

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

На правах рукописи

Таран Алёна Сергеевна

**НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ
ДИАЗЕПИНО[1,2a]БЕНЗИМИДАЗОЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель
Академик РАН, З.д.н. РФ,
доктор медицинских наук,
профессор А.А. Спасов

Волгоград, 2017

Оглавление	
Оглавление	1
Введение	5
ГЛАВА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА, ДИАЗЕПИНА И ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА ..	12
1.1 <i>Привилегированные структуры</i>	12
1.2 <i>Концепция синтеза ориентированного разнообразия на основе привилегированных структур (Concept of privileged-substructure-based diversity-oriented synthesis (DOS)).</i>	31
1.3 <i>Заключение</i>	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 <i>Материалы исследования</i>	37
2.2 <i>Методы исследования</i>	42
ГЛАВА 3. ПРОГНОЗ СПЕКТРА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА.....	56
3.1 <i>Прогноз фармакологической активности новых производных диазепинобензимидазола с помощью системы PASS</i>	56
3.2 <i>Заключение</i>	60
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА	64
4.1 <i>Изучение анксиолитической активности производных диазепинобензимидазола в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»</i>	65
4.2 <i>Зависимость анксиолитической активности производных диазепинобензимидазола от химической структуры</i>	71
4.3 <i>Влияние производных диазепинобензимидазола на двигательную активность мышей в установке «актометр»</i>	80

4.4 Влияние производных diaзепинобензимидазола на продолжительность гексеналового сна.	82
4.5 Влияние производных diaзепинобензимидазола на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.	84
4.6 Влияние производных diaзепинобензимидазола на возникновение судорог, вызванных коразолом.	86
4.7 Изучение анальгетической активности производных diaзепинобензимидазола на установке «Горячая пластина».	89
4.8 Поиск и изучение ДПП-4 ингибиторных свойств производных diaзепино[1,2a]бензимидазола.	90
4.9 Заключение.	104
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19.	106
5.1 Влияние соединения ДАБ-19 на поведение мышей в установке «приподнятый крестообразный лабиринт».	107
5.2 Влияние соединения ДАБ-19 на поведение мышей в установке «темная/светлая камера».	110
5.3 Влияние соединения ДАБ-19 в разных дозах на двигательную активность мышей в установке «актометр».	113
5.4 Влияние соединения ДАБ-19 на продолжительность гексеналового сна.	114
5.5 Изучение соединения ДАБ-19 на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.	116
5.6 Противосудорожная активность соединения ДАБ-19 на модели коразоловых судорог.	117
5.7 Анальгетическая активность соединения ДАБ-19 на установке «Горячая пластина» и модели отдергивания хвоста на установке «Tail flick».	119
5.8 Заключение.	121

ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦЕНТРАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19123

6.1 Влияние флумазенила на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», вызванное введением соединения ДАБ-19 ... 123

6.2 Влияние соединения ДАБ-19 на судорожный эффект пикротоксина . 126

6.3 Действие соединения ДАБ-19 на эффекты L-ДОФА..... 127

6.4 Действие соединения ДАБ-19 на стереотипное поведение, вызванное апоморфином..... 128

6.5 Влияние соединения ДАБ-19 на каталептогенный эффект галоперидола 129

6.6 Заключение 130

ГЛАВА 7. ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19..... 131

7.1 Изучение двигательной координации и мышечно-расслабляющего действия соединения ДАБ-19 131

7.2 Определение острой токсичности соединения ДАБ-19 133

7.3 Заключение. 134

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... 136

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 150

ВЫВОДЫ 152

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 154

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 154

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 156

Введение

Актуальность темы

Тревожные расстройства представляют собой значимую медицинскую проблему. Распространенность таких заболеваний растет с каждым годом, и актуальным является поиск и разработка новых анксиолитических препаратов [1, 101].

Перспективным направлением при получении биологически активных веществ является выявление новых структур и создание комбинированных соединений. Выявление фармакофора является первым важным шагом к пониманию взаимодействия между рецептором и лигандом. Как только фармакофор установлен, в 3D-базе данных начинается поиск новых соединений, которые соответствовали бы фармакофору, не обязательно дублируя признаки известных активных соединений. [110, 113, 120] В качестве ключевой концепции создания новых веществ используют привилегированные структуры и подструктуры, которые входят в состав огромного числа известных лекарственных препаратов. На их основе выделяют активные скаффолды, обладающие рядом фармакологических и биологических активностей, комбинация которых, возможно, приведет к получению высокоэффективных соединений. [80, 101, 76] Используя существующие в настоящее время материальные и информационные ресурсы, возможно предсказать необходимые виды активности, как у новых синтезированных соединений, так и соединений, находящихся на стадии компьютерного моделирования. [92, 40]

Определенный интерес представляют производные диазепинобензимидазола, полученные путем комбинации двух привилегированных подструктур – диазепина и бензимидазола – которые обладают широким спектром фармакологических активностей [50, 55, 59, 66, 83, 92, 140].

Актуальным и целесообразным стало изучение новых соединений на ряд фармакологических активностей – анксиолитическую, двигательную,

анальгетическую, снотворную, антидепрессантную, противосудорожную. На основании концепции привилегированных структур объединение двух скаффолдов бензимидазола и диазепина должно привести к получению высокоэффективных препаратов с низким риском развития нежелательных эффектов.

Степень разработанности.

На сегодняшний день для производных бензимидазола доказано участие в регуляции значительного количества патологических состояний, так как они обладают широким спектром фармакологической активности – противоаритмическая [Keri R.] S., 2015], антигистаминная [Bansal Y., Silakari O., 2012], противовоспалительная [Gaba M., 2015], анальгетическая [Mohammed A. F., 2013], противовирусная [Nowicka A., Nawrocka W. P., 2013], антибактериальная [Zhang Z., 2012], противосудорожная [Anandarajagopal K., 2010], анксиолитическая [Разумная Ф. Г., 2014], антидиабетическая [Чепляева Н. И., 2014] и другие.

Производные диазепина также являются соединениями, проявляющими различные фармакологические свойства – анальгетические [Хазиахметова В. Н., 2015], антитромботические [Duarte C.D., 2007], анксиолитические [Яркова М. А., 2011], снотворные [Озеров А. А., 2012], противовирусные [Шайкенов Т. Е., 2005], противоопухолевые [Gunter B. W., 2016], противосудорожные [Aastha P., 2013], противовоспалительные [Kurogi Y., Guner O. F., 2001].

Концепция объединения привилегированных структур – новое направление в синтезе новых лекарственных препаратов, а производные диазепинобензимидазола являются малоизученным классом соединений.

Целью исследования является изучение спектра фармакологических свойств нового класса химических соединений - производных диазепинобензимидазола.

Для решения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести прогноз в системе PASS новых производных диазепинобензимидазола на наличие фармакологической активности.
2. Изучить влияние новых производных диазепинобензимидазола на анксиолитическую активность в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, проанализировав зависимости между структурой и функциональной активностью изучаемых соединений по поведению животных в тесте приподнятый крестообразный лабиринт с применением логико-структурных методов.
3. Изучить влияние производных диазепинобензимидазола на двигательную активность мышей в установке «актометр».
4. Оценить влияние производных диазепинобензимидазола в тестах: гексеналового сна, принудительного плавания по Porsolt, коразоловых судорог и на установке «Горячая пластина».
5. Оценить влияние производных диазепинобензимидазола на ДПП-4 ингибирующую активность *in vitro*.
6. Изучить влияние наиболее активного соединения в тестах приподнятый крестообразный лабиринт и темная/светлая камера, в тесте гексеналового сна, коразоловых судорог, проявление анальгетической активности на установке «Горячая пластина» и модели одергивания хвоста на установке «Tail flick».
7. Изучить нежелательное влияние наиболее активного соединения на двигательную координацию и мышечно-расслабляющее действие, локомоторную активность, острую токсичность.
8. Провести фармакологический анализ наиболее активного соединения и оценить влияние флумазенила на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».
9. Провести анализ зависимости между структурой и функциональной активностью изучаемых соединений по способности ингибировать фермент ДПП-4 с применением логико-структурных методов.

Научная новизна.

Впервые были изучены психонейротропные свойства нового класса химических соединений - производных диазепинобензимидазола. В ходе работы *in silico* проведен анализ изучаемых соединений на различные виды фармакологических активностей: антидепрессантная, анксиолитическая, противосудорожная, анальгетическая и ДПП-4 ингибиторная. В экспериментальных исследованиях подтверждено наличие у данного класса соединений наличие анксиолитической, противосудорожной, ДПП-4 ингибирующей, анальгетической активностей.

В результате проведенных экспериментов выявлено, что соединение ДАБ-19 по уровню анксиолитической активности превосходит диазепам. Установлена способность экспериментального соединения эффективно снижать болевые ощущения в тесте «горячая пластина». Получены данные об отсутствии у соединения ДАБ-19 миорелаксирующего эффекта на установках сетка и проволока, а также гипногенного свойства в тесте гексенал-индуцированного сна. Выявлена способность соединения ДАБ-19 снижать летальность при коразоловой интоксикации. Впервые изучено влияние антагониста бензодиазепиновых рецепторов флумазенила на поведение животных, которым вводили соединение ДАБ-19.

Среди производных диазепинобензимидазола выявлены соединения ДАБ-13, ДАБ-15 и ДАБ-24, которые при спектрофотометрическом исследовании *in vitro*, ингибировали активность фермента ДПП-4.

Научно-практическая значимость.

Выявленные в ходе проведенного исследования закономерности между анксиолитической активностью производных диазепинобензимидазола и их структурой и физико-химическими свойствами расширяют знания и могут быть полезны при целенаправленном поиске новых соединений с транквилизирующей активностью. Установленные для соединения ДАБ-19 эффекты, связанные с возможностью снижать летальность при судорогах, снижать болевые ощущения, а

также отсутствие нежелательных реакций, позволяют рекомендовать продолжение доклинического цикла исследований для соединения под лабораторным шифром ДАБ-19.

Методология и методы исследования. Учитывая поставленные задачи, выбор методических подходов осуществлялся из современных высокоинформативных методов, имеющихся в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ ВМНЦ. Исследование осуществлялось на нелинейных половозрелых самцах мышей и крыс. Основные методы исследования, направленные на изучение анксиолитических, противосудорожных гипногенных, анальгетических, антидепрессантных свойств производных диазепинобензимидазола проводились согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012]. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Обсчет реализован в программе GraphPad Prism 5.0.

Реализация результатов исследования.

Результаты выявленных закономерностей между структурной и физико-химической характеристикой исследованного ряда производных диазепинобензимидазола с их анксиолитической и ДПП-4 ингибиторной активностью внедрены в работу по оптимизации синтеза соединений с целью получения более эффективных соединений с низким риском развития побочных эффектов, которая проводится на базе НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования по изучению фармакологической активности, анксиолитического и ДПП-4 ингибирующего действия новых производных диазепинобензимидазола: решения поставленных задач, обсуждения результатов, разработке практических рекомендаций. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Производные диазепинобензимидазола – новая группа соединений, проявляющих психотропную и ДПП-4 ингибирующую активности
2. Соединение ДАБ-19 11-[4-*трет*-бутилбензил]-2,3,4,5-тетрагидро-[1,3]дiazepино[1,2-а]бензимидазола гидробромид проявляет анксиолитическую, противосудорожную, анальгетическую активности, не влияет на локомоторную активность, не имеет гипногенного эффекта.
3. Анксиолитическая активность соединения ДАБ-19 блокируется антагонистом бензодиазепиновых рецепторов флумазенилом.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на научно-практических конференциях: 72, 73, 74, 75 открытые научно-

практические конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014-2017 гг.), Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки», посвященная 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова, Школы фармакологов и клинических фармакологов (Рязань, 2015 г.), XXI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва 2014 г.).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК, а также получены решения о выдаче 2 патентов РФ на изобретения.

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, научно-практические рекомендации, список литературы, содержащий 190 источников, из них 49 отечественных и 141 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 19 рисунками и содержит 30 таблиц.

ГЛАВА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА, ДИАЗЕПИНА И ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА

1.1 Привилегированные структуры

Создание новых лекарственных средств является приоритетной задачей современной мировой науки. Проведение исследований, направленных на разработку и внедрение оригинальных отечественных лекарств – это выполнение важнейшей государственной программы. [1] В настоящее время при поиске биологически активных веществ используют концепцию "привилегированных структур или подструктур". Сочетания этих молекул должно позволить исследователям более эффективно искать перспективные соединения для последующего изучения в качестве потенциальных лекарственных средств [101; 76; 80].

