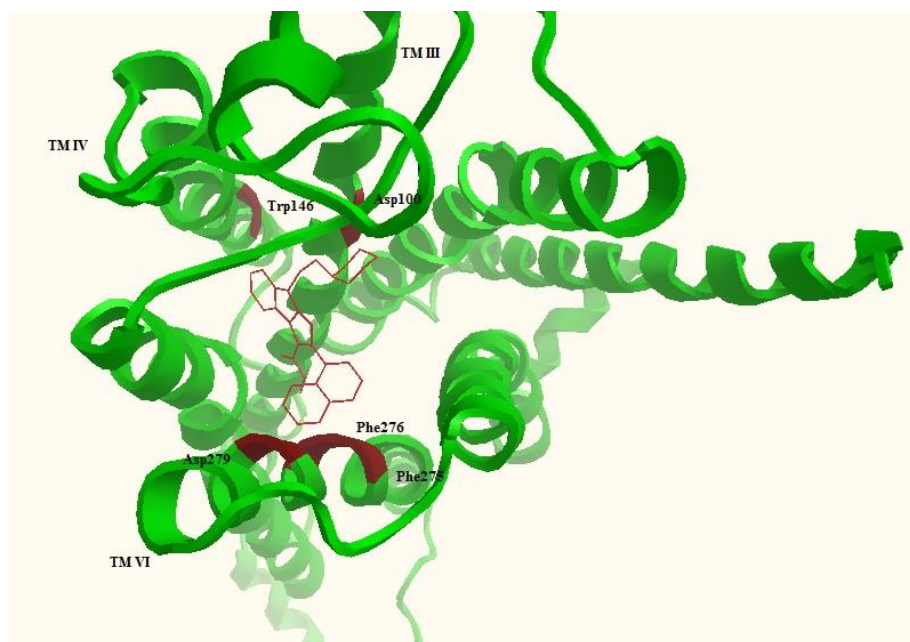


Рисунок 18. Модель сайта связывания 5-НТ₄-рецептора с докированной молекулой соединения E107 *in silico*.

В результате минимальная энергия связи для соединений E107 и E17 составила минус 10 и минус 9 ккал/моль соответственно, приближаясь к таковой для веществ сравнения ML10302 и RS57639 (минимальная энергия связи 10,2 ккал/моль). Это позволяет предполагать возможность прямого взаимодействия указанных соединений с активным центром рецептора, описанным для известных 5-HT₄-лигандов.

Обобщая данные, полученные в ходе изучения 5-HT₄-агонистической активности новых конденсированных азолов, можно сделать заключение о целесообразности дальнейшего поиска прямых 5-HT₄-агонистов среди указанного класса соединений. При этом наиболее перспективными являются N⁹-замещенные-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы. Выявленные соединения с умеренным 5-HT₄-агонистическим действием, а также статистически значимые структурно-функциональные закономерности могут представлять основу для дальнейшей модификации химической структуры молекул при разработке и направленном поиске новых высокоактивных веществ с указанным видом действия.

3.4 Заключение

Проведенные исследования по изучению серотонинергических, а именно 5-HT_{2A}-, 5HT₃- и 5-HT₄-опосредованных, эффектов расширенного класса конденсированных азолов позволили выявить новые и существенно расширить ранее известные фундаментальные представления о химико-биологических свойствах указанного класса веществ.

Была выявлена статистически обоснованная зависимость между наличием высокой 5-HT_{2A}-антагонистической активности и химическим строением и физико-химическими свойствами различных подклассов азолов: преимущественное влияние на развитие высокого 5-HT_{2A}-антагонистического действия оказывает имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное базовое ядро, а также липофильные диметиламиноэтильный фрагмент N⁹-

заместителя и 4-метоксифенильная группа в C^2 -положении. Комбинация данных фрагментов формирует обобщенную химическую структуру – «скаффолд», ответственную за развитие высокой 2A-антисеротониновой активности. Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются C^2 -4-этоксифенил; N^9 -диэтиламиноэтил, а также пропильный фрагмент вместо этильного в составе указанных вариантов N^9 -заместителей.

Была выявлена статистически значимая базовая зависимость 5-НТ₃-антагонистической активности конденсированных азолов от свойств соединений: наибольшее значение в развитии 5-НТ₃-блокирующих свойств имеет N^1, C^3 -замещенная индольная и N^1, C^2 -замещенная-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная базовая структура ядра молекулы совместно с фенил-замещенным фрагментом в составе $C^{2/3}$ -заместителей и липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N^1 -положении. Вариативными компонентами являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в составе N^1 -заместителя, а также фторфенил и метоксифенил в качестве фенил-замещенного дескриптора в положении $C^{2/3}$.

Установлено преимущественное влияние C^2, N^9 -замещенного-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного гетероциклического основания на развитие 5-НТ₄-агонистических свойств. В качестве наиболее значимого C^2 -радикала выявлен *a*-нафтильный заместитель.

В ходе проведенного исследования также были получены данные, имеющие прикладное значение для экспериментальной фармакологии и медицины, а также смежных дисциплин.

Была разработана комплексная информационно-экспериментальная методология эффективного направленного поиска новых 5-НТ_{2A/3}-антагонистов. В качестве основы методологии предложена новая комбинация методов с использованием низкопороговых критериев включения по системам PASS, TestSim ИТ Микрокосм, а также данным ретроспективного подструктурного анализа о влиянии базовой химической структуры класса на вероятность проявления изучаемого вида активности с последующим

обобщением данных с помощью полного взвешенного консенсусного подхода. Эффективность предложенной методологии поиска в рядах конденсированных азолов в 2-4 раза превосходит составляющие ее методы прогноза, использованные по отдельности.

Практическое применение предложенного методологического подхода в ходе данного исследования позволило выявить новое высокоактивное соединение с 5-НТ_{2A}-антагонистическими свойствами – динитрат 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола (E75, РУ-476), превосходящее по уровню активности препарат сравнения ципрогептадин и соответствующее кетансерину; а также новое соединение с 5-НТ₃-антагонистическими свойствами – дигидрохлорид 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола (Г12, РУ-1276) существенно превосходящее по активности метоклопрамид, сопоставимое по эффекту, но в 3,5 раза менее токсичное по величине показателя LD₅₀, чем ондансетрон. Кроме того, выявленные соединения превосходят по уровню активности ранее изученные производные бензимидазола и бензимидазолина [Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Черников М.В., 2008].

Таким образом, обобщая данные о серотонинергических свойствах многочисленных представителей конденсированных азолов, изученных в ходе первого этапа настоящего исследования, а также статистически обоснованном положительном влиянии структурных элементов последних на уровень 5-НТ_{2A/3/4}-активности, расширенный класс конденсированных азолов можно позиционировать как новый перспективный источник соединений с высокой серотонинергической активностью. При этом выявленные высокоактивные соединения E75 и Г12 являются перспективными для стартового доклинического изучения их фармакологических свойств как кандидаты в лекарственные вещества с 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-антисеротониновыми эффектами.

4 ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО 5-HT_{2A}-АНТАГОНИСТА АВАЗОЛА

Стратегия исследования фармакодинамических свойств соединения E75 (дальнейшее рабочее название «Авазол») предполагала несколько этапов¹⁶: более детальное изучение и/или уточнение возможных механизмов действия вещества и последующее изучение предполагаемой специфической фармакологической активности с учетом выявленных механизмов.

4.1 Механизм действия авазола

Исследования были выполнены с использованием прямых и косвенных методов *in vitro* в диапазоне концентраций вещества 0,001-100 мкМ в зависимости от чувствительности методики и целесообразности расширенного изучения «концентрация-эффект», а также *in vivo* с помощью методов нейрофармакологического анализа. Более детально материалы и методы представлены в главе 2.

4.1.1 Влияние на различные рецепторные системы *in vitro*

На первом этапе была изучена способность прямого конкурентного связывания авазола с активным центром 5-HT_{2A}-рецептора (Рисунок 19). В ходе радиолигандного исследования наблюдалось статистически значимое вытеснение [³H]кетансерина изучаемым соединением в минимальной концентрации 10 нМ из мест связывания с 5-HT_{2A}-рецепторами фронтальной коры крыс. При этом величина pIC₅₀ составила 6,52±0,05.

¹⁶ Результаты исследования основных токсикологических характеристик авазола и эметазола (Г12) как этапов изучения фармакодинамики соединений изложены отдельно в главе 6.

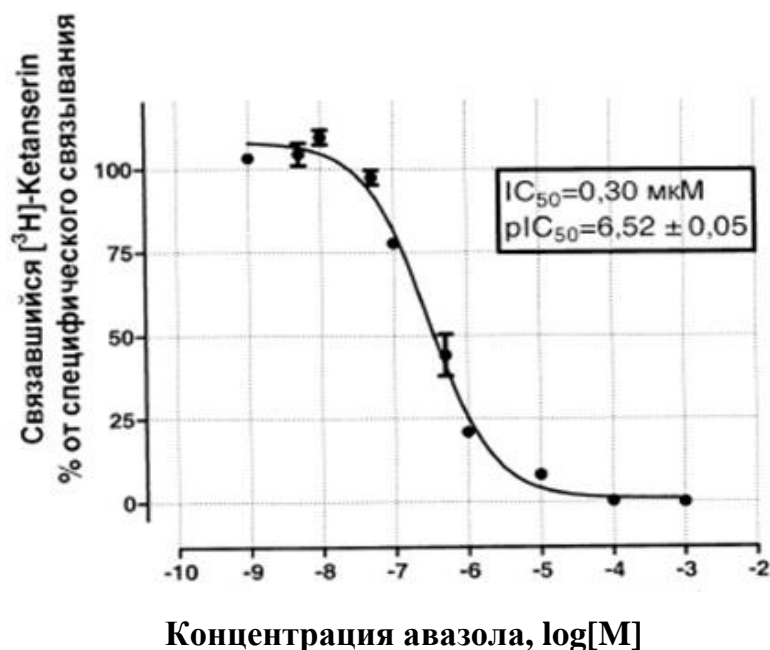


Рисунок 19. Характеристики связывания¹⁷ авазола с 5-НТ_{2А}-рецепторами фронтальной коры крыс.

Данные представлены в виде $M \pm m$; IC_{50} – концентрация полумаксимального вытеснения.

Полученные результаты, совместно с данными о 5-НТ_{2А}-опосредованном антисеротониновом действии у авазола (см. глава 3), позволяют утверждать о наличии у него прямого рецепторного конкурентного 5-НТ_{2А}-антагонистического действия.

Для понимания селективности действия авазола в отношении изучаемых в настоящем исследовании видов серотонинергической активности в дальнейшем были уточнены его 5-НТ₃- и 5-НТ₄-эффекты в расширенном виде.

В результате было установлено, что для авазола не характерно влияние на 5-НТ₃-рецепторы: в ходе исследования не отмечалось изменения

¹⁷ Исследование выполнено в лаборатории радиоизотопных методов исследования ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» под руководством д.м.н., проф. Г.И Ковалева, за что выражаем глубокую благодарность.

выраженности 5-НТ₃-зависимого гладкомышечного сокращения при инкубации с изучаемым веществом (Рисунок 20).

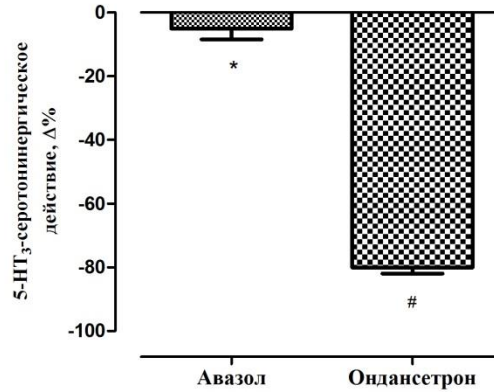


Рисунок 20. Изменение 5-НТ₃-опосредованного спазмогенного эффекта серотонина при введении авазола и ондансетрона *in vitro*.

Использован метод серотонин-индуцированного сокращения изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки, концентрация соединений 1 мкМ; данные представлены в виде $M \pm m$ относительно эффекта серотонина; * - изменение статистически значимо относительно показателей ондансетрона; # - изменение значимо относительно показателей контроля ($p < 0,05$; критерий Мана-Уитни).

Также не отмечалось влияние авазола на 5-НТ₄-зависимый миорелаксирующий эффект в тесте карбохолинового мышечного спазма (Рисунок 21).

На следующем этапе было изучено взаимодействие авазола с представителями одного из наиболее близких к серотониновым рецепторам семейств, а именно с рецепторами к следовым аминокислотам 1 и 5 типа (TAAR1 и TAAR5)¹⁸.

Было установлено что, авазол не влияет на функциональное состояние TAAR1 человека, предварительно экспрессированных в линии

¹⁸ Исследование выполнялось автором в отделе Neuroscience and Brain Technologies Итальянского института технологий, Италия, в рамках гранта фонда Centro di Cultura Scientifica "Alessandro Volta" под руководством проф. Р.Р. Гайнетдинова.

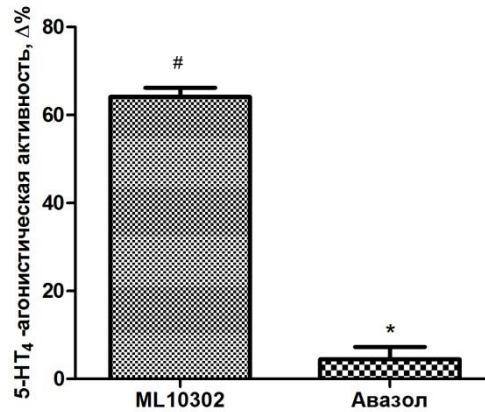


Рисунок 21. 5-HT₄-опосредованное действие авазола и ML10302 *in vitro*.

Использован метод 5-HT₄-зависимого изменения карбахолиндуцированного спазма изолированного пищевода крысы, концентрация соединений 10 мкМ; данные представлены в виде изменения ($M \pm m$) относительно выраженности спазма; селективность 5-HT₄-эффекта подтверждалась подавлением последнего 5-HT₄-антагонистом SDZ-205.557; * - изменение статистически значимо относительно показателей ML10302; # - изменение значимо относительно показателей контроля ($p < 0,05$; критерий Мана-Уитни).

клеток НЕК-293Т. В то же время было выявлено, что для авазола характерно взаимодействие с рецепторами к следовым аминокислотам 5 типа.

Установлено, что авазол способен понижать уровень внутриклеточного цАМФ в клетках, экспрессирующих связанные преимущественно с G_s-зависимым пострецепторным сигнальным каскадом TAAR5, после их стимуляции агонистом 3-метиламином. При этом подобный эффект не наблюдается в контрольной нетрансфицированной популяции клеток линии НЕК-293Т, что исключает прямое пострецепторное влияние авазола на синтез цАМФ, и подтверждает антагонистическое взаимодействие изучаемого соединения с TAAR5 (Таблица 14).

При более детальном изучении свойств авазола в широком диапазоне концентраций было установлено дозозависимое изменение эффекта 3-метиламина с формированием классического сдвига кривой и уровнем $pIC_{50} = 4,85$ (Рисунок 22).

Таблица 14. Подавление ТААР5-опосредованных эффектов 3-метиламина при введении авазола (10мкМ) *in vitro*.

Вещество	Отношение BRET
Контроль	1,118±0,0016 ^{#Δ}
Авазол	1,112±0,0023 ^{#Δ}
3-метиламин	1,005±0,0021 ^{*Δ}
Авазол + 3-метиламин	1,056±0,0024 ^{*#}

Примечания:

оценивалось динамическое изменение уровня α АМФ, индуцированное 3-метиламином; линия клеток НЕК-293Т, экспрессирующая α АМФ-активируемый биосенсор (EPAC – exchange protein activated by cAMP) и рецептор к следовым аминокислотам 5 типа (ТААР5); * - изменение статистически значимо относительно показателей контроля; # - изменение значимо относительно показателя 3-метиламина; Δ - изменение значимо относительно показателя комбинации Авазол + 3-Метиламин ($p < 0,05$; ANOVA для повторяемых измерений, постобработка с помощью критерия Тьюки).

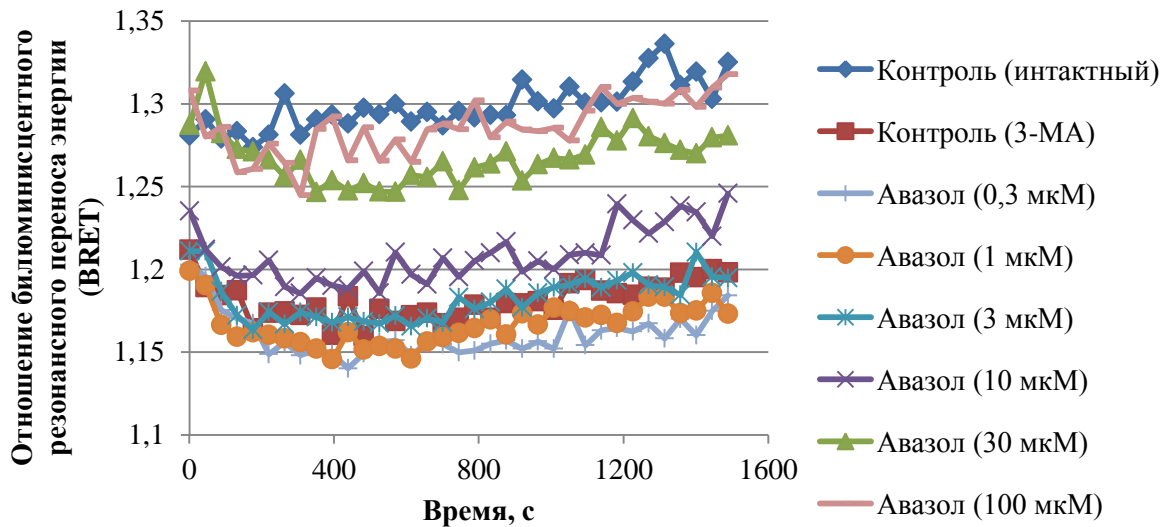


Рисунок 22. Взаимодействие авазола с рецепторами к следовым аминокислотам 5 типа в широком диапазоне концентраций.

Динамическое изменение уровня α АМФ, индуцированное 3-метиламином (3-МА). Линия клеток НЕК-293Т, экспрессирующая α АМФ-активируемый биосенсор (EPAC – exchange protein activated by cAMP) и рецептор к следовым аминокислотам 5 типа (ТААР5). Увеличение внутриклеточного уровня α АМФ приводит к уменьшению отношения билюминесцентного резонансного переноса энергии.

Используя аналогичный методический подход было изучено возможное взаимодействие авазола с дофаминовыми D_2 -рецепторами, а также персистирующими в НЕК-293Т-линии клеток β_2 -адренорецепторами. При этом было показано отсутствие влияния изучаемого вещества (в концентрации 10 мкМ) на показатель уровня цАМФ в клетках с соответствующей экспрессией рецепторов в отличие от статистически значимого эффекта веществ сравнения квинпирола и изопротеренола. Полученные данные позволяют исключить прямое рецепторное взаимодействие авазола с D_2 - и β_2 -рецепторами.

В заключение для определения селективности возможных сосудистых и/или тромбоцитарных эффектов, характерных для 5-НТ_{2A}-антагонистов, было изучено М-холинергическое, ангиотензиновое-1, P2Y₁-ергическое действие авазола, а также его влияние на контрактуру, вызванную током ионов кальция через потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы. При этом было установлено отсутствие влияния авазола на эффекты, характерные для воздействия на указанные мишени. Более подробно данные представлены в Приложении Б (Таблица Б. 10, Таблица Б. 11, Таблица Б. 12, Таблица Б. 13).

Обобщая изложенное можно заключить, что проведенный *in vitro* анализ позволил предварительно охарактеризовать селективность механизма действия авазола (Таблица 15).

У изучаемого соединения было подтверждено наличие конкурентного 5-НТ_{2A}-антагонистического действия, а также выявлено прямое TAAR5-антагонистическое влияние в высоких концентрациях. Вместе с тем были исключены некоторые рецепторные (5-НТ_{3/4}-, TAAR1, D₂-, β_2 -, М-, P2Y₁-ергические) эффекты, а также влияние на потенциал-зависимые кальциевые каналы в диапазоне эффективных концентраций, характерных для выявленной 5-НТ_{2A}-антагонистической активности.

Таблица 15. Взаимодействие авазола с различными мишенями *in vitro*.

Вид активности	Наличие взаимодействия
5-НТ _{2А} -серотонинергическая активность (связывание, эффект)	↓ IC ₅₀ =0,3 мкМ
5-НТ ₃ -серотонинергическая активность (эффект)	отсутствует
5-НТ ₄ - серотонинергическая активность (эффект)	отсутствует
β ₂ -адренорецепторы (связывание, эффект)	отсутствует
D ₂ -рецепторы (связывание, эффект)	отсутствует
M-холинергическая активность (эффект)	отсутствует
AT ₁ -ангиотензиновая активность (эффект)	отсутствует
TAAR5 (связывание, эффект)	↓ IC ₅₀ =14 мкМ
TAAR1 (связывание, эффект)	отсутствует
P2Y ₁ -пуринергическая активность (эффект)	отсутствует
Влияние на кальциевый ионный ток	отсутствует

Примечания:

«-» - отсутствие взаимодействия; ↓ - антагонистическая активность.

4.1.2 Взаимодействие с основными агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем in vivo

В результате дополнительного исследования взаимодействия изучаемого вещества с классическими анализаторами основных нейромедиаторных систем установлено, что для авазола характерно достоверное изменение эффектов 5-гидрокси-L-триптофана (Рисунок 23).

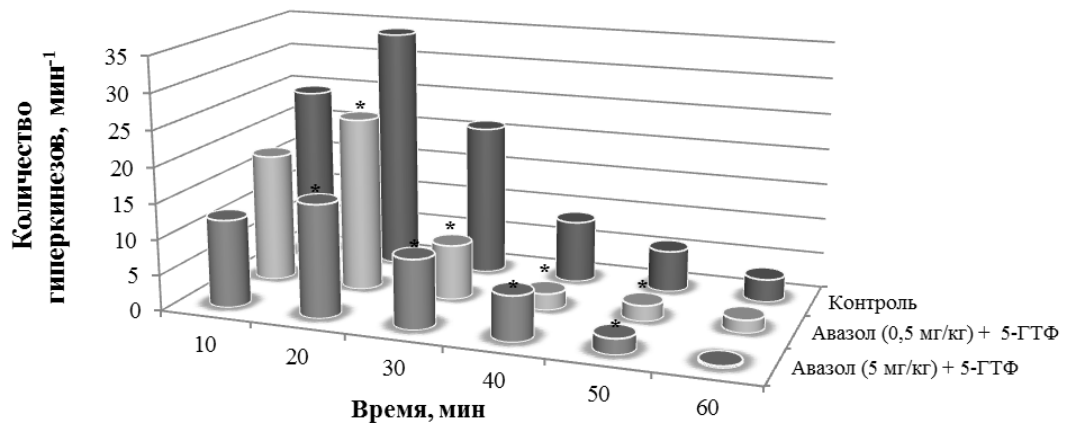


Рисунок 23. Влияние авазола на эффекты 5-гидрокситриптофана.

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

У животных, получавших авазол как в средних, так и в высоких эффективных дозах (0,5 и 5 мг/кг), отмечалось выраженное 2-3 кратное уменьшение количества проявлений специфических гиперкинезов «встряхивания головы» относительно показателей группы контроля. Полученные результаты подтверждают наличие у изучаемого соединения антисеротонинового действия *in vivo*. А учитывая ранее показанный [Arnt J., 1984; Nielsen С.К., 1998] основной 5-НТ_{2/2A}-зависимый механизм развития указанного гиперкинеза, а также характерное 5-НТ_{2A}-антагонистическое действие для авазола, выявленный эффект можно считать закономерным и отражающим основной механизм действия изучаемого вещества в условиях целостного организма.

В результате проведения фармакологического анализа также было установлено, что авазол способен уменьшать эффекты пикротоксина. Отмечалось достоверное увеличение латентного периода развития тремора и судорожных проявлений, а также уменьшение количества судорожных припадков (Таблица 16) в сравнении с показателями контрольной группы.

Выявленные свойства позволяют предполагать наличие у авазола ГАМК_A-миметического компонента в механизме действия.

Таблица 16. Влияние авазола на эффекты пикротоксина ($M \pm m$).

Группа	Латентный период развития тремора, мин	Латентный период развития судорог, мин	Количество судорожных приступов
Контроль (р-р NaCl 0,9% + пикротоксин)	5,4±0,65	9,8±0,49	5,2±0,9
Авазол (0,5 мг/кг) + пикротоксин	7,8±0,47 ^{Δ#}	13,6±0,87 ^Δ	1,5±0,3*
Авазол (5 мг/кг) + пикротоксин	11,9±0,68 ^Δ	13,1±0,82 ^Δ	1,6±0,4*

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до пикротоксина (2,5 мг/кг); ^Δ – изменения относительно группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; нормальное распределение, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса); [#] – изменения относительно группы, получавшей авазол в дозе 5,0 мг/кг, статистически значимы ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса); * – изменения относительно группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; ненормальное распределение, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой критерием Даннета).

Также было установлено, что изучаемое соединение способно изменять длительность и выраженность стереотипного поведения грызунов, вызванное фенамином. При этом наблюдалось усиление эффектов последнего в группе, получавшей более высокую (5 мг/кг) дозу авазола (Таблица 17).

Интересно, что сам авазол не способен вызывать стереотипное поведение у животных даже в десятикратно большей дозе 50 мг/кг¹⁹.

¹⁹ Результаты исследования представлены в главе 6.

Таблица 17. Изменение эффектов фенамина при введении авазола ($M \pm m$).

Группа	Латентный период развития беспокойства, мин	Длительность стереотипии, мин	Выраженность стереотипии, баллы								
			60 мин	120 мин	240 мин	360 мин	480 мин	600 мин	720 мин	840 мин	960 мин
Контроль (р-р NaCl 0,9% + фенамин)	7,3±0,4	380,0±21,9	2,7±0,2	2,3±0,2	2,3±0,4	1,0±0,3	0	0	0	0	0
Авазол (0,5 мг/кг) + фенамин	6,0±0,3	803,0±24,7*	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0*	3,0±0,0*	2,8±0,2*	2,3±0,3*	0,7±0,4	0
Авазол (5 мг/кг) + фенамин	4,8±0,3*	895,3±20,6*	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0*	3,0±0,0*	3,0±0,0*	2,8±0,2*	2,3±0,5*	0

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до фенамина (5 мг/кг); выраженность стереотипии оценивалась в балльной системе (0 – отсутствие стереотипии; 1 – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 – постоянная и интенсивная стереотипия); * – данные достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета).

Вместе с тем, для изучаемого вещества не было характерным значимое влияние на стереотипию, вызванную апоморфином (Приложение Б Таблица Б. 14), а также влияние на каталептогенное действие галоперидола (Приложение Б Таблица Б. 15). Авазол не изменял гипотермических эффектов клофелина и резерпина (Приложение Б Таблица Б. 19, Таблица Б. 20), а также не оказывал потенцирующего действия L-диоксифенилаланина (Приложение Б Таблица Б. 18).

Полученные данные могут свидетельствовать об отсутствии в спектре активности исследуемого соединения выраженного влияния на адренергическую нейротрансмиссию, а также об исключении MAO-ингибирующего влияния. При этом отсутствие статистически значимого взаимодействия с апоморфином и галоперидолом позволяет предполагать, что эффект потенцирования действия фенамина не связан с прямым влиянием на дофаминовые D₂-рецепторы, о чем также свидетельствуют данные об отсутствии у авазола D₂-зависимого изменения уровня внутриклеточного цАМФ (глава 4.1.1). Возможно, этот феномен связан с усилением влияния фенамина на транспортеры обратного захвата дофамина в присутствии авазола, что ранее отмечалось для некоторых селективных 5-HT_{2A}-антагонистов, в частности ритансерина [Pehek E.A., 1997; Ruiu S., 2000]. Также не исключено крайне малоизученное к настоящему времени возможное TAAR5-опосредованное влияние, характерное для авазола, на эффекты фенамина.

В дальнейшем было изучено взаимодействие исследуемого вещества с ареколином и никотином. При этом установлено отсутствие его влияния на длительность и выраженность тремора, а также судорожных припадков M- и N-холиномиметиков. Это может свидетельствовать об отсутствии действия авазола на холинергическую нейротрансмиссию. Более подробно результаты представлены в приложении Б (Таблица Б. 16, Таблица Б. 17).

Обобщая изложенное (Таблица 18), можно заключить, что в результате проведенного фармакологического анализа *in vivo* было подтверждено

Таблица 18. Взаимодействие авазола с агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo*.

Регистрируемый показатель	Доза, мг/кг	
	0,5	5
<i>Холинергическая система</i>		
Никотиновый тремор, никотиновые судороги	отсутствует	отсутствует
Ареколиновый тремор	отсутствует	отсутствует
<i>Адренергическая система</i>		
Клофелиновая гипотермия	отсутствует	отсутствует
Резерпиновая гипотермия, блефароптоз	отсутствует	отсутствует
<i>Дофаминергическая система</i>		
Галоперидоловая каталепсия	отсутствует	отсутствует
Апоморфиновая гипотермия	отсутствует	отсутствует
Апоморфиновая стереотипия	отсутствует	0/↑
Апоморфиновый «зевательный» гиперкинез	отсутствует	отсутствует
Фенаминовая стереотипия	↑	↑
Стереотипия, вызванная L-ДОФА	отсутствует	отсутствует
<i>Серотонинергическая система</i>		
5-ГТФ гиперкинез	↓	↓
<i>ГАМК-ергическая система</i>		
Пикротоксиновые судороги	↓	↓

Примечания:

↑ - усиление эффекта; ↓ - ослабление эффекта; 0/↑ - слабо выраженное усиление эффекта; авазол изучен при внутривенном введении.

антагонистическое влияние авазола на серотонинергическую систему, а также дополнительно выявлена способность уменьшать проявления ГАМК_A-антагониста пикротоксина. Это может свидетельствовать о ГАМК-миметическом эффекте изучаемого соединения и перспективе исследования его психотропного действия на моделях экспериментального анксиогенеза.

Выявленное усиление эффекта фенамина при отсутствии значимого изменения действия основных лигандов дофаминовых рецепторов по всей вероятности свидетельствует об отсутствии выраженного влияния на

дофаминовую нейротрансмиссию, но вместе с тем требует более детального изучения нейротоксикологического профиля авазола.

4.2 Специфические фармакологические свойства авазола в условиях моделирования патологии *in vitro* и *in vivo*

Основные направления исследования специфических фармакодинамических свойств выявленного 5-HT_{2A}-антагониста авазола были определены исходя из базовых фармакологических свойств, характерных для известных 5-HT_{2/2A}-блокаторов (кетансерин, ципрогептадин, ритансерин и др.). В этой связи представлялось целесообразным изучить влияние соединения на скорость мозгового кровотока, системные гемодинамические показатели, антитромбоцитарную активность.

Вместе с тем в настоящем исследовании также были изучены анальгетические, анксиолитические свойства исходя из выявленных аспектов механизма действия авазола, а также актуальных представлений о потенциальной клинической перспективности 5-HT_{2/2A}-антагонистов [Quesseveur G., 2012; Benyamina A., 2012; Kato K., 2015; Clinard C.T., 2015].

4.2.1 Влияние на цереброваскулярный кровоток

Известно, что основную роль в регуляции тонуса сосудов головного мозга играют моноаминергические системы. При этом существенный компонент регуляторных влияний приходится на серотонинергическую систему, нарушение функций которой лежит в основе ряда цереброваскулярных патологий [Мирзоян Р.С., 2006; Амелин А.В., 2011]. Попадая в системный кровоток, серотонин активизирует многочисленные прямые и рефлекторные реакции. В первую фазу происходит активация 5-HT₃-рецепторов парасимпатических волокон и запускается так называемый

рефлекс фон Безольда-Яриша, приводящий к выраженной брадикардии и падению системного артериального давления [Александрин В.В., 2005; Carlos M. V., 2007]. Во вторую фазу активация 5-HT₂-рецепторов вызывает спазм сосудов, что, однако, оказывает намного меньший вклад в величину системного артериального давления и маскируется парасимпатическими эффектами.

С другой стороны, такой периферический спазм совместно с понижением артериального давления существенно изменяет гемодинамику в сосудах головного мозга. Эти особенности патогенеза серотонинопосредованных нарушений мозгового кровообращения предположительно определяют способность 5-HT_{2A}-антагонистов устранять констрикторные эффекты серотонина, оказываемые на церебральные сосуды.

Влияние авазола на скорость кровотока в проекции средней мозговой артерии в норме и при серотониновой нагрузке

В исследовании была изучена способность авазола устранять выраженное падение скорости мозгового кровотока, вызванное внутривенным введением серотонина (материалы и методы представлены в главе 2).

Было установлено, что авазол с высокой эффективностью дозозависимо уменьшает действие серотонина, подавляя падение линейной скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии более чем на 62,7% и 67,8% ($p < 0,05$) в дозах 0,5 и 5 мг/кг (внутривенно), и соответствует по уровню эффекта препарату сравнения с наиболее близким механизмом действия – ципрогептадину – в эквимолярных дозах (Рисунок 24).

При дальнейшем уменьшении дозы для авазола, равно как и для ципрогептадина, антисеротониновый эффект уменьшался вплоть до статистически незначимых 8,5-12,2% в дозе 0,05 мг/кг.

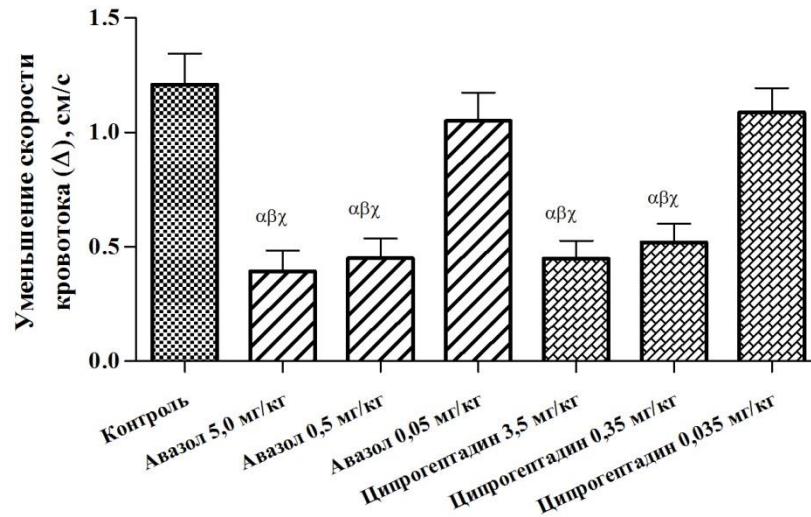


Рисунок 24. Влияние авазола и ципрогептадина в диапазоне доз 0,05-5 мг/кг* на серотонининдуцированное снижение скорости кровотока в бассейне средней мозговой артерии крыс.

Примечания: * - вещества изучены в эквимоллярных дозах при внутривенном введении; данные представлены в виде $M \pm m$; отличия от группы α контроля, β группы, получавшей авазол (0,05 мг/кг); χ группы, получавшей ципрогептадин (0,035 мг/кг) статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна).

Для наиболее детального изучения эффективности авазола было проведено расширенное сравнение его действия с рядом основных селективных и неселективных 5-НТ_{2/2A}-антагонистов аналогичным способом. При этом было установлено, что эффект исследуемого соединения статистически значимо не уступает всем изученным веществам сравнения, а именно кетансерину, ритансерину, метисергиду (Таблица 19).

Обращает на себя внимание неодинаковое влияние изученных веществ на кровотоки в средней мозговой артерии в условиях отсутствия серотониновой нагрузки (Таблица 20). Установлено, что для кетансерина и ципрогептадина в эквимоллярных дозах характерно статистически значимое уменьшение исходной скорости кровотока на 0,5-0,6 см/с, что составляет в среднем 15-18%. По всей вероятности, этот эффект связан с

Таблица 19. Влияние авазола, кетансерина, ципрогептадина, ритансерина и метисергида на вызванное серотонином изменение скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии ($M \pm m$).

Группа	Изменение скорости кровотока, $\Delta\%$
Авазол (0,5 мг/кг [*])	-62,7±7,1 [#]
Кетансерин (0,55 мг/кг [*])	-57,0±6,7 [#]
Ципрогептадин (0,35 мг/кг [*])	-59,0±6,2 [#]
Ритансерин (0,5 мг/кг [*])	-57,9±4,4 [#]
Метисергид (0,45 мг/кг [*])	-65,1±13,3 [#]

Примечание:

* - авазол, кетансерин, ритансерин, метисергид и ципрогептадин изучены в эквимоллярных дозах при внутривенном введении; # – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Таблица 20. Влияние авазола, кетансерина, ципрогептадина, метисергида и ритансерина на скорость кровотока в области средней мозговой артерии крыс ($M \pm m$).

Группа (дозировка)	Изменение линейной скорости кровотока, см/с	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	-0,13±0,06	
Авазол	(5 мг/кг)	0,14±0,05
	(0,5 мг/кг) [*]	-0,31±0,07
	(0,05 мг/кг)	-0,15±0,16
Кетансерин (0,55 мг/кг) [*]	-0,60±0,14 [#]	
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	-0,57±0,09 [#]	
Метисергид (0,45 мг/кг) [*]	-0,22±0,23	
Ритансерин (0,5 мг/кг) [*]	-0,23±0,08	

Примечания:

соединения вводились внутривенно; * - дозы эквимоллярны средней терапевтической для ципрогептадина; # - изменение относительно исходного показателя статистически значимо ($p < 0,05$; тест Вилкоксона).

неселективным α_1 - и H_1 -опосредованным вазодилатирующим влиянием указанных веществ.

В то же время для авазола такого действия не отмечалось: скорость линейного кровотока значимо не отличалась от показателей контрольной группы животных ни в одной из исследованных доз.

В заключение была изучена эффективность авазола в условиях данного теста при пероральном способе введения. При этом также было установлено, что авазол дозозависимо ($ID_{50}=12$ мг/кг) устраняет влияние серотонина на линейную скорость кровотока (Рисунок 25).

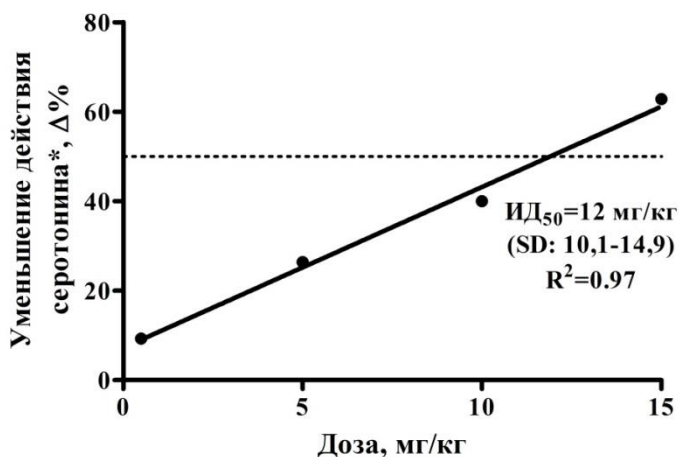


Рисунок 25. Средняя ингибирующая доза (ID_{50}) авазола, подавляющая при пероральном введении серотонининдуцированное падение скорости мозгового кровотока.

Примечания: * - изменение серотонининдуцированного снижения линейной скорости кровотока в области средней мозговой артерии крысы; линейный регрессионный анализ, SD – 95% доверительный интервал.

Величина ID_{50} для ципрогептадина при аналогичном пути введения составила 14,2 мг/кг, что с учетом молекулярного веса приблизительно в 1,5-2 раза больше, чем у изучаемого соединения.

Изменение скорости кровотока во внутренней сонной артерии при введении авазола в условиях серотониновой нагрузки

Выявленные антисеротониновые эффекты авазола были подтверждены при исследовании скорости кровотока во внутренней сонной артерии крыс (Таблица 21).

Установлено, что авазол в 3,3 раза подавляет серотонининдуцированное изменение линейной скорости кровотока ($p < 0,05$), соответствуя уровню эффективности кетансерина. При этом для ципрогептадина было характерно менее выраженное влияние на эффекты серотонина – отмечалось подавления скорости кровотока в 1,9 раза ($p > 0,05$).

Таблица 21. Влияние авазола, ципрогептадина, кетансерина и ритансерина на скорость кровотока во внутренней сонной артерии крыс при серотониновой нагрузке 20 мкг/кг ($M \pm m$).

Группа	Изменение линейной скорости кровотока при серотониновой нагрузке, см/с
Контроль (р-р NaCl 0.9%)	-4,3±0,4
Авазол (0,5 мг/кг)	-1,3±0,3*
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	-2,3±0,5
Кетансерин (0,55 мг/кг)	-1,9±0,3*
Ритансерин (0,5 мг/кг)	-1,7±0,2*

Примечания:

соединения вводились внутривенно; дозы веществ эквимолярны средней терапевтической для ципрогептадина; * - изменение статистически значимо по отношению к группе контроля ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

При этом также отмечалось статистически значимое отрицательное влияние кетансерина в дозе 0,55 мг/кг на исходный уровень скорости кровотока: через 20 минут после внутривенного введения последнего скорость кровотока снижалась на 25-30% (Таблица 22).

Таблица 22. Влияние авазола, ципрогептадина, кетансерина и ритансерина на скорость кровотока во внутренней сонной артерии крыс ($M \pm m$).

Группа	Изменение линейной скорости кровотока, см/с
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	+0,1±0,51
Авазол (0,5 мг/кг)	-1,8±0,93
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	-1,3±0,23
Кетансерин (0,55 мг/кг)	-3,1±0,31 ^Δ
Ритансерин (0,5 мг/кг)	-0,7±0,63

Примечания:

соединения вводились внутривенно; дозы веществ эквимоллярны средней терапевтической для ципрогептадина; ^Δ - изменение статистически значимо по отношению к исходному состоянию ($p < 0,05$; тест Вилкоксона).

Для остальных веществ сравнения: ритансерина, ципрогептадина, а также изучаемого вещества авазола в данном тесте подобный эффект носил невыраженный и статистически недостоверный характер.

Антисеротониновое действие авазола в условиях двусторонней окклюзии общих сонных артерий

Известно, что регуляторное влияние на мозговой кровоток многих катехоламинов (адреналина, норадреналина, дофамина и др.) неодинаково в условиях нормы и дефицита кислорода. При ишемии головного мозга наблюдается уменьшение регуляторного резерва для большинства из них. В тоже время для серотонина, в отличие от остальных основных катехоламинов, напротив, характерно усиление сосудистого действия [Топчян А.В., 1998].

Для дальнейшего изучения возможности авазола подавлять сосудистые эффекты серотонина, было исследовано его влияние на скорость мозгового кровообращения в условиях субтотальной ишемии головного мозга крыс (более детально метод представлен в главе 2.3.4).