Исследование всех потенциальных с химической точки зрения соединений невозможно, так как сегодня уже свыше 60 миллионов органических соединений синтезированы и доступны в виде образцов для тестирования биологической активности. С использованием существующих в настоящее время материальных и информационных ресурсов стало реально предсказать необходимые виды активности, а накопленный опыт позволил наложить на возможную структуру лигандов ряд ограничений, который существенно уменьшает химическое пространство (оставляя его, тем не менее, совершенно необъятным) [153, 64]. В частности, для сужения химического пространства накладываются условия подобия лекарству, которые в простом случае можно выразить «правилом пяти» Липинского, согласно которому соединение, чтобы «быть похожим» на лекарство, должно: иметь менее пяти атомов-доноров водородной связи, обладать молекулярным весом менее 500, иметь липофильность менее 5, иметь суммарно не более 10 атомов азота и кислорода [80; 153].

Само лекарственное подобие - это понятие, которое появилось из теории, что лекарственные соединения отличаются от прочих молекул своими физическими свойствами. Опра составил большую базу данных, работая с MDDR, Current Patents

Fast Alert (система оповещения о текущих патентах), Comprehensive Medicinal Chemistry, Physician Desk Reference (настольный справочник врача), базами данных New Chemical Entities, Available Chemicals Directory, в попытке идентифицировать лекарствовподобные структуры и распределение их свойств. [153]

Еще более 25 лет назад Ариенс заметил, что многие биогенные антагонисты аминов содержат, в качестве ключевого структурного элемента, гидрофобные системы двойного кольца. [101] Другие авторы тоже отмечали наличие повторяющихся молекулярных каркасов в таких молекулах и предположили, что, возможно, у разнообразных лекарств-мишеней существует общая молекулярная структура. На основании этих наблюдений совместно с собственной работой Эванс с соавт. ввели понятие «привилегированных структур», а Опра составил большую базу данных в попытке идентифицировать лекарствовподобные структуры и распределение их свойств. [80; 153]

Определение привилегированной структуры претерпело уточнения после того, как его впервые ввели как «единичный молекулярный каркас, способный предоставлять лиганды для различных рецепторов». Термин «привилегированная структура» технически неверен, по мнению исследователей, так как привилегированной считается только подструктура – базовое ядро молекулы. Оно входит в состав многих биологически активных гетероциклических соединений, для него определен широкий спектр фармакологических активностей, таких как противомикробная, противовирусная, противопаразитарная, противоопухолевая, противовоспалительная, антиоксидантная, гипотензивная, антикоагулянтная, иммуномодулирующая. Среди них найдены гормональные модуляторы, стимуляторы и депрессанты ЦНС, ингибиторы протонного насоса, модуляторы уровня липидов, противодиабетические соединения и т.д. Подструктура должна составлять значительную часть размера молекулы, иначе ее вклад в общую способность к связыванию с рецепторами сомнителен. Малые группы, такие как галогены или амиды, по-видимому, присутствуют в большом количестве во всех классах, но их вряд ли можно считать привилегированными структурами, так как они вносят небольшой вклад в межмолекулярные взаимодействия. Жестких правил, по которым некая

структура может быть отнесена к «привилегированным» нет, но она, как правило, должна содержать две или три кольцевые системы, соединенные единичными связями или слиянием колец. [153; 113]

К привилегированным структурам относятся фенил-замещенные моноциклы (бифенилы, арилпиперидины, арилпиперазины, дигидропиперидины, дигидропиримидоны), системы с конденсированным [7-6] кольцом (бензодиазепиноны), системы с конденсированным [6-6] кольцом (бензопираны, кумарины, хиназолины), системы с конденсированным [5-6] кольцом (индолы, бензимидазолы, бензофураны, бензотиофены) [101].

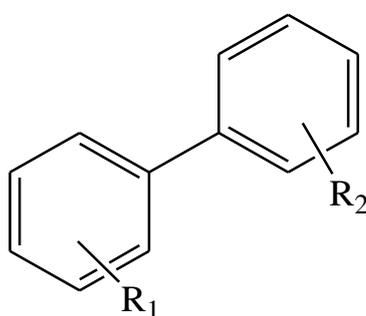
Изучаемых молекулярных мишеней лекарств – около 2 тысяч, а с учётом посттрансляционных модификаций, альтернативного сплайсинга, белок-белковых взаимодействий и наличия различных сайтов связывания лиганд–белок число потенциальных фармакологических мишеней превосходит 2 миллиона. Комбинаторика лиганд-белковых взаимодействий многократно возрастает при переходе от парадигмы "одно лекарство – одна мишень" к концепции плейотропных препаратов. Поиск новых перспективных фармакологически активных веществ является мультикритериальной задачей, поскольку, наряду с наличием целевой специфической активности, необходимо обеспечить минимум побочных и токсических эффектов и приемлемые фармакокинетические характеристики потенциального препарата [64].

Фенилзамещенные моноциклы

Фенилзамещенные моноциклы часто используются в медицинской химии. Эта базовая структура обычно наблюдается во многих разных скаффолдах, от бифенилов до арилпиперазинов. Многие из этих структур считаются основным элементом молекул, которые связываются с множественными неродственными классами рецепторов с высокой аффинностью. В связи с высокой частотой, с которой многие из этих структур появляются в литературе, тяжело найти абсолютно каждое соединение комбинаторной библиотеки привилегированных подструктур, использующих эти скаффолды [101].

Бифенильный каркас (рисунок 1.1) является привилегированной субструктурой. В базе данных медицинской химии для молекул, содержащих эту структуру, приведены следующие фармакологические эффекты: противогрибковый, противомикробный, антигиперхолестеринемический, антигиперлипидемический, фасциолицидный, противоревматический, обезболивающий, противовоспалительный, антитромботический, урикозурический и антиаритмический [176].

Рисунок 1.1. Химическая структура скаффолда бифенила



В дополнение к этому бифенильная субструктура обнаружена у 4,3% всех известных лекарств [58]. Известно также, что бифенилы обладают потенциалом противоопухолевых, антигипертензивных и антиатеросклеротических агентов. Такое разнообразие селективности рецепторов предсказуемо, если учесть, что ароматические фрагменты уже давно считаются основными участниками процесса молекулярного распознавания мишени лекарственным веществом. Когда препараты, содержащие ароматические заместители, связываются с белками, преобладают ароматические и гидрофобные взаимодействия. Было также показано, что соединения, содержащие в своей структуре ароматические кольца, взаимодействуют с полярными заместителями и даже положительно заряженными группами. При такой степени универсальности в связывании и взаимодействии неудивительно, что бифенильный каркас настолько распространен в фармацевтических препаратах [124].

Арилпиперидины

Арилпиперидиновый каркас является ключевым элементом, взаимодействующим с широким спектром рецепторов. Многие молекулы, основанные

на этой подструктуре, связываются с нейрокининовыми рецепторами. Так *цис*-(2*S*, 3*S*)-пиперидиновый каркас (рисунок 1.2) является основным для высокоаффинных антагонистов нейрокинаина-1-рецептора [101].

Арилпиперидиновый фрагмент (рисунок 1.3) также встречается у антагонистов для других нейрорецепторов. Этот каркас использовался в качестве каркаса для ингибиторов нейропептида Y (возможное применение при ожирении), дофаминового транспортера (антагонист кокаина) [129], соматостатина (ингибирование роста опухолевых клеток), рецептора CCR2B (противогрибковые свойства), опиоидного κ-рецептора (злоупотребление психоактивными веществами, анальгетик), рецептора серотонина и ингибитор обратного захвата серотонина (антидепрессант) и как обратимый ингибитор моноаминоксидазы А (антидепрессант) [72, 112, 106, 154].

Рисунок 1.2. Химическая структура *цис*-(2*S*, 3*S*)-пиперидинового каркаса

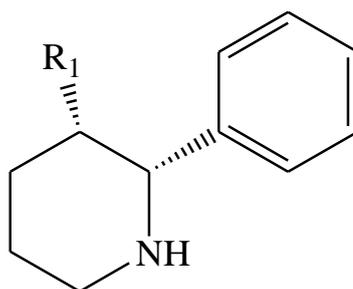
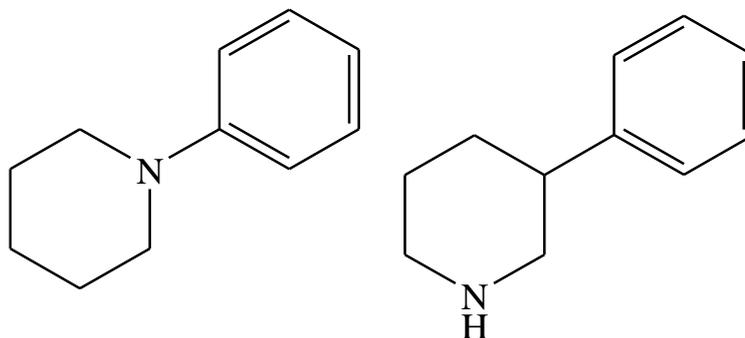


Рисунок 1.3. Арилпиперидиновые скаффолды



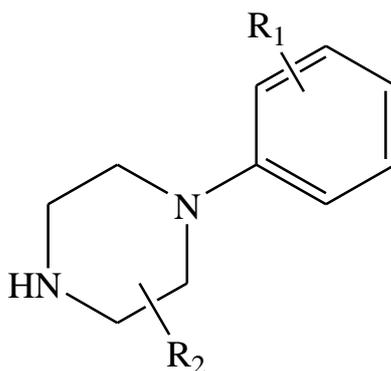
Нейрокининовые антагонисты участвуют в таких патологических состояниях как мигрень, рвота, болевой синдром, артрит, бронхиальная астма, депрессия и тревога. Многие антагонисты рецептора нейрокинаина-1 были зарегистрированы в литературе на основе арилпиперидинового каркаса. Следует отметить, что эндогенные лиганды

рецепторов нейрокина-1, -2 и -3 (вещество Р, нейрокинин А, и нейрокинин В соответственно) имеют наивысшее сродство к своим нативным рецепторным подтипам и способны действовать как полные агонисты для всех трех подтипов рецепторов.

Арилпиперазины

Структура арилпиперазина (рисунок 1.4) наблюдается в большом количестве соединений, представляющих фармацевтический интерес. В MDDR (MDL Drug Data Report) было перечислено 2271 производное фенилпиперазина, которое находилось во II фазе клинических испытаний или выше.

Рисунок 1.4. Химическая структура арилпиперазинового скаффолда



Арилпиперазиновая привилегированная подструктура входит в состав большого числа лекарственных препаратов, таких как антибактериальные средства, антиоксиданты [159], адреноблокаторы, адреномиметики [162], антидепрессанты, антагонисты серотонинового рецептора (5-НТ2А), ингибиторы фосфодиэстеразы III, противокашлевые средства, противогрибковые средства, противовирусные средства, анксиолитики, психотропные, антимикобактериальные средства, антидепрессанты, ингибиторы липооксигеназы, анальгетики, антиагреганты, антагонисты эндотелина, гиполипидемические соединения, а также молекулы, которые лечат расстройства сознания [94, 58, 145, 63].

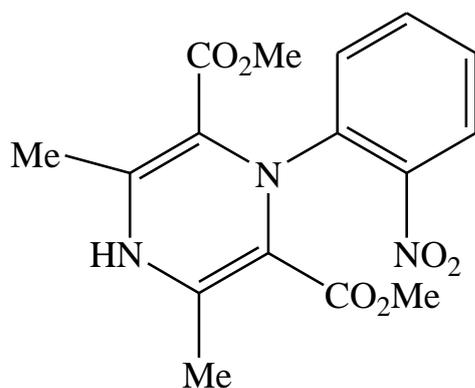
В дополнение к этому, арилпиперазиновый каркас активен в отношении большинства подтипов серотониновых рецепторов, включая рецепторы 5-НТ1А и 5-НТ1D, рецепторы 5-НТ2В и 5-НТ2С и рецептор 5-НТ6 [107].

1,4-дигидропиридины

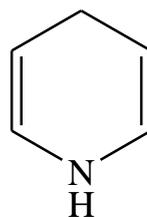
1,4-дигидропиридины являются очень интересными структурами для синтеза комбинаторной библиотеки из-за их широкого спектра биологических активностей. Возможно, самым известным фармакологическим классом 1,4-дигидропиридинов являются блокаторы кальциевых каналов, такие как нифедипин (рисунок 1.5), которые используются в клинической практике с 1975 года. Эти соединения обычно используют для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертония, сердечные аритмии или стенокардия.

Рисунок 1.5. Химическая структура: а) нифедипина, б) 1,4-дигидропиридинового scaффолда

а).