Было установлено, что авазол статистически значимо ($p < 0,05$) на 66,7% уменьшает падение линейной скорости кровотока в бассейне средней мозговой артерии, вызванный серотонином, наряду с ритансерин и кетансерин. При этом действие препарата сравнения ципрогептадина в эквимолярной дозе не превышает уровня 46,8% (Таблица 23).

Таблица 23. Изменение серотонининдуцированного снижения скорости кровотока в области средней мозговой артерии у крыс с билатеральной окклюзией общих сонных артерий при введении авазола и 5-НТ_{2A}-антагонистов ($M \pm m$).

Группа	Изменение скорости кровотока при серотониновой нагрузке (Δ), см/сек
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	-1,11 \pm 0,09
Авазол (0,5 мг/кг)	-0,37 \pm 0,10*
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	-0,59 \pm 0,18*
Кетансерин (0,55 мг/кг)	-0,34 \pm 0,07*
Ритансерин (0,5 мг/кг)	-0,46 \pm 0,04*

Примечания: вещества изучены в эквимолярных дозах при внутривенном введении; * – изменение статистически значимо по отношению к группе контроля ($p < 0,05$; нормальное распределение данных; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Интересным также представляется факт практически полного отсутствия влияния исследованных 5-НТ_{2A}-антагонистов на исходную скорость кровотока в проекции средней мозговой артерии у ишемизированных животных без моделирования серотонинового спазма. Отсутствие различий во всех группах, в том числе получавших кетансерин и ципрогептадин, подтверждает уменьшение значимости Н₁-гистаминергической и α_1 -адренергической регуляции при ишемии головного мозга и косвенно подтверждают состоятельность моделирования патологии в проведенном исследовании (Таблица 24).

Таблица 24. Влияние авазола, ципрогептадина, кетансерина и ритансерина на скорость кровотока в области средней мозговой артерии у крыс с билатеральной окклюзией общих сонных артерий ($M \pm m$).

Группа	Изменение скорости кровотока (Δ), см/с
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	+0,11±0,12
Авазол (0,5 мг/кг)	+0,11±0,08
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	+0,05±0,05
Кетансерин (0,55 мг/кг)	+0,04±0,09
Ритансерин (0,5 мг/кг)	+0,09±0,12

Примечания: вещества изучены в эквимольных дозах при внутривенном введении; статистически значимых отличий между группами не выявлено (нормальное распределение данных; однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0,05$).

Заключение

Обобщая полученные в результате исследования данные, можно выделить, что авазол в дозах 0,5 мг/кг и 5 мг/кг (внутривенно) у крыс приводит к устранению вызванного серотонином падения скорости кровообращения как в бассейне средней мозговой артерии (на 62-67%), так и в бассейне внутренней сонной артерии (в 3,3 раза). При этом по эффективности авазол превосходит препарат сравнения ципрогептадин более чем на 20-30% по влиянию на кровоток в сонных артериях и соответствует действию кетансерина и ритансерина.

Аналогичные свойства выявлены для изучаемого вещества и в условиях моделирования серотониновой нагрузки при субтотальной ишемии головного мозга у крыс.

Кроме того установлено, что для авазола не характерно нарушение скорости церебрального кровотока у интактных животных в отличие от кетансерина и ципрогептадина, что, по всей вероятности, обусловлено влиянием последних на α_1 - и H_1 -рецепторы.

Выявленные отличия могут свидетельствовать о более селективном серотонин-опосредованном сосудистом действии авазола и имеют

немаловажное значение для позиционирования разрабатываемого соединения не только биологически активного вещества для устранения серотонинового спазма при начавшемся приступе мигрени, но и для профилактики его развития в межприступном периоде при хронической форме заболевания.

В заключение для обоснования соответствия между предполагаемым позиционированием изучаемого вещества и необходимым пути его применения были получены данные, подтверждающие эффективность действия авазола при пероральном введении, с величиной ИД₅₀ практически в 1,5-2 раза меньшей, в пересчете на молекулярный вес, чем для ципрогептадина.

4.2.2 Влияние на системный кровоток, антиагрегантные, вязкостные и тромбогенные свойства крови

В продолжение исследования были дополнительно изучены фармакологические свойства авазола, способные детализировать представление о его влиянии на системную гемодинамику, вязкость крови, агрегацию тромбоцитов, а также антитромбогенный потенциал.

Влияние авазола на системное артериальное давление и хронотропизм сердца в норме и при серотониновой нагрузке

Было установлено, что при введении авазола интактным крысам в эффективной дозе 0,5 мг/кг (внутривенно) показатели системного артериального давления оставались стабильными на протяжении всего периода наблюдения. Уровень систолического и диастолического давления в магистральных сосудах не отличался от показателей группы контроля (Таблица 25, Таблица 26).

Таблица 25. Влияние авазола, ципрогептадина и кетансерина на уровень систолического артериального давления у интактных животных и в условиях серотониновой нагрузки 20 мкг/кг ($M \pm m$).

Группа	Исходный уровень САД, мм рт. ст.	Уровень САД после введения соединения, мм рт. ст.	Уровень САД при серотониновой нагрузке, мм рт. ст.
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	106,5±1,7	106,5±1,7	77,7±2,1 [#]
Авазол (0,5 мг/кг)	101,9±3,3	107,1±5,9	74,2±5,4 [#]
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	107,9±1,5	94,1±4,7	73,3±6,6
Кетансерин (0,55 мг/кг)	105,7±2,1	83,5±0,6 ^{*'}	67,1±0,7 ^{#x}

Примечания: САД – систолическое артериальное давление; вещества изучены в эквимолярных дозах при внутривенном введении; ^x - изменение значимо по отношению к группе контроля ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Ньюмана-Кеулса); ['] – изменение значимо по отношению к исходному уровню САД (критерий Вилкоксона, $p < 0,05$); [#] – изменение значимо по отношению к соответствующему уровню САД после введения вещества (критерий Вилкоксона, $p < 0,05$).

При введении ципрогептадина в эквимолярном количестве отмечалось незначительное снижение на 10-12% уровня систолического (САД) и на 14-15% диастолического артериального давления (ДАД). Более выражено артериальное давление снижалось при введении кетансерина: через 20 минут после введения последнего уровень САД и ДАД снижался на 20-21%, статистически значимо отличаясь от исходного и от значений в группе контроля ($p < 0,05$).

При моделировании серотониновой нагрузки в группе контроля отмечалось снижение САД и ДАД после внутривенного введения серотонина на 27-32% с последующим восстановлением в среднем в течение 5-6 мин. Подобное действие связано с системным влиянием серотонина, в том числе на 5-HT₃-опосредованную активацию рефлекса фон Безольда-Яриша.

Таблица 26. Влияние авазола, ципрогептадина и кетансерина на уровень диастолического артериального давления у интактных животных и в условиях серотониновой нагрузки 20 мкг/кг ($M \pm m$).

Группа	Исходный уровень ДАД, мм рт. ст.	Уровень ДАД после введения соединения, мм рт. ст.	Уровень ДАД при серотониновой нагрузке, мм рт. ст.
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	88,5±1,6	87,3±2,2	59,5±2,9 [×]
Авазол (0,5 мг/кг)	86,7±4,9	86,2±5,7	59,8±3,1 [×]
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	85,1±2,7	73,1±3,4 [*]	45,6±1,6 [×]
Кетансерин (0,55 мг/кг)	83,0±2,3	66,6±1,7 ^{*#}	53,2±2,5 [×]

Примечания: ДАД – диастолическое артериальное давление; вещества изучены в эквимоллярных дозах при внутривенном введении; * - изменение значимо по отношению к группе контроля ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Ньюмана-Кеулса); [×] - изменение значимо по отношению к уровню ДАД до введения серотонина (критерий Вилкоксона, $p < 0,05$); # - по отношению к соответствующему исходному уровню ДАД (критерий Вилкоксона, $p < 0,05$).

В группе, получавшей кетансерин, такое действие серотонина на САД было более выражено: пиковое падение систолического артериального давления статистически значимо отличалось от показателей группы контроля, достигая уровня $67,1 \pm 0,7$ мм рт. ст. Для группы, получавшей ципрогептадин, отмечалось более выраженное падение ДАД. В то же время для авазола такого усиления гипотензивного действия выявлено не было.

При исследовании хронотропного действия для всех изученных соединений было отмечено уменьшение выраженности развивающейся при серотониновой нагрузке брадикардии. При этом в группах, получавших авазол и кетансерин, уменьшение эффекта серотонина (брадикардии) было более выражено и составило (Δ) 32 ± 9 и 48 ± 13 мин⁻¹, в то время как в группе контроля и группе, получавшей ципрогептадин, изменения (Δ) составили 135 ± 21 и 89 ± 16 мин⁻¹, соответственно (Рисунок 26).

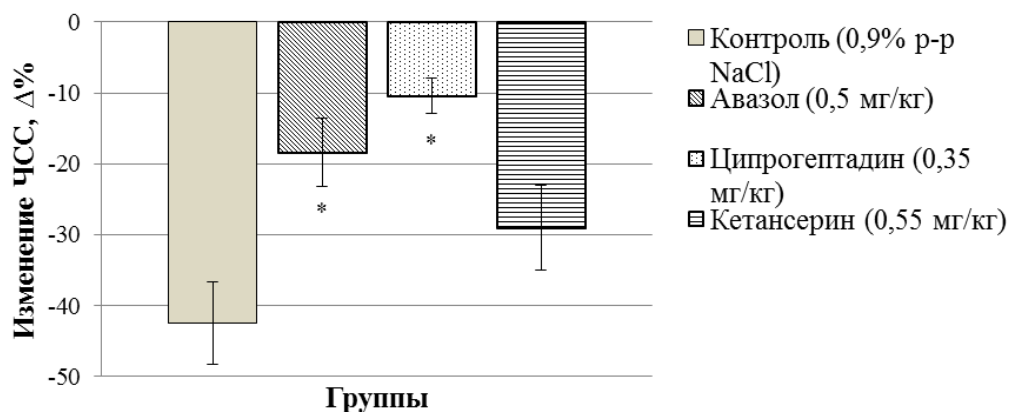


Рисунок 26. Влияние авазола, кетансерина и ципрогептадина на хронотропный эффект серотонина у крыс.

Ось ординат: изменение ЧСС, индуцированное серотонином (20 мкг/кг, внутривенно) относительно исходного ($\Delta\%$) значения. Данные представлены в виде $M \pm m$. * - отличие от группы контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

При изучении хронотропного ответа у интактных животных установлено, что ни авазол ($ЧСС = 289,5 \pm 9,3 \text{ мин}^{-1}$; 0,5 мг/кг), ни вещества сравнения (ципрогептадин: $ЧСС = 303,9 \pm 7,7 \text{ мин}^{-1}$; кетансерин: $ЧСС = 263,0 \pm 15,2 \text{ мин}^{-1}$) в аналогичных дозах не оказывали выраженного влияния на ЧСС после внутривенного введения и статистически значимо не отличались от измерений в контрольной группе ($ЧСС = 303,9 \pm 7,7 \text{ мин}^{-1}$).

Антиагрегантные свойства авазола in vitro

В ходе исследования *in vitro* (более детально метод представлен в главе 2.3.5) было установлено выраженное влияние изучаемого соединения на агрегационную способность тромбоцитов (Таблица 27).

Таблица 27. Влияние авазола на АДФ-, коллаген-, адреналин - и серотонин - индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика в сравнении с ципрогептадином, кетансерином и кислотой ацетилсалициловой ($M \pm m$).

Группа	Изменение агрегации тромбоцитов, вызванной различными индукторами, $\Delta\%^\Delta$			
	<i>АДФ</i> (5 мкМ)	<i>Коллаген</i> (50 мкг/мл)	<i>Адреналин</i> (10 мкМ)	<i>Серотонин</i> (1 мкМ)
Авазол	-21,3±2,0 ^{#Δ}	-30,8±2,8 ^{#α}	-25,6±2,9 [#]	-94,3±1,3 ^{#Δα}
Ципрогептадин	-3,7±0,5 ^α	-11,6±1,1 ^{#α}	-19,7±3,5 [#]	-68,5±2,6 ^{#α}
Кетансерин	-16,2±3,4 ^{#αβ}	-14,3±2,8 ^{#α}	-17,3±3,0 ^{#α}	-93,8±2,1 ^{#Δα}
Кислота ацетилсалициловая (100 мкМ)	-31,4±5,8 ^{#Δ}	-54,9±10,9 ^{#Δ}	-68,4±12,1 [#]	-37,8±13,0 ^{#Δ}

Примечания:

авазол, ципрогептадин и кетансерин изучены в эквимолярной концентрации, демонстрирующей выраженное антисеротониновое действие 1 мкМ; кислота ацетилсалициловая изучена в среднеэффективной концентрации; изменения относительно [#]контрольных измерений, показателей ^Δципрогептадина, ^αкислоты ацетилсалициловой, статистически значимы (нормальное распределение, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Инкубация тромбоцитов с авазолом приводила к умеренному (на 21,3±2,0%) подавлению агрегации, вызванной АДФ, значимо превосходя по уровню эффект ципрогептадина ($p < 0,05$). Сходная тенденция прослеживалась и в отношении кетансерина в данном тесте, а также при использовании адреналина и коллагена в качестве индукторов агрегации. В то же время эффекты всех изученных веществ уступали действию классического антиагреганта кислоте ацетилсалициловой в средней эффективной дозе.

Более выраженный ответ для изучаемых веществ был получен при использовании серотонина в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. Так, для авазола был выявлен наибольший антиагрегантный эффект (минус 94,3±1,3%), сопоставимый лишь с действием кетансерина. При этом по уровню активности изучаемое вещество статистически значимо ($p < 0,05$)

превосходило эффекты как ципрогептадина, так и кислоты ацетилсалициловой в 1,4 и 2,5 раза соответственно.

Влияние авазола на вязкость крови in vitro

Влияние авазола на вязкость крови проводили с использованием нормализованных по гематокриту образцов в условиях инкубации с исследуемыми веществами *in vitro* (см. главу 2.3.5).

В результате было установлено, что авазол не вызывает изменение вязкостных параметров крови. При этом как для изучаемого вещества, так и для ципрогептадина и кетансерина, не отмечалось статистически значимого изменения регистрируемых показателей относительно контрольных образцов вне зависимости от моделируемой скорости кровотока в сосудах различного калибра (Рисунок 27).



Рисунок 27. Влияние авазола на вязкостные характеристики крови кроликов *in vitro* в сравнении с ципрогептадином и кетансерином.

Примечания: соединения изучены в эквимольной концентрации 1 мкМ. Данные представлены в виде $M \pm m$; статистически значимых отличий между группами не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса).

Антитромботические свойства авазола при моделировании тромбозов в общей сонной артерии

На последнем этапе были изучены тромбогенные свойства авазола в условиях экспериментального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III), и тромбоза вызванного действием постоянного электрического тока (см. глава 2.3.5).

Было установлено, что авазол, равно как и кетансерин, статистически значимо не влияют на длительность сохранности кровотока при моделировании тромбозов (Приложение Б: Таблица Б. 21, Таблица Б. 22). При этом тиклопидин, клопидогрель, P2Y₁-антагонист SBT119 приводили к статистически значимой пролонгации времени окклюзии сосуда, подверженного воздействию факторов тромбогенеза.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного изучения системной гемодинамики у крыс было установлено, что авазол в отличие от кетансерина и ципрогептадина в эффективной дозе 0,5 мг/кг (внутривенно) не влияет на уровень систолического и диастолического артериального давления, а также на хронотропизм сердца в нормальных условиях (Таблица 28). Для ципрогептадина и для кетансерина было подтверждено наличие ранее известного гипотензивного действия, связанного с α_1 - и H₁-антагонистическим влиянием.

В условиях серотониновой нагрузки авазол уменьшает выраженность серотонининдуцированной брадикардии, по уровню эффекта сопоставимо с кетансерином и в 2 раза превосходя действие ципрогептадина.

Авазол не влияет на выраженность системного гипотензивного действия серотонина, в то время как для ципрогептадина и кетансерина было выявлено усиление эффекта последнего.

Установлено, что авазол, а также выше указанные вещества сравнения не влияют на вязкостные параметры стандартизированной по гематокриту крови *in vitro*.

Также было показано, что авазол эффективно подавляет серотонининдуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* в эффективной концентрации 1 мкМ в равной степени с кетансерином и превосходя эффект ципрогептадина и ацетилсалициловой кислоты в 1,4 и 2,5 раза соответственно. Для изучаемого соединения характерно умеренное антиагрегантное влияние на тромбоциты в условиях АДФ-, адреналин- и коллаген-индуцированной агрегации, уступающее действию кислоты ацетилсалициловой и соответствующее по выраженности кетансерину и ципрогептадину.

В то же время, несмотря на наличие у авазола антиагрегантной активности *in vitro*, для него, равно как и для ципрогептадина и кетансерина, не характерно антитромботическое действие у крыс, что, вероятно, обусловлено отсутствием значимого влияния изученных соединений на преобладающие в условиях экспериментальных тромбозов серотониннезависимые пути тромбогенеза.

Таблица 28. Сравнительное влияние авазола, ципрогептадина и кетансерина на изученные гемодинамические показатели и свойства крови.

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

Примечания:

«0» – отсутствие влияния; «↓» – уменьшение эффекта/параметра; «↑» – увеличение эффекта/параметра.

4.2.3 Анальгетическое действие

Известно, что 5-HT_{2A}-рецепторы участвуют в возникновении ноцицептивного ответа. Ранее было показано, что реализация эффектов трамадола происходит с вовлечением стимуляции серотонинергических антиноцицептивных нейронов, подавляемой кетансерином [Xie H., 2008].

С другой стороны, в ряде исследований получены убедительные доказательства потенцирования *каппа*-компонента анальгетического действия морфина тем же кетансерином [Peiró A.M., 2011]. Это, в свою очередь, подтверждает более ранние данные о вовлеченности проноцицептивных 5-HT_{2A}-рецепторов в развитие тригеминальной и кортикальной цефалгии при экспериментальном моделировании [Supornsilpchai W., 2010].

Известно, что периферические 5-HT_{2A}-рецепторы также принимают непосредственное участие в возбуждении афферентных ноцицептивных волокон. При этом блокада последних 5-HT_{2A}-антагонистами способствует значимому уменьшению болевой чувствительности, в частности в условиях экспериментальной термической [Okamoto K., 2002] и провоспалительной гипералгезии [Huang B.Q., 2015]. Подобные выводы об уменьшении провоспалительной болевой импульсации в патогенезе мигренозного состояния были получены и при использовании разрешенных в Российской Федерации лекарственных препаратов с 5-HT_{2/2A}-антагонистическим действием – ципрогептадина и пизотифена [Амелин А.В., 2011].

Принимая во внимание данные об участии 5-HT_{2A}-рецепторов в формировании процессов гипералгезии, а также влиянии их лигандов на выраженность болевой чувствительности, на следующем этапе настоящего исследования представлялось целесообразным изучить анальгетическое действие авазола в эффективной дозе 0,5 мг/кг в условиях центрального и периферического уровня организации боли (методы изложены в главе 2.3.8).

Влияние авазола на поведение животных в тесте «Горячая пластина»

Было выявлено, что при введении животным авазола значительно увеличивается латентное время первичной реакции (полилизывание лапки) на гипертермический раздражитель (Таблица 29).

Таблица 29. Влияние авазола на латентное время развития характерных болевых поведенческих реакций в тесте «Горячая пластина» в сравнении с ципрогептадином и буторфанолом ($M \pm m$).

Группа	Латентное время полилизывания задней лапки, с	Латентное время подпрыгивания, с
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	12,2±1,6	24,3±1,7
Авазол (0,5 мг/кг)	22,1±2,6 ^{*Δ}	31,0±3,6
Ципрогептадин (0,35мг/кг)	13,0±1,9	25,4±2,8
Буторфанол (1 мг/кг)	19,7±1,2 ^{*Δ}	42,8±4,9 ^{*Δ}

Примечания:

авазол и ципрогептадин изучены в эквимолярных дозах, буторфанол – в средней эффективной дозе при внутривенном введении; отличия относительно группы *контроля и группы, получавшей ^Δципрогептадин статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Выраженность данного эффекта авазола была на 39-41% выше, чем у ципрогептадина ($p < 0,05$) и соответствовала анальгетику центрального действия буторфанолу.

В то же время для авазола было характерно незначительное увеличение (в 1,2 раза) латентного времени развития феномена подпрыгивания. При этом в группе, получавшей ципрогептадин, такое действие отсутствовало полностью, а в группе буторфанола этот показатель статистически значимо увеличивался в 2 раза.

*Влияние авазола на показатели теста «Электрическое раздражение
корня хвоста крыс»*

В результате исследования было показано, что при введении авазола наблюдается 2,0-2,5 кратное увеличение порога развития всех трех форм болевых реакций: отдергивания хвоста, вокализации и пролонгированной вокализации в сравнении с таковыми контрольной группы (Таблица 30).

Сходные показатели были зарегистрированы в группе, получавшей буторфанол.

Таблица 30. Влияние авазола на порог болевой реакции в тесте электрической стимуляции корня хвоста в сравнении с эффектами ципрогептадина и буторфанола ($M \pm m$).

Группа	Время	Порог болевой реакции, мВ		
		<i>Отдергивание хвоста</i>	<i>Вокализация</i>	<i>Пролонгированная вокализация</i>
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Исход	0,5±0,06	0,8±0,08	1,1±0,16
	0	0,4±0,06	0,8±0,16	1,1±0,16
	30	0,5±0,12	0,9±0,22	1,2±0,37
	60	0,5±0,08	1,1±0,28	1,4±0,43
	120	0,6±0,14	1,0±0,20	1,3±0,31
Авазол (0,5 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,5±0,06	0,9±0,23	1,2±0,58
	0	0,6±0,13	1,0±0,33	1,3±0,40
	30	1,2±0,10*	2,0±0,33*	3,4±0,64*
	60	1,4±0,14*	2,1±0,32	3,5±0,54*
	120	1,2±0,19	2,1±0,49	3,3±0,64
Ципрогепта- дин (0,35 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,5±0,06	0,9±0,20	1,1±0,39
	0	0,6±0,07	1,0±0,34	1,1±0,36
	30	0,8±0,07	1,5±0,33	1,9±0,33
	60	1,0±0,09*	1,8±0,40	2,1±0,45
	120	1,0±0,25	2,4±0,46	2,0±0,42

Таблица 30 (окончание).

Группа	Время	Порог болевой реакции, мВ		
		<i>Отдергивание хвоста</i>	<i>Вокализация</i>	<i>Пролонгированная вокализация</i>
Буторфанол (1 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,5±0,05	0,8±0,10	1,2±0,18
	0	0,5±0,06	1,1±0,27	1,4±0,33
	30	0,8±0,27	2,7±0,24* [#]	3,2±0,32*
	60	1,0±0,28*	2,8±0,41	3,3±0,38
	120	1,0±0,34	2,9±0,49	3,3±0,50

Примечания:

авазол и ципрогептадин изучены в эквимолярных дозах, буторфанол – в рекомендуемой средней эффективной дозе при внутривбрюшинном введении; отличия относительно группы *контроля и группы, получавшей [#]ципрогептадин, статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ, с посттестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Полученные данные могут свидетельствовать об анальгетической эффективности авазола как в условиях моделирования спинальной, так и супраспинальной боли.

В группе ципрогептадина наиболее четко прослеживалось повышение порога реакции отдергивания хвоста (в 1,7 раза) и кратковременной вокализации (в 2,4 раза), тогда как в отношении длительной вокализации изменения были мало выражены.

Действие авазола в условиях формалиновой гипералгезии

В условиях периферического уровня организации ноцицепции при формалиновой гипералгезии было установлено, что при введении животным авазола в дозе 0,5 мг/кг также уменьшается выраженность болевой реакции, проявляющейся уменьшением характерных «подергиваний лапкой» (Таблица 31).

Таблица 31. Анальгетическое действие авазола в условиях теста формалиновой гипералгезии в сравнении с ципрогептадином и диклофенаком ($M \pm m$).

Группа	Количество подергиваний лапкой	
	Острая фаза (5 мин)	Фаза воспаления (10-59 мин)
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	28,5±3,1	370,0±24,8
Авазол (0,5 мг/кг)	10,3±3,1 ^{*Δ}	139,0±28,9 ^{*Δ}
Ципрогептадин (0,35 мг/кг)	24,7±6,2	313,0±39,3
Диклофенак (10 мг/кг)	12,6±3,3 ^{*Δ}	235,4±26,9 [*]

Примечания:

авазол и ципрогептадин изучены в эквимолярных дозах, диклофенак – в рекомендуемой средней эффективной дозе при внутрибрюшинном введении; отличия относительно группы *контроля и группы, получавшей ^Δципрогептадин статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Отмечалось уменьшение числа фиксируемых болевых реакций как в течение острой фазы формалиновой гипералгезии (на 60-64%), так и фазы воспаления (в 2,5-2,7 раза).

По эффективности действия в первой фазе реакции активность авазола была соизмерима с активностью диклофенака, когда как во второй фазе превосходила последнюю в среднем на 38-40%. При этом действие авазола было в 3-3,5 раза более выраженным ($p < 0,05$), чем у ципрогептадина как в первой, так и во второй фазе ноцицептивного ответа.

Заключение

В результате проведенного исследования с помощью моделирования центральных и периферических механизмов болевых реакций у изучаемого соединения авазола было выявлено выраженное анальгетическое действие.

Было установлено, что для авазола характерно подавление ноцицептивных проявлений при супраспинальном уровне организации

болевой чувствительности (вокализация, пролонгированная вокализация, горячая пластина) равное либо незначительно уступающее действию центрального анальгетика буторфанола и превосходящее эффект ципрогептадина 1,5-2,4 раза.

При моделировании спинального уровня формирования боли (отдергивание хвоста) авазол не уступает по активности буторфанолу и превосходит действие ципрогептадина в 1,7 раза.

В условиях периферического уровня организации боли (формалиновая гипералгезия) изучаемое вещество подавляет характерные ноцицептивные реакции, значимо превосходит по действию ципрогептадин в среднем в 3-3,5 раза, соответствует по уровню эффекту диклофенака в I фазе и на 40% превосходит его во II фазе ноцицептивного ответа.

Выявленные анальгетические свойства дополнительно способствуют более обоснованному позиционированию авазола как соединения-кандидата для дальнейшего доклинического изучения и разработки на его основе биологически активного вещества для лечения мигренозной боли.

4.2.4 Анксиолитическое действие

Известно о влиянии различных типов серотониновых рецепторов на поведение животных и их психоэмоциональное состояние. Для серотониновых рецепторов 1 типа отмечено влияние на проявление агрессии и возникновение депрессивных состояний [Sukoff Rizzo S.J., 2009; Snoeren E.M., 2011; Xu W.J., 2013], 5-HT₄- и 5-HT₅-типы принимают участие в процессах обучения и памяти [Gonzalez R., 2013; Meneses A., 2013]. Для большинства серотониновых рецепторов отмечена возможность влияния на чувство страха и развитие тревоги [Piszczyk L., 2015].

Считается, что кортикальные 5-HT_{2A}-рецепторы непосредственно принимают участие в анксиогенезе [Benyamina A., 2012]. Кроме того, большое значение отводится и 5-HT₂-рецепторам в миндалевидном теле. Так,

было показано, что 5-HT_{2A}-зависимое возбуждение в базолатеральной миндалине хомяков также способствует развитию тревожного поведения [Clinard С.Т., 2015].

В этой связи 5-HT_{2A}-антагонисты все чаще позиционируются как потенциальные психотропные агенты, в том числе для лечения генерализованной тревоги [Mestre Т.А., 2013].

Учитывая данные предпосылки, а также принимая во внимание спектр механизмов действия авазола, на следующем этапе было изучено его влияние на поведенческую активность животных в условиях анксиогенеза.

Влияние авазола на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

После однократного введения крысам авазола отмечались отличия от характерного для группы контроля тревожного поведения в приподнятом крестообразном лабиринте. Так, при введении авазола в дозе 0,5 мг/кг наблюдалось максимальное увеличение количества выходов животных в «открытые рукава», а также времени проведенного в них, что было соизмеримо с действием диазепама в эффективной дозе. Для ципрогептадина такое влияние было не характерным (Таблица 32).

Кроме того, обращает на себя внимание качественный характер поведения крыс из групп, получавших авазол и диазепам. Для животных было характерным заглядывать за края платформы как при нахождении в открытом рукаве, так и при выглядывании из закрытого рукава установки.

При этом в группе животных, получавших авазол в меньшей дозе 0,05 мг/кг, а также в более высокой – 5,0 мг/кг наблюдалось уменьшение всех фиксируемых показателей. В этой связи дальнейшее изучение анксиолитического действия авазола проводили в наиболее эффективной дозе 0,5 мг/кг.

Таблица 32. Влияние авазола в дозах 0,05-5 мг/кг на поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с ципрогептадином* и диазепамом ($M \pm m$).

Группа Показатель	Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Диазепам (1 мг/кг)	Ципрогептадин (0,35 мг/кг*)	Авазол		
				(5,0 мг/кг)	(0,5 мг/кг*)	(0,05 мг/кг)
Число выходов в открытый рукав	0,5±0,2	1,5±0,3 [#]	0,5±0,2	0,7±0,2	1,5±0,3 [#]	0,3±0,2
Количество выглядываний	4,5±0,6	5,5±0,7	4,4±0,4	2,9±0,7	2,4±0,5	6,6±0,8
Количество переходов	1,6±0,3	3,9±0,6 [#]	1,6±0,4	2,0±0,5	3,0±0,7	2,0±0,5
Общее время нахождения в центре, с	8,0±4,2	7,5±2,8	9,9±4,2	8,6±4,0	8,8±3,5	9,0±2,9
Латентный период ухода из центра, с	1,5±0,3	1,6±0,6	1,1±0,1	2,7±1,0	1,1±0,2	2,9±1,7
Время в открытом рукаве, с	7,3±3,5	34,4±5,1 [#]	9,1±4,7	13,4±4,8	28,3±5,0 [#]	1,9±1,2
Число болюсов	0,1±0,1	2,0±0,9	0,1±0,1	0,4±0,3	0,8±0,5	0,0±0,0

Примечания:

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

Изменение поведения животных в тесте «Vogel» при введении авазола

У животных, получавших авазол, достоверно, в 2-2,3 раза по отношению к показателям группы контроля увеличивалось количество попыток утоления жажды в условиях страха перед болезненной электростимуляцией (Таблица 33).

Таблица 33. Влияние авазола, ципрогептадина и диазепама на поведение крыс в тесте «Vogel» ($M \pm m$).

Группа	Регистрируемый параметр
<i>Латентный период подхода к поилке, с</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	41,5±8,9
Диазепам (1 мг/кг)	51,8±7,6
Авазол (0,5 мг/кг [*])	48,6±6,3
Ципрогептадин (0,35 мг/кг [*])	50,1±4,8
<i>Число наказуемых взятий воды</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,1±0,1
Диазепам (1 мг/кг)	2,8±0,3 [#]
Авазол (0,5 мг/кг [*])	2,5±0,3 [#]
Ципрогептадин (0,35 мг/кг [*])	1,0±0,4

Примечания:

* - авазол и ципрогептадин изучены в эквимолярных дозах; все соединения исследованы при внутрибрюшинном введении; [#] – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

При этом уровень активности изучаемого соединения соответствовал действию диазепама. Для ципрогептадина отличие от показателей группы контроля выявлено не было.

Влияние авазола на результаты тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Vogel» при 14 дневном введении

Принимая во внимание полученные стартовые данные о наличии анксиолитического действия у изучаемого соединения в условиях однократного введения, а также основываясь на многочисленных данных об изменении выраженности действия различных психотропных средств, включая анксиолитики, в течение 1-2 недель после начала курса терапии, в дальнейшем было изучено анксиолитическое действие авазола после 14-дневного введения в эффективной дозе 0,5 мг/кг.

При моделировании тревожного поведения в приподнятом крестообразном лабиринте отмечались аналогичные изменения в поведении животных всех групп, как и при однократном введении (Таблица 34).

Наиболее значимо увеличивалось число выходов в «светлые рукава» и длительность пребывания в них у животных из групп, получавших диазепам либо авазол. При этом в ряде случаев отмечалось увеличение общего времени реакции животных на «центральной площадке» в группе, получавшей диазепам, но не исследуемое вещество.

Более выраженные изменения поведения крыс были отмечены после 14-дневного введения веществ в условиях моделирования наказуемого поведения по Vogel (Таблица 35).

Наблюдалось значимое 3 кратное увеличение числа подходов к поилке в группах, получавших авазол и диазепам. При этом также наблюдалась тенденция увеличения данного показателя у животных из группы ципрогептадина, что было не выражено при однократном введении препарата.

Таблица 34. Влияние авазола, ципрогептадина и диазепама на поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 14-дневного введения ($M \pm m$).

Группа Показатель	Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Диазепам (1 мг/кг)	Ципрогептадин (0,35 мг/кг*)	Авазол (0,5 мг/кг*)
Число выходов в открытый рукав	0,1±0,1	1,0±0,3 [#]	0,4±0,2	0,9±0,3 [#]
Количество выглядываний	2,3±0,5	2,7±0,7	3,9±0,7	5,0±0,9 [#]
Количество переходов	2,6±0,5	3,0±0,3	1,0±0,4	3,0±0,5
Общее время нахождения в центре, с	6,7±1,9	10,7±7,6	5,8±1,6	7,7±2,1
Латентный период ухода из центра, с	1,5±0,2	1,4±0,2	2,6±0,6	2,1±0,6
Время в открытом рукаве, с	2,0±1,0	24,4±3,4 [#]	6,6±2,0	28,7±5,0 [#]
Число болюсов	0,1±0,1	0,3±0,2	1,7±0,8	0,2±0,1

Примечания:

* - доза ципрогептадина 0,35 мг/кг эквимолярна дозе 0,5 мг/кг авазола; [#] – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Таблица 35. Влияние авазола, ципрогептадина и диазепама на показатели теста «Vogel» при 14-дневном введении ($M \pm m$).

Группа	Регистрируемый параметр
<i>Латентный период подхода к поилке, с</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	44,2±3,7
Диазепам (1 мг/кг)	51,0±6,5
Авазол (0,5 мг/кг*)	50,2±7,1
Ципрогептадин (0,35 мг/кг*)	49,3±5,2
<i>Число наказуемых взятий воды</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,1±0,2
Диазепам (1 мг/кг)	3,1±0,2 [#]
Авазол (0,5 мг/кг*)	2,9±0,2 [#]
Ципрогептадин (0,35 мг/кг*)	2,1±0,2

Примечания:

* - авазол и ципрогептадин изучены в эквимолярных дозах; [#] – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Заключение

Проведенные исследования позволили выявить у авазола свойственное для анксиолитиков влияние на поведенческие реакции у животных.

Было установлено, что для авазола характерно уменьшение выраженности тревожного поведения как в условиях конфликтного (тест Vogel), так и неконфликтного (приподнятый крестообразный лабиринт)²⁰ анксиогенеза сопоставимое с диазепамом. Было показано, что выраженность анксиолитического действия авазола сохраняется при 14-дневном курсе введения вещества, превосходя при этом эффект ципрогептадина.

Выявленные свойства дополняют представления о спектре фармакологического действия авазола и расширяют предполагаемые области применения биологически активного вещества, разрабатываемого на его основе.

²⁰ Дополнительно данные о влиянии авазола на поведение животных в тесте «открытое поле» представлены в главе 6.

5 ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭМЕТАЗОЛА - НОВОГО 5-HT₃-АНТАГОНИСТА

При изучении фармакодинамических свойств соединения Г12 (дальнейшее рабочее название «Эметазол») на первом этапе проводилось уточнение возможных аспектов механизма действия вещества, на последующих – исследование наиболее вероятных фармакологических эффектов в условиях экспериментальной патологии у животных.

5.1 Детализация механизма действия эметазола

5.1.1 Влияние на различные рецепторные системы *in vitro*

В результате исследования установлено, что для эметазола не характерны свойства лигандов 5-HT_{2A}- и 5-HT₄-рецепторов как в концентрации 1 мкМ (Таблица 5, Таблица 11), так и в концентрации 10 мкМ (Таблица 36). При этом отмечалось как отсутствие влияния изучаемого

Таблица 36. 5-HT_{2A}- и 5-HT₄-опосредованное действие эметазола в тест-системах *in vitro*.

Вещество (концентрация)	5-HT _{2A} - серотонинергическая активность, Δ% (M±m)	5-HT ₄ -агонистическая активность, Δ% (M±m)
Эметазол (10 мкМ)	-9,3±5,2 ^Δ	0,0±0,3 [*]
Ципрогептадин (10 мкМ)	-73,4±3,0 [#]	...
ML10302 (10 мкМ)	...	64,1±2,10 [#]

Примечания: использованы методы 5-HT₄-зависимого изменения спазма изолированного пищевода крысы и 5-HT_{2A}-зависимой активации тромбоцитов кролика; «...» – не изучалось; отличие от показателей ^{*}ML10302, ^Δципрогептадина, [#]контроля статистически значимо (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

соединения на 5-HT_{2A}-зависимую активацию тромбоцитов, так и отсутствие 5-HT₄-опосредованного, спазмолитического эффекта, характерного для 5-HT₄-агониста ML10302.

Вместе с тем для изучаемого вещества отмечается способность подавлять ацетилхолининдуцированный гладкомышечный спазм изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки, в диапазоне высоких концентраций (10-100 мкМ). При этом величина pIC₅₀ равнялась 4,5 (Рисунок 28). Выявленный эффект позволяет судить о наличии слабовыраженного М-холиноблокирующего действия у эметазола.

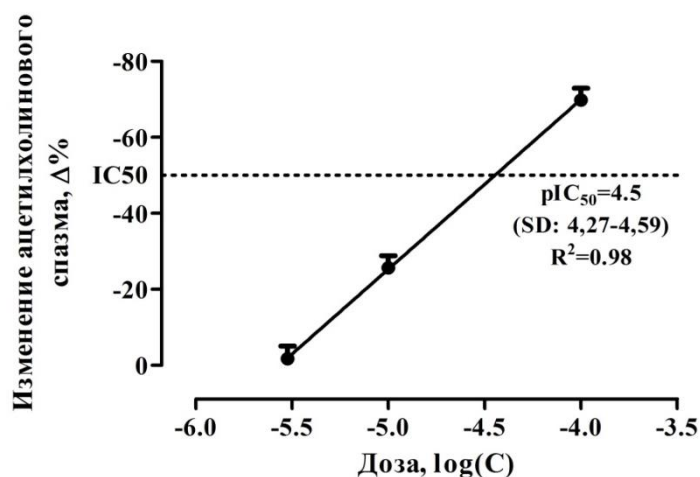


Рисунок 28. Влияние эметазола на выраженность ацетилхолинового спазма изолированной подвздошной кишки морской свинки.

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$; использован линейный регрессионный анализ; SD – 95% доверительный интервал.

Эметазол статистически значимо ($p < 0,05$) не изменял уровень внутриклеточной α АМФ в тестах с клетками линии НЕК-239Т, экспрессирующими β_2 -адренорецепторы, а также не влиял на эффекты изопротеренола, что может свидетельствовать об отсутствии как β_2 -адренергического, так и прямого пострецепторного действия (Рисунок 29).

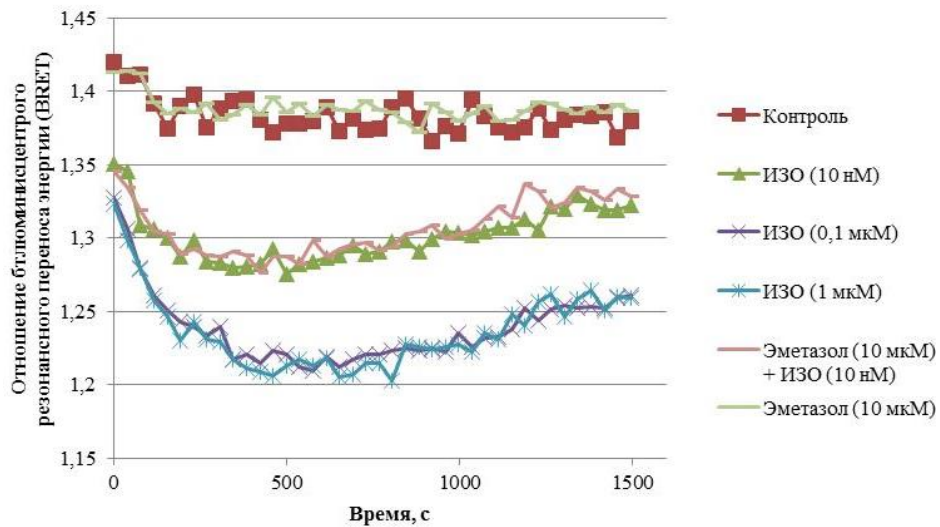


Рисунок 29. Взаимодействие эметазола с β_2 -адренорецепторами клеток линии НЕК-293Т.

Динамическое изменение уровня α АМФ, вызванное изопротеринолом (ИЗО) и/или эметазолом. Линия клеток НЕК-293Т, экспрессирующая α АМФ-активируемый биосенсор (EPAC – exchange protein activated by cAMP) и β_2 -адренорецептор (wild-тип). Увеличение внутриклеточного уровня α АМФ приводит к уменьшению отношения биолюминесцентного резонансного переноса энергии. На рисунке: эметазол не изменяет уровень α АМФ и не изменяет эффект изопротеренола.

Аналогичная ситуация наблюдалась при взаимодействии изучаемого вещества с трансфицированными колониями клеток, экспрессирующими на поверхности D_2 -рецепторы (Рисунок 30), TAAR1 или TAAR5 (Таблица 37). Полученные данные исключают наличие у него соответствующих видов рецепторной активности.

В заключительных тестах, позволяющих оценить AT_1 (ангиотензиновое типа I), а также пуриновое $P2Y_1$ -зависимое действие эметазола не было получено данных, свидетельствующих об их наличии (Приложение Б Таблица Б. 23, Таблица Б. 24).

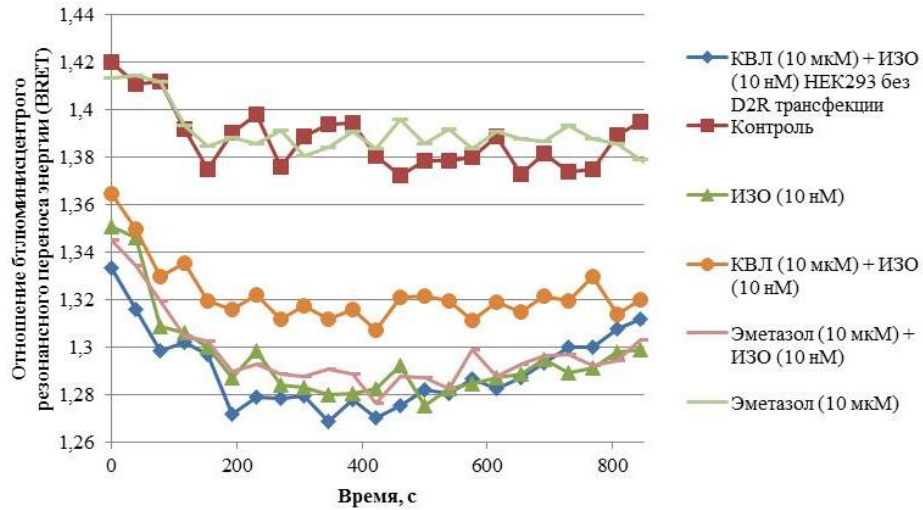


Рисунок 30. Взаимодействие эментазола с D_2 -рецепторами линии клеток НЕК-293Т.

Использована линия клеток НЕК-293Т, экспрессирующая μ АМФ-активируемый биосенсор (EPAC – exchange protein activated by *c*AMP), D_2 -адренорецептор и β_2 -адренорецептор (wild-тип). На рисунке динамическое изменение уровня μ АМФ, вызванное квинпиолом (КВЛ), изопротеренолом (ИЗО) и эментазолом. Увеличение внутриклеточного уровня μ АМФ приводит к уменьшению отношения биолуминесцентного резонансного переноса энергии. Эментазол не уменьшает уровень μ АМФ и не изменяет изопротеренолиндуцированное увеличение μ АМФ в отличие от D_2 -агониста квинпиола.

Таблица 37. Влияние эментазола (10 мкМ) на TAAR5/TAAR1-опосредованные эффекты 3-метиламина/фенилэтиламина *in vitro*.

Вещество	Отношение BRET	
	Экспрессия TAAR5	Экспрессия TAAR1
Контроль	1,118±0,0016 ^{#Δ}	1,265±0,0017 ^{#Δ}
Эментазол	1,115±0,0016 ^{#Δ}	1,270±0,0021 ^{#Δ}
3-Метиламин	1,005±0,0021 [*]	...
Эментазол + 3-Метиламин	1,000±0,0024 [*]	...
Фенилэтиламин	...	1,106±0,0020 [*]
Эментазол + Фенилэтиламин	...	1,102±0,0021 [*]

Примечания:

использована линия клеток НЕК-293Т, экспрессирующая μ АМФ-активируемый биосенсор (EPAC – exchange protein activated by *c*AMP) и рецептор к следовым аминокислотам 5 типа (TAAR5) или 1 типа (TAAR1); увеличение внутриклеточного уровня μ АМФ приводит к уменьшению отношения биолуминесцентного резонансного переноса энергии; * - изменение статистически значимо относительно показателей контроля; # - изменение значимо относительно показателя 3-Метилэтиламина/Фенилэтиламина; Δ-изменение значимо относительно показателя комбинации Эментазол + 3-Метилэтиламина/Фенилэтиламин ($p < 0,05$; ANOVA для повторяемых измерений, постобработка с помощью критерия Тьюки); «...» - не изучалось.

Таким образом, проведенные исследования *in vitro* позволили предварительно охарактеризовать спектр возможных механизмов действия нового 5-НТ₃-антагониста эметазола (Таблица 38).

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что для эметазола не характерно действие в отношении 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₄-, D₂-, β₂-, АТ₁-, P2Y₁-рецепторов, а также рецепторов, ассоциированных со следовыми аминокислотами 1 и 5 типа, в концентрациях, демонстрирующих 5-НТ₃-антагонистическое действие.

Таблица 38. Взаимодействие эметазола с различными рецепторными системами *in vitro*.

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

Примечание:

↓ - уменьшение активности.

При этом эметазол проявляет M-холиноблокирующий эффект (pIC₅₀=4,5) в концентрации, стократно превышающей среднюю эффективную для 5-НТ₃-антагонистического действия (pIC₅₀=6,3).

5.1.2 Взаимодействие с основными агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo*

Дальнейшее исследование возможных механизмов действия эметазола проводили с помощью рекомендованных руководством по доклиническому исследованию тестов *in vivo* [Андреева Н.И., 2005; Воронина Т.А., 2012а,в; Мирзоян Р.С., 2012] в дозах 1,5 и 7,5 мг/кг, эквимольных средней и высшей терапевтической для препарата сравнения ондансетрона. Материалы и методы изложены в главе 2.3.3.

Для изучаемого соединения было не характерным изменение эффектов 5-ГТФ (Приложение Б Таблица Б. 25), что свидетельствует об отсутствии у него 5-НТ₂-зависимого действия *in vivo* и согласуется с отсутствием 5-НТ_{2А}-активности *in vitro* (см. глава 5.2.1).

Принимая во внимание возможное наличие антиэметического действия у исследуемого соединения, характерное для 5-НТ₃-антагонистов, а также вовлеченность в регуляцию эметогенеза дофаминергической системы, было проведено расширенное изучение взаимодействия эметазола с агонистами/антагонистами дофаминовых рецепторов.

Было установлено, что эметазол ни в дозе 1,5 мг/кг, ни 7,5 мг/кг не изменяет проявления каталептогенного действия галоперидола. На протяжении всего исследования взаимодействия с дофаминоблокатором в группах, получавших изучаемое вещество - эметазол, а также в группе контроля наблюдались одинаково характерные изменения поведения животных (от 1,5 до 3 баллов по шкале Marpurgo), позволяющие им удерживать специфические статические позы (Рисунок 31).

Также было выявлено, что эметазол не изменяет эффекты апоморфина ни в тесте взаимодействия с высокими дозами последнего (15 мг/кг, апоморфиновая гипотермия), ни средними (1 мг/кг, апоморфиновая

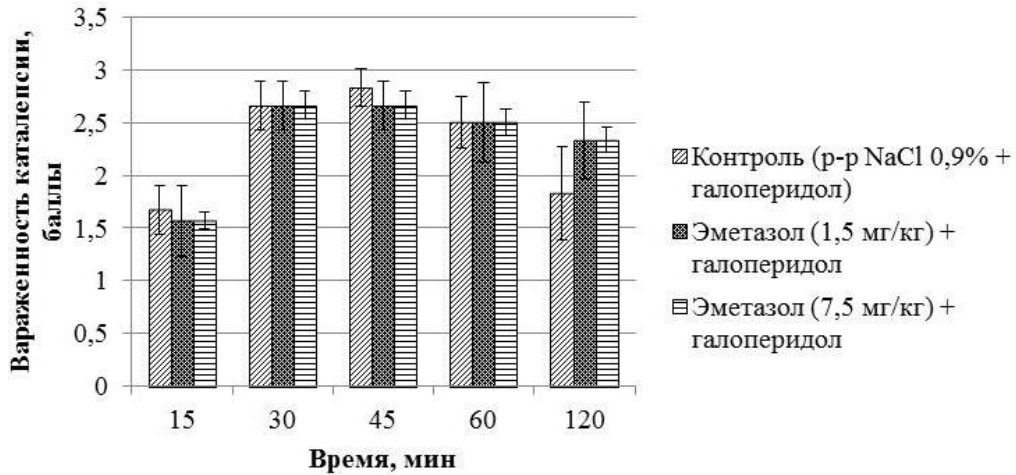


Рисунок 31. Влияние эметазола на каталепсию крыс, вызванную галоперидолом.

Внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до галоперидола (3 мг/кг; данные представлены в виде $M \pm m$; выраженность каталепсии оценивалась по способности удерживать статические позы по шкале Marpurgo (1 балл – передняя лапа слегка отводится и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см); статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса).

стереотипия), ни низкими (0,1 мг/кг, апоморфиновый гиперкинез «зевательных» движений) (Рисунок 32).

В тесте взаимодействия изучаемого вещества с фенамином также не было выявлено значимых отличий стереотипного поведения животных от показателей контрольной группы (Приложение Б Таблица Б. 26).

Полученные результаты взаимодействия эметазола с галоперидолом, апоморфином и фенамином свидетельствуют об отсутствии у него дофаминергического влияния.

При исследовании взаимодействия изучаемого вещества с клофелином, *L*-ДОФА и резерпином статистически значимых изменений между контрольными и опытными группами выявлено не было (Приложение Б: Таблица Б. 27, Таблица Б. 28, Таблица Б. 29).

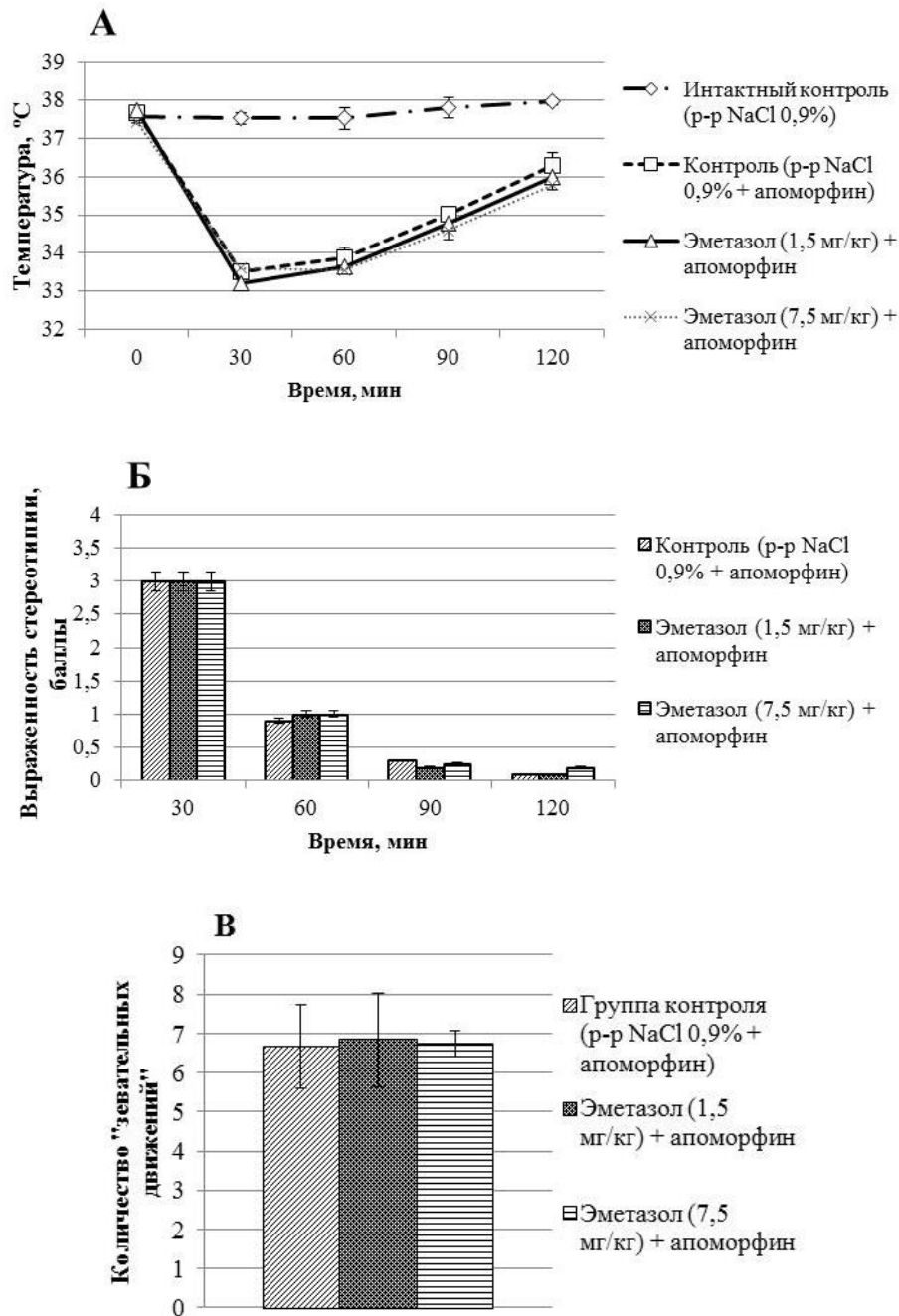


Рисунок 32. Влияние эметазола на эффекты разных доз апоморфина у крыс.

Данные представлены в виде $M \pm m$. **А**) Изменение ректальной температуры (апоморфин 15 мг/кг). **Б**) Влияние на стереотипное поведение (апоморфин 1 мг/кг). **В**) Изменение количества «зевательных движений» крыс (апоморфин 0,1 мг/кг). Эметазол изучен при внутрибрюшинном введении. Статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса).

На следующем этапе было изучено действие вещества на холинергическую систему.

Установлено, что эметазол в дозе 7,5 мг/кг способен сокращать длительность тремора, вызванного ареколином на 19-23% (Таблица 39), что может быть обусловлено наличием М-холиноблокирующего действия у изучаемого соединения в высоких дозах, показанного ранее в тестах *in vitro*.

Таблица 39. Влияние эметазола на выраженность ареколинового тремора у мышей ($M \pm m$).

Группа	Латентный период, мин	Длительность тремора, мин
Контроль (р-р NaCl 0.9% + ареколин)	1,1±0,1	6,9±0,2
Эметазол (1,5 мг/кг) + ареколин	1,2±0,1	5,9±0,2
Эметазол (7,5 мг/кг) + ареколин	1,2±0,1	5,3±0,2*

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до введения ареколина (15 мг/кг); * – изменения статистически значимы по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета).

При изучении взаимодействия с никотином значимых отличий от показателей группы контроля выявлено не было (Приложение Б Таблица Б. 30).

Далее было исследовано влияние эметазола на выраженность судорожного синдрома пикротоксина. Установлено, что в дозе 1,5 мг/кг изучаемое вещество не оказывает действие ни на качественные, ни на количественные признаки фиксируемых эффектов. При этом в дозе 7,5 мг/кг наблюдалось увеличение количества судорожных приступов без существенного влияния на латентное время их развития (Таблица 40).

Таблица 40. Влияние эметазола на эффекты пикротоксина ($M \pm m$).

Группа	Латентный период развития тремора, мин	Латентный период развития судорог, мин	Количество судорожных приступов
Контроль (р-р NaCl 0,9% + пикротоксин)	4,6±0,43	7,9±0,68	7,7±1,2
Эметазол (1,5 мг/кг) + пикротоксин	4,3±0,43	8,1±0,49	6,0±1,5
Эметазол (7,5 мг/кг) + пикротоксин	5,3±0,43	7,7±0,68	16,2±1,3*

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до введения пикротоксина (2,5 мг/кг); * – отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета).

В заключении было исследовано специфическое 5-НТ₃-зависимое действие эметазола в тесте взаимодействия с серотонином при формировании рефлекса фон Безольда-Яриша.

Принимая во внимание сложный патогенез указанного рефлекса и возможное усиление его выраженности за счет показанного М-холинергического действия эметазола, предварительно было исследовано влияние последнего на ЧСС у интактных животных.

Установлено, что исследуемое вещество не изменяет ЧСС ни в дозе 1,5 мг/кг (ЧСС=367 мин⁻¹), ни – 7,5 мг/кг (ЧСС=367 мин⁻¹) относительно исходного значения (ЧСС=370 мин⁻¹), что не характерно для классических неселективных М-холиноблокаторов. Выявленная особенность позволяет предполагать отсутствие у изучаемого соединения М₂-холиноблокирующего влияния на сердце, а также не исключает действие эметазола на формирование рефлекса фон Безольда-Яриша за счет холинергического компонента.

При моделировании самого рефлекса, было установлено, что изучаемое соединение статистически значимо ($p < 0,05$) уменьшает проявление 5-НТ₃-зависимых брадикардических свойств серотонина, что носит дозозависимый

характер. В дозе 1,5 мг/кг (внутривенно) эметазол подавляет отрицательный хронотропный рефлекс на 50-55% относительно показателей в группе контроля; а в дозе 7,5 мг/кг – на 75-79% (Таблица 41).

Таблица 41. Влияние эметазола на развитие рефлекса фон Безольда-Яриша у крыс ($M \pm m$).

Группа	Максимальное падение ЧСС, Δ уд/мин
Контроль (р-р NaCl 0,9%) + 5-гидрокситриптамин	-68,6 \pm 2,2
Эметазол (7,5 мг/кг*) + 5-гидрокситриптамин	-14,1 \pm 4,3 [#]
Эметазол (1,5 мг/кг*) + 5-гидрокситриптамин	-30,3 \pm 3,1 [#]

Примечания:

* - эметазол изучен в эквимолярной ондансетрону дозе при внутривенном введении; # - изменение относительно группы контроля статистически значимо (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Таким образом, с помощью методов фармакологического анализа в тестах взаимодействия *in vivo* было детализировано представление о возможных механизмах действия эметазола (Таблица 42).

Для изучаемого вещества подтверждено выраженное 5-HT₃-антисеротониновое действие в дозах 1,5 мг/кг и 7,5 мг/кг.

В дозе 7,5 мг/кг для исследуемого вещества характерно ослабление эффектов ареколина, что подтверждает наличие М-холиноблокирующего действия у эметазола в высоких дозах.

Установлено, что исследуемое вещество в дозе 7,5 мг/кг усиливает эффекты пикротоксина, что также может свидетельствовать о наличии у него в высоких дозах ГАМК_A-угнетающего действия.

Таблица 42. Взаимодействие эметазола с агонистами/антагонистами различных медиаторных систем.

Регистрируемый показатель	Доза, мг/кг	
	1,5	7,5
<i>Холинергическая система</i>		
Никотиновый тремор, никотиновые судороги	отсутствует	отсутствует
Ареколиновый тремор	отсутствует	↓
<i>Адренергическая система</i>		
Клофелиновая гипотермия	отсутствует	отсутствует
Резерпиновая гипотермия, блефароптоз	отсутствует	отсутствует
<i>Дофаминергическая система</i>		
Галоперидоловая каталепсия	отсутствует	отсутствует
Апоморфиновая гипотермия	отсутствует	отсутствует
Апоморфиновая стереотипия	отсутствует	отсутствует
Апоморфиновый «зевательный» гиперкинез	отсутствует	отсутствует
Фенаминовая стереотипия	отсутствует	отсутствует
Стереотипия, вызванная L-ДОФА	отсутствует	отсутствует
<i>Серотонинергическая система</i>		
Рефлекс фон Безольда-Яриша	↓	↓
5-ГТФ гиперкинез	отсутствует	отсутствует
<i>ГАМК-ергическая система</i>		
Пикротоксиновые судороги	отсутствует	↑

Примечания:

↑ - усиление эффекта; ↓ - ослабление эффекта; эметазол изучен при внутрибрюшинном введении.

В то же время для исследуемого соединения не характерно влияние на дофаминергическую (тесты взаимодействия с галоперидолом, апоморфином, фенамином) и адренергическую (тесты взаимодействия с клофелином, резерпином) передачу, а также не характерно наличие MAO-ингибирующего (взаимодействие с L-ДОФА) и 5-HT₂-зависимого (взаимодействие с 5-ГТФ) действия.

5.2 Эффекты эметазола при моделировании экспериментальной патологии *in vivo*

В настоящее время используемые в клинической практике 5-НТ₃-антагонисты применяются в основном по двум группам показаний: в качестве противорвотных (антиэметических) средств при цитостатической терапии, а также в качестве корректоров гиперкинетического и болевого компонента Д-формы синдрома раздраженного кишечника [Camilleri M., 2014; Lacy В.Е., 2015].

Принимая это во внимание, а также руководствуясь данными о 5-НТ₃-антагонистических свойствах изучаемого вещества, на следующем этапе было изучено его антиэметическое, антидиарейное и анальгетическое действие.

5.2.1 Противорвотное действие в условиях цисплатинового эметогенеза у собак

Механизм развития острой цитотоксической рвоты связан со стимуляцией цитостатиками или их метаболитами энтерохромаффинных клеток тонкого кишечника, что вызывает увеличение синтеза и высвобождения серотонина. Последний, взаимодействуя с третьим семейством серотониновых рецепторов афферентных нервных волокон, вызывает аномальную импульсацию *n. vagus*, что приводит к выделению серотонина в пограничной зоне и стимуляции 5-НТ₃-рецепторов триггерной зоны рвотного центра [Rojas С., 2012].

Исследование проводили с помощью метода цисплатин-индуцированной рвоты у собак (см. глава 2.3.6).

При формировании экспериментальной цисплатиновой рвоты у собак через 2 часа после введения цитостатика отмечалось уменьшение

эмоциональной и двигательной активности животных. Рвотные приступы начинались с обильного слюнотечения, сокращений диафрагмы и мышц брюшного пресса и продолжались 1,8-2 часа.

Было установлено, что при введении животным исследуемых соединений происходит развитие выраженного антиэметического эффекта, а уровень противорвотной активности носит дозозависимый характер.

В группах собак, получавших эметазол в дозе 1,5 мг/кг и 0,15 мг/кг, отмечалось сокращение латентного времени развития приступов рвоты по сравнению с группой контроля на 18-20 минут (Таблица 43). Также отмечалось и сокращение общей продолжительности рвотных приступов на 20% и 25% в дозах 0,15 и 1,5 мг/кг соответственно.

Таблица 43. Влияние эметазола и ондансетрона в дозах 0,015-1,5 мг/кг* на латентный период развития приступа рвоты в условиях цисплатинового эметогенеза у собак (M±m).

Группа	Время до развития первого приступа рвоты, мин		
	Доза соединения (Ондансетрон/Эметазол)		
	0,01/0,015 мг/кг*	0,1/0,15 мг/кг*	1/1,5 мг/кг*
Контроль (р-р NaCl 0,9%) + цисплатин	139±2,6		
Эметазол + цисплатин	141±2,7	159±4,1 ^{Δ#§}	157±3,3 ^{Δ#§}
Ондансетрон + цисплатин	143±2,9	152±2,0 ^{Δ#§}	156±3,6 ^{Δ#§}

Примечания:

* - эметазол и ондансетрон вводились внутривенно в эквимолярных количествах за 30 мин до цисплатина (внутривенно, 3 мг/кг); ^Δ - изменение относительно группы контроля статистически значимо, [#] - изменение относительно группы эметазола в дозе 0,01 мг/кг статистически значимо, [§] - изменение относительно группы ондансетрона в дозе 0,015 мг/кг статистически значимо (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса, p<0,05).

Аналогичные по уровню эффекты были выявлены в группах, получавших ондансетрон.

Отмечалось также изменение количества самих приступов (Таблица 44). Так, для действия эметазола было характерно статистически значимое уменьшение общего числа приступов в 2,5-2,6 раза относительно показателя группы контроля в дозах 1,5 и 0,15 мг/кг, что соответствовало эффекту ондансетрона.

Таблица 44. Выраженность противорвотного действия эметазола и ондансетрона в дозах 0,01-1 мг/кг* в условиях цисплатинового эметогенеза у собак ($M \pm m$).

Группа	Количество приступов рвоты		
	Доза соединения (Ондансетрон/Эметазол)		
	0,01/0,015 мг/кг*	0,1/0,15 мг/кг*	1/1,5 мг/кг*
Контроль (р-р NaCl 0,9%) + цисплатин	18,5±0,8		
Эметазол + цисплатин	17,0±0,6	6,8±0,7 ^{Δ#§}	6,5±0,3 ^{Δ#§}
Ондансетрон + цисплатин	17,5±1,0	9,3±0,6 ^{Δ#§}	8,5±0,9 ^{Δ#§}

Примечания:

* - эметазол и ондансетрон вводились внутривенно в эквимольных количествах за 30 мин до цисплатина (внутривенно, 3 мг/кг); изменение относительно группы ^Δконтроля, группы, получавшей [#]эметазол (0,01 мг/кг) и группы [§]ондансетрона (0,015 мг/кг) статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

При дальнейшем уменьшении дозировки до 0,015 мг/кг для эметазола и 0,01 мг/кг для ондансетрона выраженность противорвотного действия снижалась, вплоть до отсутствия статистических различий с контрольной группой животных.

Таким образом, было выявлено, что эметазол, демонстрирует выраженные антиэметические свойства, в условиях цисплатинового эметогенеза, увеличивает латентный период времени до развития приступов рвоты, а также в 2,5-2,6 раза уменьшает их количество по сравнению с группой контроля. По уровню противорвотной активности соединение соответствует селективному 5-НТ₃-блокатору ондансетрону.

Принимая во внимание данные об отсутствии влияния изучаемого вещества на эффекты галоперидола и апоморфина в тестах *in vivo* (глава 5.1.2), а также об отсутствии взаимодействия с D_2 -рецепторами *in vitro* (глава 5.1.1), можно заключить, что выявленное противорвотное действие не связано с влиянием эметазола на дофаминергическое звено эметогенеза.

Выявленные эффекты позволяют позиционировать изучаемое соединение как перспективное биологически активное вещество для дальнейшей разработки на его основе эффективного противорвотного средства с 5-HT₃-антисеротониновым механизмом действия.

5.2.2 Противодиарейные свойства эметазола

В основе влияния серотонина на функциональное состояние тонкого кишечника лежит усиление 5-HT₃- и 5-HT₄-зависимого гиперкинеза. При возбуждении 5-HT₃-рецепторы способствуют повышению секреторной активности интестинальных желез, усилению моторики, повышению рефлекторной активности.

Противодиарейное действие эметазола исследовали с использованием методов серотонининдуцированной и стрессиндуцированной дефекации в диапазоне доз 0,15-7,5 мг/кг (методы изложены в главе 2.3.7).

Действие эметазола на стрессиндуцированную дефекацию у животных

В результате исследования установлено, что изучаемое вещество вызывает значимое ($p < 0,05$) дозозависимое подавление стрессиндуцированной дефекации. Введение животным эметазола в дозе 1,5 мг/кг приводило к уменьшению выраженности дефекации на 45-48% по отношению к контрольной группе, в дозе 7,5 мг/кг – на 57-60% (Таблица 45).

Таблица 45. Противодиарейное действие эметазола в условиях стресс-индуцированной дефекации в сравнении с ондансетроном и лоперамидом ($M \pm m$).

Группа	Число болюсов		
	Доза соединения (Ондансетрон/Эметазол)		
	0,1/0,15 мг/кг*	1/1,5 мг/кг*	5/7,5 мг/кг*
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	7,4±0,8 [§]		
Эметазол	6,9±0,6	3,8±0,5	3,0±1,0 [#]
Ондансетрон	7,0±0,7	3,3±0,3 [#]	3,4±0,4 [#]
Лоперамид (2 мг/кг)	3,0±0,3 [#]		

Примечания:

* - соединение эметазол и ондансетрон вводились внутрибрюшинно эквимоллярных дозах; отличие от группы [§]интактного контроля и [#]группы контроля (модель патологии) статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

При уменьшении дозировки исследуемого соединения до 0,15 мг/кг значимых отличий фиксируемых признаков от показателей группы контроля не наблюдалось.

Аналогичное действие было отмечено для ондансетрона в эквимоллярных количествах и лоперамида в средней эффективной дозе (2 мг/кг).

Влияние эметазола на серотонининдуцированную диарею у мышей

Было установлено, что при введении животным изучаемого вещества отмечается тенденция к уменьшению частоты развития актов серотонининдуцированной дефекации, что носит дозозависимый характер. Наибольший эффект эметазола по влиянию на частоту развития диареи был отмечен в дозе 7,5 мг/кг (внутрибрюшинно) (Приложение Б Рисунок Б. 1). При этом по уровню активности изучаемое вещество соответствует

ондансетрону в эквимолярном количестве и уступает лоперамиду в средней эффективной дозе.

В дозе 1,5 мг/кг для эметазола, равно как и для ондансетрона, характерно слабое влияние на 5-гидрокситриптамининдуцированную диарею.

Заключение

В результате исследования антидиарейных свойств на моделях стрессиндуцированной и серотонининдуцированной дефекации установлено, что эметазол демонстрирует антидиарейное действие, сопоставимое по эффективности с ондансетроном.

Антидиарейный эффект эметазола наблюдается в более высоких дозах (1,5-7,5 мг/кг), чем ранее выявленное антиэметическое действие.

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

Выявленные результаты дополняют представления о фармакологических свойствах эметазола и могут расширить предполагаемые области применения биологически активного вещества, разрабатываемого на его основе.

5.2.3 Анальгетическое действие

Известно, что 5-НТ₃-рецепторы принимают участие и в проведении антиноцицептивного ответа. Считается, что периферический механизм анальгетического действия 5-НТ₃-блокаторов связан с подавлением серотонин-опосредованного выброса субстанции P и вовлечением в ответ нейрокининовых рецепторов на уровне афферентов [Färber L., 2004].

Появляются данные о влиянии 5-НТ₃-рецепторов на функциональное состояние опиоидной антиноцицептивной системы и развитии феномена опиоидиндуцированной гипералгезии [Liang D.Y., 2011].

В настоящее время антиноцицептивное действие некоторых 5-НТ₃-блокаторов находит клиническое применение. Получены доказательства эффективности доласетрона, ондансетрона и др. при лечении пациентов с фибромиалгией [Harten P., 2008; Vergne-Salle P., 2011]. Также отмечено действие ондансетрона, способствующее уменьшению болевых ощущений при проведении инъекций [Zahedi H., 2012]. Отмечается анальгетическая эффективность 5-НТ₃-блокаторов при лечении Д-формы синдрома раздраженного кишечника [de Greck M., 2014; Lacy В.Е., 2015].

Принимая это внимание, на следующем этапе было исследовано влияние эметазола на выраженность ноцицептивных реакций при различных уровнях организации боли. Более детально методы исследования представлены в главе 2.3.8.

Действие эметазола в условиях формалиновой гипералгезии

Было установлено, что в группах, получавших эметазол, отмечается уменьшение выраженности болевых симптомов, вызванных формалином (Таблица 46).

Наибольшее анальгетическое действие изучаемого вещества наблюдается во второй фазе ноцицептивного ответа. При этом отмечается дозозависимое уменьшение количества регистрируемых «подергиваний лапкой» от незначительного (в дозе 0,15 мг/кг) до выраженного и значимого ($p < 0,05$) по отношению к группе контроля (в дозах 1,5-7,5 мг/кг), соответствующее по величине эффекту диклофенаку и превосходящее ондансетрон ($p < 0,05$).

Таблица 46. Действие эметазола, ондансетрона и диклофенака в условиях теста формалиновой гипералгезии ($M \pm m$).

Группа		Количество подергиваний лапкой	
		Острая фаза (5 мин)	Фаза воспаления (10-59 мин)
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		27,3±5,2 ^х	362,3±17,2 ^{х□}
Эметазол	0,15 мг/кг	24,8±2,6	313,4±16,9 ^Δ
	1,5 мг/кг	23,3±6,1	270,6± 8,8 ^{*#}
	7,5 мг/кг	26,7±4,0	247,1±13,1 ^{*#§}
Ондансетрон	0,1 мг/кг	29,7±2,5 ^х	376,6±7,2 ^х
	1 мг/кг	25,7±3,1	351,3±12,7 ^х
	5 мг/кг	16,0±5,8	350,4±14,2 ^х
Диклофенак (10 мг/кг)		12,6±3,3 ^{*Δ}	235,4±26,9 ^{*Δ#§}

Примечания:

соединения вводились внутривенно за 30 мин до итраплантарного введения формалина (0,5%, 0,05 мл); дозы ондансетрона 0,1; 1 и 5 мг/кг эквимолярны дозам 0,15; 1,5 и 7,5 мг/кг эметазола, соответственно; отличия относительно группы *контроля и группы, получавшей ^Δондансетрон (0,1 мг/кг), [#]ондансетрон (1 мг/кг), [§]ондансетрон (5 мг/кг), ^хдиклофенак (10 мг/кг), [•]эметазол (1,5 мг/кг), [□] эметазол (7,5 мг/кг) статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

При этом также установлено, что для эметазола и ондансетрона не характерно влияние на показатели болевой реакции во время первой фазы действия формалина. Выявленные отличия от показателей контрольной группы носили незначимый характер.

Влияние эметазола на показатели теста «Электрическое раздражение корня хвоста крысы»

В результате оценки выраженности болевых реакций в тесте «электрического раздражения корня хвоста» установлено, что эметазол способствует дозозависимому повышению порога развития ноцицептивного ответа на супраспинальном уровне (вокализация и пролонгированная

вокализация). Наиболее значимое ($p < 0,05$; относительно группы контроля) влияние на указанные показатели отмечается в дозе 7,5 мг/кг через 60 мин после введения соединения. При этом по величине изменения (Δ) порога развития вокализации изучаемое вещество значимо ($p < 0,05$) превосходит эффект ондансетрона в 2,6-2,7 раза в эквимоллярном соотношении, но уступает действию центрального анальгетика буторфанола в средней терапевтической дозе.

Таблица 47. Влияние эметазола на порог болевой реакции в тесте электрической стимуляции корня хвоста в сравнении с эффектами ондансетрона и буторфанола ($M \pm m$).

Группа	Время	Порог болевой реакции, мВ		
		<i>Отдергивание хвоста</i>	<i>Вокализация</i>	<i>Пролонгированная вокализация</i>
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Исход	0,5±0,06	0,8±0,08	1,1±0,16
	0	0,4±0,06	0,8±0,16	1,1±0,16
	30	0,5±0,12	0,9±0,22 ^x	1,2±0,37 ^x
	60	0,5±0,08 ^x	1,1±0,28 ^{ox}	1,4±0,43 ^{ox}
	120	0,6±0,14 ^x	1,0±0,20 ^{ox}	1,3±0,31 ^{ox}
Эметазол (0,15 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,02	0,7±0,03	1,1±1,17
	0	0,4±0,02	0,7±0,03	1,2±0,18
	30	0,5±0,02	1,0±0,07 ^x	1,9±0,30 ^x
	60	0,4±0,04 ^x	1,2±0,24 ^x	2,2±0,23
	120	0,4±0,03 ^x	1,1±0,08 ^x	2,2±0,22
Эметазол (1,5 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,02	0,7±0,03	1,2±0,13
	0	0,4±0,03	0,6±0,04	1,2±0,13
	30	0,5±0,05	0,9±0,03 ^x	1,4±0,13 ^x
	60	0,6±0,14 ^x	1,1±0,28 ^x	2,1±0,25
	120	0,5±0,03 ^x	1,3±0,09 ^x	2,2±0,21

Таблица 47 (окончание)

Группа	Время	Порог болевой реакции, мВ		
		Отдергивание хвоста	Вокализация	Пролонгированная вокализация
Эметазол (7,5 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,02	0,6±0,03	1,1±0,08
	0	0,4±0,03	0,6±0,03	1,0±0,07
	30	0,5±0,03	1,0±0,07 ^х	1,8±0,38 ^х
	60	0,4±0,04 ^х	2,2±0,21 [*]	2,7±0,36 [*]
	120	0,5±0,03 ^х	2,2±0,15 ^{*#}	2,5±0,30 [*]
Ондансетрон (0,1 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,02	0,6±0,05	1,1±0,12
	0	0,4±0,03	0,7±0,04	1,2±0,11
	30	0,5±0,03	0,9±0,05 ^х	1,2±0,14
	60	0,4±0,08	1,0±0,11 ^х	1,6±0,28 ^х
	120	0,5±0,04 ^х	1,1±0,09 ^х	1,4±0,17 ^х
Ондансетрон (1 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,03	0,7±0,04	1,1±0,14
	0	0,4±0,03	0,7±0,05	1,1±0,13
	30	0,4±0,03	0,9±0,06 ^х	1,2±0,14 ^х
	60	0,4±0,07 ^х	1,1±0,23 ^х	1,6±0,19 ^х
	120	0,5±0,04 ^х	1,3±0,17 ^х	1,6±0,16 ^х
Ондансетрон (5 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,4±0,03	0,6±0,04	0,9±0,09
	0	0,4±0,02	0,6±0,02	1,1±0,13
	30	0,4±0,03	0,8±0,07 ^х	1,5±0,23 ^х
	60	0,5±0,11	1,4±0,11 ^х	2,0±0,38
	120	0,5±0,05 ^х	1,4±0,15 ^{х°}	2,3±0,26
Буторфанол (1 мг/кг)	Исход (до вещества)	0,5±0,05	0,8±0,10	1,2±0,18
	0	0,5±0,06	1,1±0,27	1,4±0,33
	30	0,8±0,27	2,7±0,24 ^{*#□' #Δ•}	3,2±0,32 ^{*° #Δ}
	60	1,0±0,28 ^{*□' Δ}	2,8±0,41 ^{*□' #Δ•}	3,3±0,38 ^{*Δ•}
	120	1,0±0,34 ^{*□' #Δ}	2,9±0,49 ^{*□' #Δ•}	3,3±0,50 ^{*Δ•}

Примечания:

соединения вводились внутривенно; дозы ондансетрона 0,1; 1 и 5 мг/кг эквивалентны дозам 0,15; 1,5 и 7,5 мг/кг эметазола соответственно, буторфанол использован в средней эффективной дозе; отличия относительно группы *контроля и групп, получавших •ондансетрон (0,1 мг/кг), Δондансетрон (1 мг/кг), #ондансетрон (5 мг/кг), °эметазол (0,15 мг/кг), □эметазол (1,5 мг/кг), °эметазол (7,5 мг/кг), хбуторфанол статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ, с посттестом Ньюмана-Кеулса, $p < 0,05$).

Также установлено, что эметазол и ондансетрон (но не буторфанол) не изменяли порога болевой реакции в виде «отдергивания хвоста» ни в одной из изученных доз, что может свидетельствовать об отсутствии их влияния на спинальный уровень ноцицепции.

Влияние эметазола на поведение животных в тесте «Горячая пластина»

При исследовании влияния эметазола на болевую реакцию животных в тесте «горячая пластина» было показано, что в группах, получавших исследуемое вещество, происходит дозозависимое удлинение порогового времени развития реакции «подпрыгивания» (Таблица 48). Изменение поведения животных отмечается при использовании эметазола в дозе 1,5 мг/кг и, наиболее значимо, – 7,5 мг/кг. При этом уровень анальгетического эффекта изучаемого соединения соответствует ондансетрону в эквимоллярных количествах и на 22,8% и 57,7% уступает буторфанолу в дозах 7,5 и 1,5 мг/кг соответственно.

В то же время было показано, что для эметазола, а также ондансетрона не характерно изменение латентного времени первичной реакции «полилизывания лапки» в ответ на гипертермический раздражитель не зависимо от исследованной дозы в диапазоне 0,15-7,5 мг/кг.

Заключение

Обобщая изложенные результаты по исследованию антиноцицептивных свойств эметазола, можно сделать вывод о наличии у последнего анальгетического действия, по большинству показателей превосходящего активность ондансетрона в эквимоллярных количествах.

Таблица 48. Влияние эметазола на латентное время развития характерных болевых поведенческих реакций в тесте «Горячая пластина» в сравнении с ондансетроном и буторфанолом ($M \pm m$).

Группа		Латентное время полилизывания задней лапки, с	Латентное время подпрыгивания, с
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		12,2±1,6 [#]	24,7±3,4 ^{o#}
Эметазол	0,15 мг/кг	12,3±1,6	28,4±2,9
	1,5 мг/кг	11,8±2,4	32,3±2,9
	7,5 мг/кг	11,0±2,0	38,6±1,3 [*]
Ондансетрон	0,1 мг/кг	11,3±1,3 [#]	25,3±2,1 [#]
	1 мг/кг	8,2±1,3	31,1±1,9
	5 мг/кг	12,0±3,2	35,2±2,5
Буторфанол (1 мг/кг)		19,7±1,2 ^{*Δ}	42,8±4,9 ^{*Δ}

Примечания:

соединения вводились внутривенно; дозы ондансетрона 0,1; 1 и 5 мг/кг эквивалентны дозам 0,15; 1,5 и 7,5 мг/кг эметазола соответственно; буторфанол использован в рекомендуемой средней эффективной дозе; отличия относительно группы *контроля и группы, получавшей ^Δондансетрон (0,1 мг/кг), ^oэметазол (7,5 мг/кг), [#]буторфанол (1 мг/кг) статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кейлса, $p < 0,05$).

Наиболее значимое анальгетическое действие эметазола проявляется в дозах 1,5 и 7,5 мг/кг (внутривенно) при периферическом (формалиновая гипералгезия) и супраспинальном (вокализация, пролонгированная вокализация, горячая пластина) уровне организации ноцицептивного ответа.

Выраженность анальгетического эффекта эметазола статистически значимо превосходит эффект ондансетрона и соответствует действию диклофенака во второй фазе болевой реакции. Эметазол не влияет на выраженность ноцицептивного ответа в первой фазе формалиновой гипералгезии.

Эметазол и ондансетрон в диапазоне доз 0,15-7,5 мг/кг (внутривенно) не влияют на порог развития болевой реакции в виде «отдергивания хвоста» в тесте «электрической стимуляции корня хвоста».

Влияние эметазола на изменение порога болевой реакции при супраспинальном уровне организации ноцицептивного ответа в 2,6-2,7 раза превосходит эффект ондансетрона, соответствует ему при гипертермическом раздражении (горячая пластина), уступая при этом действию буторфанола.

Полученные данные о наличии анальгетического действия у эметазола, расширяют представление о фармакодинамических свойствах вещества и могут быть использованы при разработке на его основе биологически активного соединения для коррекции специфических болевых синдромов при Д-форме СРК, фибромиалгии, связанных с гиперактивностью 5-НТ₃-зависимого ноцицептивного звена.

5.2.4 Анксиолитическое действие

Блокада 5-НТ₃-рецепторов оказывает анксиолитический эффект, что подтверждается исследованиями на мышах, нокаутных по гену 5-НТ₃-рецептора [Kelley S.P., 2003; Bhamagar S., 2004]. Кроме того, это показано в ряде экспериментальных работ выполненных на грызунах и посвященных изучению психотропных свойств таких 5-НТ₃-антагонистов, как трописетрон, ондансетрон, N-n-бутилхиноксалин-2-карбоксамид [Kumar V., 2012]. Наличие анксиолитического действия было выявлено и для близких по химической структуре 5-НТ₃-антагонистов из класса бензимидазолов [Киабия С.Т., 2003; Черников М.В., 2008; Kolobrodova N.A., 2011].

Аналогичные данные получены в ряде клинических исследований: установлено, что гранисетрон способен усиливать действие флувоксамина при лечении пациентов со среднетяжелыми и тяжелыми формами обсессивно-компульсивных расстройств [Askari N., 2012].

С другой стороны наличие анксиолитического эффекта характерно не для всех 5-НТ₃-антагонистов и не на всех моделях ангиогенеза. Так итасетрон, RS-42358, а в ряде случаев ондансетрон не оказывали значимого

влияния на поведение животных в условиях конфликтных моделей анксиогенеза. Также отмечается летучий характер противотревожного действия ондансетрона в условиях эксперимента [Nowakowska E., 1998] и отсутствие эффективности в ряде клинических исследований [Hoşten T., 2011].

Учитывая эти данные, а также принимая во внимание вероятное для эметазола влияние на супраспинальные функции нервной системы (глава 5.2.3), на следующем этапе было исследовано анксиолитическое действие изучаемого вещества в диапазоне доз 0,15-7,5 мг/кг при различных способах формирования тревожности у животных (более подробно методы представлены в главе 2.3.9).

Влияние эметазола на поведение животных в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темная/светлая камера»

В условиях анксиогенеза в «приподнятом крестообразном лабиринте» было выявлено, что при однократном введении животным эметазола происходит изменение их поведенческой активности (увеличение числа выходов в «открытые рукава», удлинение времени пребывания в них), характерной для действия анксиолитиков (Таблица 49).