б).



В последнее время появилось много антагонистов кальция второго поколения с улучшенной биодоступностью и селективностью [184]. Сообщалось, что 1,4-дигидропиридины являются вазодилататорами, антигипертензивными средствами [175] и бронходилататорами и обладают антиатеросклеротическими [121], антиоксидантными, гепатопротекторными, противоопухолевыми, антимуtagenными, противодиабетическими, геропротекторными, гербицидными и фотосенсибилизирующими действиями [117].

Эти молекулы также могут быть использованы для транспортировки лекарственного средства через гематоэнцефалический барьер. Другие 1,4-дигидропиридины, как сообщается, активны в P2-рецепторах 9 и ингибируют агрегацию тромбоцитов [101].

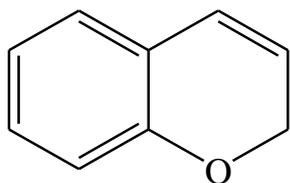
Бензопираны, хромоны, кумарины и пиранокумарины

Бензопиран, хромон и кумарин имеют сходную структуру ядра (рисунок 1.6). Все они часто встречаются в обширном спектре естественных природных соединений, и каждый из них демонстрирует широкое разнообразие типов рецепторов, к которым они имеют аффинитет.

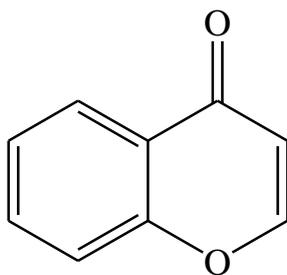
Структура бензопирана проявляется во множестве натуральных продуктов и входит в состав большого числа ингибиторов ряда известных рецепторов. Выявление этой структуры, может быть, частично связано с многочисленными реакциями пренилирования и циклизации во многих путях биосинтеза полипептидов.

Рисунок 1.6. Химические привилегированные подструктуры: а). бензопирана, б). хромона, в). кумарина

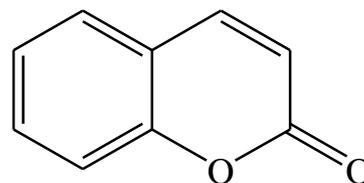
а).



б).



в).



Структуры со скаффолдом бензопирана имеют противоопухолевую, антибактериальную и противовоспалительную активности и ингибируют обратную транскриптазу ВИЧ-1, продукцию интерлейкина-1, протеинкиназы, электронный перенос NADH. Они также являются известными антагонистами рецепторов серотонина (5-HT₃), ингибируют биосинтез альдостерона и фосфодиэстеразу IV, активируют калиевые каналы и имеют брадикардическую активность [101, 180, 188, 62, 163, 90].

Хромоны представляют собой группу соединений, которые широко распространены в природе, особенно в растениях. Молекулы, содержащие хромоновое или бензопирановое кольцо, обладают широким спектром биологических активностей. Было показано, что они являются ингибиторами тирозина и протеинкиназы C, а также противогрибковыми, противовирусными, антитубулиновыми и антигипертензивными агентами [156, 168]. Хромоновые

производные также активны в отношении бензодиазепиновых рецепторов, липоксигеназы и циклооксигеназы. Кроме того, они, как было показано, являются противоопухолевыми агентами, обладающими антимуtagenными свойствами, а также способностью ингибировать перенос электронов путем ингибирования NADH [152, 190].

Кумарины относятся к числу одних из важнейших классов среди лекарственных соединений. Первый представитель этого класса, кумарин, был обнаружен еще в 1820 году. Этот скаффолд является наиболее распространенным среди соединений растительного происхождения, но может быть обнаружен также у грибов и бактерий, обеспечивая огромное разнообразие структур. Терапевтический потенциал этих соединений огромен. Кумарин является основной молекулой варфарина, а также высокоаффинным компонентом многих сигнальных трансдуцирующих белков. Мультициклические молекулы, содержащие кумариновые скаффолды, включают фуранокумарины, пиранокумарины и псоралены, которые также обладают рядом биологических активностей. Выявлены следующие виды активностей среди производных кумарина: супрессия оксидативного стресса, ингибиторы липоксигеназ, цитотоксическая активность, антагонисты фосфодиэстеразы, антиоксидантная, антибактериальная активности [95, 111, 139, 138]. Кумаринсодержащие соединения присутствуют в больших количествах в рационе человека, и в результате они представляют собой доступный источник эффективных лекарственных соединений с низкой токсичностью.

Пиранокумарины - это структура, которая используется в течение многих веков в медицине. Хотя диапазон биологической активности этих химических веществ обнаружен сравнительно недавно, они являются активными химическими компонентами многих соединений растительного происхождения, которые использовались в лекарственных средствах. Примерами являются: Bai-Hua Qian-Hu, который использовался в традиционной китайской медицине для лечения некоторых респираторных заболеваний и легочной гипертензии, *Aegle marmelos* Correa - индийского лекарственного растения для лечения различных заболеваний, и *Angelica gigas* Nakai (Umbelliferae) для лечения анемии, а также как успокаивающий и

тонизирующий препарат в Корее. Активные пиранокумарины этих растений включают в себя птериксин, который, как было выявлено, ослабляет гладкую мышцу трахеи и легочных артерий, лювангетин, который проявляет гастропротекторную активность, и дебурсин, который, обладает цитотоксической активностью и активирует протеинкиназу С [179, 115, 53, 165, 96].

Пиранокумарины проявляют широкий спектр биологических активностей. Они проявляют большие перспективы в терапии рака, поскольку они могут ингибировать NADH, также участвуют в патогенезе таких заболеваний, как паркинсоническая, фокальная дистония и наследственная оптическая нейропатия Лебера, ингибируют репликацию ВИЧ-1 в лимфоцитах, дипиранокумарины из рода *Calophyllum* проявляет специфическую активность ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1. Пиранокумарины также проявляют противомаларийную активность, антибактериальную и противогрибковую активность. Этот класс соединений также может ингибировать протеинкиназы, эндотелин-конвертирующий фермент, реабсорбцию костной ткани, арахидонатную 5-липоксигеназу, а также обладает интерферогенной активностью. [101, 115, 53, 165, 96]

Хиноксалины / хиназолины

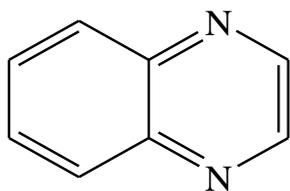
Существует множество биологически активных молекул, каркас которых включает шестичленное кольцо, содержащее два атома азота, соединенных с фенильным кольцом. Большинство из этих молекул основано на структуре хиноксалина или хиназолина (рисунок 1.7). Эти две структуры могут рассматриваться как привилегированные подструктуры сами по себе. Однако многие биологически активные молекулы этого класса содержат карбонильную группу, такую как хиноксалиноны, хиназолиноны и хиназолиндионы, или имеют слитое имидазольное кольцо [101].

Эти молекулы обладают широким спектром биологических активностей: ингибирование альдозоредуктазы и тирозинкиназы рецептора PDGF, частичный агонизм и антагонизм рецепторного комплекса γ -аминомасляной кислоты (ГАМК)/бензодиазепаина [132, 184] и антагонизм рецепторов АМРА и ангиотензина II

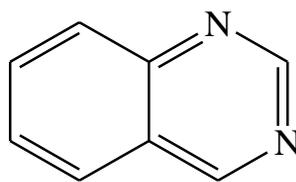
[60]. Было также показано, что 4-(ацилокси)-бензопиперазины проявляют активность против ВИЧ [148]. Эти подструктуры также могут быть использованы для синтеза лекарственных средств для лечения рака [172, 127]. У производных хиноксалина обнаружены также антидиабетические свойства [104].

Рисунок 1.7. Привилегированные подструктуры, основанные на а) хиноксалине, б) хиназолине, в) хиноксалиноне, г) хиназолиноне, д) хиназолиндионе

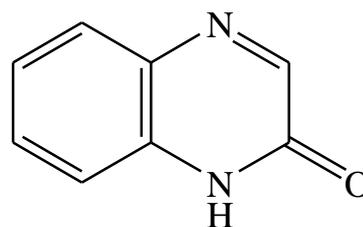
а).



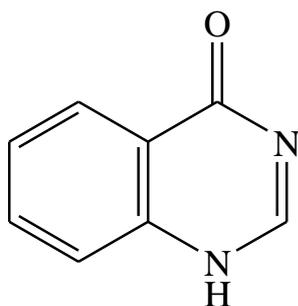
б).



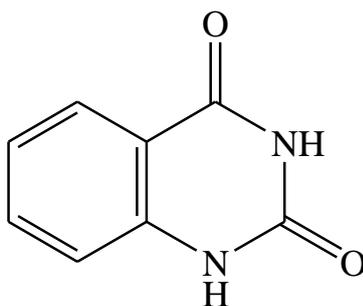
в).



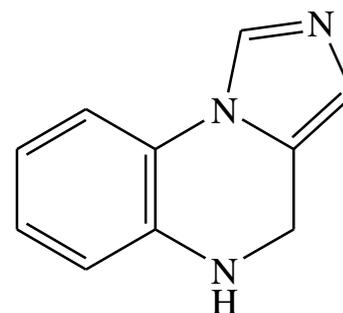
г).



д).



е).

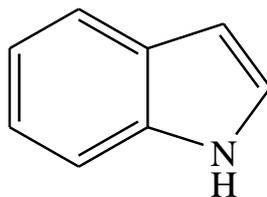


Индол

Индолы (рисунок 1.8) представляют собой один из важнейших структурных классов при открытии лекарств. Существует множество соединений, содержащих это кольцо, что практически невозможно описать полный спектр их биологической активности. Известные лекарственные средства, такие как нестероидные противовоспалительные препараты индометацин и этодолак, также содержат индольное кольцо.

Производные индолов проявляют антибактериальные, противоопухолевые, противоокислительные, противовоспалительные, противодиабетические, противовирусные, атнипролиферативные, противотуберкулезные, антисперматогенные, антипсихотические свойства [185, 52, 166, 54].

Рисунок 1.8. Химическая структура индола

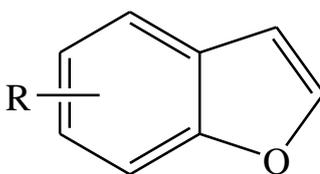


Бензофураны

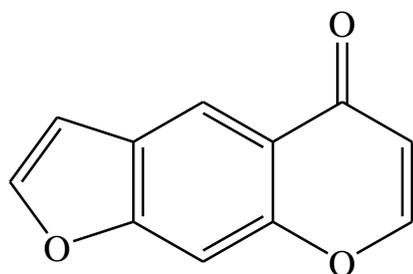
Молекулы, содержащие бензофурановый (рисунок 1.9) каркас, обладают широким спектром биологических активностей.

Рисунок 1.9. Молекулы, основанные на привилегированной подструктуре: а). бензофурана: б). фурохромон, в). бензо-[b]-фуро-[3,4-d]-фуран-1-оны

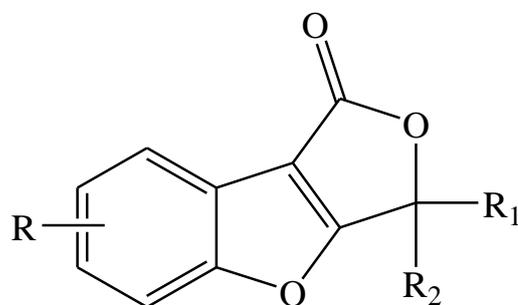
а).



б).



в).



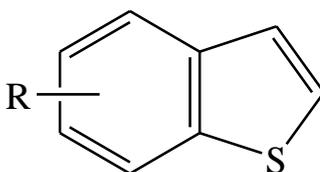
Они активны в качестве противогрибковых препаратов, κ -селективных опиоидных анальгетиков, антагонистов ангиотензина II и ингибиторов агрегации тромбоцитов. Молекулы, содержащие этот каркас, также находят применение в качестве антиоксидантов. Бензофурановая группа также присутствует в более крупных гетероциклических структурах, таких как фурохромоны, аналоги которых ингибируют циклическую АМФ-фосфодиэстеразу (ингибирующую агрегацию тромбоцитов) и ацил-СоА: ингибиторы холестерина О-ацилтрансферазы (антиатеросклеротическая активность). Бензо-[b]-фуро-[3,4-d]-фуран-1-оны также являются общим скаффолдом,

обнаруженным во многих встречающихся в природе продуктах, которые имеют широкий спектр биологических эффектов. [116, 173, 51]

Бензотиофены

Бензотиофены (рисунок 1.10) являются привилегированными субструктурами, которые тесно связаны с индольным кольцом.