По величине указанные эффекты соответствуют либо незначительно уступают действию диазепама в средней эффективной дозе (1 мг/кг) и наиболее выражены для эметазола в дозе 1,5 мг/кг. В группе, получавшей ондансетрон в эквимолярной дозе (1 мг/кг), значимого изменения соответствующих поведенческих реакций выявлено не было. При этом отмечалось умеренное (на 25-30% уступающее максимальному действию эметазола) удлинение времени пребывания животных в «открытых рукавах»

Таблица 49. Поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» при введении эметазола в дозах 0,15-7,5 мг/кг*, ондансетрона и диазепама ($M \pm m$).

Группа Показатель	Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Диазепам (1 мг/кг)	Ондансетрон			Эметазол		
			0,1 мг/кг	1 мг/кг	5 мг/кг	0,15 мг/кг	1,5 мг/кг	7,5 мг/кг
Число выходов в открытый рукав	0,5±0,19	1,5±0,27 [#]	0,7±0,4	1,3±0,4	1,3±0,4	0,7±0,4	2,3±0,2 [#]	1,5±0,5
Количество выглядываний	4,5±0,63	5,5±0,65	4,2±0,6	5,7±1,5	5,2±1,5	4,7±0,5	7,3±1,4	7,5±1,3
Количество переходов	1,6±0,26	3,9±0,58 [#]	2,5±0,4	3,8±1,1	5,5±0,8	3,2±0,8	6,8±1,1 [#]	4,5±0,9 [#]
Общее время нахождения в центре, с	8,0±4,19	7,5±2,81	5,0±1,5	7,5±1,4	6,7±1,5	6,5±1,2	7,5±1,0	7,3±1,2
Латентный период ухода из центра, с	1,5±0,27	1,6±0,63	1,5±0,4	1,7±0,4	2,0±0,4	1,7±0,5	1,8±0,3	1,8±0,4
Время в открытом рукаве, с	7,3±3,46	34,4±5,14 [#]	4,2±2,4	6,8±2,2	18,2±4,2 [#]	5,3±3,3	26,3±3,7 [#]	9,7±2,5
Число болюсов	0,1±0,13	2,0±0,87	0,0±0,0	0,5±0,2	0,5±0,3	0,2±0,2	0,1±0,3	0,1±0,3

Примечания:

* - дозы ондансетрона 0,1; 1 и 5 мг/кг эквимолярны дозам 0,15; 1,5 и 7,5 мг/кг эметазола соответственно, все соединения вводились внутрибрюшинно; # – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

при введении ондансетрона в более высокой дозе, эквимолярной 7,5 мг/кг для эметазола.

В то же время при формировании тревожности в тесте «темная/светлая камера» действие эметазола на специфичные для анксиолитиков поведенческие реакции (число выглядываний и выходов в «светлый отсек») было менее значимым. Для эметазола в дозе 1,5 мг/кг отмечалась уступающая действию диазепама тенденция к увеличению числа выглядываний и выходов из «темного отсека», а также сокращению латентного времени выглядывания из «темной камеры». При этом для ондансетрона такие изменения были не выражены (Таблица 50).

Таблица 50. Влияние эметазола, ондансетрона и диазепама на поведение крыс в тесте «Темная/светлая камера» в дозах 0,15-7,5 мг/кг* (M±m).

Группа	Параметр		
	Доза соединения		
	0,15 мг/кг	1,5 мг/кг	7,5 мг/кг
Латентный период выглядывания в светлую камеру, с			
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	39,0±6,0		
Диазепам (1 мг/кг)	19,7±5,1 [#]		
Эметазол	42,2±9,5	25,0±4,0	39,0±5,1
Ондансетрон	44,5±9,9	29,2±4,6	28,6±6,4
Число выглядываний в светлую камеру			
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	2,3±0,5		
Диазепам (1 мг/кг)	3,2±0,9		
Эметазол	1,5±0,2	4,3±0,7	2,2±0,9
Ондансетрон	1,3±0,5	2,3±0,8	2,8±0,5
Число выходов в светлую камеру			
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	0,2±0,2		
Диазепам (1 мг/кг)	2,3±0,2 [#]		
Эметазол	0,0±0,0	2,2±0,3	2,2±0,3
Ондансетрон	0,2±0,2	0,2±0,2	0,3±0,2

Примечание:

* - эметазол и ондансетрон изучены в эквимолярных дозах при внутрибрюшинном пути введения; # – отличия от группы контроля статистически значимы (p<0,05; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Действие эметазола в условиях теста «Vogel»

При исследовании поведения животных в условиях «наказуемого взятия воды» после водной депривации было показано, что для эметазола, а также для ондансетрона не характерно влияние на отражающие анксиолитическое действие показатели (число «наказуемых взятий воды» и латентное время подхода к поилке) в изученных дозах (Таблица 51).

Таблица 51. Влияние эметазола, ондансетрона и диазепама на поведение крыс в тесте «Vogel» в дозах 0,15-7,5 мг/кг* ($M \pm m$).

Группа	Параметр		
	Доза соединения		
	0,15 мг/кг	1,5 мг/кг	7,5 мг/кг
Число наказуемых взятий воды			
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,3±0,2		
Диазепам (1 мг/кг)	3,0±0,4 [#]		
Эметазол	1,3±0,2	1,3±0,2	2,0±0,4
Ондансетрон	1,2±0,2	1,3±0,2	1,5±0,2
Латентный период подхода к поилке, с			
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	41,5±8,9		
Диазепам (1 мг/кг)	51,8±7,6		
Эметазол	47,7±7,9	41,2±5,3	41,5±9,7
Ондансетрон	43,5±7,7	44,8±7,3	48,0±9,6

Примечание:

* - эметазол и ондансетрон изучены в эквимолярных дозах при внутрибрюшинном пути введения; # – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Влияние эметазола на результаты тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Vogel» при 14 дневном введении

Принимая во внимание полученные данные о неодинаковом влиянии эметазола при однократном введении на поведение животных в условиях различных форм анксиогенеза, а также учитывая возможность наличия накопительного действия, характерного для многих психотропных средств,

на следующем этапе для уточнения действия были изучены анксиолитические свойства эметазола при 14-дневном введении.

Действие эметазола было исследовано в наиболее эффективной дозе 1,5 мг/кг в условиях тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Vogel».

Было установлено, что после 14-дневного введения животным эметазола либо препаратов сравнения в условиях обоих тестов только в группе, получавшей диазепам, сохраняются характерные для анксиолитического действия изменения поведения (увеличение времени пребывания в «открытых рукавах», увеличение числа «наказуемых взятий воды»). При этом ни для эметазола, ни для ондансетрона подобные реакции зафиксированы не были (Приложение Б Таблица Б. 31, Таблица Б. 32).

Заключение

Полученные результаты о слабом влиянии эметазола на поведение животных в условиях неконфликтного моделирования тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» не были подтверждены статистически значимыми изменениями поведения при альтернативном способе изучения (тест «Темная/светлая камера»). Кроме того было показано, что эметазол не влияет на тревожное поведение в условиях конфликтного ангиогенеза (тест «Vogel»). Также не наблюдалось значимых изменений в поведении животных, свидетельствующих о противотревожном действии, и при 14-дневном введении изучаемого вещества. Принимая это во внимание, а также учитывая рекомендации по интерпретации данных руководства по доклиническим исследованиям соединений [Воронина Т.А., 2012г], можно заключить, что для эметазола не характерно наличие значимого анксиолитического действия в диапазоне изученных доз 0,15-7,5 мг/кг.

6 ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ

Исследование токсикологических свойств биологически активного вещества является неотъемлемой и обязательной частью доклинического изучения [Арзамасцев Е.В., 2012].

В данной главе изложены результаты изучения острой токсичности авазола и эметазола, а также их влияния на неврологический статус животных в широком диапазоне доз (от минимальных эффективных на различных экспериментальных моделях до минимальных летальных).

Исследования проводились параллельно с изучением фармакодинамических свойств указанных веществ, изложенных в главах 3, 4 и 5, что было продиктовано необходимостью определения диапазона безопасных доз для исследований *in vivo*, предварительной оценки фармакологических свойств, а также для наиболее адекватного изучения безопасности выявленных в условиях моделирования экспериментальной патологии эффективных доз соединений. Материалы и методы представлены в главе 2.

6.1 Токсикологические свойства авазола

6.1.1 Острая токсичность при внутрибрюшинном введении у мышей-самцов

Исследование острой токсичности авазола проводили на мышах-самцах при внутрибрюшинном введении с использованием нарастающих доз: 30, 40, 50, 80, 100, 200 мг/кг.

В группах, получавших авазол в дозах 30 и 40 мг/кг, летальных случаев зафиксировано не было в течение всего 14-дневного периода наблюдения.

При этом отмечалось угнетение двигательной активности животных в течение 2-4 часов после введения вещества.

В группе животных, получавших авазол в дозе 50 мг/кг, отмечались первые летальные случаи. При этом наблюдалось более выраженное изменение поведения животных: уменьшение подвижности, нарушение походки, регистрировались единичные случаи тремора и развития судорожного состояния, предшествовавшие летальному исходу.

При исследовании авазола в более высоких дозах 80-200 мг/кг процент гибели животных возрастал, при этом отмечалась выраженная седация, сменяемая полной неподвижностью. В ряде случаев также отмечалось развитие тремора и судорожного синдрома.

В результате исследования была определена среднесмертельная доза авазола (LD_{50}) у мышей-самцов, составившая 77,6 мг/кг (Рисунок 33).

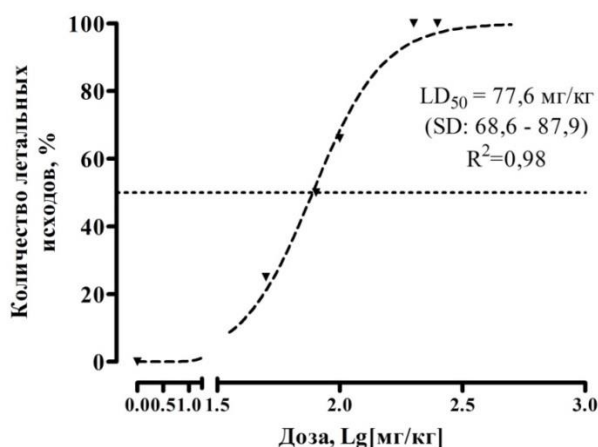


Рисунок 33. Определение показателя острой токсичности LD_{50} для авазола при внутрибрюшинном введении у мышей-самцов.

Примечание: исследование проводилось при внутрибрюшинном введении на белых нелинейных мышях-самцах; использован нелинейный регрессионный анализ; SD – 95% доверительный интервал.

Выявленная величина LD_{50} позволяет отнести авазол к 3 классу умеренно токсичных соединений [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

При этом показатель среднесмертельной дозы авазола в 1,8 раза превосходит по безопасности аналогичный параметр препарата сравнения ципрогептадина, и соответствует уровню LD₅₀ вещества сравнения кетансерина при аналогичном способе введения (Таблица 52).

Таблица 52. Острая токсичность (LD₅₀) известных 5-HT_{2A}-антагонистов у мышей при внутрибрюшинном/внутривенном введении (данные литературы).

Название вещества	LD ₅₀ , мг/кг	Путь введения	Источник
Ципрогептадин	43,3 15,0	внутрибрюшинно внутривенно	ARZNAD Arzneimittel-Forschung. Drug Research., V.1- 1951; Vol. 25, p. 1723, 1975.
Кетансерин	71,5 37,1	внутрибрюшинно внутривенно	Ketanserin [Electronic resource] : Drug future Base [Data Base]. – URL: http://www.drugfuture.com/toxic/q121-q638.html (дата обращения 03.02.2016).
Ритансерин	28,2	внутривенно	RTECS (Register of Toxic Effects of Chemical Substances) [Electronic resource] : Canadian Centre for Occupational Health and Safety. – URL: http://ccinfoweb2.ccohs.ca/rtecs/records/XZ6157235.html . (дата обращения: 11.12.2015).

6.1.2 Общий нейротоксикологический профиль по Ирвину

На заключительном этапе настоящего исследования свойств авазола было проведено изучение его влияния на общий неврологический статус животных в тестах наблюдения по Ирвину (см. глава 2.3.10). Показатели тестов оценивали в параллельных группах, получавших вещество в дозах от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг.

Было установлено, что авазол статистически значимо не изменяет показатели практически всех тестов, оценивающих вегетативные эффекты, нервно-мышечную возбудимость и поведенческие реакции в дозах 0,5 и 5 мг/кг.

Исключение составили показатели болевой чувствительности и поведенческой реакции в тесте «Открытое поле» (Таблица 53, Таблица 54).

Таблица 53. Влияние авазола в дозах 0,5-50,0 мг/кг на болевую чувствительность при сдавлении (оценка нервно-функционального статуса мышцей по Ирвину, фрагмент)²¹ ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
<i>Болевая чувствительность, с</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,9±0,1	2,1±0,2	2,0±0,0	2,0±0,1	1,9±0,1	2,0±0,3	1,9±0,3	
Авазол	0,5 мг/кг	2,0±0,0	2,8±0,2	2,6±0,3*	2,6±0,3	2,6±0,3	2,4±0,3	2,2±0,2
	5 мг/кг	2,0±0,0	2,5±0,3	2,8±0,3*	2,5±0,3	2,3±0,3	2,5±0,3	2,0±0,0

Примечания:

* - статистически значимые изменения относительно группы контроля ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Таблица 54. Влияние авазола в дозе 0,5 мг/кг на количество выходов в центр у мышцей в тесте «открытое поле» при многопараметровой оценке нервно-функционального статуса по Ирвину (фрагмент)²² ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин			
	Исход	60	90	120
Количество выходов в центр				
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	0,0±0,0	0,2±0,2	0,0±0,0	0,2±0,2
Авазол (0,5 мг/кг)	0,0±0,0	1,3±1,3	0,3±0,3	2,3±0,3*

Примечания: внутривентральное введение авазола; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимы ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Было отмечено, что при введении авазола в дозе 0,5 и 5,0 мг/кг у мышцей увеличивается латентность ноцицептивной реакции в сравнении с

²¹ Полные данные представлены в Приложении Б (Таблица Б. 38).

²² Полные данные представлены в Приложении Б (Таблица Б. 34).

группой контроля ($p < 0,05$; временной интервал 60 мин) в среднем через 60-120 мин после введения соединения.

В тесте «Открытое поле» у группы животных, получавших авазол в дозе 0,5 мг/кг, отмечалось значимое ($p < 0,05$ относительно группы контроля) увеличение количества «выходов в центр».

По всей вероятности, выявленные эффекты являются следствием анальгетических и анксиолитических свойств авазола (см. глава 4.2.3 и 4.2.4).

При увеличении дозы авазола (15 мг/кг) отмечалось изменение двигательной и поисковой активности мышей, а также, в единичных случаях, изменение реактивности, мышечного тонуса, реакции на раздражение слухового прохода. Наиболее выраженные нарушения функционально-поведенческого статуса наблюдались при введении авазола в более высоких дозах (30-50 мг/кг) (Приложение Б Таблица Б. 33 -Таблица Б. 47).

Обобщенные данные представлены в таблице (Таблица 55).

6.1.3 Заключение

Проведенные исследования позволили охарактеризовать острую токсичность и нейротоксикологический профиль авазола.

Величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) авазола (на мышах-самцах при внутрибрюшинном пути введения) составляет 77,6 мг/кг, что позволяет отнести авазол к умеренно токсичным соединениям, класс токсичности 3 [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

По показателю острой токсичности (LD_{50}) при внутрибрюшинном введении авазол в 1,8 раза менее токсичен, чем препарат сравнения ципрогептадин и равен веществу сравнения кетансерину.

В эффективных дозах (0,5 и 5 мг/кг; внутрибрюшинно), демонстрирующих выраженное антисеротониновое действие *in vivo*, для авазола характерно уменьшение болевой реакции, а также подавление

Таблица 55. Влияние авазола на функционально-поведенческий статус мышей при внутрибрюшинном введении.

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

Примечания:

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

характеризующего тревожность поведения, что согласуется с доказанной анальгетической и анксиолитической активностью изучаемого вещества. Для авазола не характерно значимое влияние на остальные изученные параметры (поведенческие реакции, нервно-мышечная возбудимость, вегетативные

реакции) функционально-поведенческого статуса животных в указанных дозах.

Минимальные значимые (не связанные с анксиолитическим действием) изменения поведенческого статуса мышей наблюдаются при введении авазола в дозе 15 мг/кг (внутрибрюшинно). Минимальные значимые изменения нервно-мышечных (не связанных с анальгетическим действием) и вегетативных реакций животных отмечаются при введении авазола в дозе 30 мг/кг (внутрибрюшинно).

Таким образом, полученные данные позволяют считать авазол веществом, не обладающим нейротоксическими эффектами в диапазоне эффективных доз, менее токсичным, чем препарат сравнения ципрогептадин, при большей серотонинергической активности.

6.2 Токсикологические свойства эметазола

6.2.1 Острая токсичность при внутрибрюшинном введении у мышей-самцов

Для большинства известных 5-HT₃-антагонистов, в том числе для препаратов, используемых в клинической практике (ондансетрон, гранисетрон, трописетрон), в целом характерны высокие показатели острой токсичности (Таблица 56).

Уровень среднесмертельной дозы (LD₅₀) на мышах для большинства препаратов не превышает 20-30 мг/кг при внутрибрюшинном либо внутривенном пути введения, в то время как для ондансетрона он равен 10,8 мг/кг [Yakuri, 1972].

Таблица 56. Острая токсичность (LD_{50}) некоторых известных 5-HT₃-антагонистов у мышей при внутрибрюшинном/внутривенном введении (данные литературы).

Название вещества	LD_{50} , мг/кг	Путь введения	Источник
Ондансетрон	10,8	внутрибрюшинно	YACHDS Yakuri to Chiryō. Pharmacology and Therapeutics. V.1-1972- Vol. 20, Suppl 4, p. S995, 1992.
Гранисетрон	17	внутривенно	Granisetron [Electronic resource] : Drug future Base [Data Base]. – URL: http://www.drugfuture.com/toxic/q68-q200.html (дата обращения 03.02.2016).
Трописетрон	37,9	внутривенно	YAKUDS Gekkan Yakuji. Pharmaceuticals Monthly. V.1- 1959; Vol. 40, p. 2445, 1998.

В настоящем исследовании острую токсичность эметазола изучали в параллельных группах мышей-самцов, получавших возрастающие дозы вещества (внутрибрюшинно): от 25 мг/кг до 50 мг/кг.

Первые единичные случаи гибели животных были зафиксированы в группе, получавшей эметазол в дозе 30 мг/кг. Как правило, летальному исходу предшествовала следующая картина интоксикации: уменьшение двигательной активности, нарушение походки, снижение частоты дыхания.

В группах, получавших более высокие дозы (37,5-50 мг/кг) изучаемого соединения, количество летальных исходов увеличивалось. При этом в картине интоксикации дополнительно отмечались единичные случаи развития тремора и судорожного синдрома.

В результате проведения исследования для эметазола была рассчитана среднесмертельная доза (LD_{50}) (на мышцах-самцах при внутрибрюшинном пути введения), составившая 38,9 мг/кг (доверительный интервал 29,5-48,3 мг/кг) (Рисунок 34).

Выявленные свойства (LD_{50}) позволяют отнести эметазол ко 2 классу токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976], в 3,6 раза менее токсичным, чем

препарат сравнения ондансетрон, при том же пути введения и в 2 раза менее токсичным, чем гранисетрон (при внутривенном пути введения).

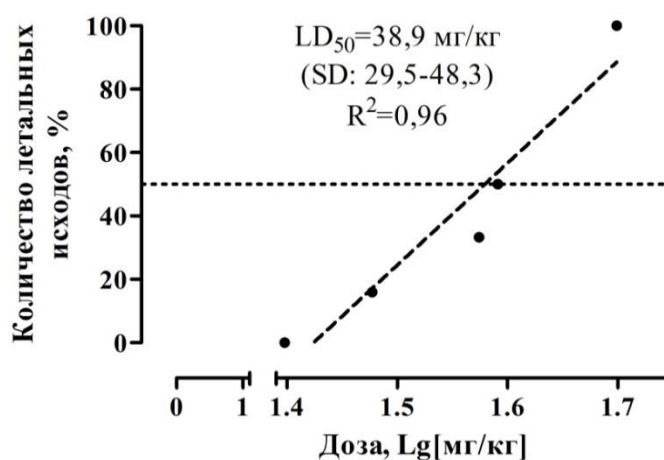


Рисунок 34. Среднесмертельная доза (LD₅₀) эметазола на мышах при внутрибрюшинном введении.

Примечание: исследование проводилось при внутрибрюшинном введении на белых нелинейных мышах-самцах; использован линейный регрессионный анализ; SD – 95% доверительный интервал.

Меньшая токсичность эметазола позволяет предполагать меньшую выраженность побочных и токсических проявлений у изучаемого соединения в сравнении с ондансетроном при неуступающей по уровню специфической антисеротониновой активности (см. глава 5).

6.2.2 Нейротоксикологический профиль эметазола по Ирвину

В заключительном блоке исследований для выявления возможных нейротоксических эффектов эметазола было изучено его влияние на функционально-поведенческий статус животных в диапазоне доз 1,5-26 мг/кг.

Было установлено, что в дозах до 3,8 мг/кг (внутрибрюшинно) эметазол значимо не влияет на показатели проведенного многопараметрового

тестирования (Приложение Б Таблица Б. 48 -Таблица Б. 62). Обобщенные результаты представлены в таблице (Таблица 57).

Таблица 57. Влияние эметазола на функционально-поведенческий статус мышей при внутривенном введении.

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

Примечания:

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

Полученные данные могут свидетельствовать об отсутствии значимого нейротоксического влияния эметазола в диапазоне эффективных антиэметических (0,15-1,5 мг/кг) и анальгетических доз (1,5 мг/кг).

При этом обращает на себя внимание тенденция к уменьшению болевой реакции у животных, получавших эметазол в дозах 1,5-7,5 мг/кг, с максимальным увеличением времени развития ноцицептивной реакции в дозе 3,8 мг/кг (Рисунок 35). Полученные данные согласуются с выявленным ранее анальгетическим действием соединения (глава 5.2.3).

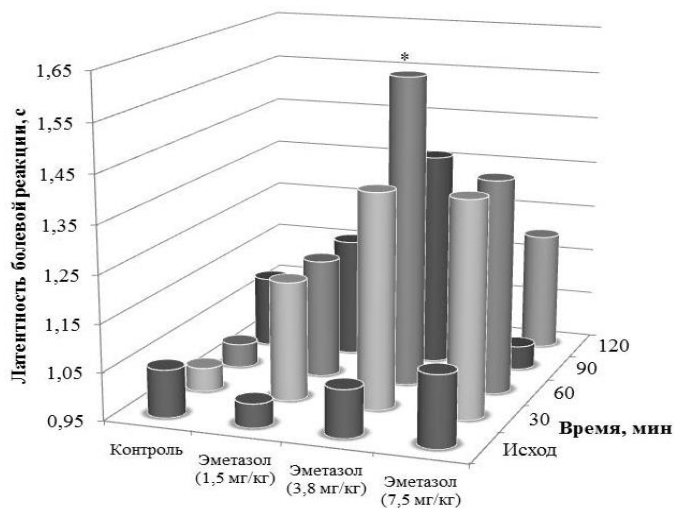


Рисунок 35. Влияние эметазола в дозах 1,5-7,5 мг/кг на болевую чувствительность мышей при сдавлении (фрагмент из определения нервно-функционального статуса по Ирвину)²³.

Примечания: эметазол изучен при внутрибрюшинном введении. На рисунке: тенденция повышения времени ответа на болевую реакцию (М); * - статистически значимые отличия от показателей группы контроля ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Дальнейшее увеличение доз эметазола позволило выявить границы развития наиболее значимых нейрофункциональных нарушений.

В дозе 15 мг/кг отмечались минимальные значимые изменения поведенческих реакций в виде уменьшения «вертикальной активности» в

²³ Полные данные представлены в Приложении Б (Таблица Б. 62).

тесте «Открытое поле». С увеличением доз (15,0-22,5 мг/кг) наблюдалось уменьшение поисковой активности, увеличение показателей реактивности.

Влияние на нервно-мышечную возбудимость (уменьшение мышечного тонуса) отмечалось начиная с дозы 22,5 мг/кг. При дальнейшем повышении дозы к указанным симптомам интоксикации добавлялись нарушения координации, походки, изменения выраженности ипсилатерального сгибательного рефлекса, реакции на раздражение слухового прохода.

Из вегетативных реакций изменения наблюдались только в отношении частоты дыхания (уменьшение) при введении эметазола в дозе 26 мг/кг.

6.2.3 Заключение

В результате исследования была изучена острая токсичность и нейротоксикологический профиль эметазола.

Величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) эметазола у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении составляет 38,9 мг/кг, в 3,6 раза превосходя по безопасности аналогичный показатель ондансетрона.

По уровню острой токсичности эметазол, равно как и препараты сравнения ондансетрон, гранисетрон, трописетрон относятся к классу токсичности 2 [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

Для эметазола не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методологии Ирвина, в дозах, демонстрирующих выраженное антиэметическое (0,15-1,5 мг/кг) и анальгетическое (1,5 мг/кг) действие.

Минимальные значимые нейротоксические эффекты, связанные с изменением поведенческих реакций (уменьшение «вертикальной активности», изменение реактивности) отмечаются при введении эметазола в дозе 15 мг/кг и более. Минимальные значимые изменения нервно-мышечной возбудимости, не связанные с анальгетическим действием эметазола,

отмечаются в дозах начиная с 22,5 мг/кг. Влияние на вегетативные реакции (частота дыхания) отмечается в дозе 26 мг/кг.

Таким образом, полученные результаты позволяют позиционировать изучаемое вещество эметазол как соединение, не обладающее нейротоксическим влиянием в эффективных дозах, и являющееся менее токсичным, чем ондансетрон, с превосходящими его анальгетическими и равными антиэметическими свойствами.

7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотониновые рецепторы с момента их открытия и дальнейшей детализации представляют высокий интерес в качестве фармакологических мишеней воздействия для низкомолекулярных соединений [Середенин С.Б., 1998; Шимановский Н.Л., 2009]. Во многом это обусловлено высокой значимостью, а в некоторых случаях первоочередной ролью серотонинергической системы в формировании большого числа патофизиологических процессов организма [Andrews P., 1993; Crowell M.D., 2004; Александрин В.В., 2005; Мирзоян Р.С., 2006; Bardin L., 2011; Belkind-Gerson J., 2015].

В настоящее время широко изучены свойства лигандов первого серотонинового семейства рецепторов, выявлены соединения с разной степенью селективности, внедрены и широко используются в клинической практике несколько поколений препаратов группы «триптанов» для купирования, в первую очередь, мигренозного приступа [Fedotova J.O., 2004 ; Амелин А.В., 2011 ; Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: <http://www.rlsnet.ru>].

Напротив, в значительно меньшей степени изучены свойства лигандов V-VII семейств рецепторов к серотонину, исследуется их клиническая перспективность [Alexander S.P., 2013]. Это вызывает как значительный фундаментальный, так и прикладной интерес к эффектам указанных семейств рецепторов и их лигандам, но все еще далекий на текущий момент от широкого внедрения в практическую медицину [Иващенко А.В., 2014].

Настоящее исследование было направлено на поиск, дальнейшую разработку и изучение свойств новых лигандов – представителей II(A)-IV семейств серотониновых рецепторов, с одной стороны как достаточно хорошо фундаментально изученных мишеней, с другой стороны, имеющих высокий нереализованный фармакологический потенциал. Кроме того,

несмотря на внедрение в практическую медицину ряда препаратов с 5-НТ₂-; 5-НТ₃-антагонистическим и 5-НТ₄-агонистическим механизмом действия (ципрогептадин, пизотифен, метисергид, ондансетрон, трописетрон, тегасерод), их широкое применение ограничено либо недостаточной эффективностью, либо побочными эффектами, связанными с низкой селективностью и относительно высокой токсичностью.

На первом этапе исследования, основываясь на описанных [Киабия С.Т., 2003; Анисимова В.А, 2005; Черников М.В., 2008; Горягин И.И., 2008] и полученных ранее собственных данных [Яковлев Д.С., 2007] о серотонинергической активности отдельных представителей ряда азотсодержащих гетероциклических соединений: бензимидазола, бензимидазолина, в настоящем исследовании была разработана и применена стратегия направленного поиска антагонистов серотониновых рецепторов 2A, 3 типа, а также агонистов 4 типа рецепторов среди представителей обобщенного класса конденсированных азолов (а именно: 1,3-дизамещенных индолов; индолов, сопряженных с бицикло[3.3.1]нонановыми и бицикло[3.2.1]октановыми каркасами; N¹-бензимидазолов, пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов, пиазоло[1,2-*a*]бензимидазолов, 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолов, N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, N⁹-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, N¹-1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов).

В ходе выполнения направленного поиска высокоактивных 5-НТ_{2A/3}-антагонистов была разработана методология, сочетающая в себе: элементы ретроспективного обобщения данных о серотонинергической активности наиболее близких по химическому строению соединений; использование методов 2D-QSAR анализа с помощью прогнозных систем определения активности неиспытанных химических веществ (PASS, TestSim) [Филимонов Д.А., 2006; Васильев П.М., 2009]; методы консенсусного обобщения результатов прогнозов активности с экспериментальными ретроспективными

данными о 5-НТ_{2/3}-активности соединений; проспективное экспериментальное тестирование новых химических соединений.

На примере поиска 5-НТ_{2A}-антагонистов в исследовании была доказана эффективность предложенной методологии консенсусного обобщения прогнозных правил при одновременном снижении коэффициентов значимости оценки фармакологической активности по каждому из используемых прогнозных методов в отдельности. Коэффициент (R) корреляции между консенсусным прогнозным суждением об активности (5-НТ_{2A}) и итоговым значением активности, полученным при экспериментальном фармакологическом тестировании, равнялся 0,8; превосходя аналогичный показатель для монопрогнозов при тех же параметрах значимости оценки: коэффициент корреляции, в зависимости от используемой системы (PASS, TestSim), а также набора эталонных структур (TestSim) не превышал 0,6.

Полученные значения коэффициентов корреляции монопрогнозов с результатами экспериментальных исследований обусловлены понижением критериев значимости прогнозов в ходе исследований, что закономерно должно приводить к повышению числа ложноположительных прогнозных оценок. Однако, стоит отметить, что при попытке увеличить значимость таких оценок, как в системе PASS (увеличение отношения вероятностей наличия активности к ее отсутствию - P_a/P_i выше 1,0), так и в системе TestSim (применение общего коэффициента сходства – ОКС – выше максимального, относительно эталонной выборки), наблюдалось практически полное исключение структурных описаний изучаемой выборки конденсированных азолов из числа прогнозируемых соединений как активных/высокоактивных, что не соответствовало конечным результатам экспериментального тестирования. По всей вероятности, это обусловлено дефицитом описания структур, аналогичных по химическому строению исследуемым представителям азолов с 5-НТ_{2A/3}-активностью в эталонных базах, и, как следствие, повышением числа ложноотрицательных оценок.

Другой особенностью предложенной методологии поиска явилось использование принципа преемственности, реализованного в виде количественного, статистически обобщающего подструктурного анализа ретроспективных данных (из числа описанных и ранее изученных веществ) о величине 5-НТ_{2A/3}-активности наиболее близких по строению соединений. При этом в качестве основного определяющего развитие высокого 5-НТ_{2A}- и 5-НТ₃-антисеротонинового действия дескриптора было использовано описание структуры базового ядра молекулы – «кóра»²⁴. Такое интегрирование данных позволило повысить эффективность направленного поиска активных и высокоактивных соединений среди еще не изученных веществ.

В результате исследования из общего числа (1532) изучаемых структурных описаний новых производных азола с помощью указанного подхода, а также исходя из соответствия физико-химических свойств конечных субстанций условиям тестирования *in vitro*, для экспериментального исследования на предмет наличия 5-НТ_{2A}-активности, было отобрано 154, 5-НТ₃-активности – 128.

При этом в результате изучения *in vitro* было установлено, что для 61% рекомендованных веществ, характерно наличие значимого 5-НТ_{2A}-антисеротонинового эффекта, достоверно отличающегося от показателей контрольных измерений. Для 17 из них уровень активности соответствовал либо превосходил аналогичный показатель препарата сравнения ципрогептадина.

Для 49 веществ, было выявлено статистически значимое подавление 5-НТ₃-опосредованных эффектов серотонина. При этом 10 соединений (Г8, Г12, Г10, Г21, В11, Г20, Г6, Г4, Е63, Е91) превосходили или соответствовали по уровню активности метоклопрамиду, 3 из которых (Г8, Г12, Г10)

²⁴ Кор (ядро, «сердцевина») (медицинская химия) - это достаточно общая базовая структура, как правило, без радикалов.

равнялись по величине антисеротонинового эффекта более селективному ондансетрону.

Иную методологию использовали для поиска активных соединений в отношении 5-HT₄-рецепторов. В исследовании проводили эмпирическую оценку структурного сходства, а также оценку перспективности подклассов конденсированных азолов только с помощью систем PASS и TestSim, без использования эталонной выборки 5-HT₄-активных, близких по структуре соединений и без интеграции данных ретроспективного подструктурного анализа. Это было обусловлено впервые проводимым поиском 5-HT₄-агонистов среди изучаемых подклассов конденсированных азолов и отсутствием экспериментальных данных о 5-HT₄-активности наиболее близких структурных аналогов.

В результате обобщения прогнозных оценок 5-HT₄-активности представителей конденсированных азолов, для экспериментального исследования *in vitro* из 1532 были отобраны 103 вещества.

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

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

использованного похода в сравнении с более полной предложенной для направленного скрининга 5-НТ_{2A/3}-антагонистов консенсусной методологией.

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

Ранее в работах М.В. Черникова, И. И. Горягина 2008 и 2013 г. было показано, что наибольшую целесообразность в плане поиска 5-НТ₂- и 5-НТ₃-антагонистов среди производных бензимидазола представляют N⁹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы. При этом наиболее значимым для развития 5-НТ₂-антагонистического действия считался пиперидиноэтильный заместитель в N⁹ положении [Черников М.В., 2008; Горягин И.И., 2008; Черников М.В., 2013], а для развития 5-НТ₃-антагонистического эффекта – пиперидиноэтильный либо диэтиламиноэтильный [Киабия С.Т., 2003; Черников М.В., 2008].

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

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

В результате проведения обобщенного анализа полученных в настоящем исследовании данных с ранее показанными в работах Черникова М.В., Горягина И.И. [Черников М.В., 2008; Горягин И.И., 2008], были выявлены заместители в положениях 2, 9 наиболее значимого имидазо[1,2-*a*]бензимидазольного ядра, оказывающие преимущественное влияние на развитие высокого 5-НТ_{2A}-антагонистического действия. В положении С² ими явились 4-метоксифенил, 2-тиенил, *трет*-бутил; в положении N⁹ – диэтиламинопропил, диэтиламиноэтил. При этом, значимость пиперидиноэтильного заместителя, напротив, существенно изменилась до выраженного отрицательного влияния. Кроме того, дополнительно, в качестве С²-заместителей, вызывающих значимый отрицательный вклад в развитие указанного действия, были определены: метил, 4-гидроксифенил, 3,4-дигидроксифенил.

Для заместителей в положении 3 в результате обобщения наличия статистически достоверного влияния изученных заместителей, в том числе с учетом ретроспективных данных, выявлено не было.

В результате проведения частотного анализа уровня активности от физико-химических свойств, были определены диапазоны значений параметра липофильности ($1,86 \leq \text{LogP} < 2,37$ для С²-заместителей; $0,88 \leq \text{LogP} < 1,35$ для N⁹-заместителей) и стерического параметра молекулярной рефракции ($17,55 \leq \text{MR} < 24,67$ для С²-заместителей), определяющие наиболее значимое влияние на возможность развития высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности среди соединений, содержащих имидазо[1,2-*a*]бензимидазольный «кор».

В результате суммарной количественной оценки проведенных анализов была выявлена обобщенная зависимость между наличием высокой 5-НТ_{2A}-антагонистической активности и описанными выше свойствами различных подклассов азолов, реализованная в итоговой обобщенной химической

структуре – «скаффолде»²⁵. Основная часть «скаффолда» сформирована 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом.

Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются $C^{2/4}$ -этоксифенил; N^9 -диэтиламиноэтил, а также пропильный фрагмент вместо этильного в составе N^9 -заместителей.

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

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

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

Учитывая малое количество выявленных 5-НТ₄-активных соединений, наиболее статистически обоснованные зависимости между наличием 5-НТ₄-агонистического эффекта и свойствами исследованных конденсированных

²⁵ Скаффолд (медицинская химия) – базовая молекула (кор, ядро), модифицированная некоторыми структурными фрагментами (например, заместителями), присутствие которых может определять наличие или высокий уровень заданного вида биологической активности.

азолов были получены для отрицательного влияния на изучаемый признак. Установлено, что наиболее выраженный отрицательный вклад в развитие 5-HT₄-агонистического действия вносят N¹-замещенное-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное и N¹,C³-замещенное индольное ядро, а также N⁹- и N¹-замещенные-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазольные и N¹-бензимидазольная гетероциклические основы.

Наибольшее положительное влияние на развитие 5-HT₄-активности имеет сочетание таких признаков как N⁹-замещенное-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольное ядро молекулы и *a*-нафтильный заместитель в положении C².

Обращает на себя внимание выявленная отрицательная тенденция влияния 4-метоксифенильного заместителя в N⁹-положении на возможное проявление 5-HT₄-агонистических свойств соединений. В то же время данный дескриптор, напротив, характерен для наличия высокой 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-антагонистической активности.

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

Для 5-HT_{2A}-активных соединений (E75, E92, E56, E36, E53) с использованием молекулярного 3D-моделирования была предварительно подтверждена возможность взаимодействия с активным центром 5-HT_{2A}-рецептора, описанным для селективного 5-HT_{2A}-антагониста кетансерина [Barden M.R., 2007; Nichols D.E., 2012; Ponnalaa S., 2014]. Выявленное при этом сходство по величине минимальной энергии докирования с кетансерином позволяет предположить взаимодействие изученных соединений с известными для последнего точками связывания. По-видимому, благодаря гетероциклическому фрагменту может образовываться π-связь с фенилаланином (Phe339, 340) рецептора, которое также усиливается за счет метоксифенильного/этоксифенильного заместителя в C² положении

«скаффолда». Вероятна способность образования ионных связей между протонированной аминогруппой N⁹-радикалов лигандов и COO⁻ группой аспарагиновой кислоты (Asp155).

Сходные данные по 3D-докированию в активный центр 5-HT₄-рецептора были получены для наиболее активных среди выявленных 5-HT₄-агонистов (E107, E17). При этом также были получены сопоставимые с 5-HT₄-агонистами ML10302 и RS57639 величины минимальной энергии связывания с рецептором, позволяющие предполагать взаимодействие выявленных соединений с аналогичными для веществ сравнения точками связывания. По всей вероятности *α*-нафтальный заместитель в положении C² может образовывать гидрофобное взаимодействие с карманом, представленным триптофаном (Trp146), фенилаланином (Phe275, 276) и аспарагином (Asp279) [Mialet J., 2000]; а аминогруппа в составе N⁹-заместителя формировать ионный мостик с остатком аспарагина (Asp100).

Обобщая результаты, полученные при исследовании 5-HT_{2A}-, 5-HT₃- и 5-HT₄-опосредованных эффектов расширенного класса конденсированных азолов, можно заключить, что выявленные закономерности о структурно-функциональной взаимосвязи, зависимости уровня активности от физико-химических свойств, обобщенные с ретроспективными данными (для 5-HT_{2A/3}-активности), позволили выявить новые и существенно дополнить ранее известные фундаментальные представления о химико-фармакологических свойствах указанного класса. В результате выполнения первого этапа настоящего исследования, расширенный класс конденсированных азолов можно позиционировать как перспективный источник соединений с высокой серотонинергической активностью.

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

В результате дозозависимого исследования *in vitro*, предварительного изучения среднесмертельной дозы, наиболее перспективным для дальнейшего исследования было выбрано соединение E75 (химический шифр РУ-476) – 2-(4-метоксифенил)-9-(2-диэтиламиноэтил)имидазо[1,2-а]бензимидазола динитрат. Выявленное вещество (дальнейшее рабочее название «Авазол») превосходило по уровню активности *in vitro* (IC_{50} 38 нМ vs. 410 нМ), показателю острой токсичности (LD_{50}) (в 1,8 раза менее токсично) препарат сравнения ципрогептадин.

При исследовании аспектов механизма действия авазола на рецепторном уровне, с использованием метода радиолигандного анализа было подтверждено наличие у него конкурентного 5-НТ_{2А}-антагонистического действия, сопоставимого по величине pIC_{50} со спипероном.

В последнее время все большее внимание обращает на себя концепция создания биологически активных веществ с так называемым «мультитаргетным» действием [Anighoro A., 2014; Jacobson K.A., 2015]. Согласно общей идее данной концепции, в противоположность стремлению к созданию высокоактивных и высокоселективных соединений считается целесообразной разработка новых фармакологических агентов, обладающих комплексом взаимодополняющих механизмов действия, более эффективных для использования в конкретных патофизиологических условиях [Hopkins A.L., 2008]. Представляется, что менее выраженное воздействие такого вещества на каждую мишень в отдельности, но в сочетании с «мультитаргетностью», может открыть перспективы к уменьшению токсичности при увеличении и расширении фармакологической эффективности.

Интересно, что в большинстве случаев для используемых сегодня высокоактивных фармакологических агентов с высокой долей вероятности можно выделить не одну, а несколько мишеней воздействия в организме [там же]. В пользу высказываемой гипотезы свидетельствует эволюция

представлений о механизмах действия агентов, ранее считавшихся высокоселективными. Так, например, длительное время кетансерин позиционировался как высокоселективный 5-HT_{2A}-антагонист. В настоящее время в более высоких концентрациях доказана его «мультитаргетность» – активность не только в отношении 5-HT_{2A}-рецептора, но и 5-HT_{1D}-, 5-HT_{2B/C}-, 5-HT₇-, $\alpha_{1A/B/D}$ -, D₅-рецепторов [5-Hydroxytryptamine receptors: IUPHAR/BPS].

В этой связи особый интерес приобретает детализация механизмов действия любого нового биологически активного вещества, приводящая к более адекватному пониманию его возможного применения.

С помощью методов исследования прямого рецепторного влияния на клеточном уровне, а также опосредованного рецепторного действия в условиях изолированных органов/тканей для авазола было выявлено TAAR5-антагонистическое действие в высоких концентрациях (10-100 мкМ); а также исключены некоторые рецепторные эффекты (5-HT_{3/4}-, TAAR1, D₂-, β_2 -, M-, P2Y₁-ергические), влияние на кальциевый трансмембранный ток в диапазоне эффективных концентраций, характерных для выявленной 5-HT_{2A}-антагонистической активности вещества.