Рисунок 1.10. Привилегированная подструктура бензотиофена

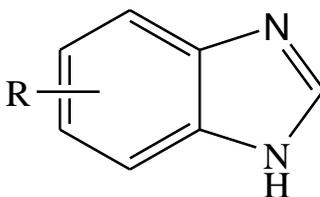


Молекулы с этим каркасом являются ингибиторами репликации вируса простого герпеса типа I (HSV-1), тубулина (антимитотическая активность), цистеиновых протеаз, таких как катепсины K и L, сериновые протеазы, такие как тромбин и к-селективные опиоидные рецепторные анальгетики. И при использовании в сочетании с арилпиперазиновой частью представляют собой антагонисты 5-НТ6 (потенциальные роли при шизофрении и депрессии). Бензотиофены также образуют ядро молекул, таких как ралоксифен (ралоксифен был одобрен для использования в Европе и США для профилактики остеопороза), которые являются селективными модуляторами рецепторов эстрогена. [101, 79]

Производные бензимидазола

Бензимидазол – является структурным ядром многих природных соединений и лекарственных препаратов [160, 67, 140]. Свойства производных бензимидазола изучаются уже более ста лет, их структуры родственны одной из самых распространенных привилегированных подструктур, индольному кольцу (рисунок 1.11). Производные бензимидазола являются полезными промежуточными продуктами/субъединицами для получения новых молекул представляющих интерес в фармацевтической или биологической сферах [59].

Рисунок 1.11. Подструктура бензимидазольного скаффолда.



Молекулы, содержащие структуру бензимидазола, имеют антиаритмическое, антигистаминное, противоязвенное, противораковое, инотропное, фунгицидное, противопаразитарное и противовирусное свойства [113, 59] (таблица 1.1). Бензимидазол представляет собой фрагмент, который содержит бензол и гетероциклическое кольцо имидазола. Это одни из наиболее перспективных фрагментов, которые присутствуют во многих лекарственных средствах [71, 59]. Его производные вызывают широкий интерес из-за их различных видов биологической активности и клинического применения [78]. Бензимидазольный фрагмент удовлетворяет структурные требования, которые являются общими для соединения с противовоспалительной активностью [86, 82]. Многие молекулы, содержащие бензимидазольный фрагмент обладают противовоспалительной и анальгетической активностью [135]. Выявлена значительная активность в отношении грибов и бактерий [109]. Бензимидазол-замещенные соединения обладают противовирусным [83], антигельминтным, антипролиферативным [131, 102], антигипертензивным [161], H₃-антагонистическим [158] и антибактериальным [189] действием. Эти молекулы также ингибируют рецептор хемокинов (CXCR3) [137]. 1-Н замещенные производные бензимидазола использовались для предотвращения повреждений слизистой желудка, вызванного ингибиторами воспаления [57]. N-содержащие производные бензимидазола хорошо известны как ингибиторы протонного насоса (Омепразол) [151], противоглистны (Альбендазол) [149], антагонист дофаминовых рецепторов (Домперидон) [146].

Оптимизация заместителей вокруг ядра бензимидазола привела к созданию лекарственных препаратов: антигельминтных - альбендазол, мебендазол, тиабендазол; противоязвенных ингибиторов протонного насоса - омепразол, лансопразол,

пантопризол; антигистаминных - астемизол; противовирусных – энвираден [144]; гипотензивных - кадесартана цилекситил и телмисартан и др.

В настоящее время у производных бензимидазола установлена противосудорожная активность [55, 169]. Среди производных имидазобензимидазола обнаружены соединения с местноанестезирующей и противосудорожной активностями [4, 5, 14, 15].

Таблица 1.1 – Производные бензимидазола, используемые в клинической практике.

№	Производные бензимидазола	Вид активности
1	Омепразол, лансопризол, эзомепразол, пантопризол и рабепразол	Ингибиторы протонной помпы париетальных клеток. Наиболее мощный класс антисекреторных препаратов, революционизировавших терапию гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, синдрома Золлингера–Эллисона.
2	Фенбендазол, мебендазол, албендазол	Антгельминтное действие основано на ингибировании ферментной системы паразитов, повреждении оболочки мышечной ткани и деполяризации нейромышечных ганглиев, что приводит к нарушению энергетического метаболизма, нервно-мышечной иннервации, параличу и в результате – к гибели гельминтов.
3	Энвираден	Ингибирует размножение 15 различных серотипов риновируса. Противовирусное действие.
4	Бемитил	Антиастеническое, транквилизирующее, антигипоксическое, психостимулирующее действие. Повышает устойчивость органов и тканей к гипоксии. Стимулирует функции головного мозга, психическую и физическую активность, работоспособность при физических нагрузках, процессы физической выносливости, нормализует внимание. Психотропная активность проявляется в психостимулирующем и транквилизирующем действии

Окончание таблицы 1.1		
5	Астемизол	Блокирует гистаминовые H1-рецепторы. Противоаллергическое, антигистаминное действие.
6	Домперидон	Блокирует дофаминовые D2-рецепторы. противорвотное действие обусловлено сочетанием периферического (гастрокинетического) действия и блокадой хеморецепторов триггерной зоны рвотного центра.
7	Телмисартан	Блокирует рецепторы ангиотензина II, понижает уровень альдостерона в плазме, увеличивает диурез, экскрецию натрия и хлоридов. Антигипертензивное действие
8	Бендазол	Снижает содержание свободного кальция в гладких мышцах, вызывая их расслабление; повышает синтез нуклеиновых кислот и белков, стимулирует иммунную систему (способствует образованию антител, фагоцитозу, синтезу интерферона). сосудорасширяющее, спазмолитическое, гипотензивное действия.
9	Кадесартана цилекситил	Селективно блокирует AT1 рецепторы ангиотензина II, уменьшает ОПСС, повышает почечный кровоток, поддерживает (или повышает) клубочковую фильтрацию. Антигипертензивное действие
10	Этомерзол	Антигипоксанта, антиоксиданта, актопротектора - повышает физическую работоспособность и коэффициент полезного действия физической работы без увеличения потребления кислорода и теплопродукции
11	Афобазол	Анксиолитик. Стабилизирует ГАМК/бензодиазепиновые рецепторы и восстанавливает их чувствительность к эндогенным медиаторам торможения. Также повышает биоэнергетический потенциал нейронов и оказывает нейропротективное действие: восстанавливает и защищает нервные клетки.

Некоторые производные БИ являются антагонистами H3 рецепторов [136, 157]; другие обладают сродством к серотонинергическим 5-HT1A, 5-HT3, 5-HT6

рецепторам, селективностью к $\alpha 1$ -адрено- и дофаминовым D2 [126, 91]; ингибируют обратный захват норэпинефрина [187]. Наличие психоактивных свойств связано также с агонистическим действием в отношении ГАМК [142], бензодиазепиновых и $\alpha 1$ – адренорецепторам, антагонизмом с NMDA-рецепторами [42]. Известны производные бензимидазола со свойствами агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов [99].

Одним из производных бензимидазола является Афобазол - новый препарат, разработанный в НИИ фармакологии РАМН им. В.В. Закусова. Он входит в основу концепции академика РАМН С.Б. Середенина о генетической зависимости анксиолитического эффекта от фенотипа эмоционально-стрессовой реакции. По химическому строению афобазол представляет собой 5-этоксигидрохлорид [2-(морфолино)-этилтио]-бензимидазола [21]. Установлен широкий спектр рецепторных взаимодействий афобазола. Афобазол взаимодействует с сигма1, мелатониновыми рецепторами M1 типа и M3 типа и регуляторным участком MAO-A [27]. Отмечено, что афобазол является обратимым ингибитором MAO-A. Особое значение имеет взаимодействие афобазола с сигма1 рецепторами, которые оказывают модулирующее влияние на все основные нейромедиаторные системы: ГАМКергическую [28, 130], серотонинергическую [141], норадренергическую [21], дофаминергическую [178], холинергическую [98] системы и NMDA-регулируемые глутаматные эффекты [21].

Афобазол не связывается непосредственно с ГАМК-A рецепторным комплексом, а механизм его анксиолитического действия основан на способности предотвращать стресс-индуцированное падение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК-A рецептора и восстанавливать чувствительность ГАМК-A рецептора к действию ГАМК [21].

Наряду с анксиолитическим, афобазол обладает антидепрессивным действием [26]. Афобазол оказывает анксиолитическое действие с активирующим компонентом, не сопровождающееся гипноседативным эффектом. У препарата отсутствуют миорелаксантные свойства, негативное влияние на показатели памяти и внимания. При его применении не формируется лекарственная зависимость и не развивается синдром отмены, афобазол не вызывает характерных для традиционных

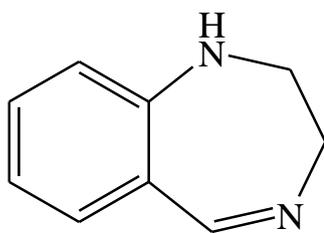
транквилизаторов агонистов бензодиазепиновых рецепторов таких побочных эффектов как гипноседативный, миорелаксирующий и амнестический [21].

Производные диазепина

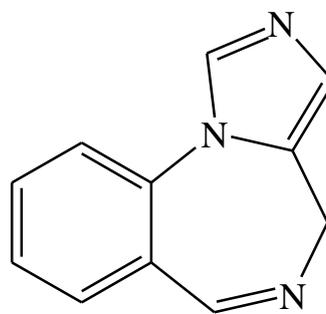
Диазепины (рисунок 1.12) представляют собой широкий класс нейроактивных соединений, действующих на ионный канал и рецептор-лиганд, сопряженный с G-белками (GPCR).

Рисунок 1.12. Структуры синтезированные на основе диазепина: а). бензодиазепины, б). имидазобензодиазепины.

а).



б).



В качестве важных примеров анксиолитических фармацевтических препаратов этого класса можно привести диазепам и лоразепам, лиганды центральных рецепторов. [42] Имидазобензодиазепины и родственные лиганды селективно взаимодействуют с нейроингибирующим постсинаптическим рецептором GABA_A1 α , γ с высоким сродством. Соответственно, они могут действовать как агонисты, частичные агонисты и антагонисты [134]. Бензодиазепины имеют специфический участок связывания на GABA_A рецепторе и являются его аллостерическими регуляторами. Соединения данного класса, относящиеся к полным агонистам, усиливают рецепцию ГАМК, увеличивают транспорт ионов Cl⁻ и способны, в зависимости от структуры и дозы, вызывать анксиолитическое, седативное и снотворное действие [48]. Установлено также действие бензодиазепиновых производных на холецистокининовые рецепторы (ССК-1) [75], встречаются в литературе случаи описания соединений бензодиазепинового ряда в качестве анальгетиков [42], используемых при лечении висцеральной боли, антагонистов фактора активации тромбоцитов с

антиромботической активностью [80]. Среди ингибиторов ферментов были описаны ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ, такие как невирапин [19] и ингибиторы RAS-фарнезилтрансферазы, применяемые для лечения рака [46]. Эти данные характеризуют бензодиазепиновую субъединицу как подлинную привилегированную структуру, способную быть молекулярно распознаваемой различными сайтами биорецепторов.

Бензодиазепины являются прототипом привилегированной подструктуры. Именно к этому классу соединений, впервые Эвансом и соавт. в 1988 г был применен термин "привилегированная структура" из-за способности связываться с ССК-1, гастриновыми и центральными бензодиазепиновыми рецепторами. Эти соединения способны связываться с большим количеством мишеней, относящихся не только к рецепторам, сопряженным с G-белками, но также и ферментам. К тому же, они могут модулировать ионные каналы. Добавление одной метильной группы к бензодиазепиновому заместителю превращает соединение из антагониста ССК-А в агонист [69]. Молекулы производных 1,5-бензодиазепин-2-она являются привилегированными подструктурами, демонстрирующими широкий спектр биологической активности. Некоторые из них в клинике используют в качестве анксиолитических средств, таких как арфендазам, лофендазам, трифлубазам и клобазам или в качестве антисекреторных агентов, таких как телензепин. Некоторые бензодиазепины, такие как арфендазам, лофендазам, трифлубазам и клобазам, обладают широким спектром биологической активности, в то время как другие, такие как телензепин, действуют только как антисекреторные агенты. [134]

Клиническая значимость и коммерческий успех, связанные с активными производными бензодиазепинов, которые влияют на центральную нервную систему (ЦНС), и перспективностью использования 1,4-дiazепинов в качестве пептидомиметических каркасов, привели к тому, что их признали привилегированными структурами.