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

5-HT_{2A}-антагонистическое влияние авазола на серотонинергическую систему было доказано в тесте с 5-гидрокситриптофаном, а также дополнительно была выявлена способность уменьшать проявления ГАМК_A-антагониста пикротоксина, что может свидетельствовать о ГАМК-миметическом эффекте изучаемого соединения. Возможно, действие авазола на ГАМК-ергическую систему является следствием 5-HT_{2A}-зависимого угнетения ГАМК-ергических нейронов, известного, например, для синаптической регуляции в теменной (аудиальной) области [García-Oscos F., 2015], в таламических ядрах [Goitia B., 2015]. В то же время, руководствуясь

концепцией «мультитаргетности», выявленные компоненты механизма действия, могут быть эффективны в реализации анксиолитической активности вещества.

В исследовании также была выявлена способность авазола потенцировать эффекты фенамина (продолгование стереотипного поведения). В то же время у авазола отсутствует влияние на эффекты апоморфина и галоперидола, а также собственная способность вызывать стереотипное поведение. Совместно с показанным отсутствием прямого D₂-рецепторного действия *in vitro* полученные данные, в целом, могут свидетельствовать об отсутствии выраженного собственного дофаминергического действия у авазола. Возможно, этот феномен связан с усилением влияния фенамина на транспортеры обратного захвата некоторых катехоламинов в присутствии авазола, характерным, в частности, для ритансерина [Решек Е.А., 1997; Ruiu S., 2000], что требует дополнительного исследования на синаптическом уровне.

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

С учетом выявленных аспектов механизма действия у авазола были изучены фармакологические свойства в условиях моделирования экспериментальной патологии.

Считается, что среди периферических эффектов наибольший клинический потенциал 5-HT_{2A}-антагонистов связан с возможностью устранять серотонинопосредованное влияние на мозговой кровоток [Kovács A., 2012], функциональное состояние тромбоцитарного звена [Lin O.A., 2014], имеющих наиболее важное значение в развитии транзиторных церебральных дисциркуляторных состояний. В этой связи 5-HT_{2A}-блокаторы

могут позиционироваться как возможные корректоры мигренозных состояний, особенно в случае хронической формы заболевания [Амелин А.В., 2011].

Учитывая методологические особенности исследования противомигренозных свойств биологически активных соединений, связанные, в первую очередь, со сложностью моделирования подобной патологии в условиях эксперимента, дальнейшее исследование авазола проводили с использованием рекомендованного для доклинического изучения набора методов [Мирзоян Р.С., 2012], позволяющих оценить системную и церебральную гемодинамику в обычных условиях и при серотониновой нагрузке, при нормальном кровоснабжении головного мозга и в условиях ишемии.

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

Более значимое антисеротониновое действие авазола (минус 66,7%) выявлено при серотониновой нагрузке у животных с моделированной субтотальной ишемией головного мозга (для ципрогептадина аналогичный показатель соответствовал значению минус 46,8%). По всей вероятности, это связано с усилением сосудистого действия серотонина, в отличие от остальных катехоламинов, при ишемии [Топчян А.В., 1998] и, как следствие, способностью 5-НТ_{2А}-антагонистов устранять его эффекты.

Также установлено, что для авазола не характерно нарушение скорости церебрального кровотока, изменение уровня систолического и диастолического артериального давления, а также хронотропизма сердца в нормальных условиях у интактных животных. При этом для кетансерина и ципрогептадина, напротив, данные эффекты статистически выражены, и

связаны, в первую очередь, с блокирующим влиянием последних на α_1 - и H_1 -рецепторы гладких миоцитов сосудов.

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

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

Принимая во внимание иные аспекты патогенеза дисциркуляторных мозговых нарушений [Supornsilpchai W., 2010; Danese E., 2014] дополнительно были изучены антиагрегантные, вязкостные, тромбогенные свойства авазола, а также его анальгетический потенциал.

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

По всей вероятности это обуславливает отсутствие для авазола, равно как и для ципрогептадина и кетансерина, влияния на вязкостные параметры

стандартизированной по гематокриту крови, а также антитромботического действия *in vivo*.

В результате проведенного исследования с помощью моделирования центральных и периферических механизмов болевых реакций [Воронина Т.А., 2012б] у авазола было выявлено выраженное анальгетическое действие. При этом было установлено, что для авазола характерно развитие анальгетического действия как при супраспинальном и спинальном уровне организации боли, так и в условиях периферической гипералгезии.

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

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

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

Полученные данные об анальгетическом действии авазола коррелируют с представлением о проноцицептивном влиянии 5-НТ_{2A}-рецепторного звена на уровне афферентных нервных окончаний в условиях провоспалительной реакции, а также восходящих ноцицептивных путей. Huang В. и соавторами была показана связь между возбуждением 5-НТ_{2A}-рецепторов и развитием болевой импульсации в условиях воспалительной реакции [Huang В.Q., 2015]. Цикл исследований, проведенный группой во главе с Supornsilpchai W. подтверждает непосредственное участие 5-НТ_{2A}-

рецепторов в формировании боли на уровне корковых и субкорковых структур [Supornsilpchai W., 2010; Srikiatkachorn A., 2014].

Принимая во внимание описанное участие серотониновых 2A рецепторов в формировании тревожного поведения у животных [Benyamina A., 2012; Clinard C.T., 2015], а также выявленное ГАМК-стимулирующее влияние авазола на уровне взаимодействия с пикротоксином, следующим направлением изучения фармакодинамических свойств нового 5-HT_{2A}-антагониста явилось исследование его анксиолитического потенциала.

В результате исследования было доказано наличие анксиолитического действия авазола как при остром, так и при 14-дневном курсе введения. Установлено, что для авазола характерно уменьшение выраженности тревожного поведения сопоставимое с диазепамом как в условиях конфликтного (тест Vogel), так и неконфликтного (приподнятый крестообразный лабиринт) ангиогенеза, коррелирующего с показателями выхода в центр площадки в тесте «открытое поле». При этом не отмечалось развития уменьшения анксиолитического действия при введении вещества в течение 14-дневного периода.

Учитывая описанные серотонинергические механизмы ангиогенеза, а также проводя параллели с эффектами ритансерина [Ruiu S., 2000; Begg D.P., 2005] можно предположить, что выявленные противотревожные эффекты авазола могут быть связаны с блокадой 5-HT_{2A}-рецепторов в базолатеральной миндалине [Clinard C.T., 2015], околотоводопроводном пространстве среднего мозга [Gomes K.S., 2009], а также кортикальных образованиях [Benyamina A., 2012].

В заключение исследования свойств авазола была охарактеризована его острая токсичность и нейротоксикологический профиль.

Величина среднесмертельной дозы (LD₅₀) авазола (на мышах-самцах при внутрибрюшинном пути введения) составляет 77,6 мг/кг, что позволяет отнести авазол к соединениям 3 класса токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

Обращает на себя внимание меньшая токсичность авазола в сравнении с известными 5-HT_{2A}-антагонистами. Для ципрогептадина характерна более низкая среднесмертельная доза 15 мг/кг при внутривенном, и 43,3 мг/кг при внутрибрюшинном пути введения [ARZNAD, 1951; Engelhardt G., 1975; RTECS. URL: <http://ccinfoweb2.ccohs.ca/rtecs/records/XZ6157235.html>]; для вещества сравнения кетансерина – 37,1 мг/кг (при внутривенном введении) и 71,5 мг/кг (при внутрибрюшинном пути введения) [Ketanserin: Drug future Base; 1960; RTECS]; для ритансерина – 28,2 мг/кг (внутривенно) [RTECS].

Также было установлено, что в эффективных дозах (1/150 – 1/15 от LD₅₀), демонстрирующих выраженное антисеротониновое действие *in vivo*, для авазола не характерно изменение основных параметров, отражающих функционально-поведенческий статус животных (поведенческие реакции, нервно-мышечная возбудимость, вегетативные реакции), за исключением отражающих анальгетическое и анксиолитическое действие. Минимальные значимые отличия от указанных показателей в контрольных группах отмечаются при использовании авазола в дозе 15 мг/кг (приблизительно соответствующей 1/5 от LD₅₀) и более.

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

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

В результате расширенного дозозависимого исследования по совокупности характеристик (подавление серотонинового спазмогенного эффекта $\Delta\%$ и IC_{50} ; среднесмертельная доза) в качестве наиболее перспективного для более детального изучения было выбрано вещество Г12 (химический шифр РУ-1276) 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола дигидрохлорид (дальнейшее рабочее название «Эметазол»).

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

В диапазоне концентраций от 10 нМ до 10 мкМ избирательность в отношении 5-НТ₃-опосредованного действия у эметазола оставалась высокой. Для него было исключено влияние на 5-НТ_{2A}-, 5-НТ₄-, D₂-, β_2 -, АТ₁-, P2Y₁-рецепторы, а также на рецепторы, ассоциированные со следовыми аминокислотами 1 и 5 типа (TAAR1, TAAR5).

В более высоких концентрациях с помощью метода ацетилхолиновой стимуляции спазмогенного эффекта изолированной подвздошной кишки морской свинки было установлено, что эметазол демонстрирует М-холиноблокирующее действие ($pIC_{50}=4,5$).

Возможно, уменьшение селективности эметазола в области высоких концентраций может быть обусловлено неселективным мембранотропным эффектом соединения, известного для различных представителей конденсированных азолов [Вислобоков А.И., 2010]. Вместе с тем возвращаясь к концепции «мультитаргетности» при разработке новых биологически активных соединений [Hopkins A.L., 2008; Anighoro A., 2014; Jacobson K.A., 2015], выявленное М-холиноблокирующее действие эметазола может оказать дополнительное усиление фармакологического влияния при

коррекции D-формы синдрома раздраженного кишечника, перспективное для 5-HT₃-антагонистов [Camilleri M., 2014].

Дополнительное представление об аспектах механизма действия эметазола было получено с помощью методов нейромедиаторного фармакологического анализа *in vivo*.

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

Также было исключено действие эметазола на N-холинергическую (взаимодействие с никотином), адренергическую (тесты взаимодействия с клофелином, резерпином) передачу, исключено наличие MAO-ингибирующего (взаимодействие с L-ДОФА) и 5-HT₂-зависимого (взаимодействие с 5-ГТФ) действия.

Для известных 5-HT₃-антагонистов как правило характерно специфическое противорвотное действие [Navari R.M., 2015]. При этом не исключается возможность параллельного влияния соединений на дофаминергическое звено пусковой зоны рвотного центра, известного, например, для метоклопрамида. В тестах взаимодействия с апоморфином в широком диапазоне доз, галоперидолом, фенамином гипотеза о возможном влиянии эметазола на дофаминергическую нейротрансмиссию была опровергнута.

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

На следующем этапе, исходя из доказанного 5-НТ₃-антагонистического действия эметазола, были изучены его противорвотные свойства.

Антиэметическое действие блокаторов 5-НТ₃-рецепторов связано с патогенезом развития тошноты и рвоты при токсическом цитостатическом воздействии на энтерохромаффинные клетки тонкого кишечника [Rojas С., 2012; Navari R.M., 2015]. Стимуляция цитостатиками или их метаболитами последних вызывает увеличение синтеза и высвобождения серотонина, который, взаимодействуя с третьим семейством серотониновых рецепторов афферентных нервных волокон, вызывает аномальную импульсацию *n. vagus* и приводит к выделению серотонина в пограничной зоне и стимуляции 5-НТ₃-рецепторов пусковой зоны рвотного центра.

В исследовании с использованием модели цисплатиновой рвоты у собак по методу Fukui Н.А. [Fukui Н.А., 1992] было доказано, что эметазол способен устранять выраженность цитостатического эметогенного действия в области селективных доз 0,15-1,5 мг/кг. Так при введении эметазола, равно как и ондансетрона наблюдалось выраженное подавление (в 2,5-2,6 раза) показателей (латентность приступов рвоты, количество, продолжительность) относительно характеристик контрольной группы.

Обобщая полученные данные о противорвотном действии изученного вещества в условиях цитостатического эметогенеза, наличии выраженной 5-НТ₃-антагонистической активности *in vitro* и *in vivo*, селективной в диапазоне эффективных доз, а также об отсутствии прямого дофаминергического действия, можно заключить, что эметазол демонстрирует специфическое 5-НТ₃-зависимое антиэметическое действие, не уступающее по величине ондансетрону.

Другой перспективный аспект клинического применения 5-НТ₃-антагонистов связан с подавлением серотонинзависимой стимуляции секреции и перистальтики тонкого кишечника, а также с уменьшением формирования энтероноцицептивной импульсации [Плотникова Е.Ю., 2014; Yu Y., 2015]. Считается, что наибольшее специфическое подавление

болевого и пропульсивного действия эндогенного медиатора целесообразно при D-форме синдрома раздраженного кишечника, что расширяет возможности использования 5-HT₃-блокаторов [de Greck M., 2014; Lacy B.E., 2015].

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

В результате исследования антидиарейных свойств на моделях стрессиндуцированной и серотонининдуцированной дефекации установлено, что эметазол демонстрирует антидиарейное действие, сопоставимое по эффективности с ондансетроном. При этом было показано, что наиболее высокий антидиарейный эффект эметазола наблюдается в более высоких дозах (1,5 мг/кг и более), чем выявленное антиэметическое действие. Вероятно, как и предполагалось, подобное действие связано с вовлечением M-холиноблокирующего механизма действия эметазола в высоких дозах, способного усиливать 5-HT₃-опосредованное антиспастическое действие.

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

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

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

при гипертермическом раздражении, уступая при этом действию опиоидного анальгетика буторфанола.

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

В рамках данного исследования также была предпринята попытка изучения анксиолитической активности эметазола. Считается, что 5-НТ₃-антагонисты неоднородны по способности оказывать противотревожное действие, в ряде случаев отмечаются существенные видовые отличия по данному эффекту [Olivier B., 2000]. С одной стороны у некоторых соединений, например N-циклогексил-3-метоксихиноксалин-2-карбоксиамида [Gupta D., 2015], трописетрона отмечается способность к устранению тревожной поведенческой активности животных. С другой стороны, для ондансетрона отмечается непостоянство подобного действия, либо полное его отсутствие в ряде исследований [Nowakowska E., 1998; Hoşten T., 2011].

В результате проведения комплексного исследования анксиолитического действия у эметазола с использованием конфликтного и неконфликтного моделирования тревожного состояния у животных, в условиях острого и 14-дневного введения эметазола не было получено значимых доказательств его наличия.

Высказываются предположения, что анксиолитическое действие серотонинергических средств может быть связано с прямым или опосредованным влиянием последних на ГАМК-ергические нейроны [Olivier J.D., 2013]. В свою очередь, принимая во внимание выявленное отсутствие ГАМК_A-стимулирующего влияния у эметазола, это согласуется с отсутствием у него значимого противотревожного действия.

На заключительном этапе настоящего исследования были исследованы общетоксикологические характеристики эметазола.

Все соединения, принадлежащие к классу 5-HT₃-антагонистов, относятся к высокотоксичным веществам. Это обусловлено высокой рецепторной ионотропной активностью последних и вовлеченностью 5-HT₃-звена в регуляцию большого количества физиологических процессов организма. Несмотря на высокие абсолютные показатели острой токсичности (LD₅₀), ондансетрон (LD₅₀=10,8 мг/кг) [Yakuri, 1972], гранисетрон (LD₅₀=17 мг/кг) [Granisetron. URL: <http://www.drugfuture.com/toxic/q68-q200.html>] зарегистрированы в качестве лекарственных препаратов и разрешены к использованию FDA, EMEA, Научным центром экспертизы средств медицинского применения Минздрава России.

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

С целью определения минимальных токсических доз эметазола, более детально было исследовано возможное наличие у него нейротропных побочных и токсических эффектов в широком диапазоне доз, от эффективных до минимальных летальных. Было установлено, что при введении животным эметазола в эффективных для антиэметического действия дозах 0,15 – 1,5 мг/кг (что соответствует 1/250 – 1/25 от LD₅₀) изменения реакций со стороны влияния на соматоневрологический статус отсутствовали. Наименьшей дозой вещества, при введении которой фиксировались значимые признаки изменения соматоневрологического статуса животных явилась доза 15 мг/кг.

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные в ходе проведенного исследования данные, основываясь на результатах многоэтапного виртуального изучения различных представителей расширенного класса конденсированных азолов *in silico*, экспериментального изучения их 5-HT_{2A/3/4}-ергических свойств *in vitro* и *in vivo*, проведенных проспективных и обобщенных с ретроспективными данными структурно-функциональных анализов можно с достаточно высокой степенью вероятности утверждать, что конденсированные азолы – перспективный класс для поиска и разработки новых серотонинергически активных соединений (Рисунок 36).

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

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

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

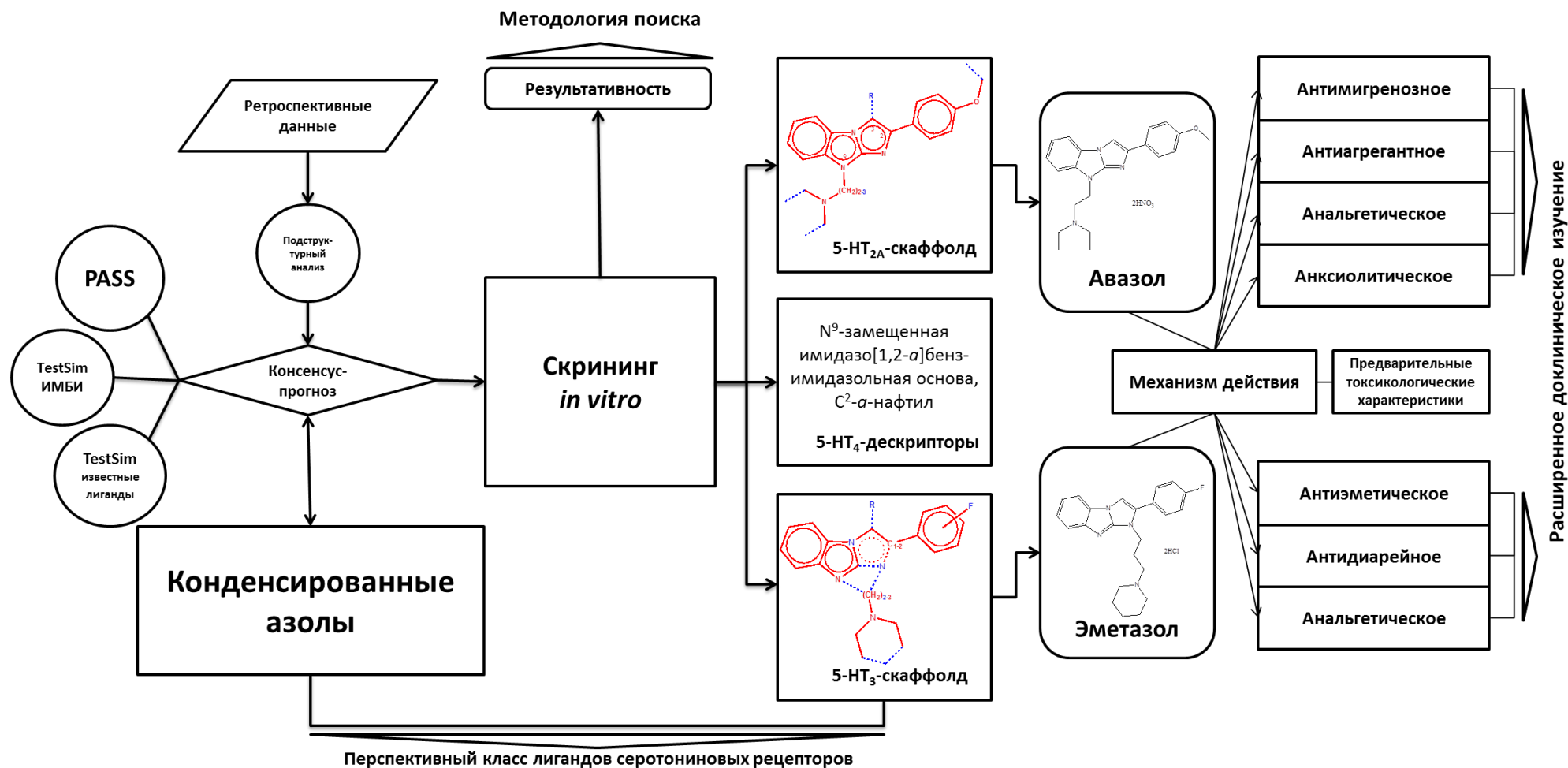


Рисунок 36. Конденсированные азолы - перспективный класс для поиска новых лигандов серотониновых рецепторов.

Примечания: ИМБИ – имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы

синтеза и экспериментального поиска *in vitro* новых лигандов 2A, 3 и 4 типов серотониновых рецепторов.

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

Результаты проведенных фармакологических исследований выявленного нового 5-HT_{2A}-антагониста авазола позволяют рассматривать его как перспективную основу для разработки и создания нового противомигренозного средства с 5-HT_{2A}-блокирующим механизмом действия с антиагрегантными, анальгетическими и анксиолитическими свойствами, более активного, чем препарат сравнения с 5-HT₂-антагонистическим профилем ципрогептадин.

Полученные в результате фармакологических исследований данные об активности и предварительном токсикологическом профиле нового 5-HT₃-антагониста – эметазола позволяют рассматривать его в качестве перспективной основы для разработки нового, менее токсичного, чем эталонный препарат сравнения ондансетрон, серотонинергического антиэметика с противодиарейными и анальгетическими свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Консенсусная методология поиска новых 5-HT_{2A/3}-активных соединений (включающая методы ретроспективного анализа «структура-эффект» соединений с аналогичной активностью; методы прогноза активности на основе 2D-QSAR/SAR анализа, реализованные в системах PASS и TestSim; методы консенсусного обобщения данных и методы экспериментального изучения активности веществ *in vitro*) позволяет эффективно выявлять 5-HT_{2A}- и 5-HT₃-высокоактивные вещества среди представителей класса конденсированных азолов.
2. Для представителей конденсированных азолов, а именно 1,3-дизамещенных индолов, 1,2-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 1,9-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов характерна высокая 5-HT_{2A/3}-антагонистическая и 5-HT₄-агонистическая активность.
3. Для исследованных соединений из класса конденсированных азолов:
 - наличие высокой 5-HT_{2A}-антагонистической активности определяет обобщенная 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазольная структура с вариативными компонентами в виде C²-4-этоксифенила; N⁹-диэтиламинопропила либо N⁹-диэтиламиноэтила;
 - наличие высокого 5-HT₃-антагонистического действия определяет обобщенная структура в виде N¹,C³-замещенной индольной либо N¹,C²-дизамещенной-имидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы с липофильным диэтиламинопропильным радикалом в N¹-положении и фенил-замещенным фрагментом в составе C²/C³- заместителя. Вариативными компонентами указанной обобщенной структуры являются пиперидиновый фрагмент вместо диэтиламина в составе N¹-

- заместителя, а также фторфенил либо метоксифенил в качестве указанного фенил-замещенного фрагмента;
- наличие 5-HT₄-агонистического действия зависит от сочетания в структуре С²,N⁹-дизамещенной имидазо[1,2-а]бензимидазольной основы и *α*-нафтильного заместителя в С²-положении.
4. Динитрат 9-(2-диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола – авазол – является конкурентным 5-HT_{2A}-антагонистом. Влияние авазола на серотонининдуцированную активацию тромбоцитов *in vitro* в 1,7 раза превосходит эффект ципрогептадина и соответствует кетансерину.
5. Авазол эффективно устраняет вызванное серотонином изменение:
- скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии и во внутренней сонной артерии, превышая по активности препарат сравнения ципрогептадин более чем на 20-30%;
 - частоты сердечных сокращений крыс, по уровню эффекта сопоставимо с кетансерином и в 2 раза более выражено, чем действие ципрогептадина;
 - агрегации тромбоцитов *in vitro*, в 1,4 и в 2,5 раза превосходя действие ципрогептадина и кислоты ацетилсалициловой соответственно.
6. Авазол уменьшает развитие болевых реакций, вызванных термическими, электрическими, химическими стимулами. По большинству показателей анальгетическое действие авазола превосходит эффект ципрогептадина в 1,7-3,5 раза, и незначительно уступает буторфанолу. В условиях формалиновой гипералгезии авазол соответствует по уровню эффекта диклофенаку в I фазе и на 40% превышает его во II фазе ноцицептивного ответа.
7. В условиях моделирования тревожного поведения у крыс в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Наказуемое взятие воды по Vogel» авазол при остром и 14-дневном введении оказывает анксиолитическое действие, по большинству показателей

- превосходящее эффект ципрогептадина и соответствующее активности диазепама в дозе 1 мг/кг.
8. Дигидрохлорид 1-пиперидинопропил-2-(4-фторфенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – эметазол – проявляет свойства антагониста 5-HT₃-рецепторов. Уровень активности эметазола в условиях спазмогенного серотонинопосредованного сокращения гладкомышечного препарата изолированного отрезка подвздошной кишки крысы в 2,5 раза превышает эффект метоклопрамида и соответствует действию ондансетрона.
 9. В условиях экспериментальной патологии *in vivo* эметазол демонстрирует выраженные антиэметические и противодиарейные свойства, соответствующие по величине ондансетрону; анальгетические свойства, по большинству показателей превосходящие активность ондансетрона до 2,7 раз и не уступающие диклофенаку. Для эметазола не характерно наличие значимого анксиолитического действия.
 10. По показателю среднесмертельной дозы: авазол является в 1,8 раза менее токсичными, чем в ципрогептадин; эметазол – в 3,6 раза менее токсичными, чем ондансетрон. Для авазола и эметазола не характерно влияние на соматоневрологический статус животных в дозах, демонстрирующих специфическое фармакологическое действие.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)

5-НТ_{2A/3/4} – 2A/3/4 тип серотониновый

5-ГТФ – 5-гидрокситриптафан

АДФ – динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты

ДАД – диастолическое артериальное давление

Д-форма СРК – диарейная форма синдрома раздраженного кишечника

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МАО – моноаминоксидаза

ОКС – общий коэффициент сходства

САД – систолическое артериальное давление

СРК – синдром раздраженного кишечника

ТМ – трансмембранный домен рецептора

ФЛ_С – фосфолипаза С

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

Asn – аспарагин

BRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии

DOB – 1-(4-бromo-2,5-диметоксифенил)пропан-2-амин

DOI – 1-(4-йодо-2,5-диметоксифенил)пропан-2-амин

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

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

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

IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин

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

LSD – (+)-лизергиновой кислоты диэтиламид

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин

MR – молекулярная рефракция

Phe – фенилаланин

Pro – пролин

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

Rluc – Ренилла (*Renilla*) -люцифераза

SD – доверительный интервал

TAAR1 – рецепторы к следовым аминокислотам 1 типа

TAAR5 – рецепторы к следовым аминокислотам 5 типа

Trp – триптофан

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, М.Е. Палonosетрон в профилактике тошноты и рвоты при проведении высоко и умеренно эметогенной химиотерапии [Текст] / М.Е. Абрамов, К.С. Лодыгина // Фарматека. – 2014. – Т.8. – №281. – С.29-34.
2. Александрин, В.В. Влияние серотонина на дыхание, мозговой кровотока и артериальное давление у крыс [Текст] / В.В. Александрин, Н.Н. Тарасова, И.А. Тараканов // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2005. – Т.139. – №1. – С.72-76.
3. Амелин, А.В. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия [Текст]: руководство для врачей. / А.В. Амелин, Ю.Д. Игнатов, А.А. Скоромец, А.Ю. Соколов. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 256 с.
4. Андреева, Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ [Текст] / Н.И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.
5. Анисимова, В.А. Гидробромид 9-(2-диэтиламиноэтил)2-фенилимидазо[1,2-а]бензимидазола, проявляющий свойства антагониста серотониновых 5-HT₃-рецепторов [Текст]: пат. 2285006 Рос. Федерация: С07D487/04, А61Р1/08, А61К31/415 / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, М.В. Черников [и др.]; заявители и патентообладатели Юж. науч. центр Рос. акад. наук, Волгогр. гос. мед. универ.", Науч.-иссл. инс. физ. и орг. химии Рост. гос. унив., Волгогр. науч. центр РАМН и Админ. Волгогр. обл. - № 2005118284/04; заявл. 14.06.05; опубл. 10.10.06, Бюлл.№ 28. – 5 с.

6. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств [Текст] / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С.13-24.
7. Васильев, П.М. Информационная технология прогноза фармакологической активности химических соединений [Текст]: дисс. ... докт. биол. наук: 14.00.25 / Васильев Павел Михайлович. – Волгоград. – 2009. – 428 с.
8. Васильев, П.М. Исследование связи между биологической активностью и физико-химическими параметрами производных имидазо[1,2- α]бензимидазола [Текст]: автореф. дис.... канд. биол. наук: 14.00.25, 03.00.03 / Васильев Павел Михайлович. – Купавна, 1983. – 17 с.
9. Васильев, П.М. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов [Текст] / П.М. Васильев, А.А. Спасов, К.В. Ленская, В.А. Анисимова // Вестник волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – Т.51. – №3. – С.28-30.
10. Васильев, П.М. Применение метода сходства к эталонам для поиска *in silico* ингибиторов реакции Мейларда класса циклических гуанидинов [Текст] / П.М. Васильев, С.В. Криволапов, В.А. Кузнецова [и др.] // XX Российский национальный конгресс "Человек и лекарство": материалы конф. - М. : ЗАО РИЦ "Человек и лекарство", 2013. – С. 341-342.
11. Вислобоков, А.И. Мембранотропное действие фармакологических средств [Текст] / А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, П.Д. Шабанов, П.А. Галенко-Ярошевский. - Краснодар: ООО "Просвещение-Юг", 2010. – 528 с.
12. Воронина, Т.А. (а) Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью [Текст] / Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман, Л.Н. Неробкова,

- И.Г. Капица // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 212-235.
13. Воронина, Т.А. (б) Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.С. Гузевых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 197-218.
14. Воронина, Т.А. (в) Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 235-250.
15. Воронина, Т.А. (г) Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин, М.А. Яркова, М.В. Воронин // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 264-275.
16. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов [Текст] / З.А. Габбасов, Б.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов [и др.] // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 15-18.
17. Галенко-Ярошевский, П.А. Перспективы развития современной фармакологии в XXI веке [Книга] / П.А. Галенко-Ярошевский В.В. Гацура. - Краснодар : ООО "Просвещение-Юг", 2011. – С. 163.
18. Голендер, В.Е. Вычислительные методы конструирования лекарств [Текст] / В.Е. Голендер, А.Б. Розенблит. – Рига: Зинатне. – 1978. – 238 с.
19. Горбунов, А.А. Влияние тропоксина на цереброваскулярные эффекты мета-хлорфенил-пиперазина и серотонина [Текст] / А.А. Горбунов, Т.С.

- Ганьшина, Р.С. Мирзоян // Эксп. и клин. фармакология. – 2010. – Т.73. – №9. – С.13-16.
20. Горягин, И.И. Поиск и изучение 5-HT₂ антисеротониновой активности в ряду конденсированных производных бензимидазола: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.00.25 / Горягин Иван Иванович. – Пятигорск, 2008. – 24 с.
21. ГОСТ 12.1.007–76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [Текст]. – Введ. 1977-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 2007.
22. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия [Текст]. – Введ. 1994-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1994.
23. ГОСТ Р 51000.3-96. Общие требования к испытательным лабораториям [Текст]. – Введ. 1996-04-01. – М.: Изд-во стандартов, 1996.
24. Деркачев, Э.Ф. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов [Текст]: пат. 2108579 Рос.Федерация: G01N33/49 / Э.Ф. Деркачев, И.В. Миндукшев А.И. Кривченко, А.А. Крашенинников; заявители и патентообладатели Э.Ф. Деркачев, И.В. Миндукшев А.И. Кривченко, А.А. Крашенинников. – № 96116232/14; заявл. 30.07.96; опубл. 10.04.98, Бюл.№ 10. – Т.2. – С. 298.
25. Добровольский, Н.А. Анализатор вязкости крови [Текст]. / Н.А. Добровольский, Ю.М. Лопухин, А.С. Парфенов [и др.] // Реологические исследования в медицине: Сб. науч. тр. – М.: НЦХ РАМН, 1998. - С. 45-51.
26. Зефирова, О.Н. Физиологически активные соединения, взаимодействующие с серотониновыми (5HT) рецепторами [Текст] / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефирова // Успехи химии. – 2001. – Т. 70. - №4. – С. 382-407.
27. Иващенко, А.В. Синтез и рецепторная активность 2-замещенных 8-метил-5-(2-пиридинилэтил)-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-пиридо[4,3-

- б]индоллов [Текст] / А.В.Иващенко, О.Д. Митькин, В.М. Кисиль [и др.]
// Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47. – №1. – С. 13-20.
- 28.Иващенко, А.В. Сульфонилсодержащие модуляторы серотониновых 5-НТ6-рецепторов и их фармакофорные модели [Текст] / А.В.Иващенко
// Успехи химии. - 2014. – Т. 83. – №5 – С. 439-473.
- 29.Киабия, С.Т. Поиск и изучение фармакологических свойств антагонистов третьего подтипа серотониновых рецепторов в ряду конденсированных производных бензимидазола [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Киабия Сюзанна Теофилевна. – Волгоград, 2003. – 24 с.
- 30.Ковалев, Г.И. Качественные и количественные особенности взаимодействия с рецепторами нейромедиаторов *in vitro*: пантогам и пантогам актив [Текст] / Г.И. Ковалев, Ю.Ю. Фирстова, Д.А. Абаимов, Н.А. Старикова // Ж. неврол. и псих. – 2012. – №3. – С. 39-43.
- 31.Колобродова, Н.А. Метод изучения 5-НТ4-серотонинергической активности *in vitro* [Текст] / Н.А. Колобродова, Д.С. Яковлев // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – Прил. – С. 101.
- 32.Косточка, Л.М. Синтез и антисеротониновая активность новых производных тропана [Текст] / Л.М. Косточка, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян, С.Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. – №9. – С. 6-9.
- 33.Люсов, В.А. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов [Текст] / В.А. Люсов, Ю.Б. Белоусов // Лаб. дело. - 1975. – №8. – С. 463-468.
- 34.Мандель, И.Д. Кластерный анализ [Текст] / И.Д. Мандель - М.: Финансы и статистика, 1988. – 176 с.
- 35.Минкин, В.И. Теория строения молекул [Текст] / В.И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев – Ростов на Дону: Феникс, 1997. – 560 с.

36. Мирзоян, Р.С. Изыскание и изучение новых цереброваскулярных и проти-вомигренозных средств [Текст] / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, А.В.Топчян [и др.] // Бюлл. сибирской мед. - 2006. - Т. 5 - Прил. 2. – С. 55-57.
37. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени [Текст] / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 478-485.
38. Надеев, А.Д. Серотонин и рецепторы серотонина в клетках сердечно-сосудистой системы [Текст] / А.Д. Надеев, ИЛ. Жарких, П.В. Авдонин, Н.В. Гончаров // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. – Т. 77. – №5. – С. 32-37.
39. Науменко, В.С. Участие 5-НТ2А рецепторов в генетических механизмах ауторегуляции серотониновой системы мозга [Текст] / В.С. Науменко, А.С. Цыбко, Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Молекулярная Биология. – 2012. – Т. 46. – №2. – С. 1-7.
40. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств [Текст] / Р.У. Островская, К.С. Раевский, Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 251-263.
41. Палюлин, В.А. Предисловие редакторов перевода [Текст] / В.А. Палюлин, Е.В. Радченко // Молекулярное моделирование: теория и практика / Х.-Д. Хельтье, В. Зиппль, Д. Роньян [и др.] // Под. ред. Почкаева Т.И. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – С. 2.
42. Петров, В.И. Фундаментальные и прикладные достижения ученых ВолгГМУ в области фармакологии [Текст] / В.И. Петров, А.А. Спасов,

- И.Н. Тюренков [и др.] // Актуальные проблемы стратегии развития Волгограда: под ред. В.С. Боровик. – 2012. – Городские вести.
43. Плотникова, Е.Ю. Роль серотониновых рецепторов в моторно-эвакуаторной функции желудочно-кишечного тракта [Текст] / Е.Ю. Плотникова, О.А. Краснов // Лечащий врач. – 2014. – №8. – С. 40.
44. Сакаев, М.Р. Оценка эффективности действия пуриновых нуклеотидов на P2-рецепторы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния [Текст] / М.Р. Сакаев, Е.Е. Лесиовская, И.В. Миндукшев [и др.] // Эксп. клин. фармакол. – 2000. – Т.63. – №3. – С.22-23.
45. Сергеев, В.П. Рецепторы физиологически активных веществ [Текст] / В.П. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров // изд. 2, перераб.и доп. Москва – Волгоград, 1999 – 640 с.
46. Сергиенко, В.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева, Е.И. Маевский // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронов. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. - С. 889-940.
47. Середенин, С.Б. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106 [Текст] / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Т.А. Гудашева [и др.] // Acta Naturae (Русскоязычная версия). – 2013. – Т. 4. – №19. – С. 116-120.
48. Середенин, С.Б. Тропоксин - новый антагонист серотонина и потенциальное противомигренозное средство [Текст] / С.Б. Середенин, Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – №3. – С. 28-31.
49. Спасов, А.А. Направленный поиск противомигренозных средств – блокаторов серотониновых рецепторов 2А типа – среди гетероциклических азотсодержащих соединений [Текст] : отчет о НИР

- (заключит.) / Волгоград. гос. мед. унив. ; рук. Спасов А.А. ; исполн.: Васильев П.М. [и др.]. - Волгоград : [б.и.], 2015.
50. Спасов, А.А. Метод изучения ангиотензиновой активности соединений *in vitro* [Текст] / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина, А.А. Бригадирова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2014. - Т.158. - №7. - С.128-130.
51. Спасов, А.А. Функциональные резервы сердца в условиях алиментарного дефицита магния [Текст] / А.А. Спасов, М.В. Харитонов, И.Н. Иежица [и др.] // Кардиология. - 2012. - Т. 52. - №10. - С.39-44.
52. Спасов, А.А. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем [Текст] / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Химико-фармацевтический журнал. - 2006. - Т. 40. - №11. - С. 23-26.
53. Топчян, А.В. Фармакологическая коррекция кровоснабжения и функционального состояния мозга при его локальном ишемическом поражении [Текст]: дисс. ... докт. Мед. наук: 14.00.25 / Акоп Варданович Топчян - М., 1998. - 340 с.
54. Федотова, Ю.О. Участие 5-HT_{1a}- и 5-HT_{2a/2c}-подтипов серотониновых рецепторов в тревожном поведении пренатально стрессированных овариоэктомированных крыс [Текст] / Ю.О. Федотова, С.Г. Пивина, Н.Э. Ордян // Нейрохимия. - 2012. - Т. 29. - №4. - С. 335-339.
55. Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений [Текст] / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский Химический Журнал - 2006. - Т.1 - №2. - С. 66-75.
56. Цыбко, А.С. Серотониновые 5-HT_{2A} рецепторы в механизмах ауторегуляции и пластичности серотониновой (5-HT) системы мозга [Текст]: дисс. ... канд. биол. наук 03.03.01. / Антон Сергеевич Цыбко - Новосибирск., 2013. - 125 с.

57. Черников, М.В. Анализ функционально значимых структурных фрагментов веществ с 5-НТ2- и 5-НТ3-антагонистической активностью [Текст] / М.В. Черников, П.М. Васильев, А.А. Спасов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – Т.11. – №3. – С. 38-41.
58. Черников, М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ [Текст]: дисс. ... док. мед. наук. 14.00.25 / Максим Валентинович Черников – Волгоград., 2008. – 267 с.
59. Шимановский, Н.Л. Молекулярная и нанофармакология [Текст] / Н.Л. Шимановский, М.А. Епинетов, М.Я. Мельников – М.: ООО Издательская фирма "Физико-математическая литература", 2009. – 624 с.
60. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс] : Официальный сайт Группы компаний РЛС® [База данных]. URL: <http://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 15.01.2016).
61. Яковлев, Д.С. Поиск антагонистов серотониновых 5-НТ3-рецепторов среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола и бензимидазолина и изучение их фармакологических свойств [Текст]: автореф... канд. мед. наук. 14.00.25 / Дмитрий Сергеевич Яковлев. – Волгоград., 2007. – 24 с.
62. 5-Hydroxytryptamine receptors [Electronic resource]: IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Data Base]. – URL: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=1> (дата обращения 15.01.2016).
63. Abenhardt, W. Treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists / W. Abenhardt, D. Bosse, L. Boning [et al.] // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2006. – Vol.131. – №48. – P.2707-2718.

64. Alexander, S.P. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview / S.P. Alexander, H.E. Benson, E. Faccenda [et. al.] // Br. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 170. – №8. – P. 1449-1458.
65. Andrews, P. The 5-hydroxytryptamine receptor antagonists as antiemetics: preclinical evaluation and mechanism of action / P. Andrews, P. Bhandari // Eur. J. Cancer. – 1993. – Supp. 11. – P. 1-16 .
66. Anighoro, A. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discover / A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastell // J. Med. Chem. – 2014. – Vol. 57. – №19. – P. 7874-7887.
67. Arnt, J. The citalopram 5-HTP-induced head shake syndrome is correlated to 5-HT₂ receptor affinity and also influenced by other transmitters / J. Arnt, J. Hyttel, J.J. Larsen // Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh). – 1984. – Vol. 55. – №5. C. 363-372.
68. ARZNAD Arzneimittel-Forschung / ARZNAD // Drug Research. – 1951. - №1.
69. Askari, N. Granisetron adjunct to fluvoxamine for moderate to severe obsessive-compulsive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / N. Askari, M. Moin, M. Sanati M. [et al.] // CNS Drugs. – 2012. – Vol. 26. – №10. – P. 883-892.
70. Barak, L.S. Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor / L.S. Barak, A. Salahpour, X. Zhang [et al.] // Mol. Pharmacol. – 2008. – Vol.74. – P. 585–594.
71. Barden, M.R. Assessment of the Roles os Serine 5.43(239) and 5.46(242) for Binding and potency of Agonist Ligands at the Human Serotonin 5-HT_{2A} Receptor / M.R. Barden, D.E. Nichols // Molecular Pharmacology. – 2007. – Vol.72. – №5. – P. 1200-1209.
72. Bardin, L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain / L. Bardin // Behav. Pharmacol. – 2011. – Vol. 22. – №5-6. – P. 390-404.