Бензодиазепины являются эффективными транквилизаторами, снотворными и противосудорожными препаратами, но имеют большое количество нежелательных побочных эффектов, обладают токсичностью и наркогенным потенциалом, которые

ограничивают их использование. [92] Применение бензодиазепинов может привести к непреднамеренной передозировке препарата и зависимости. Бензодиазепины - это препараты, которые Управление по контролю за продуктами и лекарствами (Food and Drug Administration) одобрило только для кратковременного использования, соблюдая ряд условий [66]. Поэтому они должны использоваться в малых дозах и краткосрочно. Эффектами отмены бензодиазепинов являются главным образом симптомы беспокойства, бессонница и судороги в серьезных случаях [125]. Бензодиазепины и их аналоги проявляют миорелаксирующее, антистрессовое, противосудорожное, анти-ВИЧ-1, антикоагулянтное свойства, они могут являться антагонистами кальциевых каналов, антагонистами холецистокинина, агонистами рецепторов тромбопоэтина, антилейкимическими, противоэпилептическими, противораковыми, противовирусными, противогрибковыми, антибактериальными, анальгезирующими, противовоспалительными, противогельминтными, жаропонижающими и противоязвенными препаратами [50, 81, 61, 70, 105, 119, 143].

1.2 Концепция синтеза ориентированного разнообразия на основе привилегированных структур (Concept of privileged-substructure-based diversity-oriented synthesis (DOS)).

Небольшая библиотека молекул, встроенная в привилегированные подструктуры, может иметь большой потенциал для обнаружения биоактивных соединений или потенциальных лекарственных препаратов. Однако простая модификация привилегированных структур только увеличивает количество аналогов без увеличения скелетного разнообразия, что противоречит фундаментальной цели подхода DOS.

Чтобы максимизировать покрытие химического пространства с высокой биологической релевантностью, было предусмотрено творческое построение полигетероциклов, внедренных с привилегированными субструктурами, посредством реакций комплексообразования.

Благодаря включению привилегированных подструктур в жесткие каркасные скелеты ожидается усиление взаимодействия молекул со специфическими биополимерами. Особый интерес представляет открытие низкомолекулярных модуляторов сложных биологических мишеней, включая белок-белковые взаимодействия, для чего требуется большая реакционная поверхность, чтобы разорвать границу между белковыми партнерами. Учеными разрабатываются и синтезируются в качестве субстратных аналогов жесткие полигетероциклические скелеты, а не гибкие линейные соединения. Жесткие скелеты ограничивают конформационную гибкость в соединениях pDOS, и это приводит к высокой специфичности к биополимерам, что наблюдается у многих биологически активных веществ. В этом отношении стратегия pDOS, которая строит разнообразные подобные лекарству полигетероциклические соединения с высоким молекулярным разнообразием и сложностью, а также высокую биологическую релевантность, была в центре внимания нескольких исследований.

Построение разнообразных полигетероциклов с использованием стратегии pDOS проводится посредством двух различных подходов: одно проектирование различных скелетов, содержащих общие привилегированные подструктуры, а другое - использование общих ключевых промежуточных звеньев, поддающихся модификации различных привилегированных полигетероциклов. [64, 177]

К дополнительным требованиям при создании нового соединения, которое в последующем подвергается клиническим испытаниям, относится избирательность к рецептору с целью снизить риск проявления возможных неблагоприятных эффектов, так как безопасность лекарств имеет большое значение для фармакотерапии [97]. Однако высокая специфичность препарата, и действие только на одну мишень не всегда достаточны. Таким образом, при конструировании новых потенциальных лекарственных веществ придерживаются концепции мультитаргетного действия, разработанной в течение последних нескольких лет. [87]

В 1909 году первоначально рассматривалась концепция изостеризма между относительно простыми химическими образованиями. Ленгмюр придумал термин «изостер» за 18 лет до его фактического выделения и описания характеристик и

предсказал, что физические свойства тогда неизвестного кетена будут напоминать физические свойства диазометана. Термин «биоизоостер» был введен Харрисом Фридманом в 1950 году, который определил его как соединения, вызывающие аналогичный биологический эффект, при этом признавая, что соединения могут быть изостерическими, но не обязательно биоизомерными. Это понятие предполагает, что применение биоизоостеризма будет зависеть от среды, полагаясь в меньшей степени на физико-химические свойства как на основной принцип биохимической мимикрии. Биоизоостеры обычно являются менее точными структурными миметиками и часто более схожи в биологических, а не в физических свойствах. В конструкцию биоизоостеров часто вносят структурные изменения, которые могут быть полезными или вредными в зависимости от цели: меняют размер, форму, электронное распределение, поляризуемость, диполь, полярность, липофильность и рKa, потенциально играющие ключевую роль в молекулярном распознавании и мимикрии. В современной практике медицинской химии разработка и применение биоизоостеров были приняты в качестве фундаментального тактического подхода, полезного для решения ряда вопросов, связанных с дизайном и разработкой потенциальных лекарственных средств. [133]

Независимо от типа высокопроизводительного скрининга, успешное открытие новых модуляторов было в значительной степени обусловлено молекулярным разнообразием библиотек для скрининга. Поэтому очень важно создать коллекцию малоподвижных модуляторов с максимальным молекулярным разнообразием. С этой целью химики разработали подход, основанный на многообразном синтезе (DOS), который направлен на эффективное создание библиотек комплексных и лекарство-подобных соединений, которые содержат большое количество структурно разнообразных молекулярных компонентов [78]. Особый интерес в разработке библиотеки эффективных модуляторов представляет творческая сборка полигетероциклов, содержащих привилегированные субструктуры, включая бензопираны, бензодиазепины, 1,4-ацеталконденсированные пиранопираны, и тетрагидроиндолоны.

Так в медицинской химии и фармакологии уже широко используются комплексы, образованные двумя и более привилегированными скаффолдами.

В последнее десятилетие значительный интерес был уделен многокомпонентным реакциям (MCRs) в целом и многокомпонентным реакциям на основе изоцианидов (IMCRs), в частности. Результат методологии, ориентированной на разнообразие - IMCR, как четырехкомпонентная реакция по Ugi (U-4CR) - важный инструмент в комбинаторной химии. Использование бифункциональных реагентов, в которых сочетаются функциональные группы двух подструктур U-4CR в одной структуре, является еще одной стратегией увеличения разнообразия скаффолдов.

После открытия новой серии производных бензимидазола, содержащих диарилметильную группу в качестве ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B, были расширены исследования зависимости структура-активность (SAR) и получены аналоги, несущие замещенную бифенильную группу, что привело к существенному улучшению активности. [99, 89]

Семичленные гетероциклические кольца – химические структуры, представляющие значительный интерес, главным образом, из-за их фармакологических свойств. Например, 1,4-дiazepin-5-оны обладают широким спектром биологических свойств: ингибирование ассоциированного с лимфоцитами антигена-1, эффективны при воспалении и аутоиммунных заболеваниях, обладают противосудорожной активностью, ингибируют обратную транскриптазу ВИЧ-1. 1,4-бензодиазепины также обладают широким спектром терапевтических и биологических эффектов, поэтому интерес представляет замена конденсированного бензольного кольца на гетероциклические кольца, такие как тиофен, имидазол, пиррол, изоксазол, пиазин и пиазол.

В медицинской химии привилегированный бензимидазольный фрагмент представляет собой структуру, присутствующую в ряде коммерческих лекарств, включая Prilosec, Nexium, Protonix, Atacand, Famvir и Vermox, а также многочисленных экспериментальных соединений-кандидатов на препарат в широком диапазоне терапевтических областей. Конденсированные бензимидазол-1,4-дiazepin-2-оны синтезируют и подвергают структурной модификации для получения

соединений, которые можно будет использовать в качестве потенциальных противоопухолевых агентов [88, 89].

Исследования 3-замещенных [1,2,4]-триазино-[4,3-с]-бензимидазолов, разработанных в качестве жестких аналогов производных N-бензилиндолилглиоксиламида, на центральном бензодиазепиновом рецепторе (BzR) оказались эффективными при судорогах, индуцированных пентилентетразолом у мышей. [88]

Последовательные структурные модификации арилоксипропанаминовой матрицы (атомоксетина 2) привели к созданию новой серии 1-(3-амино-2-гидрокси-1-фенилпропил) -1,3-дигидро-2H-бензимидазол-2-онов в качестве селективных ингибиторов обратного захвата норэпинефрина (NRIs). В целом эта серия соединений потенциально блокировала переносчик норадреналина человека (hNET), проявляя селективность при hNET в отношении как серотонина человека (hSERT), так и дофаминовых переносчиков (hDAT). Многочисленные соединения имели низкую молекулярную эффективность hNET с величинами IC₅₀ 7-10 нМ и превосходной селективностью (более чем в 500 раз) в hNET по hSERT и hDAT. Несколько соединений были протестированы на крысах с телеметрическими датчиками, у которых моделировали терморегуляторную дисфункцию (индуцированную овариэктомией), исследуемые вещества были эффективны при пероральном применении, что определили по снижению температуры кожи хвоста. Кроме того, соединения изучались также на моделях острой и нейропатической боли с помощью установки горячая пластина и лигирования спинномозгового нерва, и были также эффективны при пероральном введении. [186]

Для синтеза полиазетероциклов часто используются мультикомпонентные реакции, использующие функционализированные имидазолы и бензимидазол.

Пирамидо-бензимидазолы, как класс азетероциклов, широко изучаются по их различным биологическим свойствам, таким как антигипертензивная, противовоспалительная, антиоксидантная и иммуносупрессивная активность и ингибирование ДНК-гиразы. Например, производное бициклического пиримидинона является мощным ингибитором ВИЧ-интеграции, другое его производное действует

как NF-ингибитор пролилгидроксилазы; производное бензимидазохиназолинона является иммуносупрессивным агентом; а производное хиначолинона проявляет антипролиферативную активность [68].

1.3 Заключение

Таким образом, активно развивается направление комбинированных привилегированных структур с целью получения высокоактивных веществ, которые могли бы действовать одновременно на несколько видов мишеней, проявляя тем самым мультитаргетное воздействие. В НИИ ФОХ ЮФУ сотрудниками Морковник А.С., Анисимовой В.А., Диваевой Л.Н., Кузьменко Т.А., Кошкинко Ю.В., Богославцевой М.В. были синтезированы соединения - диазепинобензимидазолы, включающие в себя две привилегированные структуры – бензимидазола и диазепина. Производные обеих структур обладают широким спектром фармакологической активности, что определяет перспективность их комбинации. Производные бензимидазола обладают низким риском развития нежелательных побочных эффектов, чего нельзя сказать о бензодиазепинах, таким образом, совмещая активные каркасы лекарственных веществ, исследователи поставили цель добиться увеличения активности препаратов наряду с уменьшением нежелательных реакций.

Производные диазепинобензимидазола проявляют антитромботическое [33], антиагрегантное, ДПП-4 ингибирующее свойство, не влияют на α -глюкозидазу и не обладают антигликирующей активностью. Таким образом, актуально исследование фармакологической активности нового класса химических соединений – производных диазепинобензимидазола.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

В исследовании было изучено 23 производных диазепино[1,2-а]бензимидазола, разделенных на 2 группы (табл. 2.1). Все вещества синтезированы в НИИ физико-органической химии Южного федерального университета¹.

При проведении экспериментов были использованы следующие вещества: диазепам (Simplex pharma Pvt. Ltd.; Реланиум, «Польфа», Польша), коразол («Sigma», США), гексенал (ООО «МедПро Инк», Латвия), имипрамин (Мелипрамин, р-р 25 мг/2 мл; ОАО Фармацевтический завод ЭГИС, Будапешт, Венгрия), амитриптилин (р-р 10 мг/мл; ФГУП «Московский эндокринный завод», Москва, Россия), буторфанол («Московская фармацевтическая фабрика», Россия), флумазенил (ACS, США), пикртоксин («Sigma», США), галоперидол («Мосхимфармпрепараты», Россия), L-ДОФА («Sigma», США), апоморфин («ICN Biomedical», США), ситаглиптин («Sigma», США), вилдаглиптин (Галвус 50 мг., «Novartis Pharma», Швейцария), Гли-Про-р-нитроанилид (Sigma, США), Трис-НСI, натрия хлорид 0,9% («Эском», Россия).

Исследования проведены на 1234 белых мышах-самцах массой 19-30 г. Животные содержались в условиях вивария кафедры фармакологии ВолгГМУ с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной полнорационной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92).