73. Barnes, N.M. 5-HT₃ receptors: Introduction [Electronic resource] : N.M. Barnes, T.G. Hales, S.C.R. Lummis, J.A. Peters / IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Data Base]. –URL: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=68> (дата обращения: 10.01.2016 г).
74. Begg, D.P. Attenuation of benzodiazepine withdrawal anxiety in the rat by serotonin antagonists / D.P. Begg, K.T. Hallam, T.R. Norman // *Behav. Brain Res.* – 2005. – Vol. 161. – №2. – P. 286-290.
75. Belkind-Gerson, J. Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT₄-dependent mechanism / J. Belkind-Gerson, R. Hotta, N. Nagy [et al.] // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2015. – Vol. 21. – № 4. – P. 870-878.
76. Bell, R. Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT₂/5-HT₃/5-HT₄ ligands / R. Bell, A.A. Duke, P.E. Gilmore [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. №4. – P. 3881.
77. Benyamina, A. Potential role of cortical 5-HT(2A) receptors in the anxiolytic action of cyamemazine in benzodiazepine withdrawal // A. Benyamina, M. Naassila, M. Bourin / *Psychiatry Res.* – 2012. – Vol.198. – №2. – P. 307-312.
78. Berg, K.A. Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors / K.A. Berg, J.A. Harvey, U. Spampinato, W.P. Clarke // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2005. – №26. – P. 625.
79. Bhamagar, S. Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests / S. Bhamagar, N. Nowak, L. Babich [et al.] // *Behav. Brain Res.* – 2004. – №153. – P. 527-535.
80. ExPASy: Bioinformatics Resource Portal of Swiss Institute of Bioinformatics [Electronic resource] : Bioinformatics Resource Portal of Swiss Institute of Bioinformatics [Data Base]. - URL: <http://www.expasy.org/> (дата обращения: 30.11.2010).

81. Blaazer, A.R. Structure-activity relationships of phenylalkylamines as agonist ligands for 5-HT_{2A} receptors / A.R. Blaazer, P. Smid, C.G. Kruse // *ChemMedChem*. – 2008. – Vol.3. - №9. – P. 1299-1309.
82. Bockaert, J. 5-HT₄ receptors, a place in the sun: act two / J. Bockaert, S. Claeyssen, V. Compan, A. Dumuis // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 11. – №1. – P. 87-93.
83. Boess, F.G. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor / F.G. Boess, L. Beroukhim, I.L. Martin [et al.] // *J. Neurochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 1401-1405.
84. Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V.R. Born // *Nature*. – 1962. – Vol. 194. – P. 927-929.
85. Borroto-Escuela, D.O. Hallucinogenic 5-HT_{2A}R agonists LSD and DOI enhance dopamine D₂R protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes // D.O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, M. Narvaez [et al.] / *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 443. – №1. – P. 278-284.
86. Boyd, G.W. Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is controlled by an endoplasmic reticulum retention signal / G.W. Boyd, A.I. Doward, E.F. Kirkness [et al.] / *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – №30. – P. 27681-27687.
87. Braden, M.R. Molecular Interaction of Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Residues Phe339(6.51) and Phe340(6.52) with Superpotent N-Benzy Phenethylamine Agonists / M.R. Braden, J.C. Parrish, J.C. Naylor, D.E. Nichols // *Mol. Pharm.* – 2006. – Vol. 70. – №6. – P. 1956-1964.
88. Brady, C. Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A} / C. Brady, I. Stanford, I. Ali [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2001. – №41. – P. 282-284.
89. Branes, M. Neuronal 5-HT Receptors and SERT / M. Branes, F. Neumaier // *Tocris Bioscience Scientific Review Series*. – 2011. – №34. – P. 1-16.

90. Branes, N. A review of central 5-HT receptors and their function // N. Branes, T. Sharp / *Neuropharmacology*. – 1999. – №38. – P. 1083-1152.
91. Bruess, M. Exon-intron organization of the human 5-HT_{3A} receptor gene / M. Bruess, T. Eucker, M. Goethert, M. Bonisch // *Neuropharmacology*. – 2000. – №39. – P. 308-315.
92. Bureau, R. Review of 5-HT₄R ligands: state of art and clinical applications / R. Bureau, M. Boulouard, F. Dauphin [et al.] // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10. – №5. – P. 527-553.
93. Burkert, U. *Molecular Mechanics [Text]* / U. Burkert, N.L. Allinger – Washington, D.C. (USA): ACS, 1982. – 340 p.
94. Bywater, R.P. Privileged structures in GPCRs / R.P. Bywater // *Ernst. Schering. Found. Symp. Proc.* – 2006. – №2. – P. 75-91.
95. Cachard-Chastel, M. 5-HT₄ receptor agonists increase sAPP α levels in the cortex and hippocampus of male C57BL/6j mice / M. Cachard-Chastel, F. Lezoualc'h, I. Dewachter [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 150. – №7. – P. 883-892.
96. Camilleri, M. Novel therapeutic agents in neurogastroenterology: advances in the past year / M. Camilleri // *Neurogastroenterol Motil.* – 2014. – Vol. 26. – №8. – P. 1070-1078.
97. Cappelli, A. The interactions of the 5-HT₃ receptor with quipazine-like arylpiperazine ligands: the journey track at the end of the first decade of the third millennium // A. Cappelli, S. Butini, A. Brizzi [et al.] // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10. – №5. – P. 504-526.
98. Carlos, M. V. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications / M.V. Carlos, C. David // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 376. – №1-2. – P. 45-63.
99. Carrol, N.M. Observations of neuropharmacology of morphine – like analgesia / N.M. Carrol, P.K. Lim // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1960. – №125. – P. 383-403.

100. Chłoń-Rzepa, G. Arylpiperazynylalkyl derivatives of 8-amino-1,3-dimethylpurine-2,6-dione as novel multitarget 5-HT/D receptor agents with potential antipsychotic activity / G. Chłoń-Rzepa, A. Bucki, M. Kołaczkowski [et al.] // *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* – 2015. – P. 1-15.
101. Clinard, C.T. Activation of 5-HT_{2a} receptors in the basolateral amygdala promotes defeat-induced anxiety and the acquisition of conditioned defeat in Syrian hamsters / C.T. Clinard, L.R. Bader, M.A. Sullivan, M.A. Cooper // *Neuropharmacology*. – 2015. №90. – P. 102-112.
102. Compan, V. Feeding disorders in 5-HT₄ receptor knockout mice / V. Compan, Y. Charnay, N. Dusticier [et al.] // *J. Soc. Biol.* – 2004. – Vol. 198. – №1. – P. 37-49.
103. Compan, V. Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT₄ receptor knock-out mice / V. Compan, M. Zhou, R. Grailhe [et al.] // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – №2. – P. 412-419.
104. Crowell, M.D. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome // M.D. Crowell / *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 141. – P. 1285-1293.
105. Cummings, J. Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial / J. Cummings, S. Isaacson, R. Mills [et al.] // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383. – №9916. – P. 533-540.
106. Damaj, M.I. Pharmacological Characterization of Nicotine-Induced Seizures in Mice / M. I. Damaj, W. Glassco, M. Dukat, B. R. Martin // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. – 1999. – Vol. 291. – №3. – P. 1284-1291.
107. Danese, E. Platelets and migraine / E. Danese, M. Montagnana, G. Lippi // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 134. – №1. – P. 17-22.
108. Database of Comparative Protein Structure Models University of California [Electronic resource]: Official website Database of Comparative

- Protein Structure Models, University of California, San Francisco [ModBase]. - URL: <http://modbase.compbio.ucsf.edu> (дата обращения 30.11.2010).
109. Davies, P.A. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function / P.A. Davies, M. Pistis, M.C. Hanna [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 397. – №6717. – P. 359-363.
 110. de Greck, M. Pain therapy in irritable bowel syndrome / M. de Greck, P. Layer, V. Andresen // *Schmerz*. – 2014. – Vol.28. – №3. – P. 289-293.
 111. DeSimone, R.W. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery / R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell [et al.] // *Combinat. Chem. High Thr. Screening*. – 2004. – №7. – P. 473-493.
 112. Diener, H.C. New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine / H.C. Diener, A. Charles, P.J. Goadsby, D. Holle // *Lancet Neurol*. – 2015. – Vol. 14. – №10. – P. 1010-1022.
 113. Duarte, C.D. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates / C.D. Duarte, E.J. Barreiro, C.A. Fraga // *Mini Rev. Med. Chem*. – 2007. – Vol. 7. – №11. – P. 1108-1119.
 114. Dubin, A.E. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit / A.E. Dubin, R. Huvar, M.R. D'Andrea [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 1999. – Vol. 274. – №43. – P. 30799-30810.
 115. Engelhardt, G. On the pharmacology of 9,10-dihydro-10-(1-methyl-4-piperidylidene)-9-anthrol (WA 335), a histamine and serotonin antagonist (author's transl) / G. Engelhardt // *Arzneimittel-Forschung Drug Research*. – 1975. – Vol. 25. – P. 1723.
 116. Espinoza, S. BRET approaches to characterize dopamine and TAAR1 receptor pharmacology and signaling / S. Espinoza, B. Masri, A. Salahpour, R.R. Gainetdinov // *Methods Mol. Biol*. – 2013. – Vol. 964. – P.107–122.

117. Färber, L. Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor / L. Färber, U. Haus, M. Späth [et al.] // *Scand. J. Rheumatol.* – 2004. – №119. – P. 2-8.
118. Fedotova, J.O. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in passive avoidance learning in intact and ovariectomized female rats / J.O. Fedotova, G. Hartmann, L. Lenard, N.S. Sapronov // *Acta. Physiol. Hung.* – 2004. – Vol. 91. – №3-4. – P. 185-196.
119. Ferezou, I. 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons / I. Ferezou, B. Cauli, E.L. Hill [et al.] // *J. Neurosci.* – 2002. – №22. – P. 7389–7397.
120. Fozard, J.R. MDL 72222: a potent and highly selective antagonist at neuronal 5-hydroxytryptamine receptors / J.R. Fozard // *Naunyn-Schmiedenberg Arch. Pharmacol.* – 1984. – №326. – P. 36–44.
121. Francis, H.M. Serotonin 5-HT₄ receptors in the nucleus accumbens are specifically involved in the appetite suppressant and not locomotor stimulant effects of MDMA ('ecstasy') / H.M. Francis, N.J. Kraushaar, L.R. Hunt, J.L. Cornish // *Psychopharmacology (Berl.)*. – 2011. – Vol. 213. – №2-3. – P. 355-363.
122. Fukui, H. Involvement of 5-HT₃ receptors and vagal afferents in copper sulfate- and cisplatin-induced emesis in monkeys / H. Fukui, M. Yamamoto, S. Sasaki, S. Sato // *Eur. J. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 249. – №1. – P. 13-18.
123. Fukui, H.A. Vagal afferent fibers and peripheral 5-HT₃ receptors mediate cisplatin-induced emesis in dogs / H. A. Fukui, M. Yamamoto, S. Sato // *Japan J. Pharmacol.* – 1992. – №59. – P. 221-226.
124. Gandhimathi, A. Molecular modelling of human 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT_{2A}) and virtual screening studies towards the identification of agonist and antagonist molecules / A. Gandhimathi, R. Sowdhamini // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2015. – P. 1-19.

125. García-Oscos, F. Activation of 5-HT receptors inhibits GABAergic transmission by pre-and post-synaptic mechanisms in layer II/III of the juvenile rat auditory cortex / F. García-Oscos, O. Torres-Ramírez, L. Dinh [et al.] // *Synapse*. – 2015. – Vol. 63. – №3. – P. 115-127.
126. Gathers, C. Characterization of muscarinic receptors on the isolated guinea pig ileum at pharmacologically low concentrations / C. Gathers, W. Colbert, J. Berger // *Gen. Pharmacol.* – 1993. – Vol.24. – №3. – P. 659-961.
127. Giordano, J. Peripherally administered serotonin 5-HT₃ receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats / J. Giordano, La V. Rogers // *Eur. J. Pharmacol.* – 1989. – №170. – P. 83-86.
128. Goitia, B. Modulation of gaba release from the thalamic reticular nucleus by cocaine and caffeine: role of serotonin receptors [Electronic resource] : B. Goitia, M.C. Rivero-Echeto, N.V. Weisstaub [et al.] // *Journal of Neurochemistry*; [Wiley Online Library]. - URL: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13398>
129. Gomes, K.S. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice / K.S. Gomes, R.L. Nunes-De-Souza // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. – 2009. – Vol. 33. – №7. – P. 1261-1269.
130. Gonzalez, R. Role of 5-HT_{5A} receptors in the consolidation of memory / R. Gonzalez, K. Chávez-Pascacio, A. Meneses // *Behav. Brain Res.* – 2013. – №252. – P. 246-251.
131. Guglielmi, G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach, 1: electrochemical basis, technique and experimental results / G. Guglielmi, F. Vinuela, I. Sepetka, V. Macellari // *J. Neurosurg.* – 1991. – Vol. 75. – P. 1-7.
132. Gupta, D. Pharmacological evaluation of novel 5-HT₃ receptor antagonist, QCM-13 (N-cyclohexyl-3-methoxyquinoxalin-2-carboxamide) as anti-anxiety agent in behavioral test battery / D. Gupta, M.

- Radhakrishnan, D. Thangaraj, Y. Kurhe // *J. Pharm. Bioallied Sci.* – 2015. – Vol. 7. – №2. – P. 103-108.
133. Hall, J.D. Serotonin enhances urinary bladder nociceptive processing via a 5-HT₃ receptor mechanism / J.D. Hall, C. DeWitte, T.J. Ness, M.T. Robbins // *Neurosci. Lett.* – 2015. – №604. – P. 97-102.
134. Hannon, J. Molecular biology of 5-HT receptors / J. Hannon, D. Hoyer // *Behav. Brain Res.* – 2008. – Vol. 195. – №1. – P. 198-213.
135. Harten, P. Fibromyalgia syndrome: new developments in pharmacotherapy / P. Hannon // *Z. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 61. – №1. – P. 75-82.
136. Hayat, F. Synthesis and biological evaluation of 4-nitroindole derivatives as 5-HT_{2A} receptor antagonists / F. Hayat, A.N. Viswanath, A.N. Pae [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23. – №6. – P. 1313-1320.
137. Hibert, M.F. Conformation-activity relationship study of 5-HT₃ receptor antagonists and a definition of a model for this receptor site / M.F. Hibert, R. Hoffmann, R.C. Miller, A.A. Carr // *J. Med. Chem.* – 1990. – №33. – P. 1594-1600.
138. Hopkins, A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery / A.L. Hopkins // *Nature Chemical Biology.* – 2008. – №11. – Vol. 4. – P. 6982-690.
139. Hoşten, T. Ondansetron does not modify emergence agitation in children / T. Hoşten, M. Solak, L. Elemen [et al.] // *Anaesth. Intensive Care.* – 2011. – Vol. 39. – №4. - P. 640-645.
140. Hoyer, D. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors / D. Hoyer, J.P. Hannon, G.R. Martin // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2002. – Vol. 71. – №4. – P. 533-554.
141. Hoyer, D. 5-HT receptors: subtypes and second messengers / D. Hoyer, P. Schoeffter // *J. Recept. Res.* – 1991. – Vol. 11. – №1-4. – P. 197-214.

142. Huang, B.Q. Effects of blockade of 5-HT_{2A} receptors in inflammatory site on complete Freund's adjuvant-induced chronic hyperalgesia and neuropeptide Y expression in the spinal dorsal horn in rats / B.Q. Huang, B. Wu, Y. Hong, W. Hu // *Sheng Li Xue Bao.* – 2015. – Vol. 67. – №5. – P. 463-469.
143. HyperCube Inc [Electronic resource]: official website. - URL: <http://www.hyper.com> (дата обращения 31.12.2015).
144. Imamura, T. Expression of 5-Hydroxytryptamine Receptors in Human Urinary Bladders with Benign Prostatic Hyperplasia / T. Imamura, O. Ishizuka, T. Ogawa [et al.] // *Adv. Ther.* – 2015. – Supp.1. - P. 29-37.
145. Irwin, S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics.* – 1964. – Vol. 5. – P. 174-179.
146. Isberg, V. Structure-Activity Relationships of Constrained Phenylethylamine Ligands for the Serotonin 5-HT₂ Receptors / V. Isberg, J. Paine, S. Leth-Petersen [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – №11. – P. e78515.
147. Iskander, M.N. Optimization of a pharmacophore model for 5-HT₄ agonists using CoMFA and receptor based alignment / M.N. Iskander, L.M. Leung, T. Buley [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2006. – №1. – Vol. 41. – P. 16-26.
148. Jacobson, K.A. New paradigms in GPCR drug discovery / K.A. Jacobson // *Biochemical Pharmacology.* – 2015. – №4. – Vol. 98. – P. 541-555.
149. Jordan, K. Comparative activity of antiemetic drugs / K. Jordan, H.J. Schmoll, M.S. Aapro [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* – 2007. – №61. – P. 162–175.
150. Kato, K. The effect of a 5-HT_{2A} receptor antagonist on pain-related behavior, endogenous 5-hydroxytryptamine production, and the expression 5-HT_{2A} receptors in dorsal root ganglia in a rat lumbar disc herniation

- model / K. Kato, M. Sekiguchi, S. Kikuchi, S. Konno // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2015. – Vol. 40. – №6. – P. 357-362.
151. Kawa K. Distribution and functional properties of 5-HT₃ receptors in the rat hippocampal dentate gyrus: a patch-clamp study / K. Kawa // *J. Neurophysiol.* – 1994. – №71. – P. 1935–1947.
152. Kelley, S. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors / S. Kelley, J. Dunlop, E. Kirkness [et al.] // *Nature*. – 2003. – №424. – P. 321-324.
153. Kelley, S.P. Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice / S.P. Kelley, A.M. Bratt, C.W. Hodge // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – №461. – P. 19-25.
154. Kesim, M. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice / M. Kesim, E.N. Duman, M. Kadioglu // *J. Pharmacol. Sci.* – 2005. – Vol. 97. – №1.– P. 61-66.
155. Ketanserin [Electronic resource] : Drug future Base [Data Base]. – URL: <http://www.drugfuture.com/toxic/q121-q638.html> (дата обращения 03.02.2016).
156. Granisetron [Electronic resource] : Drug future Base [Data Base]. – URL: <http://www.drugfuture.com/toxic/q68-q200.html> (дата обращения 03.02.2016).
157. Knowledgebase Universal Protein UniProtKB [Electronic resource] : Official website UniProt Consortium of European Bioinformatics Institute, the SIB Swiss Institute of Bioinformatics and the Protein Information Resource [Data Base]. – URL: <http://www.uniprot.org/> (дата обращения 08.01.2016)
158. Kolobrodova, N.A. Anxiolytic profile of 5-HT₃-antagonist RU-1204 versus tropisetron and diazepam / N.A. Kolobrodova, D.S. Yakovlev, A.A. Spasov, V.A. Anisimova // *Eur. Neuropsychopharmac.* – 2011. – S2. – P. S147.

159. Kometer, M. Activation of serotonin 2A receptors underlies the psilocybin-induced effects on alpha oscillations, N170 visual-evoked potentials, and visual hallucinations /M. Kometer, A. Schmidt, L. Jancke, F.X. Vollenweider // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 33. – P. 10544–10551.
160. Kovács, A. Vasoconstrictor 5-HT receptors in the smooth muscle of the rat middle cerebral artery / A. Kovács, L.G.Jr. Hársing, G. Szénási // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 689. – №1-3. – P. 160-164.
161. Kumar, B. Antidepressant and anxiolytic-like effects of 4n, a novel 5-HT₃ receptor antagonist using behaviour based rodent models / B. Kumar, A. Jindal, D.K. Pandey [et al.] // *Indian J. Exp. Biol.* – 2012. – Vol. 50. – №9. – P. 625-632.
162. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride / K.D. Kurz // *Thromb. Res.* – 1990. – Vol. 15. – P. 269-280.
163. Yoon, M. Lack of reciprocity between opioid and 5-HT₃ receptors for antinociception in rats / M. Yoon, H. Bae, J. Choi [et al.] // *Pharmacology.* – 2006. – Vol. 77. – №4.– P. 195-202.
164. Lacy, B.E. New and Emerging Treatment Options for Irritable Bowel Syndrome / B.E. Lacy, W.D. Chey, A.J. Lembo // *Gastroenterol. Hepatol. (NY).* – 2015. – Vol. 4. – S.2. – P. 1-19.
165. Laporte, A.M. Autoradiographic mapping of central 5-HT₃ receptors. Central and peripheral 5-HT₃ receptors / A.M. Laporte, E.G. Kidd, D Vergé [et al.] //ed. M. Hammon. - London : Academic press, 1992. – P. 157 – 187.
166. Liang, D.Y. 5-hydroxytryptamine type 3 receptor modulates opioid-induced hyperalgesia and tolerance in mice / D.Y. Liang, X. Li, J.D. Clark, // *Anesthesiology.* – 2011. – Vol. 114. – №5. – P. 1080-1089.
167. Lin, O.A. The antidepressant 5-HT_{2A} receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function / O.A. Lin, Z.A. Karim, H.P. Vemana [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – №1. – P. e87026.

168. Lin, X. Life beyond kinases: Structure-based discovery of sorafenib as nanomolar antagonist of 5-HT receptors / X. Lin, X. Huang, G. Chen [et al.] // *J. Med Chem.* – 2012. – Vol. 55. – №12. – P. 5749-5759.
169. Lu, R. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2a} receptor-mediated contraction in aorta / R. Lu, A. Alioua, Y. Kumar [et al.] // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 586. – P. 3855-3869.
170. Manesh, R. Discovery of new anti-depressants from structurally novel 5-HT₃ receptor antagonists: design, synthesis and pharmacological evaluation of 3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamides / R. Manesh, T. Devadoss, D.K. Pandey, S. Bhatt // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. – №4. – P. 1253-1256.
171. McCleane, G.J. Does a single intravenous injection of the 5HT₃ receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study / G.J. McCleane, R. Suzuki, A.H. Dickenson // *Anest. Analg.* – 2003. – Vol. 97. – №5. – P. 1474-1478.
172. McCorvy, J.D. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors / J.D. McCorvy, B.L. Roth // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – №150. – P. 129-142.
173. McMahan, L.L. Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels / L.L. McMahan, J.A. Kauer // *J. Neurophysiol.* – 1997. – №78. – P. 2493-2502.
174. MDL ISIS/Draw 2.5 [Electronic resource] : MDL Information Systems Inc.; Electronic programs and software. – 2002. - Software. – 1 CD-ROM.
175. Mendez-David, I. Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism / I. Mendez-David, D.J. David, F. Darcet [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2014. – Vol. 39. – №6. – P. 1366-1378.

176. Meneses, A. 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alteration / A. Meneses // *Rev. Neurosci.* – 2013. – Vol. 6. – №24. – P. 629–664.
177. Mengod, G. Cartography of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptor Subtypes in Prefrontal Cortex and Its Projections / G. Mengod, J.M. Palacios, R. Cortés // *ACS Chem. Neurosci.* – 2015. – Vol. 6. – №7. – P. 1089-1098.
178. Mestre, T.A. 5-Hydroxytryptamine 2A receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders / T.A. Mestre, M. Zurowski, S.H. Fox // *Expert Opin. Investig Drugs.* – 2013. – Vol. 22. – №4. – P. 411-421.
179. Metoclopramide [Electronic resource] : Official website Look for Chemicals [Data Base]. – URL: <http://www.lookchem.com/Metoclopramide/> (дата обращения 02.02.2016).
180. Mialet, J. Exploration of the ligand binding site of the human 5-HT₄ receptor by site-directed mutagenesis and molecular modeling / J. Mialet, Y. Dahmoune, F. Lezoualc'h [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2000. – Vol. 130. – P. 527-538.
181. Min, Y.W. The clinical potential of ramosetron in the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) / Y.W. Min, P.L. Rhee // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 8. – №3. – P. 136-142.
182. Miyata, K. Pharmacologic profile of (R)-5-[(1-methyl-3-indolyl)-carbonyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-benzimidazole hydrochloride (YM060), a potent and selective 5-hydroxytryptamine₃ receptor antagonist, and its enantiomer in the isolated tissue / K. Miyata, T. Kamato, A. Nishida [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1991. – №259. – P. 15-21.
183. Miyata, K. Effect of serotonin (5-HT)₃-receptor antagonist YM060, YM114 (KAE-393), ondansetron and granisetron on 5-HT₄ receptors and gastric emptying in rodents / K. Miyata, M. Yamano, T. Kamato [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1995. – №69. – P. 205-214.

184. Miyata, K. Role of the serotonin receptor in stress-induced defecation / K. Miyata, T. Kamato // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1992. – №261. – P. 297-303.
185. Morris, G.M. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility / G.M. Morris, R. Huey, R. Lindstrom [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2009. – Vol.30. – №16. – P. 2785-2791.
186. Nagatomo, T. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system / T. Nagatomo, M. Rashid, H. Abul Muntasir, T. Komiyama // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 104. – №1. – P. 59-81.
187. Nakamura, H. Theoretical evaluation of antiemetic effects of 5-HT₃ receptor antagonists for prevention of vomiting induced by cisplatin / H. Nakamura, H. Yokoyama, R. Takayanagi // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2015. – Vol. 4. – №1. – P. 39-44.
188. Navari, R.M. 5-HT₃ receptors as important mediators of nausea and vomiting due to chemotherapy / R.M. Navari // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1048. – №10(B). – P. 2738-2746.
189. Nichols, D.E. Structure-activity relationship of serotonin 5-HT_{2A} agonists / D.E. Nichols // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. – 2012. – Vol.1. – №5. – P. 559–579.
190. Nielsen C.K. Head and whole-body jerking in guinea pigs are differentially modulated by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{2A} receptor antagonists / C.K. Nielsen // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – №2-3. – Vol. 361. – P. 185-190.
191. Nirogi, R. Synthesis and SAR of Imidazo[1,5-a]pyridine derivatives as 5-HT₄ receptor partial agonists for the treatment of cognitive disorders associated with Alzheimer's disease / R. Nirogi, A.R. Mohammed, A.K. Shinde [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – №103. – P. 289-301.
192. Nowakowska, E. An anxiolytic-like effect of ondansetron disappears in oxazepam-tolerant rats / E. Nowakowska, A. Chodera, K. Kus // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1998. – Vol. 59. – №4. – P. 935-938.

193. Oechsle, K. Aprepitant as salvage therapy in patients with chemotherapy-induced nausea and emesis refractory to prophylaxis with 5-HT(3) antagonists and dexamethasone / K. Oechsle, M.R. Muller, J.T. Hartmann [et al.] // *Oncologie*. – 2006. – Vol. 29. – №12. – P. 557-561.
194. Ohlsson, L. Algesimetric studies by the hot plate method in mice / L. Ohlsson // *Act. Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. – 1953. – Vol. 9. – №4. – P. 322-331.
195. Okamoto, K. 5-HT_{2a} recaptor subtype in the peripheral branch os sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats / K. Okamoto, H. Imbe, Y. Morickawa [et al.] // *Pain*. – 2002. – Vol. 99. – P. 133-143.
196. Okamoto, K. Central serotonin 3 receptors play an important role in the modulation of nociceptive neural activity of trigeminal subnucleus caudalis and nocifensive orofacial behavior in rats with persistent temporomandibular joint inflammation / K. Okamoto, A. Kimura, T Donishi [et al.] // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 135. – №2. – P. 569-581.
197. Olivier, B. 5-HT(3) receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review / B. Olivier, I. van Wijngaarden, W. Soudijn // *Eur Neuropsychopharmacol*. – 2000. – Vol. 10. – №2. – P. 77-95.
198. Olivier, J.D. The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders / J.D. Olivier, C.H. Vinkers, B. Olivier // *Front Pharmacol*. – 2013. – №4. – P. 74.
199. Oyamada, Y. Combined serotonin (5-HT)_{1A} agonism, 5-HT(2A) and dopamine D₂ receptor antagonism reproduces atypical antipsychotic drug effects on phencyclidine-impaired novel object recognition in rats / Y. Oyamada, M. Horiguchi, L. Rajagopal [et al.] // *Behav. Brain Res*. – 2015. – №285. – P. 165-175.
200. Ozaki, A. Selective 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) receptor blocking activity of KB-R6933, a novel benzimidazole derivative [Журнал] / A.

- Ozaki, Y. Fujishima, T. Sukamoto // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1999. – №80. – P. 25-32.
201. Padayatti, P.S. A hybrid structural approach to analyze ligand binding by the serotonin type 4 receptor (5-HT₄) / P.S. Padayatti, L. Wang, S. Gupta [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2013. – Vol. 12. – №5. – P. 1259-1271.
202. Pehek, E.A. Ritanserin administration potentiates amphetamine-stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex / E.A. Pehek, Y. Bi // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 1997. – Vol. 21. – №4. – P. 671-682.
203. Peiró, A.M. Ketanserin potentiates morphine-induced antinociception mediated by kappa-receptor activation / A.M. Peiró, L. Climent, P. Zapater [et al.] // *Pharmacol Res.* – 2011. – Vol. 64. – №1. – P. 80-84.
204. Peters, J.A. Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT₃ receptor / J.A. Peters, T.G. Hales, J.J. Lambert // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2005. – Vol. 26. – №11. – P. 587-594.
205. Piszczek, L. Modulation of anxiety by cortical serotonin 1A receptors / L. Piszczek, A. Piszczek, J. Kuczanska [et al.] // *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* – 2015. – Vol. 9. – P. 10.
206. Ponnalaa, S. Evaluation of structural effects on 5-HT_{2A} receptor antagonism by aporphines: Identification of a new aporphine with 5-HT_{2A} antagonist activity / S. Ponnalaa, J. Gonzalesa, N. Kapadi, W. Hardinga // *Bioorganic & Med. Chem. Letters.* – 2014. – Vol.24. – №7. – P. 1664-1667.
207. Pranzatelli, M.R. Brainstem serotonergic hyperinnervation modifies behavioral supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in the rat / M.R. Pranzatelli, Y.Y. Huang [et al.] // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1989. – Vol.50. – №501. – P. 89-99.
208. Preston, A.R. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory / A.R. Preston, H. Eichenbaum // *Curr. Biol.* – 2013. – Vol. 23. – P. R764–R773.

209. Quesseveur, G. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression / G. Quesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier, B.P. Guiard // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2012. – Vol. 21. – №11. – P. 1701-1725.
210. Raiteri, M. Inhibition by 5-HT₃ receptor antagonists of release of cholecystinin – like immunoreactivity from the frontal cortex of freely moving rats / M. Raiteri, P. Paudice, F. Vallebuona // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1993. – №347. – P. 111-114.
211. Rajkumar, R. The auspicious role of 5-HT₃ receptors in depression: A probable neuronal target? / R. Rajkumar, R. Mahesh // *J. Psychopharmacol.* – 2010. – №24. – P. 455–469.
212. Ratz, P.H. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus / P.H. Ratz, K.M. Berg, N.H. Urban, A.S. Miner // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – №4. – P. C769-C783.
213. Reeves, D. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel / D. Reeves, S. Lummis S // *Mol. Membr. Biol.* – 2002. – №19. – P. 11-26.
214. Rojas, C. Pharmacological mechanisms of 5-HT₃ and tachykinin NK₁ receptor antagonism to prevent chemotherapy-induced nausea and vomiting / C. Rojas, B.S. Slusher // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 684. – №1-3. – P. 1-7.
215. RTECS (Register of Toxic Effects of Chemical Substances) [Electronic resource] : Canadian Centre for Occupational Health and Safety. – URL: <http://ccinfoweb2.ccohs.ca/rtecs/records/XZ6157235.html>. (дата обращения: 11.12.2015).
216. Ruiu, S. The 5-HT₂ antagonist ritanserin blocks dopamine re-uptake in the rat frontal cortex / S. Ruiu, G. Marchese, P.L. Saba [et al.] // *Molecular Psychiatry.* – 2000. – №5. – P. 673-677.
217. Sagrada, A. Antiemetic activity of the new 5-HT₃ antagonist DAU 6215 in animal models of cancer chemotherapy and radiation / A. Sagrada,

- M. Turconi, P. Bonali [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 28. – №6. – P. 470-474.
218. Segu, L. Hyperfunction of muscarinic receptor maintains long-term memory in 5-HT₄ receptor knock-out mice / L. Segu, M. J. Lecomte, M. Wolff [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – №3. – P. e9529.
219. Snoeren, E.M. Chronic paroxetine treatment does not affect sexual behavior in hormonally sub-primed female rats despite 5-HT₁(A) receptor desensitization / E.M. Snoeren, L.K. Refsgaard, M.D. Waldinger [et al.] // *J. Sex. Med.* – 2011. – Vol. 8. – №4. – P. 976-988.
220. Spath, M. Efficacy and tolerability of intravenous tropisetron in the treatment of fibromialgia / M. Spath, T. Stratz, G. Neeck [et al.] // *Scand. J. rheumatol.* – 2004. – Vol. 33. – №4 – P. 267-370.
221. Srikiatkachorn, A. Pathophysiology of medication overuse headache - an update / A. Srikiatkachorn, S.M. le Grand, W. Supornsilpchai, R.J. Storer // *Headache.* – 2014. – Vol. 54. – №1 – P. 204-210.
222. Stewart, J.J.P. MOPAC2009 [Electronic resource]: Official website Stewart Computational Chemistry. – URL: <http://openmopac.net> (дата обращения 07.03.2011).
223. Sukoff Rizzo, S.J. 5-HT(1A) receptor antagonism reverses and prevents fluoxetine-induced sexual dysfunction in rats / S.J. Sukoff Rizzo, C. Pulicicchio, J.E. Malberg [et al.] // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2009. – Vol. 12. – №8 – P. 1045-1053.
224. Supornsilpchai, W. Involvement of pro-nociceptive 5-HT_{2A} receptor in the pathogenesis of medication-overuse headache / W. Supornsilpchai, S.M. le Grand, A. Srikiatkachorn // *Headache.* – 2010. – Vol. 50. – №2. – P. 185-197.
225. Suwa, B. Distribution of serotonin 4(a) receptors in the juvenile rat brain and spinal cord / B. Suwa, N. Bock, S. Preusse [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 2014. – №55. – P. 67-77.

226. Tavorath, R. Drug treatment of chemotherapy-induced delayed emesis / R. Tavorath, P.J. Hesketh // *Drugs*. – 1996. – №52. – P. 639-648.
227. Tecott, L.H. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA / L.H. Tecott, A.V. Maricq, D. Julius // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – №90. – P. 1430-1434.
228. Thompson, A. Unbinding pathways of an agonist and an antagonist from the 5-HT₃ receptor / A. Thompson, P. Chan, S. Chan S. [et al.] // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – №6.– P. 1979-1991.
229. Thompson, A. Locating an Antagonist in the 5-HT₃- Receptor Binding Site Using Modeling and Radioligand Binding / A. Thompson, K. Price, D. Reeves [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – №21. – P. 20476-20482.
230. Thompson, A.J. Recent developments in 5-HT₃ receptor pharmacology / A.J. Thompson // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2013. – №2 : Vol. 34. – P. 100-109.
231. Tricco, A.C. Comparative safety of serotonin (5-HT₃) receptor antagonists in patients undergoing surgery: a systematic review and network meta-analysis / A.C. Tricco, C. Soobiah, E. Blondal [et al.] // *BMC Med.* – 2015. – №13. – P. 82.
232. Trott, O. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches [Electronic resource]: Official website AutoDock Vina. – Molecular Graphics Lab. – URL: <http://vina.scripps.edu> (дата обращения 07 03 2011).
233. Unwin, N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy / N. Unwin // *FEBS Lett.* – 2003. – №505. – P. 91-95.
234. Varnas, K. Distribution of 5-HT₄ receptors in the postmortem human brain-an autoradiographic study using [125I]SB 207710 / K. Varnas, C. Halldin, V.W. Pike, H. Hall // *Eur. Neuropsychopharmacology.* – 2003. – №13. – P. 228-234.

235. Venkataraman, P. Functional group interactions of a 5-HT₃R antagonist / P. Venkataraman, P. Joshi, S.P. Venkatachalan [et al.] // *BMC Biochemistry*. – 2002. – 3. – P. 315-319.
236. Vergne-Salle P. Dufauret-Lombard C., Bonnet C., Simon A. et al., A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of dolasetron, a 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonist, in patients with fibromyalgia / P. Vergne-Salle, C. Dufauret-Lombard, C. Bonnet [et al.] // *Eur. J. Pain* . – 2011. – Vol. 15.– №5. – P. 509-514.
237. Voronova, I.P. 5-HT_{2A} receptors control body temperature in mice during LPS-induced inflammation via regulation of NO production / I.P. Voronova, G.M. Khramova, E.A. Kulikova [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2015. – №103. – P. 123-131.
238. Watts, S.W. Serotonin and blood pressure regulation / S.W. Watts, S.F. Morrison, R.P. Davis, S.M. Barman // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – Vol. 64.– №2. – P. 359-388.
239. Wischhof, L. 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor interactions: on their relevance to cognitive function and psychosis / L. Wischhof, M. Koch // *Behav. Pharmacol.* – 2016. – №1. – Vol. 27. – P. 1-11.
240. Wolf, H. Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists / H. Wolf // *Scand. J. Rheumatol.* – 2000. – Vol. 29.– №113. – P. 37-46.
241. Xie, H. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats / H. Xie, Z.Q. Dong, F. Ma [et al.] // *Brain Res.* – 2008. – №1210. – P. 76-83.
242. Xu, W.J. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1-7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia / W.J. Xu, Y. Zhao, F.Q. Huo [et al.] // *Neuroscience*. – 2013. – №238. – P. 252-257.

243. Yaakob, N.S. Distribution of 5-HT₃, 5-HT₄, and 5-HT₇ Receptors Along the Human Colon / N.S. Yaakob, K.A. Chinkwo, N. Chetty [et al.] // *J. Neurogastroenterol. Motil.* – 2015. – №3. – Vol. 21. – P. 361-369.
244. Yakuri, L. // *Pharmacology and Therapeutics.* – 1972. – Vol. 20. – Supp. 4. – P. S995.
245. Yamano, M. Characteristics of inhibitory effects of serotonin (5-HT)₃-receptor antagonists, YM060 and YM114 (KAE-393), on the von Bezold-Jarisch reflex induced by 2-Methyl-5-HT, veratridine and electrical stimulation of vagus nerves in anesthetized rats / M. Yamano, H. Ito, T. Kamato [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1995. – №4. – Vol. 69. – P. 351-357.
246. Yamano, M. Species difference in the 5-hydroxytryptamine₃ receptor associated with the von Bezold-Jarisch reflex / M. Yamano, H. Ito, T. Kamato, K. Miyata // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1995. – №2. – Vol. 330. – P. 177-189.
247. Yang, Y. Novel serotonin receptor 2 (5-HT_{2R}) agonists and antagonists: a patent review (2004-2014) / Y. Yang, S. An, Y. Liu [et al.] // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2016. – Vol. 26. – №1. – P. 1-18.
248. Yang, Z. Discovery of 2-substituted benzoxazole carboxamides as 5-HT₃ receptor antagonists / Z. Yang, D.J. Fairfax, J.H. Maeng [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – №22. – P. 6538-6541.
249. Yoshida, S. Regulatory molecules for the 5-HT₃ receptor ion channel gating system / S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Sato // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – №15. – P. 3515-3523.
250. Yu, Y. Involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in colonic motor patterns in rats / Y. Yu, J.H. Chen, H. Li [et al.] // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2015. – Vol. 27. – №7. – P. 914-928.
251. Zahedi, H. How Can 5-HT₃ Receptor Antagonists Exert Analgesic Properties? / H. Zahedi, A. Maleki, G. Rostami // *Acta. Med. Iran.* – 2012. – Vol. 50. – №4. – P. 239-243 .

252. Zangrossi, H. Jr. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze / H. Jr. Zangrossi, F.G. Graeff // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2014. – Vol. 46. – Pt.3.– P. 397-406.
253. Zeitz, K.P. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors / K.P. Zeitz, N. Guy, A.B. Malmberg [et al.] // *J. Neurosci.* – 2002. – №3. – Vol. 22. – P. 1010-1019.
254. Zhang, G. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition / G. Zhang, R.W.Jr. Stackman // *Front Pharmacol.* – 2015. – №6. – P. 225.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(информационное)

Химическая структура изученных конденсированных производных азола

Таблица А.1. Шифры и химическая структура изученных конденсированных азолов

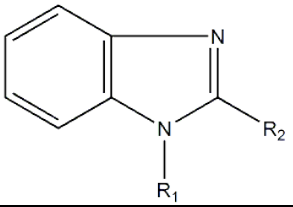
Соединение	Химический шифр	R ¹ заместитель	R ² заместитель	R ³ заместитель	Солевой остаток	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
N ¹ -бензимидазолы						
A1	РУ-28	-C ₃ H ₃	-H	-	HCl	192,6
A2	РУ-910	-CH ₃	-CH ₃	-	HCl·H ₂ O	200,6
A3	РУ-912	-C ₄ H ₉	-CH ₃	-	HCl	224,7
A4	РУ-29	-C ₂ H ₅	-N(CH ₂ CCH) ₂	-	HCl	273,7
A5	РУ-911	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	-	HCl·2H ₂ O	294,7
A6	РУ-914	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-CH ₃	-	2HCl	304,2
A7	РУ-913	-CH ₂ -4-C ₆ H ₄ C(CH ₃) ₃	-CH ₃	-	HCl	314,8
A8	РУ-916	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-CH ₃	-	2HCl	316,2
A9	РУ-312	-CH ₃	-NHC ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-	2HCl	333,2
A10	АЖ-71	-C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	-NHCH ₂ C ₆ H ₃ O ₂ CH ₂	-	2HCl	425,3
A11	АЖ-69	-C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	-NHCH ₂ -3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-	2HCl	441,3

Таблица А.1 (продолжение)

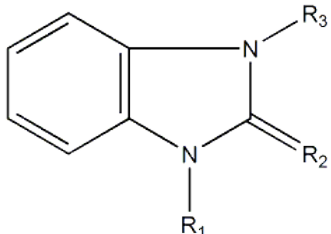
1	2	3	4	5	6	7
А12	АЖ-23	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-NHCH ₂ -2-C ₆ H ₄ Cl	-	2HCl	441,8
А13	ПУ-538	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-CH ₃	⁺ -CH ₂ C(O)C ₆ H ₅	Br ⁻	442,3
А14	АЖ-21	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-NHCH ₂ -3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-	2HCl	455,4
А15	АЖ-18	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-NH-CH ₂ -3,4,5- C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃	-	2HCl	497,4
А16	АЖ-19	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-NHCH ₂ -3,4,5- C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃	-	2HCl	499,4
<p>2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы</p> 						
Б1	АСИ-1	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH ₂	HCl	240,6
Б2	АСИ-13	-C ₃ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)NH ₂	HCl	266,7
Б3	АСИ-3	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	296,7
Б4	АСИ-4	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NC ₅ H ₁₀	HCl	308,8
Б5	АСИ-14	-C ₃ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	322,8
Б6	АСИ-2	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)N(CH ₃)C ₆ H ₅	HCl	330,8
Б7	АСИ-5	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ F	HCl	334,7
Б8	АСИ-8	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH-2,6-C ₆ H ₃ (CH ₃) ₂	HCl	344,8
Б9	АСИ-7	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ CH(CH ₃) ₂	HCl	358,8
Б10	АСИ-16	-CH ₂ C ₆ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	372,8
Б11	ПУ-91	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	=NH	-CH ₂ COOH	2HCl	375,2
Б12	АСИ-6	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ CF ₃	HCl	384,7

Таблица А.1 (продолжение)

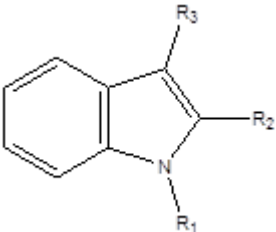
1	2	3	4	5	6	7
Б13	АСИ-17	-CH ₂ C ₆ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)NC ₅ H ₁₀	HCl	384,9
Б14	АСИ-9	-CH ₃	=NH	-CH ₂ C(O)NH-3,5-C ₆ H ₃ Cl ₂	HCl	385,6
Б15	АСИ-15	-C ₃ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅	HCl	386,8
Б16	АСИ-11	-C ₄ H ₉	=NH	-CH ₂ C(O)NH-2,6-C ₆ H ₃ (CH ₃) ₂	HCl	386,9
Б17	ПУ-400	-C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	=NH	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	HBr	397,3
Б18	АСИ-18	-CH ₂ C ₆ H ₅	=NH	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ F	HCl	410,8
Б19	ПУ-136	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	=NH	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	HBr	411,3
Б20	ПУ-137	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	=NH	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	HBr	423,3
Б21	ПУ-401	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	=NH	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	HBr	425,3
Б22	АСИ-10	-C ₄ H ₉	=NH	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ CF ₃	HCl	426,8
Б23	АСИ-12	-C ₄ H ₉	=NH	-CH ₂ C(O)NH-3,5-C ₆ H ₃ Cl ₂	HCl	427,7
Б24	ПУ-1171	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	=NH	-CH ₂ CH(OH)-4-C ₆ H ₄ OCH ₃	2HCl	467,4
Индолы						
В1	SBT-815	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ N(CH ₃)C ₄ H ₉	-H	-C ₂ H ₂ C(O)C ₆ H ₅	HCl	426,9
В2	SBT-828	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ NC ₅ H ₁₀	-H	-C ₂ H ₂ C(O)C ₄ H ₃ S	HCl	430,9
В3	SBT-820	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ NC ₆ H ₁₂	-H	-C ₂ H ₂ C(O)C ₆ H ₅	HCl	438,9
В4	SBT-814	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ N(C ₃ H ₇) ₂	-H	-C ₂ H ₂ C(O)C ₆ H ₅	HCl	441,0

Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
B5	SBT-79	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)C ₆ H ₅)C(O)NHC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	469,0
B6	SBT-130	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ OCH ₃)C(O)NHNC ₄ H ₈ N	HCl	483,0
B7	SBT-143	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ F)C(O)NHC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	487,0
B8	SBT-68	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)C ₆ H ₅)C(O)NHC ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	HCl	497,0
B9	SBT-11	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-4-C ₆ H ₄ OCH ₃)C(O)NHC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	499,0
B10	SBT-140	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ F)C(O)NHC ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	HCl	500,9
B11	SBT-8	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ Cl)C(O)NHC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	503,4
B12	SBT-109	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ OCH ₃)C(O)NHC ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	HCl	513,0
B13	SBT-25	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ - N(C ₄ H ₉) ₂	-H	-CH-2,3,5-C ₃ N ₂ (CH ₃)(C ₆ H ₅)O	HCl	523,1
B14	SBT-5	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ Cl)C(O)NHC ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	HCl	531,4
B15	SBT-178	-C ₂ H ₅	-H	-CHC(NHC(O)-3,4,5-C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃)C(O)NHC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	HCl	559,0
B16	SBT-46	-S(O) ₂ N(CH ₃) ₂	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ F)C(O)NHC ₃ H ₆ NC ₃ H ₃ N	HCl	575,0
B17	SBT-708	-S(O) ₂ N(CH ₃) ₂	-H	-CHC(NHC(O)-4-C ₆ H ₄ CH ₃)C(O)NHC ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	HCl	576,1
B18	SBT-26	-S(O) ₂ N(CH ₃) ₂	-H	-CHC(NHC(O)-2-C ₆ H ₄ F)C(O)NHC ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	HCl	594,0

Таблица А.1 (продолжение)

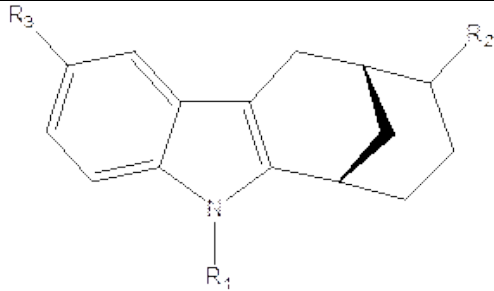
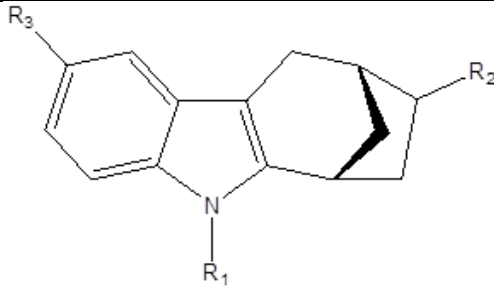
1	2	3	4	5	6	7
		Индолы, сопряженные с бицикло[3.3.1]нонановым каркасом				
B19	BT-182	-H	-NH ₂	-OH	-	242,3
B20	BT-188	-H	-NH ₂	-	-	226,3
		Индолы, бицикло[3.2.1]октановым каркасом				
B21	BT-261	-H	-CH ₂ NH ₂	-	CH ₃ COOH	286,4
B22	BT-292	-H	-NHCONH ₂	-	-	255,3
B23	BT-187	-H	-NH ₂	-	-	212,2
B24	BT-184	-H	-NH ₂	-OH	-	228,2

Таблица А.1 (продолжение)

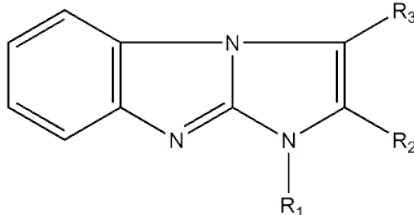
1	2	3	4	5	6	7
N^1 -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы 						
Г1	РУ-33	-CH ₃	-C ₆ H ₅	-H	HCl	283,7
Г2	РУ-563	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₅	-H	2HCl	305,2
Г3	РУ-591	-C ₂ H ₄ OH	-4-C ₆ H ₄ Br	-H	HCl	392,6
Г4	РУ-718	-C ₃ H ₆ NC ₅ H ₁₀	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	411,4
Г5	РУ-719	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	413,3
Г6	РУ-720	-C ₃ H ₆ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₅	-H	2HCl	419,3
Г7	РУ-880	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-C ₄ H ₃ S	-H	2HCl	425,3
Г8	РУ-1275	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈	-4-C ₆ H ₄ F	-H	2HCl	435,3
Г9	РУ-562	-C ₂ H ₄ OH	-3,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂	-H	HCl·5H ₂ O	435,8
Г10	РУ-1274	-C ₃ H ₆ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ F	-H	2HCl	437,3
Г11	РУ-883	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	-C ₄ H ₃ S	-H	2HCl	439,4
Г12	РУ-1276	-C ₃ H ₆ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ F	-H	2HCl	449,3
Г13	РУ-729	-C ₃ H ₆ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃	-H	2HCl	449,4
Г14	РУ-1277	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	-4-C ₆ H ₄ F	-H	2HCl	451,3
Г15	РУ-598	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	451,8
Г16	РУ-1273	-C ₃ H ₆ Br	-4-C ₆ H ₄ F	-H	HBr	453,1
Г17	РУ-597	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	453,7
Г18	РУ-723	-C ₃ H ₆ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	453,8
Г19	РУ-731	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃	-H	2HCl	463,4
Г20	РУ-724	-C ₃ H ₆ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	465,8

Таблица А.1 (продолжение)

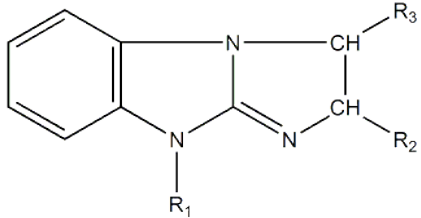
1	2	3	4	5	6	7
Г21	РУ-721	-C ₃ H ₆ NC ₅ H ₁₀	-C ₆ H ₅	-H	2HCl·2H ₂ O	467,4
Г22	РУ-725	-C ₃ H ₆ NC ₄ H ₈ O	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	467,8
Г23	РУ-592	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ Br	-H	2HCl	484,2
Г24	РУ-631	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl·3H ₂ O	491,8
Г25	РУ-593	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Br	-H	2HCl	496,2
Г26	РУ-594	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-4-C ₆ H ₄ Br	-H	2HCl·H ₂ O	516,2
<p>N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы</p> 						
Д1	РУ-1316	-CH ₂ C(O)NH ₂	-H	-H	HCl	252,7
Д2	РУ-663	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	-H	-H	HCl	293,7
Д3	РУ-1297	-CH ₂ C(O)N(C ₂ H ₅) ₂	-H	-H	HCl	308,8
Д4	РУ-1317	-CH ₂ C(O)NC ₅ H ₁₀	-H	-H	HCl	320,8
Д5	РУ-1299	-CH ₂ C(O)NC ₄ H ₈ O	-H	-H	HCl	322,7
Д6	RF-51	-CH ₂ C(O)C(CH ₃) ₃	-H	-H	2HCl	330,2
Д7	РУ-254	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-H	-H	2HCl	331,2
Д8	РУ-1307	-CH ₂ C(O)N(CH ₃)C ₆ H ₅	-H	-H	HCl	342,8
Д9	РУ-255	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-H	-H	2HCl	343,2
Д10	РУ-283	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-H	-H	2HCl	345,2
Д11	РУ-1303	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ F	-H	-H	HCl	346,7
Д12	РУ-1301	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ F	-H	-H	HCl	346,7
Д13	РУ-1309	-CH ₂ C(O)NH-2,6-C ₆ H ₃ (CH ₃) ₂	-H	-H	HCl	356,8
Д14	РУ-1312	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ C(CH ₃) ₂	-H	-H	HCl	370,8
Д15	РУ-1311	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅	-H	-H	HCl	372,8

Таблица А.1 (продолжение)

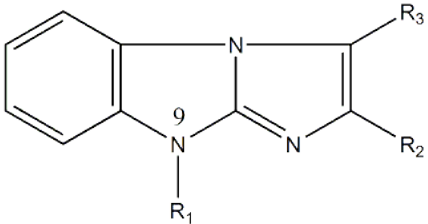
1	2	3	4	5	6	7
Д16	РУ-891	-CH ₂ C(O)-,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂	-H	-H	HBr	390,2
Д17	РУ-857	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	441,8
Д18	РУ-860	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Cl	-H	2HCl	453,8
Д19	РУ-1195	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈	-3,4-C ₆ H ₃ Cl ₂	-H	2HCl	472,2
Д20	РУ-324	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ Br	-H	2HBr	575,1
<p>N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы</p> 						
Е1	РУ-1325	-CH ₃	-CH ₃	-H	HCl	221,6
Е2	РУ-1326	-CH ₂ CHCH ₂	-CH ₃	-H	HCl	247,7
Е3	РУ-138	-CH ₃	-C(CH ₃) ₃	-H	HCl	263,7
Е4	РУ-1327	-C ₄ H ₉	-CH ₃	-H	HCl	263,7
Е5	ТИА-9	-CH ₃	-CH ₃	-C(S)NHCH ₂ CHCH ₂	-	284,3
Е6	РУ-139	-C ₃ H ₇	-C(CH ₃) ₃	-H	HCl	291,8
Е7	РУ-156	-CH ₃	-C ₆ H ₅	-CH ₃	HCl	297,7
Е8	РУ-1328	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-H	HCl	297,7
Е9	РУ-626	-CH ₃	-C ₄ H ₃ O	-H	HNO ₃	300,2
Е10	ТИА-12	-C ₃ H ₇	-CH ₃	-C(S)NHC ₂ H ₅	-	300,4
Е11	ТИА-10	-C ₃ H ₇	-CH ₃	-C(S)NHCH ₂ CHCH ₂	-	312,4
Е12	РУ-1330	-C ₂ H ₄ N(CH ₃) ₂	-CH ₃	-H	2HCl	315,2

Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
E13	ТИА-1	-CH ₃	-CH ₃	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	320,4
E14	РУ-157	-CH ₃	-C ₆ H ₅	-CH ₃	HNO ₃	324,3
E15	РУ-26	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈	-CH ₃	-H	2HCl	341,2
E16	РУ-18	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-CH ₃	-H	2HCl	343,2
E17	ТИА-4	-CH ₂ CHCH ₂	-CH ₃	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	346,4
E18	ТИА-13	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-C(S)NHC ₂ H ₅	-	348,4
E19	РУ-1331	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-CH ₃	-H	2HCl	355,3
E20	РУ-1332	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-CH ₃	-H	2HCl	357,2
E21	РУ-470	-C ₂ H ₄ N(CH ₃) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	357,3
E22	РУ-121	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ OH	-H	-	360,4
E23	ТИА-2	-C ₄ H ₉	-CH ₃	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	362,4
E24	РУ-398	-C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	371,3
E25	ТИА-5	-CH ₃	-C ₅ H ₆	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	382,4
E26	РУ-229	-CH ₃	-CH ₃	-C(O)CH ₂ NC ₅ H ₁₀	2HCl	383,3
E27	РУ-36	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	385,3
E28	РУ-499	-CH ₃	-CH ₃	-C(O)OC ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	2HCl	387,3
E29	ТИА-3	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	396,5
E30	РУ-126	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	397,3
E31	РУ-527	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-C(CH ₃) ₃	-H	2HCl	399,3
E32	РУ-141	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	(COOH) ₂	402,4
E33	РУ-13	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₅	-H	2HCl	405,3
E34	ТИА-6	-CH ₂ CHCH ₂	-C ₅ H ₆	-C(S)NHC ₆ H ₅	-	408,5
E35	РУ-391	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	H ₂ SO ₄	410,5

Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
E36	ПУ-204	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	-H	2HCl	411,3
E37	ПУ-259	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{CH}_3$	$-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$	2HCl	415,3
E38	ПУ-488	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$	2HCl	415,3
E39	ПУ-335	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$	$2\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	417,3
E40	ПУ-275	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$	-H	2HCl	419,3
E41	ПУ-205	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	-H	2HCl	423,4
E42	ПУ-35	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$	-H	2HCl	424,2
E43	ТИА-7	$-\text{C}_4\text{H}_9$	$-\text{C}_5\text{H}_6$	$-\text{C}(\text{S})\text{NHC}_6\text{H}_5$	-	424,5
E44	ПУ-708	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	-H	2HCl	425,3
E45	ПУ-162	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{CH}_3$	2HCl	431,4
E46	ПУ-276	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$	-H	2HCl	431,4
E47	ПУ-704	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	-H	H_2SO_4	436,5
E48	ПУ-125	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	-H	2HNO_3	438,4
E49	ПУ-691	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	-H	H_2SO_4	442,5
E50	ПУ-174	$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NC}_5\text{H}_{10}$	2HCl	445,3
E51	ПУ-707	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$	-H	H_2SO_4	448,5
E52	ПУ-501	$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_5\text{H}_6$	$-\text{C}(\text{O})\text{OC}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2HCl	449,3
E53	ПУ-30	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_5$	-H	2HCl	449,4
E54	ПУ-140	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_5\text{H}_{10}$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	-H	2HNO_3	450,4
E55	ПУ-858	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	-H	2HCl	451,3
E56	ПУ-31	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	-H	$2\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	453,4
E57	ПУ-285	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	$-4-\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$	-H	2HCl	453,7

Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
E58	ПУ-134	$C_2H_4N-(C_2H_5)_2$	$-C(CH_3)_3$	-H	HI	454,3
E59	ПУ-32	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-C_{10}H_7$	-H	2HCl	455,4
E60	ПУ-620	$-C_2H_4N(CH_3)_2$	$-4-C_6H_4OCH_3$	-H	$2HCl \cdot 3H_2O$	461,3
E61	ПУ-531	-CH ₃	$-C_6H_5$	$-C(O)OC_2H_4N(C_2H_5)_2$	2HCl	463,4
E62	ПУ-179	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-3,4-C_6H_3(OCH_3)_2$	-H	2HCl	465,4
E63	ПУ-68	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-C_{10}H_7$	-H	2HCl	467,4
E64	ПУ-692	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-C_6H_5$	-H	2HNO ₃	470,4
E65	ПУ-158	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-C_6H_5$	-CH ₃	2HNO ₃	472,4
E66	ПУ-124	$C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-C(CH_3)_3$	-H	2HBr	474,2
E67	ПУ-532	-CH ₃	-CH ₃	$-C(O)OC_3H_6N(CH_3)_2$	2HBr	476,2
E68	ПУ-147	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-4-C_6H_4OCH_3$	$-COCH_3$	2HCl	477,4
E69	ПУ-490	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-C_6H_5$	$-C(O)OC_2H_5$	2HCl	477,4
E70	ПУ-290	$-C_2H_4NC_4H_8O$	$-2,5-C_6H_3(OCH_3)_2$	-H	2HCl	479,3
E71	ПУ-291	$-C_2H_4NC_4H_8O$	$-3,4-C_6H_3(OCH_3)_2$	-H	2HCl	479,3
E72	ПУ-163	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-C_6H_5$	-CH ₃	2HNO ₃	484,5
E73	ПУ-213	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-4-C_6H_4OH$	-H	2HNO ₃	486,4
E74	ПУ-397	$-C_2H_4NC_4H_8O$	$-C(CH_3)_3$	-H	2HBr	488,2
E75	ПУ-476	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-4-C_6H_4OCH_3$	-H	2HNO ₃	488,4
E76	ПУ-148	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-4-C_6H_4OCH_3$	$-COCH_3$	2HCl	489,4
E77	ПУ-399	$-C_3H_6N(CH_3)_2$	$-C(CH_3)_3$	-H	2HClO ₄	499,3
E78	ПУ-262	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2$	$-C_4H_3S$	-H	2HBr	500,2
E79	ПУ-72	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-C_6H_5$	$-C(O)OCH_3$	$HBr \cdot H_2O$	501,4
E80	ПУ-123	$-C_2H_4NC_5H_{10}$	$-4-C_6H_4OH$	-H	I	502,3

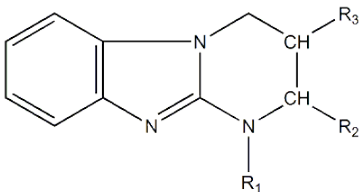
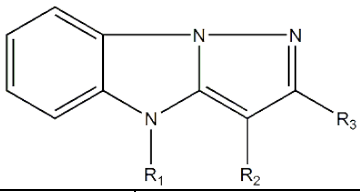
Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
E81	ПУ-189	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-3,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂	-H	2HNO ₃	502,4
E82	ПУ-698	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-H	H ₂ SO ₄	502,5
E83	ПУ-774	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-CH ₃	-C(O)OCH ₃	2HBr	504,2
E84	ПУ-474	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-C ₆ H ₅	-H	2HBr	508,2
E85	ПУ-392	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C(CH ₃) ₃	-H	2H ₃ PO ₄	508,4
E86	ПУ-85	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ (OH)	-H	2HBr	510,2
E87	ПУ-617	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-3-C ₆ H ₄ (OH)	-H	2HBr	510,2
E88	ПУ-709	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-C ₄ H ₃ S	-H	2HBr	514,2
E89	ПУ-180	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-H	2HCl	518,5
E90	ПУ-164	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C ₆ H ₅	-CH ₃	2HBr	520,2
E91	ПУ-86	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ OH	-H	2HBr	522,2
E92	ПУ-477	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃	-H	2HBr	524,2
E93	ПУ-639	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₅	-H	2H ₃ PO ₄	528,4
E94	ПУ-183	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-H	2HNO ₃	530,5
E95	ПУ-703	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₄ H ₃ S	-H	2H ₃ PO ₄	534,4
E96	ПУ-533	-CH ₃	-C ₅ H ₆	-C(O)OC ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	2HBr	538,2
E97	ПУ-75	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Br	-C(O)CH ₃	2HCl	538,3
E98	ПУ-702	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₄ H ₃ S	-H	2HClO ₄	539,3
E99	ПУ-694	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C ₆ H ₅	-H	2H ₃ PO ₄	540,4
E100	ПУ-693	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C ₆ H ₅	-H	2HClO ₄	545,3
E101	ПУ-705	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C ₄ H ₃ S	-H	2HClO ₄	551,3
E102	ПУ-710	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-C ₄ H ₃ S	-H	2HClO ₄	553,3

Таблица А.1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
E103	ПУ-188	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-3,4-C ₆ H ₃ (OH) ₂	-H	2HBr·H ₂ O	556,2
E104	ПУ-375	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-2,5-C ₆ H ₃ (OH) ₂	-H	2HBr·2H ₂ O	562,2
E105	ПУ-81	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-4-C ₆ H ₄ Br	-C(O)C ₂ H ₂ C ₄ H ₃ O	HCl	579,9
E106	ПУ-697	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂	-H	2H ₃ PO ₄	588,4
E107	ПУ-90	-C ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-C ₁₀ H ₇	-C(O)OCH ₃	2HBr	614,3
E108	ПУ-521	-C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	-C ₆ H ₅	-C(O)C ₄ H ₃ S	2HBr·H ₂ O	622,4
Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы <div style="text-align: center;"> </div>						
Ж1	ПУ-1315	-CH ₂ C(O)NH ₂	-H	-H	HCl	266,7
Ж2	ПУ-1298	-CH ₂ C(O)N(C ₂ H ₅) ₂	-H	-H	HCl	322,8
Ж3	ПУ-1156	-C ₂ H ₄ NHCH(CH ₃) ₂	-H	-H	2HCl	331,2
Ж4	ПУ-1318	-CH ₂ C(O)NC ₅ H ₁₀	-H	-H	HCl	334,8
Ж5	ПУ-1300	-CH ₂ C(O)NC ₄ H ₈ O	-H	-H	HCl	336,8
Ж6	RF-102	-C ₂ H ₄ NHC(CH ₃) ₃	-H	-H	2HCl	345,3
Ж7	ПУ-1308	-CH ₂ C(O)NH(CH ₃)C ₆ H ₅	-H	-H	HCl	356,8
Ж8	ПУ-1304	-CH ₂ C(O)NH-4-C ₆ H ₄ F	-H	-H	HCl	360,8
Ж9	ПУ-1302	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ F	-H	-H	HCl	360,8
Ж10	ПУ-1310	-CH ₂ C(O)NH-2,6-C ₆ H ₃ (CH ₃) ₂	-H	-H	HCl	370,8
Ж11	ПУ-1157	-C ₂ H ₄ NHC ₆ H ₁₁	-H	-H	2HCl	371,3

Таблица А.1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
Ж12	RF-104	-C ₂ H ₄ -4-NC ₄ H ₈ N(CH ₃)	-H	-H	2HCl	372,3
Ж13	ПУ-1306	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₆ H ₄ CF ₃	-H	-H	HCl	410,8
Ж14	RF-105	-C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ N	-H	-H	2HCl·2H ₂ O	438,3
Ж15	ПУ-1314	-CH ₂ C(O)NH-2-C ₈ H ₅ N(C ₆ H ₅)	-H	-H	HCl	457,9
Ж16	ПУ-1313	-CH ₂ C(O)NHC ₄ HS(COOC ₂ H ₅)C ₆ H ₅	-H	-H	HCl	497,9
		N ¹ -1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы				
						
31	ГТА-4	-C(S)NHC ₂ H ₅	-H	-H	-	260,4
32	ГТА-6	-C(S)NHAII	-H	-H	-	272,4
33	ГТА-2	-C(S)NHC ₆ H ₅	-H	-H	-	308,4
		Пиразоло[1,2-а]бензимидазолы				
						
И1	РУС-27	CH ₃	-C(O)C ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-CH ₃	HCl	362,8
И2	РУС-39	-CH ₃	-C(O)OC ₂ H ₄ NC ₄ H ₈ O	-CH ₃	HCl	378,8
И3	РУС-71	-CH ₃	-C(O)OC ₂ H ₄ NC ₅ H ₁₀	-CH ₃	HCl·H ₂ O	394,8

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(информационное)

Дополнения и уточнения к результатам исследованияТаблица Б. 1. Фрагмент полного консенсусного прогноза 5-HT_{2A}-антагонистической активности изучаемых производных азола.

Шифр	Прогноз по системе PASS, баллы	Прогноз по системе TestSim (эталонны IUPHAR)		Прогноз по системе TestSim (эталонны ряда бензимидазолов)		Соответствие «кóра» значимым дескрипторам ретроспективного анализа, баллы	Консенсус прогноз, баллы
		ОКС	Баллы	ОКС	Баллы		
E92	0	0,1804	0	0,5817	2	1	3
E108	0	0,2382	1	0,3839	1	1	3
E93	0	0,1767	0	0,5875	2	1	3
E51	1	0,1896	0	0,4854	1	1	3
E102	1	0,1866	0	0,4717	1	1	3
Г4	1	0,2179	0	0,3615	1	1	3
Г10	1	0,2136	0	0,4114	1	0	2
Г8	1	0,2108	0	0,4192	1	0	2
E19	1	0,1882	0	0,4431	1	1	3
E16	0	0,1584	0	0,4075	1	1	2
E27	0	0,1756	0	0,3595	1	1	2
E66	0	0,1756	0	0,3595	1	1	2
E48	0	0,1756	0	0,3595	1	1	2
E30	0	0,2012	0	0,3844	1	1	2
E58	0	0,1741	0	0,3297	1	1	2
E3	0	0,1646	0	0,3175	1	1	2
E6	0	0,1730	0	0,3465	1	1	2
E54	0	0,2012	0	0,3844	1	1	2
E32	0	0,1756	0	0,3595	1	1	2
E7	0	0,1594	0	0,4217	1	1	2

Примечания:

ОКС – общий коэффициент сходства.

Таблица Б. 2. Ретроспективный подструктурный анализ влияния типа «кóра» на высокий²⁶ уровень 5-НТ₃-антагонистической активности производных азола.

№ п/п	Химический класс	n	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
1	N ⁹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	49	0,55	0,45	1,05	1,5×10 ⁻¹	2
2	N ⁹ -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	3	0,57	0,43	0,30	3,8×10 ⁻¹	0
3	Пиримидо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	1	0,38	0,62	0,36	3,6×10 ⁻¹	0
4	2,3-дигидро-N ¹ -бензимидазолы	6	0,17	0,83	2,15	1,6×10 ⁻²	-3
5	N ¹ -бензимидазолы	19	0,19	0,81	3,39	3,5×10 ⁻⁴	-5
6	N ¹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	15	0,76	0,24	3,41	3,2×10 ⁻⁴	5
7	Индолы	4	0,22	0,78	1,57	5,8×10 ⁻²	-2

Примечания:

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

²⁶ Подавление эффектов серотонина более, чем на 33% (рассчитано в результате кластерного анализа).

Таблица Б. 3. Расширенный подструктурный анализ влияния типа «кóра» на высокий уровень 5-НТ₃-антагонистической активности производных азола.

№ п/п	Химический класс	n	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
1	N ⁹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	111	0,51	0,49	0,24	4,0×10 ⁻¹	0
2	N ⁹ -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	17	0,10	0,90	3,58	1,7×10 ⁻⁴	-5
3	Пиримидо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	17	0,09	0,91	3,89	5,0×10 ⁻⁵	-5
4	2,3-дигидро-N ¹ -бензимидазолы	11	0,53	0,47	0,14	4,5×10 ⁻¹	0
5	N ¹ -бензимидазолы	21	0,31	0,69	0,75	2,3×10 ⁻¹	-1
6	N¹-имидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы	45	0,59	0,41	1,52	6,4×10⁻²	3
7	Индолы	26	0,68	0,32	2,84	2,2×10⁻³	4

Примечания:

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

Таблица Б. 4. Расширенный подструктурный анализ влияния типа заместителя²⁷ на развитие высокого²⁸ уровня 5-HT₃-антагонистической активности производных индола.

№ п/п	Признак	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
C³(R₃)						
1	(Z)-2-хлоро-N-(1-(2-(диэтиламино)этиламино)-1-оксобут-2-ен-2-ил)бензамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
2	(Z)-2-фтор-N-(1-(3-морфолинопропиламино)-1-оксобут-2-ен-2-ил)бензамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
3	(Z)-N-(1-(2-(диэтиламино)этиламино)-1-оксобут-2-ен-2-ил)бензамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
4	(Z)-2-метокси-N-(1-(4-метилпиперазин-1-ил)-1-оксобут-2-ен-2-ил)бензамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
5	(Z)-N-(1-(2-(диэтиламино)этиламино)-1-оксобут-2-ен-2-ил)-2-фторбензамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
6	(E)-1-бенилбут-2-ен-1-он	0,71	0,29	1,26	0,10	1
N¹(R₁)						
1	N,N-диметилметансульфонамид	0,72	0,28	0,99	0,16	1
2	1-(дипропиламино)бутан-2-ол	0,72	0,28	0,99	0,16	1
3	1-(азепан-1-ил)бутан-2-ол	0,72	0,28	0,99	0,16	1

Примечания:

представлены наиболее значимые признаки; P_h – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с высоким уровнем активности; P_{nh} – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих высокой активности; Z – биномиальный критерий, характеризующий различия P_h и P_{nh}; Pr – достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие активности; Ind – индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния; 1 – тенденция; «+» - положительное; «-» - отрицательное).

²⁷ Представлены наиболее значимые заместители.

²⁸ Подавление эффекта серотонина более, чем на 33% в концентрации 1 мкМ (граница класса определена с помощью кластерного анализа).

Таблица Б. 5. Расширенный подструктурный анализ влияния типа заместителя²⁹ на развитие высокого³⁰ уровня 5-HT₃-антагонистической активности производных N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

№ п/п	Признак	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
C²(R₂)						
1	-C(CH ₃) ₃ ; трет-бутил	0,76	0,24	1,32	9,4×10 ⁻²	2
2	-C ₆ H ₅ ; фенил	0,70	0,30	1,40	8,0×10 ⁻²	2
3	-4-C₆H₄F; 4-фторфенил; п-фторфенил	0,72	0,28	1,85	3,2×10⁻²	3
4	-4-C ₆ H ₄ Br; 4-бромфенил; п-бромфенил	0,22	0,78	1,55	6,0×10 ⁻²	-2
N¹(R₁)						
1	-CH ₃ ; метил	0,22	0,78	1,55	6,0×10 ⁻²	-2
2	-(CH₂)₃NC₅H₁₀; пиперидинопропил	0,91	0,09	3,62	1,5×10⁻⁴	5
3	-(CH₂)₃N(C₂H₅)₂; диэтиламинопропил	0,76	0,24	1,82	3,5×10⁻²	3
4	-(CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ O; морфолинопропил	0,22	0,78	1,55	6,0×10 ⁻²	-2
5	-(CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ ; пирролидинопропил	0,76	0,24	1,32	9,4×10 ⁻²	2
6	-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,19	0,81	1,86	3,2×10 ⁻²	-3

Примечания:

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

²⁹ Представлены наиболее значимые заместители.

³⁰ Подавление эффекта серотонина более, чем на 33% в концентрации 1 мкМ (граница класса определена с помощью кластерного анализа).

Таблица Б. 6. Частотный анализ влияния липофильности заместителей³¹ на развитие высокого³² уровня 5-НТ₃-антагонистической активности производных N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

№ п/п	Липофильность (LogP)	Заместитель	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
<i>R_I(N¹)</i>							
1	-0,28 ≤ Log P < -0,14	-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; -2-C ₂ H ₄ OH	0,15	0,85	2,38	8,6×10 ⁻³	-4
2	-0,14 ≤ Log P < 0,16	-(CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ O	0,19	0,81	1,86	3,2×10 ⁻²	-3
3	0,16 ≤ Log P < 0,45	-CH ₃ ; -(CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ ; -(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈	0,22	0,78	1,55	6,0×10 ⁻²	-2
4	0,74 ≤ Log P < 1,17	-(CH ₂) ₃ NC ₅ H ₁₀ ; -(CH ₂) ₃ N(C ₂ H ₅) ₂ ; -(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀	0,74	0,26	2,84	2,3×10⁻³	4

Примечания:

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

³¹ Представлены наиболее значимые заместители.

³² Подавление эффекта серотонина более, чем на 33% в концентрации 1 мкМ (граница активности определена в результате кластерного анализа).

Таблица Б. 7. Частотный анализ влияния молекулярной рефракции заместителей³³ на развитие высокого³⁴ уровня 5-HT₃-антагонистической активности производных N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

№ п/п	Молекулярная рефракция (MR)	Заместитель	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
<i>R'(N')</i>							
1	5,00 ≤ MR < 8,46	-CH ₃ ; метил	0,22	0,78	1,55	0,06	-2
2	29,21 ≤ MR < 39,59	- (CH ₂) ₃ NC ₅ H ₁₀ ; - (CH ₂) ₃ N(C ₂ H ₅) ₂ ; - (CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ O; - (CH ₂) ₃ NC ₄ H ₈ ; - (CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; - (CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; - (CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; - (CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈	0,60	0,40	1,36	0,09	2

Примечания:

представлены наиболее значимые признаки; P_h – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с высоким уровнем активности; P_{nh} – Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих высокой активности; Z – биномиальный критерий, характеризующий различия P_h и P_{nh}; Pr – достоверность влияния MR (молекулярной рефракции) на наличие или отсутствие активности; Ind – индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния; 2 – слабое; «+» - положительное; «-» - отрицательное).

³³ Представлены наиболее значимые заместители.

³⁴ Подавление эффекта серотонина более, чем на 33% в концентрации 1 мкМ (граница активности определена в результате кластерного анализа).

Таблица Б. 8. 5-НТ₄-агонистические свойства конденсированных азолов на модели спазма изолированного пищевода крысы.

Соединение	5-НТ ₄ -опосредованное подавление спазма (M±m), %	Соединение	5-НТ ₄ -опосредованное подавление спазма (M±m), %
1	2	1	2
1H-бензимидазолы			
A13	1,4±0,5	A11	0,7±0,3
A9	1,0±0,6	A10	0,7±0,3
A16	1,0±0,6	A14	0,0±0,0
A4	0,8±0,5		
2,3-дигидро-1H-бензимидазолы			
B11	1,0±0,6	B20	0,5±1,1
B24	0,8±1,9	B17	0,3±0,4
B21	0,8±1,9	B19	0,0±1,2
Индолы			
B12	3,2±1,4	B14	0,5±2,3
B17	1,5±1,1	B15	0,5±0,9
B11	1,0±1,6	B5	0,3±3,1
B2	1,0±1,6	B1	0,3±2,2
B3	0,8±2,7	B8	0,3±1,1
B13	0,8±1,3	B9	0,3±0,4
B16	0,8±0,8	B10	0,3±0,4
B6	0,8±0,4	B4	0,0±1,9
B7	-0,5±4,3	B18	0,0±1,7
N¹-имидазо[1,2-a]бензимидазолы			
Г4	2,5±3,6	Г8	0,8±4,0
Г9	2,3±1,9	Г21	0,8±2,2
Г3	1,8±5,3	Г19	0,8±0,8
Г16	1,8±1,8	Г23	0,8±0,8
Г18	1,8±1,3	Г24	0,5±4,3
Г26	1,3±1,1	Г6	0,5±3,8
Г1	1,0±3,6	Г15	0,3±3,3
Г11	1,0±3,5	Г10	0,3±1,5
Г25	1,0±1,9	Г20	0,0±1,9

Таблица Б. 8 (продолжение)

1	2	1	2
Г7	1,0±0,7	Г12	0,0±0,3
N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Д8	1,0±1,2	Д13	0,5±1,1
Д14	0,8±2,9	Д18	0,3±1,8
Д1	0,8±0,8	Д4	0,3±0,4
Д11	0,8±0,8	Д5	0,3±0,4
Д20	0,75±0,4	Д6	0,0±3,2
Д15	0,5±2,5	Д12	-0,3±1,3
N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы			
Е107	31,5±5,5 [#]	Е56	0,3±0,3
Е17	27,7±5,4 [#]	Е57	0,3±0,3
Е43	17,1±3,3 [#]	Е29	0,3±0,3
Е28	15,9±1,4 [#]	Е11	0,3±0,3
Е33	15,2±6,7 [#]	Е53	0,3±0,3
Е18	13,1±1,7 [#]	Е55	0,3±0,3
Е36	3,8±2,4	Е26	0,3±0,3
Е79	1,0±0,6	Е52	0,3±0,3
Е23	1,0±0,6	Е38	0,7±0,3
Е75	0,8±0,5	Е50	0,7±0,3
Е92	0,8±0,5	Е61	0,7±0,3
Е34	0,7±0,7	Е106	0,3±0,3
Е96	0,7±0,3	Е37	0,0±0,0
Е25	0,7±0,3	Е39	0,0±0,0
Е10	0,7±0,3	Е69	0,0±0,0
Е67	0,7±0,3	Е5	-2,8±2,8
Е21	0,3±0,3	Е83	-4,6±5,6
N¹-1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы			
33	1,0±0,6	32	0,3±0,3
31	1,0±0,6		
Пиразоло[1,2-а]бензимидазолы			
И1	0,7±0,7	И3	0,3±0,3
И2	0,3±0,3		
Вещества сравнения			
Серотонин			90,6±1,6 [#]
ML10302			45,6±6,9 [#]

Примечания:

вещества изучены в концентрации 10 мкмоль/л; [#] - отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05; критерий Даннета).

Таблица Б. 9. Подструктурный анализ влияния типа заместителя на развитие 5-НТ₄-антагонистической активности³⁵ изученных производных N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

№ п/п	Признак	P _h	P _{nh}	Z	Pr	Ind
C²(R₂)						
1	-C ₄ H ₃ O; 2-фурил	0,50	0,50	-0,25	6,0×10 ⁻¹	0
2	-CH ₂ NC ₅ H ₁₀ ; пиперидинометил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
3	-C ₄ H ₃ S; 2-тиенил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
4	-CH ₃ ; метил	0,55	0,45	0,54	3,0×10 ⁻¹	0
5	-C(CH ₃) ₃ ; <i>трет</i> -бутил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
6	-C ₆ H ₅ ; фенил	0,53	0,47	0,22	4,1×10 ⁻¹	0
7	-3,4-C ₆ H ₃ (OCH ₃) ₂ ; 3,4-диметоксифенил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
8	-4-C ₆ H ₄ OCH ₃ ; 4-метоксифенил; <i>п</i> -метоксифенил	0,23	0,77	1,46	7,2×10 ⁻²	-2
9	-α-C₁₀H₇; α-нафтил	0,79	0,21	1,66	4,8×10⁻²	3
10	-4-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅ ; 4-этоксифенил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
N⁹(R₁)						
1	-C ₃ H ₇ ; пропил	0,31	0,69	0,76	2,2×10 ⁻¹	0
2	-C ₃ H ₅ ; пропен-ил	0,70	0,30	1,20	1,2×10 ⁻¹	1
3	-CH ₃ ; метил	0,35	0,65	1,28	1,0×10 ⁻¹	-1
4	-C ₄ H ₉ ; <i>н</i> -бутил	0,70	0,30	1,20	1,2×10 ⁻¹	1
5	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂ ; диметиламиноэтил	0,38	0,62	0,31	3,8×10 ⁻¹	0
6	-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; диэтиламиноэтил	0,40	0,60	0,81	2,1×10 ⁻¹	0
7	-CH ₂ C ₆ H ₅ ; бензил	0,70	0,30	1,20	1,2×10 ⁻¹	1
8	-(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; пиперидиноэтил	0,70	0,30	1,20	1,2×10 ⁻¹	1
9	-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,26	0,74	1,14	1,3×10 ⁻¹	-1

Примечания:

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

³⁵ Наличие статистически значимого (p<0,05) 5-НТ₄-агонистического эффекта.

Таблица Б. 10. Влияние авазола и MRS1279 на P2Y₁-опосредованную активацию тромбоцитов кролика.

Вещество (концентрация)	P2Y ₁ -пуриnergическая активность, Δ% (M±m)
Авазол (1 мкМ)	-13,8 ± 7,50*
MRS1279 (1 мкМ)	-80,2 ± 0,03 ^x

Примечание:

* – отличие от показателя соединения MRS1279 статистически значимо (p<0,05, критерий Манна-Уитни); ^x – отличие по отношению к контролю статистически значимо (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

Таблица Б. 11. Влияние авазола и валсартана на АТ₁-опосредованный спазм изолированной портальной вены крыс.

Шифр	АТ ₁ -антагонистическая активность (10 мкмоль/л), Δ% (M ± m)	АТ ₁ -антагонистическая активность (0,1 мкмоль/л), Δ%
Авазол	-3,2±3,2 [#]	-5,2±4,0 [#]
Валсартан	-99,0±1,1*	-95,2±1,8*

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к контролю, тест Манна-Уитни (p<0,05); [#] - статистически значимо по отношению к валсартану, тест Манна-Уитни (p<0,05).

Таблица Б. 12. Влияние авазола и верапамила на гиперкалиевую контрактуру изолированной портальной вены крыс.

Шифр	Изменение мышечного спазма (10 мкмоль/л), Δ% (M ± m)
Авазол	-13,9±6,7 [#]
Верапамил	-65,0±1,9*

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к контролю, тест Манна-Уитни (p<0,05); [#] - статистически значимо по отношению к верапамилу, тест Манна-Уитни (p<0,05).

Таблица Б. 13. Влияние авазола и атропина на ацетилхолиновый спазм изолированной подвздошной кишки морской свинки.

Шифр	Изменение мышечного спазма (1 мкмоль/л), Δ% (M ± m)
Авазол	-16,0±4,9 [#]
Атропин	-84,6±0,9*

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к контролю, тест Манна-Уитни ($p < 0,05$); [#] - статистически значимо по отношению к атропину, тест Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Таблица Б. 14. Влияние авазола на выраженность стереотипного поведения крыс, вызванного апоморфином (M±m).

Группа	Выраженность стереотипии, баллы			
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль (р-р NaCl 0,9% + апоморфин)	3,0±0,00	0,8±0,17	0,3±0,21	0,0±0,00
Авазол (0,5 мг/кг) + апоморфин	3,0±0,00	1,0±0,00	0,2±0,17	0,0±0,00
Авазол (5 мг/кг) + апоморфин	3,0±0,00	1,5±0,34	1,0±0,25	0,3±0,21

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до введения апоморфина; статистически значимых отличий не выявлено ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уолиса).

Таблица Б. 15. Изменение каталептогенного эффекта галоперидола при введении авазола ($M \pm m$).

Группа	Выраженность каталепсии, баллы				
	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	120 мин
Контроль (р-р NaCl 0,9% + галоперидол)	3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00	2,2±0,54
Авазол (0,5 мг/кг) + галоперидол	2,8±0,17	2,8±0,17	3,0±0,00	2,8±0,17	2,7±0,21
Авазол (5 мг/кг) + галоперидол	2,8±0,17	3,0±0,00	3,0±0,00	2,7±0,21	2,8±0,17

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до галоперидола (3 мг/кг); статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Даннета); выраженность каталепсии оценивалась по способности удерживать статические позы по шкале Margurgo (1 балл – передняя лапа слегка отводится и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см).