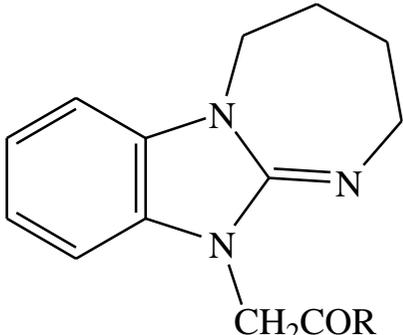
Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали Международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (2010 г.), а

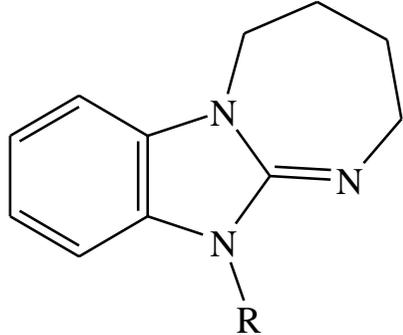
¹ Выражаем признательность сотрудникам лаборатории синтеза биологически активных соединений Морковник А.С., Анисимовой В.А., Диваевой Л.Н., Кузьменко Т.А., Кощиенко Ю.В., Богославцевой М.В. за синтез и предоставление субстанций веществ производных диазепино[1,2-а]бензимидазола для настоящего исследования.

также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным Главным Государственным санитарным врачом 29.08.2014 г. № 51.

Все исследования были одобрены к проведению Региональным независимым этическим комитетом при ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» (протокол № 191-2014 от 25 февраля 2014 года.)

Таблица 2.1 - Химическое строение 11-замещенных-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола

	Шифр вещества	Формула вещества	R	nX
	1	2	3	4
	11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидробромиды			
				
1	ДАБ-4	$C_{19}H_{18}ClN_3O \cdot HBr$	C_6H_4Cl-4	HBr
2	ДАБ-5	$C_{27}H_{35}N_3O_2 \cdot HBr$	$C_6H_2OH-4-[C(CH_3)_3]_{2-3,5}$	HBr
3	ДАБ-7	$C_{17}H_{23}N_3O \cdot HBr$	$C(CH_3)_3$	HBr
4	ДАБ-8	$C_{19}H_{18}FN_3O \cdot HBr$	C_6H_4F-4	HBr
5	ДАБ-12	$C_{20}H_{21}N_3O \cdot HBr$	$C_6H_4CH_3$	HBr
6	ДАБ-24	$C_{19}H_{20}N_4O \cdot HCl$	NHC_6H_5	HCl
7	ДАБ-31	$C_{23}H_{27}N_3O_3 \cdot HBr$	$C_6H_3(CH_3)_{2-3,4}$	HBr

Продолжение таблицы 2.1				
	Шифр вещества	Формула вещества	R	nX
	1	2	3	4
	11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды			
				
8	ДАБ-13	$C_{19}H_{20}ClN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4Cl-4$	HBr
9	ДАБ-14	$C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot HBr$	$CH_2CH_2OC_6H_4(OCH_3)-4$	HBr
10	ДАБ-15	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl
11	ДАБ-17	$C_{21}H_{23}N_3O_3 \cdot HBr$	$CH_2COC_6H_3(OCH_3)_{2-3,4}$	HBr
12	ДАБ-18	$C_{19}H_{19}N_3O_3 \cdot HBr$	$CH_2COC_6H_3(OH)_{2-3,4}$	HBr
13	ДАБ-19	$C_{22}H_{27}N_3 \cdot HBr$	$CH_2C_6H_4C(CH_3)_3$	HBr
14	ДАБ-20	$C_{17}H_{26}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	2HCl

Окончание таблицы 2.1

15	ДАБ-21	$C_{17}H_{24}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(CH_2)_4$	2HCl
16	ДАБ-22	$C_{18}H_{26}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(CH_2)_5$	2HCl
17	ДАБ-23	$C_{17}H_{24}N_4O \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(CH_2CH_2)_2O$	2HCl
18	ДАБ-25	$C_{19}H_{20}FN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4F-4$	HCl
19	ДАБ-26	$C_{23}H_{29}N_3O \cdot HBr$	$CH_2CH_2OC_6H_4C(CH_3)_3-4$	HBr
20	ДАБ-27	$C_{19}H_{18}CF_3N_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4CF_3-4$	HCl
21	ДАБ-28	$C_{20}H_{22}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl
22	ДАБ-29	$C_{21}H_{22}F_3N_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4CF_3-4$	HCl
23	ДАБ-30	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl

2.2 Методы исследования

2.2.1 Прогноз фармакологической активности в системе PASS

Прогноз в системе PASS Professional Extended (Version 10.4 1992-2011)² основан на расчете для прогнозируемого соединения вероятностей наличия и отсутствия активности по двум типам MNA-дескрипторов, которые основаны на топологическом представлении структуры химического соединения, где указываются все атомы водорода и не учитываются типы связей. Метод прогноза основан на оценке условной вероятности по формуле Байеса с использованием арксинусного преобразования Фишера. Рассчитываются вероятности наличия P_a и отсутствия P_i у прогнозируемого соединения заданной активности. Вещество считается активным, если $P_a > P_i$. [Филимонов Д. А., Поройков В. В., 2006]. Далее рассчитывается среднее отношение правдоподобий P_a/P_i , за счет которого определяется индекс перспективности соединения (Ind):

$$P_a/P_i \geq 100 \text{ Ind} = 3; 100 < P_a/P_i \leq 10 \text{ Ind} = 2; 10 < P_a/P_i \leq 1 \text{ Ind} = 1$$

Таким образом, чем больше индекс перспективности Ind, тем больше вероятность проявления высокой заданной активности у исследуемого соединения.

² Выражаем признательность заведующему лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН Поройкову Д.А. и ведущему научному сотруднику лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН Филимонову Д. А. за предоставленную версию программы PASS Professional Extended (Version 10.4 1992-2011).

2.2.2 Изучение анксиолитического действия на установке приподнятый крестообразный лабиринт.

Эксперимент проводился на 230 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Метод основан на естественном предпочтении грызунами темных нор, а также на страхе нахождения на открытых площадках и падения с высоты [Воронина Т.А., 2012].

Крестообразный лабиринт представляет собой установку, состоящую из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов размерами 10×50 см, два из которых открыты, а два имеют светонепроницаемые стенки высотой 30 см. Установка располагалась на высоте 90 см и была жестко зафиксирована, во избежание движений лабиринта.

Исследуемые вещества вводили за 30 минут до начала теста. Животным опытных групп внутрибрюшинно вводили вещества в эквимолярных дозах, либо диазепам (2 мг/кг). Контрольным группам вводили растворитель - изотонический раствор хлорида натрия.

Животных помещали в середину площадки, хвостом к исследователю. В течение 3 минут регистрировали следующие показатели анксиолитической активности: латентный период времени до выхода в открытый рукав (сек), количество выходов в светлый рукав, суммарное время, проведенное в открытых рукавах лабиринте (сек), общее число переходов из рукава в рукав (с указанием переходов типов рукавов), количество свешиваний, реактивность принятия решения - время ухода из центра (сек), общее время нахождения в центре (сек), количество выглядываний из закрытого рукава, количество болюсов.

2.2.3 Изучение острой токсичности и определение показателя LD₅₀.

Острую токсичность определяли в соответствии методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств

[Арзамасцев, 2012]. Исследование токсичности соединения ДАБ-19 проводили на 24 белых нелинейных мышах–самцах массой 22-30 г. (ООО «Питомник РАМТН», ветеринарное свидетельство 202 № 0128531 от 19.12.2012) при однократном внутрибрюшинном введении. Оценка общего состояния и поведения животных проводилась по: характеру двигательной активности, координации движений, наличию судорог и их типу, наличию тремора. По истечению 14 суток проводили подсчет процента павших и выживших животных. Расчет токсикологического показателя - LD50 – проводили по методу Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 1963].

2.2.4 Изучение анксиолитической активности на установке «темная/светлая камера»

Эксперимент проводился на 30 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Метод основан на естественном предпочтении грызунами темных нор, а также на страхе нахождения на открытых площадках [Воронина Т.А., 2012].

Данный тест применяется в настоящее время как одна из основных моделей оценки тревожного поведения грызунов. Установка «Темно-светлая камера» предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: предпочтение темноты/света; выраженность и динамику поведения «выглядывания»; привыкание. Используется для скрининга анксиолитиков (в сочетании с тестом «Приподнятый крестообразный лабиринт»).

Установка состоит из двух частей – темная и светлая камера с параметрами 30х30 см (для крыс) и 20х20 см (для мышей), камеры разделены перегородкой, высота стенок равна 30 см и 20 см, соответственно. В зависимости от задач эксперимента, темный отсек камеры можно закрывать крышкой или оставлять открытым.

Согласно руководству по доклиническому изучению новых фармакологических веществ оценка поведения крыс и мышей в темно-светлой камере входит в перечень исследований, доказывающих наличие транквилизирующей (анксиолитической) активности у изучаемого соединения (базовые тесты). Обычно, транквилизаторы увеличивают число переходов из одного отсека в другой и время нахождения в светлом отсеке.

Эксперименты выполняются на животных, разделенных на группы по 10 животных в каждой.

В опытах изучаемые вещества вводятся за 30 минут до начала теста. Животным опытных групп внутрибрюшинно вводится вещество в эквимолярных дозах, либо диазепам в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг. Контрольным группам крыс вводится изотонический раствор хлорида натрия.

Животных помещают в ярко освещенный отсек двухкамерной светлой/темной установки и за определенный период времени (3-5 мин) регистрируют:

- латентный период первого захода в отсек;
- число перемещений туда-обратно;
- время, проведенное в светлом и темном отсеках;
- выглядывание из темного в светлый отсек;
- число вставаний на задние лапы.

Анксиолитики (вещества, снижающие уровень тревоги) увеличивают число переходов между темным и светлым отсеками камеры и другие параметры [Michel Bourin, 2003].

2.2.5 Влияние исследуемых соединений на локомоторную активность.

Эксперимент проводился на 230 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Актометр Activity cage 7401 представляет собой прибор, состоящий из камеры размером 41x41x33 см, со стенками, не пропускающими свет и

прозрачной плексигласовой крышкой. В камере расположены датчики, фиксирующие горизонтальную активность животного. Информация передается на самописец, в котором есть возможность установки таймера с автоматической фиксацией полученных результатов.

В опытах изучаемые вещества вводили за 30 минут до начала теста. Животным опытных групп внутривенно делали инъекцию вещества в эквивалентных дозах, либо диазепам в дозе 2 мг/кг. Контрольным группам мышей вводили изотонический раствор хлорида натрия.

Животных помещали в прибор, хвостом к исследователю. В течение 5-и минут автоматически регистрировалось количество переходов, совершаемых животным внутри актометра.

2.2.6 Влияния соединений на продолжительность гексаналового сна.

Длительность сна оценивали по времени «бокового положения». Тестирование проводилось в условиях звукоизоляции и изотермии ($t=20^{\circ}$) [Николаев М.П., 1941; Новожеева Т.П., Саратиков А.С., 1999; Kim E.J. et al., 2001].

Эксперименты выполнялись на 110 животных, разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Животным опытных групп внутривенно вводили исследуемые вещества в эквивалентных дозах и гексенал. Контрольным группам животных вводили физ. раствор в эквивалентном объеме и гексенал.

Регистрировали время засыпания (принятие «бокового положения») и окончания сна (появление первых признаков активности).

Об уровне гипногенного действия судили по изменению продолжительности сна в опытных группах по сравнению с контрольной.

2.2.7 Изучение антидепрессантной активности в тесте принудительного плавания по Porsolt.

В российской интерпретации Porsolt test (тест Портсолта) обычно называют тест «принудительного плавания» (так же используются термины тест «поведения отчаяния»; в иностранных источниках тест может называться «Behavioural Despair test»). Изначально тест был предложен с целью проверки формирования депрессивноподобного статуса у лабораторных животных.

Оборудование, предложенное Roger D. Porsolt для проведения теста, представляло собой прозрачный цилиндр диаметром 10 см и высотой 30 см. При проведении теста оценивается время, когда животное от активных попыток найти выход из неприятного положения (погружение в воду и невозможности покинуть установку), переходит к неподвижности, «зависанию», которое исследователи ассоциируют с поведением отчаяния или так называемым «состоянием потери животным надежды - безысходность» [Ковалева М. А., 2015]. Данный тест обладает самой высокой валидностью (в зарубежных статьях определяется термином predictive validity), то есть все эффективные антидепрессанты снижают время неподвижности животного, которое расценивается, как чувство безысходности, неспособности выбраться из сосуда с водой. Говоря о психофармакологии, тест «принудительного плавания» так же используется с целью поведенческого фенотипирования лабораторных грызунов для определения изначального уровня тревожности у животных их эмоционального поведения (склонность к депрессии).