Таблица Б. 16. Влияние авазола на выраженность ареколинового тремора у мышей ($M \pm m$).

Группа	Латентный период, мин	Длительность тремора, мин
Контроль (физ. раствор + ареколин)	1,1±0,2	6,8±0,6
Авазол (0,5 мг/кг) + ареколин	1,0±0,1	7,0±0,6
Авазол (5 мг/кг) + ареколин	1,5±0,2	6,0±0,4

Примечание:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до ареколина (15 мг/кг); статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмана-Кеулса).

Таблица Б. 17. Влияние авазола на выраженность эффектов низкой пороговой дозы (2 мг/кг) и высокой дозы (4 мг/кг) никотина у мышей ($M \pm m$).

Группа	Латентный период развития тремора, с	Количество животных с судорожными приступами, %	Латентный период развития судорог, с
Контроль 1 (физ. раствор + никотин 2 мг/кг)	70,2±5,2	0	–
Авазол (0,5 мг/кг) + никотин (2 мг/кг)	74,3±2,6	0	–
Авазол (5 мг/кг) + никотин (2 мг/кг)	72,8±2,3	0	–
Контроль 2 (физ. раствор + никотин 4 мг/кг)	55,7±3,4*	100 [#]	97,4±4,2
Авазол (0,5 мг/кг) + никотин (4 мг/кг)	56,5±3,7*	100 [#]	95,4±4,5
Авазол (5 мг/кг) + никотин (4 мг/кг)	54,7±2,8*	100 [#]	96,5±4,2

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до никотина; «←» - показатель не может быть измерен в виду отсутствия судорог; * – отличия по отношению к контрольной группе 1 статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета); # – отличия по отношению к контрольной группе 1 статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 18. Влияние авазола на эффекты L-ДОФА ($M \pm m$).

Группа	Выраженность стереотипии, баллы		
	30 мин	60 мин	90 мин
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9% + L-ДОФА 500 мг/кг)	2,5±0,22	2,2±0,17	1,8±0,31
Контроль 2 (р-р NaCl 0,9% + L-ДОФА 100 мг/кг)	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*
Авазол (0,5 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг	0,3±0,21*	0,3±0,21*	0,0±0,00*
Авазол (5 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг	0,2±0,17*	0,2±0,17*	0,0±0,00*

Примечание:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до L-ДОФА; * – отличие от контрольной группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета).

Таблица Б. 19. Изменение эффектов (гипотермия, блефароптоз) резерпина при введении авазола ($M \pm m$).

Группа	Ректальная температура, °С			Блефароптоз, баллы
	Исход	4 часа	4,5 часов	
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9%)	38,2±0,07	38,2±0,05	38,2±0,04	0
Контроль 2 (резерпин)	38,2±0,14	37,4±0,11 ^{*#}	37,6±0,10 ^{*#}	2,0±0,2 [*]
Авазол (0,5 мг/кг) + резерпин	38,2±0,08	37,3±0,10 ^{*#}	37,6±0,11 ^{*#}	1,8±0,3 [*]
Авазол (5 мг/кг) + резерпин	38,2±0,06	37,4±0,09 ^{*#}	37,8±0,09 ^{*#}	2,0±0,2 [*]

Примечания:

внутрибрюшинное введение авазола через 4 ч после введения резерпина (2,5 мг/кг); * – отличие от показателей контрольной группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса); # - отличие статистически значимо относительно соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$; парный t-тест).

Таблица Б. 20. Изменение гипотермического эффекта клофелина при введении авазола ($M \pm m$).

Группа	Ректальная температура, °С				
	Исход	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9%)	38,2±0,11	38,3±0,11	38,2±0,07	38,1±0,10	38,3±0,10
Контроль 2 (клофелин)	38,2±0,20	36,3±0,14*	36,2±0,18*	36,4±0,13*	36,5±0,10*
Авазол (0,5 мг/кг) + клофелин	38,1±0,12	36,0±0,10*	36,1±0,13*	36,0±0,23*	36,1±0,16
Авазол (5 мг/кг) + клофелин	38,4±0,25	36,5±0,17*	36,3±0,18*	36,4±0,31*	36,9±0,25

Примечание:

внутрибрюшинное введение авазола за 30 мин до клофелина (0,1 мг/кг); * – отличие от контрольной группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Даннета)

Таблица Б. 21. Влияние авазола на уровень скорости кровотока в общей сонной артерии крыс в условиях экспериментального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III) в сравнении с кетансерин, тиклопидином, клопидогрелем, P2Y₁-антагонистом SBT119 (M±m)

Группа	Время снижения линейной скорости кровотока на 50%; 95% и 99,9%; мин		
	50%	95%	99,9%
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	14,0±0,8	23,9±1,5	24,0±0,3
Авазол (0,5 мг/кг)	12,7±0,8	24,1±1,4	30,3±3,6
Кетансерин (0,55 мг/кг)	10,3±0,4	15,7±1,0	18,0±2,9
Тиклопидин (6 мг/кг)	21,9±2,9*	44,9±3,45*	54,7±5,5*
Клопидогрел (7,3 мг/кг)	26,3±2,0*	50,2±3,2*	69,2±0,9*
SBT119 (11,6 мг/кг)	26,3±2,9*	53,6±3,9*	62,4±3,8*

Примечания:

* – отличия относительно группы контроля статистически значимы (p<0,05; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна); авазол и кетансерин изучены в эквимолярных дозах, клопидогрел, тиклопидин, SBT119 исследованы в среднеэффективных дозах при внутрибрюшинном (SBT119 при пероральном) введении.

Таблица Б. 22. Влияние авазола на уровень скорости кровотока в общей сонной артерии крыс в условиях экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током в сравнении с кетансерином, тиклопидином, клопидогрелем, P2Y₁-антагонистом SBT119 (M±m)

Группа	Время снижения линейной скорости кровотока на 50%; 95% и 99,9%; мин		
	50%	95%	99,9%
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	7,6±0,6	13,4±1,0	20,9±2,6
Авазол (0,5 мг/кг)	6,9±0,9	12,1±1,5	18,3±3,7
Кетансерин (0,55 мг/кг)	6,2±1,4	11,8±1,4	19,1±3,6
Тиклопидин (6 мг/кг)	12,9±1,4	19,5±3,2	28,4±7,6
Клопидогрел (7,3 мг/кг)	26,0±4,6*	55,8±7,1*	95,9±20,2*
SBT119 (11,6 мг/кг)	12,1±0,9*	21,1±0,9*	31,4±0,7*

Примечания:

характеристики электрического тока – постоянный, 10 мА, 12В; авазол и кетансерин изучены в эквимольных дозах, клопидогрел, тиклопидин, SBT119 исследованы в среднеэффективных дозах при внутрибрюшинном (SBT119 при пероральном) введении; * – отличия относительно группы контроля статистически значимы (p<0,05; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 23. Влияние эметазола и валсартана на выраженность АТ₁-зависимого спазма изолированной портальной вены крысы.

Шифр	АТ ₁ -антагонистическая активность (10 мкмоль/л), Δ% (M±m)	АТ ₁ -антагонистическая активность (0,1 мкмоль/л), Δ% (M±m)
Эметазол	-1,6±0,8 [#]	-0,8±0,8 [#]
Валсартан	-99,0±1,1 [*]	-95,2±1,8 [*]

Примечания:

* - статистически значимо по отношению к контролю, тест Манна-Уитни (p<0,05); [#] - статистически значимо по отношению к валсартану, тест Манна-Уитни (p<0,05).

Таблица Б. 24. Влияние эметазола и MRS1279 на P2Y₁-опосредованную активацию тромбоцитов кролика.

Вещество (концентрация)	P2Y ₁ -пуриnergическая активность, Δ% (M±m)
Эметазол (1 мкМ)	-6,4 ±5,50*
MRS1279 (1 мкМ)	-80,2 ± 0,03 ^x

Примечания:

* – отличие от показателя соединения MRS1279 статистически значимо (p<0,05, критерий Манна-Уитни); ^x – отличие по отношению к контролю статистически значимо (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

Таблица Б. 25. Влияние эметазола на выраженность эффектов 5-гидрокситриптофана ($M \pm m$).

Группа	Количество гиперкинезов «встряхивание головой»					
	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин
Контроль (р-р NaCl 0,9% + 5-ГТФ)	4,3±0,7	10,3±1,2	6,8±0,8	5,0±1,0	3,2±1,0	1,0±0,5
Эметазол (1,5 мг/кг) + 5-ГТФ	4,2±0,8	11,2±1,3	7,8±0,9	4,7±0,6	3,5±0,6	1,3±0,5
Эметазол (7,5 мг/кг) + 5-ГТФ	5,3±1,0	9,2±0,8	8,0±0,9	6,5±0,9	3,0±0,8	0,8±0,3

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении за 1 ч до 5-гидрокситриптофана (300 мг/кг); статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса).

Таблица Б. 26. Изменение эффектов фенамина при введении эметазола (M±m).

Группа	Латентный период беспокойства, мин	Длительность стереотипии, мин	Выраженность стереотипии, баллы							
			30 мин	60 мин	120 мин	180 мин	240 мин	300 мин	360 мин	420 мин
Контроль (р-р NaCl 0,9% + фенамин)	7,3±0,4	380,0±21,9	2,3±0,2	2,7±0,2	2,3±0,2	2,2±0,3	2,3±0,4	1,5±0,5	1,0±0,3	0,3±0,2
Эметазол (1,5 мг/кг) + фенамин	8,6±0,4	400,0±13,9	1,8±0,3	2,8±0,2	2,7±0,2	2,7±0,4	2,7±0,2	2,3±0,4	1,8±0,5	1,0±0,4
Эметазол (7,5 мг/кг) + фенамин	6,6±0,4	380,0±21,9	2,0±0,0	2,3±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2	2,7±0,2	1,8±0,5	0,5±0,2

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до фенамина (5 мг/кг); выраженность стереотипии оценивалась в балльной системе (0 – отсутствие стереотипии; 1 – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 – постоянная и интенсивная стереотипия); статистически значимых отличий в параллельных группах не выявлено (p<0,05; критерий Краскела-Уоллиса).

Таблица Б. 27. Изменение гипотермического эффекта клофелина при введении эметазола ($M \pm m$).

Группа	Ректальная температура, °С				
	Исход	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9%)	37,6±0,1	37,6±0,1	37,7±0,1	37,7±0,1	37,7±0,1
Контроль 2 (клофелин)	37,7±0,3	35,0±0,3*	33,9±0,5*	34,9±0,7*	35,4±0,5*
Эметазол (1,5 мг/кг) + клофелин	37,5±0,1	36,1±0,4*	35,1±0,4*	35,9±0,5*	36,3±0,4*
Эметазол (7,5 мг/кг) + клофелин	37,5±0,4	34,6±0,4*	34,1±0,3*	35,1±0,4*	35,5±0,5*

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до клофелина (0,1 мг/кг); * – отличие от контрольной группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета)

Таблица Б. 28. Изменение эффектов (гипотермия, блефароптоз) резерпина при введении эметазола ($M \pm m$).

Группа	Ректальная температура, °С			Блефароптоз, баллы
	Исход	4 часа	5 часов	
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9%)	38,0±0,2	38,1±0,1	37,9±0,1	0
Контроль 2 (резерпин)	37,9±0,1	37,1±0,1* [#]	36,0±0,4* [#]	2,0±0,3*
Эметазол (1,5 мг/кг) + резерпин	38,0±0,1	37,2±0,1* [#]	36,6±0,2* [#]	1,8±0,2*
Эметазол (7,5 мг/кг) + резерпин	38,1±0,2	37,1±0,2* [#]	36,4±0,5* [#]	2,0±0,3*

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола через 4 ч после введения резерпина (2,5 мг/кг); * – отличие от показателей контрольной группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса); [#] - отличие статистически значимо относительно соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$; парный t-тест).

Таблица Б. 29. Изменение эффектов L-ДОФА при введении эметазола ($M \pm m$).

Группа	Выраженность стереотипии, баллы		
	30 мин	60 мин	90 мин
Контроль 1 (р-р NaCl 0,9% + L-ДОФА 500 мг/кг)	2,5±0,2*	2,2±0,2*	1,8±0,3*
Контроль 2 (р-р NaCl 0,9% + L-ДОФА 100 мг/кг)	0,2±0,2	0,3±0,2	0,2±0,2
Эметазол (1,5 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг	1,0±0,3	1,2±0,3	1,0±0,3
Эметазол (7,5 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг	1,3±0,2	1,2±0,2	1,3±0,2

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до L-ДОФА; выраженность стереотипии оценивалась в балльной системе (0 – отсутствие стереотипии; 1 – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 – постоянная и интенсивная стереотипия); * – отличие от контрольной группы 2 статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета).

Таблица Б. 30. Влияние эметазола на выраженность эффектов низкой пороговой дозы (2 мг/кг) и высокой дозы (4 мг/кг) никотина у мышей ($M \pm m$).

Группа	Латентный период развития тремора, с	Количество животных с судорожными приступами, %	Латентный период развития судорог, с
Контроль 1 (физ. раствор + никотин 2 мг/кг)	70,2±5,2	0	–
Эметазол (1,5 мг/кг) + никотин (2 мг/кг)	75,7±2,3	0	–
Эметазол (7,5 мг/кг) + никотин (2 мг/кг)	73,8±2,6	0	–
Контроль 2 (физ. раствор + никотин 4 мг/кг)	54,5±2,4*	100 [#]	96,4±3,2
Эметазол (1,5 мг/кг) + никотин (4 мг/кг)	57,5±2,5*	100 [#]	93,8±4,3
Эметазол (7,5 мг/кг) + никотин (4 мг/кг)	56,7±2,2*	100 [#]	93,5±3,1

Примечания:

внутрибрюшинное введение эметазола за 60 мин до никотина; «–»- показатель не может быть измерен в виду отсутствия судорог; * – отличия по отношению к контрольной группе 1 статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Даннета); # – отличия по отношению к контрольной группе 1 статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат)

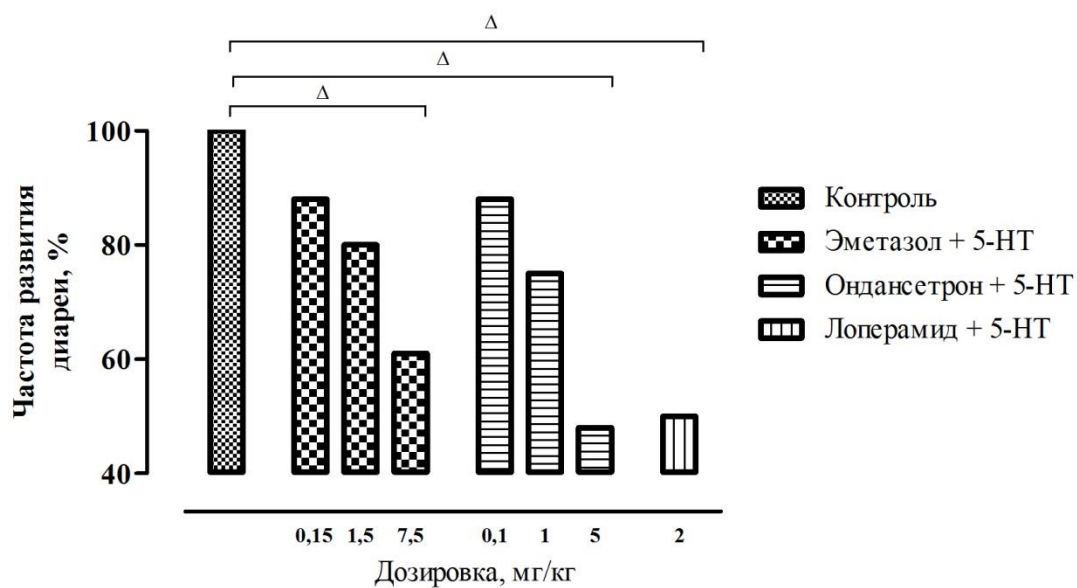


Рисунок Б. 1. Противодиарейное действие эметазола в тесте 5-гидрокситриптамиин-индуцированной дефекации в сравнении с ондансетроном и лоперамидом.

Примечания: 5-НТ – 5-гидрокситриптамиин (серотонин), эметазол и ондансетрон вводились внутривентриально эквимолярных дозах за 30 мин до 5-гидрокситриптамиина (3 мг/кг, внутривентриально), Δ - отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 31. Поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 14 дневном введении эметазола в сравнении ондансетроном и диазепамом ($M \pm m$).

Группа Показатель	Контроль (р-р NaCl 0,9%)	Диазепам (1 мг/кг)	Ондансетрон (1 мг/кг)	Эметазол (1,5 мг/кг)
Число выходов в открытый рукав	0,6±0,3	1,2±0,1	0,4±0,3	0,5±0,3
Количество выглядываний	2,3±0,5	2,7±0,8	2,5±0,5	2,6±0,5
Количество переходов	2,6±0,1	3,0±0,3	1,6±0,4	1,9±0,3
Общее время нахождения в центре, с	6,7±1,9	10,7±7,6	5,0±1,1	5,6±1,0
Латентный период ухода из центра, с	1,5±0,2	1,4±0,2	1,6±0,2	1,6±0,3
Время в открытом рукаве, с	2,0±1,0	24,4±3,4 [#]	1,8±1,3	2,6±1,4
Число болюсов	0,1±0,1	0,3±0,2	0,6±0,3	1,0±0,4

Примечания:

* - доза ондансетрона 1 мг/кг эквимолярна дозе 1,5 мг/кг эметазола; # – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Таблица Б. 32. Влияние эметазола на показатели теста «Vogel» при 14 дневном введении в сравнении с ондансетроном и диазепамом ($M \pm m$).

Группа	Регистрируемый параметр
<i>Латентный период подхода к поилке, с</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	44,2±3,7
Диазепам (1 мг/кг)	51,0±6,5
Эметазол (1,5 мг/кг)	49,9±5,9
Ондансетрон (1 мг/кг)	57,4±7,6
<i>Число наказуемых взятий воды</i>	
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	0,8±0,3
Диазепам (1 мг/кг)	2,7±0,3 [#]
Эметазол (1,5 мг/кг)	1,2±0,4
Ондансетрон (1 мг/кг)	1,5±0,4

Примечание:

* - эметазол и ондансетрон изучены в эквимолярных дозах; # – отличия от группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

Таблица Б. 33 (окончание)

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество выходов в центр</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,2	0,0±0,0	0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	0,0±0,0	0,5±0,3	1,3±1,3	0,3±0,3	2,3±0,3*	0,0±0,0	0,0±0,0
	5 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,5±0,5	0,0±0,0	0,8±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0
	15 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0
	30 мг/кг	0,5±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0
	40 мг/кг	0,3±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	50 мг/кг	0,3±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>Число болюсов</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	5 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	15 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	30 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	40 мг/кг	0,0±0,0	0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	50 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Примечания:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 34. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на реактивность мышей ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
Реактивность, сек.								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	5,6±1,4	4,2±1,1	11,8±5,9	4,6±0,9	6,0±2,6	6,6±1,4	5,6±1,7	
Авазол	0,5 мг/кг	5,4±1,3	7,4±1,8	5,4±1,5	5,4±0,5	6,8±1,6	6,6±0,7	7,8±0,8
	5 мг/кг	6,8±2,6	19,0±4,5	20,3±13,6	21,8±3,5	43,0±11,6*	37,5±13,2	27,8±12,2
	15 мг/кг	4,5±1,3	6,5±1,8	5,0±1,9	14,0±6,0	25,0±12,3	34,5±15,0	11,3±2,4
	30 мг/кг	4,0±0,8	27,8±5,8	31,3±10,9	11,5±2,9	17,0±3,8	15,0±6,0	10,5±3,
	40 мг/кг	4,4±0,7	37,2±13,9*	35,6±12,9	27,2±13,4	25,0±11,2	24,8±9,9	39,0±12,9*
50 мг/кг	8,3±2,0	21,3±13,2	34,3±15,1	36,0±14,0*	23,8±12,4	22,3±12,2	40,5±11,3*	

Примечания:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 35. Изменение двигательной активности мышей в актометре при введении авазола в дозах 0,5-50 мг/кг (M±m).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
<i>Количество фиксированных передвижений</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	59,2±12,1	20,8±13,1	19,0±10,4	10,8±4,2	10,6±5,3	13,6±5,1	16,0±5,1	
Авазол	0,5 мг/кг	54,4±4,7	26,6±5,0	19,0±10,4	16,8±7,2	13,6±5,3	13,6±5,1	16,0±0,1
	5 мг/кг	51,0±1,2	23,0±4,7	18,3±9,1	18,5±8,4	18,0±9,8	8,3±3,8	9,6±5,4
	15 мг/кг	52,0±4,6	13,5±3,5	2,75±0,5*	3,0±0,4	2,3±1,0	1,5±0,9	9,6±5,4
	30 мг/кг	44,3±8,8	1,5±0,3*	0,0±0,0*	0,8±0,3*	0,0±0,0	1,8±0,5*	3,0±0,6*
	40 мг/кг	52,8±6,3	2,0±0,3*	2,2±0,7*	2,6±0,5	3,2±1,3	32,4±14,3	11,2±3,2
	50 мг/кг	47,3±5,9	1,3±0,5*	0,5±0,3*	0,5±0,3*	2,5±1,0	2,0±0,7*	4,0±1,0

Примечания:

Авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 36. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на развитие кратковременной вокализации мышей при прикосновении.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных, проявляющих вокализацию (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	25	20	25	0	0	0
	40 мг/кг	0	20	20	20	0	0	0
	50 мг/кг	0	50*	50*	50*	50*	50*	0

Примечание:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 37. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на походку мышей.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных с нарушением походки (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	25	50*	25	25	0	0
	40 мг/кг	0	20	20	20	0	0	0
	50 мг/кг	0	50*	50*	50*	50*	50*	50*

Примечания:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 38. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на болевую чувствительность ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
Болевая чувствительность, сек								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,9±0,1	2,1±0,2	2,0±0,0	2,0±0,1	1,9±0,1	2,0±0,3	1,9±0,3	
Авазол	0,5 мг/кг	2,0±0,0	2,8±0,2	2,6±0,3*	2,6±0,3	2,6±0,3	2,4±0,3	2,2±0,2
	5 мг/кг	2,0±0,0	2,5±0,3	2,8±0,3*	2,5±0,3	2,3±0,3	2,5±0,3	2,0±0,0
	15 мг/кг	2,0±0,0	2,5±0,3	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0
	30 мг/кг	2,0±0,0	1,5±0,3	1,5±0,3	1,5±0,3	2,0±0,0	2,3±0,3	2,0±0,0
	40 мг/кг	2,0±0,0	2,4±0,4	1,8±0,4	2,2±0,4	2,6±0,3	2,8±0,2	2,4±0,3
	50 мг/кг	2,0±0,0	1,5±0,3	1,8±0,3	2,3±0,5	2,8±0,3	2,5±0,3	2,0±0,0

Примечания:

авазол изучен при внутривенном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 39. Изменение частоты дыхания при введении авазола в дозах 0,5-50 мг/кг ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
Частота дыхательных движений, мин ⁻¹								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	170,0±5,7	173,0±4,6	164,8±1,5	165,6±2,0	166,6±2,3	169,2±5,6	165,2±5,2	
Авазол	0,5 мг/кг	148,0±15,4	163,2±3,4	150,2±14,1	150,6±7,7	161,6±1,9	160,4±11,3	168,4±4,3
	5 мг/кг	162,0±1,1	156,3±3,0	136,8±15,5	144,5±10,9	148,5±10,5	154,0±8,1	156,5±5,9
	15 мг/кг	172,8±3,2	135,2±9,8*	112,0±15,1*	121,6±10,9*	132,0±10,0*	123,2±11,2*	124,0±11,5*
	30 мг/кг	163,0±4,4	131,5±6,7*	108,0±13,4*	127,0±6,8*	136,0±5,2	142,0±3,5	151,0±1,9
	40 мг/кг	161,6±7,1	109,6±8,6*	120,8±7,2*	143,2±6,6	144,0±8,5	149,6±13,0	158,0±8,4
	50 мг/кг	174,0±3,8	114,0±5,8*	134,0±6,8	132,0±8,6*	140,0±9,8	150,0±5,8	151,0±3,8

Примечания:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 40. Влияние авазола на двигательную координацию мышей в дозах 0,5-50 мг/кг ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин							
	Исход	30	60	90	120	150	180	
Время удержания на вращающемся стержне, сек								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	
Авазол	0,5 мг/кг	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	
	5 мг/кг	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	
	15 мг/кг	>30,0	27,5±2,5	28,8±1,3	27,8±2,3	26,3±3,8	25,0±3,8	27,3±2,8
	30 мг/кг	>30,0	9,3±6,9*	8,8±7,1*	8,3±7,3*	7,0±5,7*	7,0±3,9*	7,0±5,4*
	40 мг/кг	>30,0	8,4±5,4*	13,8±5,2*	12,0±5,2*	9,6±5,7*	13,8±5,7*	13,0±6,0*
	50 мг/кг	>30,0	1,3±0,3*	1,0±0,0*	1,0±0,0*	1,0±0,0*	1,0±0,0*	2,0±1,0*

Примечания:

авазол изучен при внутривенном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 41. Изменение мышечной координации мышц при введении авазола в дозах 0,5-50 мг/кг ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Удержания на проволоке, баллы</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	3,8±0,2	3,6±0,3	3,4±0,4*
	5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	3,8±0,3	3,3±0,5	3,0±0,6	3,0±0,4
	15 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	3,0±0,6	2,0±1,2*	2,8±1,0	2,0±1,2*
	30 мг/кг	4,0±0,0	2,8±1,0	3,8±0,3	3,8±0,3	3,5±0,3	3,5±0,3	3,8±0,3
	40 мг/кг	4,0±0,0	3,6±0,3	3,8±0,2	4,0±0,0	3,6±0,3	3,6±0,3	3,6±0,3
	50 мг/кг	4,0±0,0	3,0±0,4	1,5±0,9*	2,8±0,3	3,5±0,3	3,3±0,3	3,5±0,3
<i>Удержание на сетке, баллы</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	15 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	30 мг/кг	4,0±0,0	3,5±0,3	1,8±1,0*	2,8±1,0	3,8±0,2	2,0±1,2*	2,0±1,2*
	40 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	2,0±0,3*	2,1±0,2*	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	50 мг/кг	4,0±0,0	3,3±0,5	2,8±0,2*	2,8±0,3*	3,0±0,5	3,1±0,4	3,0±0,6

Примечания:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 42. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на рефлексы мышей (M±m).

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Выраженность роговичного рефлекса (баллы)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	15 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	2,8±0,3	2,8±0,3	2,0±0,4*	2,0±0,4*
	30 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	40 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,20	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	50 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
<i>Выраженность ответа на раздражение наружного слухового прохода (баллы)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	15 мг/кг	3,0±0,0	2,8±0,3	3,0±0,0	2,8±0,3	2,8±0,3	2,0±0,4*	2,0±0,4*
	30 мг/кг	3,0±0,0	2,8±0,3	1,8±0,5*	2,0±0,4*	2,0±0,4*	2,5±0,5	2,5±0,5
	40 мг/кг	3,0±0,0	2,6±0,3	1,6±0,4*	2,6±0,3	2,6±0,3	2,4±0,3	2,8±0,2
	50 мг/кг	3,0±0,0	2,3±0,3	2,5±0,3	2,5±0,3	2,8±0,3	2,8±0,3	2,8±0,3

Таблица Б. 42 (окончание)

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Выраженность ипсилатерального сгибательного рефлекса (баллы)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
Авазол	0,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	15 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,3	3,0±0,0
	30 мг/кг	3,0±0,0	2,8±0,3	2,5±0,5	2,5±0,3	2,5±0,3	2,5±0,3	2,8±0,3
	40 мг/кг	3,0±0,0	1,8±0,5*	2,0±0,5*	2,4±0,4	2,4±0,4	2,8±0,2	2,8±0,2
	50 мг/кг	3,0±0,0	2,3±0,5	2,8±0,3	2,8±0,3	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0

Примечания:

авазол изучен при внутривенном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна); для оценки использовалась балльная шкала: 0 баллов – отсутствие рефлекса; 1 балл – возникновение требует усиление воздействия раздражителя; 2 балла – рефлекс выражен слабо; 3 балла – рефлекс выражен.

Таблица Б. 43. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на реакцию мышей на звук.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных, проявляющих реакцию на стук (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		100	100	100	100	100	100	100
Авазол	0,5 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	5 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	15 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	30 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	40 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	50 мг/кг	100	100	80	100	100	100	100

Примечание:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; статистически значимых отличий от параллельных групп контроля не выявлено ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 44. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на возникновение блефароптоза у мышей (%).

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных с развившимся блефароптозом (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	25	25	0	0	0	0
	40 мг/кг	0	60*	40	40	0	0	0
	50 мг/кг	0	0	20	0	0	0	0

Примечание:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 45. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на развитие саливации у мышей.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных, с повышенной саливацией (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	40 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	50 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0

Примечание:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; отличий от параллельных групп контроля не выявлено ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 46. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на возникновение тремора у мышей.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных с тремором (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	25	25	25	25	0	0
	40 мг/кг	0	40	40	40	20	20	0
	50 мг/кг	0	50*	40	25	20	20	0

Примечание:

авазол изучен при внутрибрюшинном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 47. Влияние авазола в дозах 0,5-50 мг/кг на возникновение судорог у мышей.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных с судорожным синдромом (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0	0	0
Авазол	0,5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	5 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	30 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	40 мг/кг	0	0	0	0	0	0	0
	50 мг/кг	0	25	50*	25	0	0	0

Примечание:

авазол изучен при внутривенном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 48. Влияние эметазола на поведенческую активность мышей в тесте «открытое поле» в дозах 1,5-26 мг/кг ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Число пересеченных квадратов</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		55,2±7,7	34,2±7,2	29,6±5,1	25,4±4,0	11,0±4,7
Эметазол	1,5 мг/кг	60,0±7,2	38,0±13,9	35,6±1,6	25,6±12,4	8,8±1,5
	3,8 мг/кг	60,8±7,1	34,0±15,7	29,0±16,9	25,2±15,4	7,6±3,6
	7,5 мг/кг	62,2±3,2	17,4±7,7*	15,2±3,5*	7,0±4,8*	14,8±7,7
	15 мг/кг	61,0±5,0	21,2±5,0	13,8±3,5	10,8±4,5	5,6±2,6
	22,5 мг/кг	55,8±7,4	29,6±15,5	21,8±2,4	22,4±11,8	18,4±9,9
	26 мг/кг	61,2±15,6	9,0±2,1*	12,7±5,6	15,0±9,7	21,3±10,6
<i>Количество стоек</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		20,2±4,8	17,2±3,0	12,0±4,5	9,0±2,0	2,4±1,3
Эметазол	1,5 мг/кг	16,0±1,8	12,8±4,3	13,2±3,9	8,0±1,8	1,8±0,7
	3,8 мг/кг	17,2±1,6	9,0±6,1	11,0±7,0	6,0±3,7	2,2±1,5
	7,5 мг/кг	17,0±1,9	7,4±4,2	6,0±3,5	5,8±3,0	1,6±0,8
	15 мг/кг	17,2±2,7	2,0±0,9*	2,0±1,4	1,8±1,2	0,0±0,0
	22,5 мг/кг	20,0±2,9	10,2±8,6	3,0±1,7	3,2±1,7	2,6±2,2
	26 мг/кг	16,6±1,8	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,3±0,4

Таблица Б. 48 (окончание)

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Число заглядываний в отверстия</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		5,4±0,8	4,0±0,7	4,0±0	9,0±2,0	0,4±0,3
Эметазол	1,5 мг/кг	5,6±1,6	3,4±0,6	1,4±0,6	1,4±0,6	2,0±0,8
	3,8 мг/кг	5,2±1,3	2,8±1,2	1,0±0,5	1,6±0,8	2,4±1,2
	7,5 мг/кг	5,2±1,2	1,2±0,4	1,2±0,4	0,4±0,4	2,0±1,3
	15 мг/кг	4,6±1,3	1,4±0,7	1,2±0,5	1,6±1,0	0,6±0,7
	22,5 мг/кг	5,0±0,6	1,4±0,7	2,2±0,8	1,0±0,7*	1,0±0,5
	26 мг/кг	5,2±1,6	0,3±0,4*	0,7±0,4	0,7±0,8*	0,7±0,8
<i>Грумлинг</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,4±1,3	4,8±1,4	2,8±1,0	2,4±1,3	3,0±1,5
Эметазол	1,5 мг/кг	2,8±0,4	2,4±0,6	1,8±0,4	1,2±0,4	1,8±0,7
	3,8 мг/кг	3,0±0,8	4,0±0,9	3,0±0,9	1,6±0,8	2,0±1,5
	7,5 мг/кг	2,8±0,7	1,2±0,9	2,8±1,5	3,0±1,5	3,6±1,8
	15 мг/кг	2,6±0,8	1,6±0,8	1,8±1,1	2,0±0,9	0,2±0,2
	22,5 мг/кг	4,0±0,8	1,8±0,7	2,6±1,9	1,8±1,0	3,6±1,4
	26 мг/кг	2,6±1,8	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,7±0,8	0,3±0,4
<i>Количество выходов в центр</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		1,8±0,7	2,4±1,3	1,4±0,4	2,0±0,8	1,2±0,5
Эметазол	1,5 мг/кг	2,2±0,5	1,2±0,5	1,0±0,6	0,6±0,4	0,8±0,4
	3,8 мг/кг	2,6±0,9	2,2±2,0	1,0±0,9	0,2±0,2	0,4±0,3
	7,5 мг/кг	2,0±1,0	0,4±0,3	0,2±0,2	0,2±0,2	1,2±0,8
	15 мг/кг	1,8±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	1,0±0,5	1,0±0,5
	22,5 мг/кг	2,0±0,5	1,2±1,1	2,0±1,5	1,2±0,9	0,2±0,2
	26 мг/кг	2,2±0,2	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
<i>Число болюсов</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Эметазол	1,5 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	3,8 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	7,5 мг/кг	0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	15 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	22,5 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,2
	26 мг/кг	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 49. Изменение двигательной активности мышей в актометре при введении эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
Количество фиксированных передвижений						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		51,2±10,1	19,6±2,0	16,6±2,1	9,0±2,1	3,2±1,0
Эметазол	1,5 мг/кг	49,4±4,5	17,8±3,1	14,8±4,0	6,6±2,7	3,2±0,2
	3,8 мг/кг	59,6±7,2	18,4±5,1	15,4±3,4	6,2±2,5	2,4±0,8
	7,5 мг/кг	51,6±5,0	10,2±3,7	6,6±4,3	4,7±2,0	1,4±1,1
	15 мг/кг	59,8±3,6	9,2±2,4	7,0±2,0*	5,5±3,0	1,6±0,9
	22,5 мг/кг	51,8±6,4	10,6±3,9	8,2±0,5*	6,1±2,8	2,1±0,5
	26 мг/кг	50,1±2,4	6,2±1,2*	4,4±0,3*	3,0±0,2*	0,4±0,2*

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 50. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на развитие кратковременной вокализации мышей при прикосновении.

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
Количество животных, проявляющих вокализацию (%)						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	26 мг/кг	0	0	0	0	0

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; отличий в параллельных группах не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса).

Таблица Б. 51. Изменение частоты дыхания при введении эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Частота дыхательных движений, мин⁻¹</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		159,2±3,3	162,4±6,1	160,0±8,0	160,0±3,7	164,0±6,5
Эметазол	1,5 мг/кг	166,4±3,3	164,8±5,0	166,4±4,8	164,8±2,6	162,4±3,6
	3,8 мг/кг	161,6±8,0	163,2±5,0	160,8±11,8	159,2±11,0	157,6±10,4
	7,5 мг/кг	164,8±7,3	160,0±10,9	158,8±3,8	167,2±10,0	166,4±3,0
	15 мг/кг	165,6±3,3	167,2±7,4	164,4±10,6	155,2±5,2	168,0±2,4
	22,5 мг/кг	166,8±4,9	154,4±7,3	156,8±11,4	159,2±8,3	167,2±5,0
	26 мг/кг	166,4±6,9	132,0±7,5*	150,7±8,6	149,3±1,6	142,7±4,3

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 52. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на реактивность мышцей ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Реактивность, сек.</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,8±0,7	3,4±1,4	3,0±0,4	4,0±0,4	4,4±1,0
Эметазол	1,5 мг/кг	3,6±0,4	1,8±0,2	2,6±0,8	1,6±0,4	2,2±0,7
	3,8 мг/кг	4,6±0,8	6,0±2,9	3,6±1,3	8,4±2,9	6,8±2,5
	7,5 мг/кг	3,6±1,6	5,6±5,4	9,4±7,2	18,0±8,7	10,4±1,9
	15 мг/кг	4,8±2,4	33,4±8,2*	36,4±9,0*	31,4±10,0*	38,2±9,9*
	22,5 мг/кг	4,2±1,4	14,0±3,7*	30,6±8,4*	25,6±8,2*	16,4±9,0
	26 мг/кг	4,0±0,5	14,0±5,3	20,0±7,4*	16,3±4,8*	10,0±9,2

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 53. Влияние эметазола на двигательную координацию мышей в дозах 1,5-26 мг/кг ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин					
	Исход	30	60	90	120	
<i>Время удержания на вращающемся стержне, сек</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	
Эметазол	1,5 мг/кг	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	
	3,8 мг/кг	>30,0	26,0±4,5	25,6±4,9	27,0±3,4	26,0±4,5
	7,5 мг/кг	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0
	15 мг/кг	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0
	22,5 мг/кг	>30,0	27,6±2,7	>30,0	>30,0	21,0±6,2
	26 мг/кг	>30,0	9,0±2,1*	12,7±10,6*	15,0±9,7*	27,7±2,9

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 54. Изменение мышечной координации мышей при введении эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин					
	Исход	30	60	90	120	
<i>Удержания на проволоке, баллы</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	
Эметазол	1,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	
	3,8 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	
	7,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	3,8±0,2
	15 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	3,8±0,2	3,6±0,3
	22,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	3,6±0,4	2,6±0,8*	2,6±0,7*
	26 мг/кг	4,0±0,0	0,0±0,0*	2,0±0,0*	2,3±0,4*	3,0±0,7
<i>Удержание на сетке, баллы</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	
Эметазол	1,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	3,8 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	7,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	3,6±0,4	4,0±0,0	4,0±0,0
	15 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	22,5 мг/кг	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
	26 мг/кг	4,0±0,0	3,3±0,5	2,8±1,0	2,8±0,3*	2,0±0,4*

Примечания: эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таблица Б. 55. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на походку мышей.

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Количество животных с нарушением походки (%)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	10	0	0	0
	26 мг/кг	0	75*	75*	30	30

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * отличия от показателей группы контроля статистически значимы ($p \leq 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 56. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на реакцию мышей на звук.

Группа		Время измерения, мин						
		Исход	30	60	90	120	150	180
<i>Количество животных, проявляющих реакцию на стук (%)</i>								
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		100	100	100	100	100	100	100
Эметазол	1,5 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	3,8 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	7,5 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	15 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	22,5 мг/кг	100	100	100	100	100	100	100
	26 мг/кг	100	100	100	80	100	100	100

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; статистически значимых отличий от параллельных групп контроля не выявлено ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 57. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на рефлекс мышей ($M \pm m$).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Выраженность роговичного рефлекса (баллы)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0
Эметазол	1,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,00	3,0±0,0	3,0±0,0
	3,8 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	7,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	15 мг/кг	3,0±0,0	2,8±0,2	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	22,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,2	3,0±0,0	2,8±0,2
	26 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,2	3,0±0,0	3,0±0,0
<i>Выраженность ответа на раздражение наружного слухового прохода (баллы)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
Эметазол	1,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	3,8 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	7,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,3	3,0±0,0	2,8±0,2	2,8±0,2
	15 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,2	2,8±0,2
	22,5 мг/кг	3,0±0,0	2,8±0,2	2,8±0,2	2,8±0,2	2,8±0,2
	26 мг/кг	3,0±0,0	2,3±0,8	1,7±0,5*	2,3±0,8	1,0±0,7*
<i>Выраженность ипсилатерального сгибательного рефлекса (баллы)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
Эметазол	1,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	3,8 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	7,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,2	2,8±0,2
	15 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,8±0,2	2,8±0,2
	22,5 мг/кг	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,6±0,3	2,0±0,5
	26 мг/кг	3,0±0,0	2,3±0,8	2,3±0,8	1,7±0,5*	0,7±0,4*

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; * – изменения по отношению к группе контроля статистически значимо ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна); для оценки использовалась балльная шкала: 0 баллов – отсутствие рефлекса; 1 балл – возникновение требует усиление воздействия раздражителя; 2 балла – рефлекс выражен слабо; 3 балла – рефлекс выражен.

Таблица Б. 58. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на возникновение блефароптоза у мышей (%).

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Количество животных с развившимся блефароптозом (%)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	26 мг/кг	0	0	20	0	0

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; статистически значимых отличий от параллельных групп контроля не выявлено ($p < 0,05$; критерий Хи-квадрат).

Таблица Б. 59. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на развитие саливации у мышей.

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Количество животных, с повышенной саливацией (%)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	26 мг/кг	0	0	0	0	0

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; отличий в параллельных группах не выявлено.

Таблица Б. 60. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на возникновение тремора у мышей.

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Количество животных с тремором (%)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	26 мг/кг	0	0	0	0	0

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; отличий в параллельных группах не выявлено.

Таблица Б. 61. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на возникновение судорог у мышей.

Группа		Время измерения, мин				
		Исход	30	60	90	120
<i>Количество животных с судорожным синдромом (%)</i>						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)		0	0	0	0	0
Эметазол	1,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	3,8 мг/кг	0	0	0	0	0
	7,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	15 мг/кг	0	0	0	0	0
	22,5 мг/кг	0	0	0	0	0
	26 мг/кг	0	0	0	0	0

Примечание:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; отличий в параллельных группах не выявлено.

Таблица Б. 62. Влияние эметазола в дозах 1,5-26 мг/кг на болевую чувствительность ($M \pm m$).

Группа	Время измерения, мин					
	Исход	30	60	90	120	
Болевая чувствительность, сек						
Контроль (р-р NaCl 0,9%)	1,2±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,4±0,3	1,0±0,0	
Эметазол	1,5 мг/кг	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,0±0,0
	3,8 мг/кг	1,2±0,2	1,4±0,3	1,6±0,2*	1,4±0,3	1,2±0,2
	7,5 мг/кг	1,4±0,3	1,4±0,6	1,4±0,3	1,0±0	1,2±0,2
	15 мг/кг	1,0±0,0	1,0±0,0	1,6±0,4	1,6±0,4	1,6±0,4
	22,5 мг/кг	1,4±0,4	2,2±0,5	1,2±0,2	2,4±0,8	1,2±0,2
	26 мг/кг	1,0±0,0	1,3±0,4	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0

Примечания:

эметазол изучен при внутрибрюшинном введении; статистически значимых изменений не выявлено ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уолиса).