Эксперименты выполнялись на 140 животных, разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Животным опытных групп трехкратно (за 24 часа, 12 часов, 1 час до эксперимента) внутрибрюшинно вводили исследуемые вещества в эквимолярных дозах, а также препараты сравнения диазепам (2 мг/кг), amitriptyline (10 мг/кг) и imipramine (15 мг/кг). Контрольным группам животных вводили физ. раствор в эквивалентном объеме.

Регистрировали время активного плавания (любого движения животного, в попытке выбраться или держаться на воде) и время иммобильности (полного отсутствия движений – состояние безысходности).

2.2.8 Изучение противосудорожной активности на модели коразоловых судорог.

Исследование противосудорожной активности проводилось на 130 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г, разделенных на группы по 10 животных в каждой. Исследуемые соединения в эквимолярных дозах вводили животным внутрибрюшинно за 30 минут до введения коразола (доза 80 мг/кг). Контрольной группе животных вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме. Препарат сравнения – диазепам вводили животным внутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг за 30 минут до введения коразола. Коразол вводили подкожно в область шейного отдела спины. За животными вели наблюдение в течение 30 минут после введения коразола. Для оценки противосудорожной активности регистрировали следующие показатели: латентный период - время до наступления судорог (сек), длительность клонико-тонических судорог, летальность животных в группе. Отсутствие судорог свидетельствовало о противосудорожной активности исследуемых веществ [Воронина Т.А., 2005].

2.2.9 Изучение противосудорожной активности соединений на модели пикротоксиновых судорог.

Исследование противосудорожной активности проводилось на 20 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Исследуемые соединения в эквимолярных дозах вводили животным внутрибрюшинно за 30 минут до введения пикротоксина. Пикротоксин вводили в

дозе, вызывающей судороги у 97% животных (2,5 мг/кг), подкожно в область шейного отдела спины. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме. Препарат сравнения – диазепам вводили животным внутривентриально в дозе 2,0 мг/кг за 30 минут до введения пикротоксина. За животными вели наблюдение в течение 30-60 минут после введения пикротоксина. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества использовали его способность подавлять развитие повторяющихся клонических судорог передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 сек. без потери рефлекса переворачивания [Воронина Т.А., 2005].

2.2.10 Изучение анальгетической активности соединений в тесте «Горячая пластина».

Исследование анальгетической активности проводилось на 140 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Тест горячей пластины основан на поведенческих реакциях, контролируемых супраспинальными структурами, в ответ на болевое воздействие. При помещении животного на горячую поверхность (55°C) с достижением порога болевой реакции наблюдаются двигательные реакции беспокойства: отдергивание лап, облизывание подушечек лап, подпрыгивание, которые характеризуются самой сложной организацией рефлекса с вовлечением корковых и подкорковых структур головного мозга. Данная экспериментальная модель позволяет не только оценить обезболивающее действие вещества, но и определить уровень вмешательства в нейромедиаторные процессы ЦНС [Kitchen I., Crowder M., 1985].

Мышей помещали на термостатически контролируемую, электронагревательную поверхность, окруженную цилиндром диаметром 15 см с установленным температурным режимом. Регистрировали латентный период

(ЛП) болевой реакции в виде облизывания задних лап. При отсутствии активности в течение 30-секундного интервала (максимальное время экспозиции) за ЛП принимались 30 секунд.

Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения исследуемого вещества по отношению к интактным животным.

2.2.11 Изучение анальгетической активности соединений в тесте отдергивания хвоста.

Исследование анальгетической активности проводилось на 60 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Прибор «Tail flick» (Ugo Basil) производит точное измерение болевого порога при воздействии инфракрасного теплового стимула. Животное помещают в специальный фиксатор, инфракрасное излучение фокусируется на хвосте животного специальным образом. При наступлении болевого порога животное отдергивает хвост, что улавливается датчиком. Автоматически записывается время реакции животного и интенсивность инфракрасного излучения.

Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения исследуемого вещества по отношению к интактным животным.

2.2.12 Взаимодействие антагониста бензодиазепиновых рецепторов флумазенила с исследуемыми соединениями и их совместное влияние на поведение животных в установке «приподнятый крестообразный лабиринт».

Исследование проводилось на 50 беспородных белых мышах-самцах массой 19-30 г., разделенных на группы по 10 животных в каждой.

Животным одной группы однократно вводили препарата сравнения диазепам в дозе 2,0 мг/кг. Животным второй группы вводили исследуемое соединение в эквимолярной диазепаму дозе 2,9 мг/кг. Животным третьей и четвертой групп за 30 минут до введения диазепама и исследуемого соединения вводили антагонист бензодиазепиновых рецепторов – флумазенил (1,0 мг/кг). Контрольная группа животных получала физ. раствор внутривенно в эквивалентном объеме.

Животных помещали в середину площадки, хвостом к исследователю. В течение 3 минут регистрировали следующие показатели анксиолитической активности: латентный период времени до выхода в открытый рукав (сек), количество выходов в светлый рукав, суммарное время, проведенное в открытых рукавах лабиринте (сек), общее число переходов из рукава в рукав (с указанием переходов типов рукавов), количество свешиваний, скорость принятия решения - время ухода из центра (сек), общее время нахождения в центре (сек), количество выглядываний из закрытого рукава, количество болюсов.

Оценку активности проводили путем сравнения результатов, полученных в группах, которым вводили только исследуемые соединения, по отношению к группам, получавшим флумазенил.

2.2.13 Изучение влияния изучаемого соединения на каталептогенный эффекта галоперидола.

В данном тесте исследовалась способность вещества оказывать влияние на дофаминовые рецепторы 2 типа, локализованные в центральной нервной системе, блокируя их. Это выражалось в угнетении двигательной активности и ориентировочных реакций, а также в возможном возникновении каталепсии. Проявление такой симптоматики является характерной чертой для типичных нейролептиков [Карпов В.Н., 1976; Маймете М.О. и соавт., 1985; Андреева Н.И., 2005]. Тестирование проводилось на 20 крысах, разделенных на 2 группы (1 контрольную, 1 опытная) по 10 животных в каждой. Соединение ДАБ-19 вводили

внутрибрюшинно в дозах 2,9 мг/кг, контрольной группе вводился изотонический раствор хлорида натрия. Через 1 час производилась инъекция галоперидола (3 мг/кг, внутрибрюшинно) и велось наблюдение за животными. Развившуюся каталепсию оценивали по способности сохранять заданную непривычную позу в течение 15 секунд через 15, 30, 45, 60 и 120 минут после введения галоперидола по балльной шкале С. Морпуго (1962): 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. О наличии дофаминергического влияния судили по изменению выраженности каталептогенной реакции в опытных группах по отношению к контролю.

2.2.14 Изучение стереотипии эффектов L-ДОФА при введении исследуемого соединения

Данный тест применяется для выявления у изучаемого соединения MAO-ингибирующего действия. Тест основан на возможности L-ДОФА в высоких дозах (500 мг/кг) вызывать у животных стереотипные движения, при этом если одновременно использовать вещества, способные ингибировать моноаминоксидазу, эффекты, связанные с проявлением стереотипных движений, возможно наблюдать и при введении низких доз L-ДОФА (100мг/кг) [Андреева Н.И., 2005]. Эксперимент был выполнен на 30 мышах, разделенных на 3 группы (2 контрольных, 1 опытная) по 10 особей в каждой. Животным опытной группы внутрибрюшинно вводилось соединение ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг, животным контрольных групп – изотонический раствор хлорида натрия. На 30 минуте после введения вещества и физиологического раствора мышам контрольной группы №1 внутрибрюшинно вводился L-ДОФА в дозе 500 мг/кг, контрольной группе №2 и опытной группе – в дозе 100 мг/кг. В ходе эксперимента оценивали наличие и выраженность у животных стереотипии. Измерения проводили с интервалом в 30 минут в течение полутора часов после введения L-ДОФА. За каждым животным

вели наблюдение в течение 1 минуты, во время которой экспериментатор оценивал уровень проявляемой стереотипии, используя балльную шкалу оценок:

0 баллов – отсутствие стереотипии;

1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание;

2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение;

3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. О наличии MAO-ингибирующего действия у изучаемого вещества судили по изменению показателей в опытных группах в сравнении с контрольными.

2.2.15 Изучение эффектов апоморфина при введении исследуемого соединения

Апоморфин в малых (0,01-0,15 мг/кг) дозах вызывает стереотипные движения у крыс. Такой эффект, как предполагается, связан с пресинаптическими дофаминовыми рецепторами и непосредственной их активацией [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005]. Это дает возможность использовать данный эффект при анализе пресинаптического влияния веществ на дофаминовые рецепторы.

Эксперименты были выполнены на 20 крысах, разделенных на 2 группы по 10 животных в каждой (1 контрольную, 1 опытная). Соединение ДАБ-19 вводилось животным внутривенно в дозе 2,9 мг/кг, контрольная группа получала физиологический раствор. Спустя 30 минут животным вводился апоморфин (0,1 мг/кг, подкожно). Через 30, 60, 90 и 120 минут у животных оценивалась выраженность стереотипных движений. Для оценки использовалась балльная шкала:

0 баллов – отсутствие стереотипии;

1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе единичные случаи зевательных движений, непостоянное принюхивание;

2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе зевание, лизание и грызение;

3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. О выраженности влияния изучаемого соединения на данный феномен судили в сравнении с показателями контрольной группы.

2.2.16 Изучение ДПП-4 ингибиторной активности спектрофотометрическим методом in vitro

Для определения величины ингибирования смешивали 10мкл раствора исследуемого вещества (10⁻⁴ М/л) с 50мкл 0,1 М Трис-НСl буфер с рН 8.4 и 40 мкл плазмы человека. В тест-системе исследовали тестируемые соединения (производные азолов) в концентрации 10⁻⁴ М/л, которые были синтезированы в Научно-исследовательском институте физической и органической химии (НИИ ФОХ ЮФУ). В качестве препарата сравнения использовали ситаглиптин (Sigma, США). Анализируемую смесь преинкубировали при 37°С в течение 5 мин. После преинкубации вносили 100мкл 1 мМ субстрата реакции Гли-Про-р-нитроанилида (Sigma, США), полученную смесь инкубировали при 37°С в течение 15 мин. Развитие желтого окрашивания в результате высвобождения 4-нитроанилина определяли при длине волны 405 нм используя прибор для считывания планшетов (ELx800, BioТес, США) [34].

Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле:

(контроль – тест/контроль) * 100%. Значения IC50 подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK).

2.2.17 Методы статистической обработки данных

При парном сравнении независимых данных использовались Т-тест и тест Манна-Уитни, для анализа зависимых данных использовали тест Вилкоксона. Достоверность величины IC50 оценивалась методом линейного регрессионного

анализа. Для многопараметровых исследований статистическая обработка результатов проводилась с использованием теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных. Результаты динамических наблюдений обсчитывали с помощью двухфакторного ANOVA метода. Вычисления реализованы в программе GraphPad Prism 5.0 и «Microsoft Excel 2002».

ГЛАВА 3. ПРОГНОЗ СПЕКТРА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА

3.1 Прогноз фармакологической активности новых производных диазепинобензимидазола с помощью системы PASS.

Анализ литературы об исследуемом классе веществ – производных диазепинобензимидазола – выявил наличие у представителей изучаемого класса соединений только антиагрегантной активности [33]. Так как производные диазепинобензимидазола являются новым классом соединений, который плохо изучен, было решено исследовать вещества на наличие иных фармакологических активностей. Чтобы установить наличие у изучаемых веществ спектра биологических эффектов, необходимо было проводить длительные эксперименты, однако, тотальный скрининг всех новых соединений на все виды активности осуществить невозможно из-за высокой стоимости и временных затрат. Успехи в области медицинской химии, молекулярной биологии и биоинформатики привели к использованию прорывных компьютерных технологий в поиске новых биологически активных веществ и созданию на их основе новых лекарственных препаратов, что сокращает время и материальные затраты. Поэтому первым этапом изучения стало исследование производных диазепинобензимидазола *in silico*, с целью прогнозирования спектра фармакологической активности в тест-системе PASS. Вторым этапом изучения нового класса соединений стали экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*.

В системе PASS около 314 тыс. испытанных соединений, описывается 76 тыс. фрагментных дескрипторов, с помощью которых можно спрогнозировать более 7 тыс. видов биологической активности [18].

Для каждого соединения рассчитывается два значения наличие (Pa) и отсутствие (Pi) заданной активности. Их отношение Pa/Pi является отношением правдоподобий и характеризует на сколько вероятность наличия активности выше чем ее отсутствие. Нами в рабочем порядке были выбраны условные пороги

отношений правдоподобий и присвоен индекс перспективности. Так, например, если $P_a/P_i \geq 100$, то $Ind = 3$, то есть соединение высоко перспективно в плане наличия у него заданной активности; если $100 < P_a/P_i \leq 10$, то $Ind = 2$, то есть соединение достаточно перспективно с точки зрения наличия у него заданной активности; если $10 < P_a/P_i \leq 1$, то $Ind = 1$, то есть соединение мало перспективно на наличие активности.

Система PASS уровень активности не прогнозирует, но в общем можно считать, что чем выше индекс перспективности, тем выше вероятность проявления у соединения заданной активности.

В ходе исследования был проведен анализ фармакологических свойств производных diazepinobenzimidazola. Из широкого спектра активностей, имеющих в базе, были выбраны те виды активности, которые проявлялись у соединений, имеющих в химической структуре привилегированные фрагменты diazepina и benzimidazola, а именно психотропную и антидиабетическую. Так как обширное понятие психотропной активности включает в себя антидепрессантное, анксиолитическое действие, неврологические расстройства и фобии, был проведен прогноз на данные фармакологические свойства.

В результате анализа производных diazepinobenzimidazola в тест-системе PASS обнаружен широкий спектр возможных активностей, которые можно условно разделить на 4 группы (Табл. 3.1): эффекты, действующие на сердечно-сосудистую систему, нейропсихотропные, иммунотропные и разного действия. Так потенциальное влияние на ССС возможно по следующим видам активностей – антиишемическая, вазодилатационная, лечение инфаркта миокарда, кардиотоническая, антимигренозная. В группу нейропсихотропных эффектов включены 12 видов активности таких, как психотропная, лечение расстройств настроения, лечение фобий, антидепрессантная, лечение острых неврологических расстройств, анксиолитическая, ноотропная, антиневротическая, противосудорожная, лечение нейродегенеративных заболеваний и анальгетическая. К иммунотропным эффектам относятся три вида активностей - лечение аллергического конъюнктивита, антиэкзематическая и противозудная. Так

же у производных диазепинобензимидазола выявлена вероятность проявления и других видов активности, таких как антинейротоксическая, лечение заболеваний репродуктивной системы, стимулирующая функции почек, антидискинетическая, антидиабетическая, антиостеопоротическая, лечение офтальмологических заболеваний, антинефротоксическая.

Из 23 исследуемых соединений вероятность проявления психотропной активности была обнаружена у 78% веществ. Использование 45,5% изучаемых производных диазепинобензимидазола возможно для лечения расстройств настроения, у 40,9% веществ выявлена вероятность проявления антидепрессантной активности и возможность использования при лечении фобий. Анксиолитической активностью в результате прогноза в системе PASS должны обладать только три соединения, так же, как и способностью применения при острых неврологических расстройствах. Наличие ноотропной и противоневротической активности перспективно у 9,1% производных диазепинобензимидазола. Вероятность наличия у исследуемых соединений анальгетической и противосудорожной активности и эффективность при лечении нейродегенеративных заболеваний составляла по 4,5%. Индекс перспективности соединений с психотропными свойствами больше 1, что свидетельствует о достаточной вероятности проявления эффектов.

Проанализировав количество потенциально активных соединений, установлено, что у всех соединений должны проявляться антиишемический и противоаллергический (лечение конъюнктивита) эффекты, с достаточной перспективностью $Ind = 1,91$ и $Ind = 2,68$ соответственно. Среди группы сердечно-сосудистых эффектов вазодилатационная активность возможна только у 27,3% из изучаемых веществ, при лечении инфаркта миокарда возможно эффективны 9,1% соединения, кардиотоническая и антимигренозная активность спрогнозирована только у 4,5% веществ.

К иммунотропным свойствам, прогнозируемым в тест-системе PASS, помимо влияния на аллергический конъюнктивит относится антиэкзематическая активность, которая с низкой вероятностью ($Ind = 1,00$) может быть обнаружена у 5

соединений, достаточно перспективна (Ind=2,00) вероятность у 4 производных диазепинобензимидазола противозудной активности.

В группе других потенциальных активностей у 8 соединений наиболее вероятно обнаружить антинейротоксические эффекты и способность влиять на репродуктивную систему – у 7 соединений. Наличие стимулирующего влияния на функции почек и антидискинетическую активность есть вероятность обнаружить у 3 и 2 веществ, соответственно. Остальные же виды активности – противодиабетическая, антиостеопоротическая, антинефротоксическая – могут быть только у 4,5% от исследуемых веществ.

Учитывая химическую структуру исследуемых соединений, полученных путем комбинации двух привилегированных структур, наличие диазепинового фрагмента может привести к проявлению психотропных свойств, так как большинство применяемых в терапевтической практике анксиолитиков являются производными диазепаина. Наличие бензимидазольного фрагмента, так же свидетельствует о потенциальной психотропной активности, но в отличие от производных диазепаина, у них меньше риск развития нежелательных эффектов [35, 26, 42]. Таким образом, благодаря прогнозу *in silico*, полученному при исследовании производных диазепинобензимидазола в тест-системе PASS, для дальнейшего изучения была выбрана группа с наиболее широким спектром активностей – нейропсихотропных, так как у большого числа исследуемых соединений высока вероятность их проявления. В результате анализа индекса перспективности у исследуемых соединений с наибольшей вероятностью должна быть выявлена антидепрессантная активность (Ind = 2,56). Достаточно вероятно обнаружение анксиолитической, анальгетической, противосудорожной и антидиабетической активностей (Ind = 2,00), и мало вероятно наличие у исследуемых соединений свойств для лечения фобий и острых неврологических расстройств (Ind = 1,11 и Ind = 1,33, соответственно).

3.2 Заключение

Анализ соединений *in silico* в системе PASS позволил определить наличие нейрорепродуктивного, иммуностимулирующего, сердечно-сосудистого и других спектров фармакологической активности у нового класса производных диазепинобензимидазола. Так как химическая структура производных диазепинобензимидазола включает в себя диазепиновый скаффолд, который встречается у лекарственных средств с анксиолитическими, противосудорожными, антидепрессантными свойствами, а так же в структуре имеется бензимидазольный фрагмент, входящий в состав веществ с ДПП-4 ингибирующей, анксиолитической, противосудорожной активностями, перспективно изучить данный класс соединений на наличие прогнозируемых в тест-системе PASS психотропных видов фармакологической активности и антидиабетической *in vitro*.

Таблица 3.1 - Спектр активностей соединений производных diaзепинобензимидазола под лабораторными шифрами ДАБ по данным прогноза в PASS*

№	Фармакологическая активность [#]	Число соединений активных по прогнозу, N	Процент соединений активных по прогнозу, %	Среднее отношение правдоподобий, Aver (Pa/Pi)	Индекс перспективности, Aver (Ind)
Влияние на сердечно-сосудистую систему					
1	Антиишемическая	23	100,0	40,5	1,91
2	Вазодилатационная	6	27,3	11,0	1,33
3	Лечение инфаркта миокарда	2	9,1	140,8	3,00
4	Кардиотоническая	1	4,5	27,9	2,00
5	Антимигренозная	1	4,5	143,8	3,00
Нейропсихотропные эффекты					
6	Психотропная	18	78,0	60,6	2,24
7	Лечение расстройств настроения	10	45,5	82,9	2,50
8	Лечение фобий	9	40,9	7,4	1,11

Продолжение таблицы 3.1

9	Антидепрессантная	9	40,9	90,0	2,56
10	Лечение острых неврологических расстройств	3	13,6	9,0	1,33
11	Анксиолитическая	3	13,6	19,2	2,00
12	Ноотропная	2	9,1	19,2	1,50
13	Антиневротическая	2	9,1	7,6	1,50
14	Противосудорожная	1	4,5	15,0	2,00
15	Лечение нейродегенеративных заболеваний	1	4,5	18,4	2,00
16	Анальгетическая	1	4,5	14,2	2,00
Иммунотропные эффекты					
17	Лечение аллергического конъюнктивита	23	100,0	146,2	3,00
18	Антиэкзематическая	5	22,7	4,9	1,00
19	Противозудная	4	18,2	26,6	2,00
Другие эффекты					
20	Антинейротоксическая	8	36,4	10,3	1,63

Окончание таблицы 3.1

21	Лечение заболеваний репродуктивной системы	7	31,8	83,5	2,29
22	Стимулирующая функции почек	3	13,6	5,9	1,00
23	Антидискинетическая	2	9,1	11,4	2,00
24	Антидиабетическая	1	4,5	34,8	2,00
25	Антиостеопоротическая	1	4,5	35,9	2,00
26	Лечение офтальмологических заболеваний	1	4,5	123,0	3,00
27	Антинефротоксическая	1	4,5	16,7	2,00

* - PASS Professional Extended v10.4, SAR Base v12.6, тестовая выборка DAB v01 (Pa > 0,5)

- названия видов активностей приводится в редакции системы PASS

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА

Распространённость заболеваний, связанных с тревожными расстройствами, составляет от 13,6 до 40% и постоянно растет [13, 41]. Поэтому проблема эффективной диагностики и лечения невротических расстройств выходит сегодня на одно из ведущих мест в практическом здравоохранении. Тревожные расстройства могут проявляться такими симптомами как тревога, беспокойство, ощущение напряжения, повышенная раздражительность, нарушение сна, повышенная утомляемость и страхи, а также учащенным сердцебиением, одышкой, ощущением сдавливания в груди и горле, повышенной потливостью и т.д. [11].

На сегодняшний день препараты, обладающие анксиолитическим эффектом, представлены в основном группой соединений бензодиазепинового ряда, так как их противотревожное действие реализуется быстро и достаточно эффективно. Но, несмотря на многообразие современных подходов к лечению генерализированной тревоги использование хорошо апробированных схем не всегда приводит к качественному анксиолитическому эффекту [16]. Помимо основного клинико-фармакологического эффекта у транквилизаторов проявляются и другие эффекты: седативный, миорелаксирующий, противосудорожный, снотворный, вегетостабилизирующий, а также амнестический, многие анксиолитики к тому же способны вызывать лекарственную зависимость [2, 8]. В связи с этим для одновременного повышения эффективности терапии и снижения проявлений нежелательных реакций используют комбинации транквилизаторов и лекарственных средств иных фармакологических групп, в спектре действия которых также предполагается анксиолитическая активность [37, 29]. Актуальным остается и поиск новых эффективных транквилизаторов, которые на фоне высокой биологической активности не оказывали бы токсического действия и обладали минимальными побочными эффектами. Рациональным решением, возможно,

станет синтез новых соединений путем комбинации структур уже известных препаратов [7, 39, 38]. Так в последние годы при поиске биологически активных веществ развивается концепция "привилегированных структур или подструктур [153; 76].

В ранних исследованиях, психотропная активность была установлена у производных бензимидазола, у которых так же отмечался низкий риск проявления нежелательных эффектов [182; 16]. Экспериментальные исследования позволили выявить у производных бензимидазола анксиолитическую активность [8; 37]. В связи с этим перспективным является исследование комбинации двух привилегированных подструктур – производных диазепина и бензимидазола – диазепинобензимидазола, которые отличаются высокой эффективностью и низким риском появления нежелательных реакций.

4.1 Изучение анксиолитической активности производных диазепинобензимидазола в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»

В установке «приподнятый крестообразный лабиринт» изучили влияние ряда производных диазепинобензимидазола. Всего в скрининговом исследовании было протестировано 15 соединений (табл. 4.1). В качестве основного показателя использовали время нахождения животных в открытом рукаве, но также учитывались и другие показатели: латентное время выхода в светлый рукав, количество выходов в светлый рукав, количество свешиваний и выглядываний.

Исследование проводили на 160 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 16 групп по 10 особей в каждой. Животным группы препарата сравнения однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозе 2 мг/кг, животным опытных групп вводили исследуемые вещества в эквивалентных препарату сравнения дозах. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

Все изученные соединения оказывали различный уровень влияния на поведение мышей. В зависимости от полученных результатов исследуемые

вещества можно условно разделить на 4 группы: соединения, превосходящие по активности препарат сравнения (высоко активные); активные соединения, соответствующие показателям препарата сравнения; соединения с умеренной активностью – уступающие диазепаму, но превосходящие показатели контрольной группы и неактивные.

Лишь 3 соединения превосходили влияние препарата сравнения диазепамы по времени нахождения животных в открытом рукаве. Еще 5 соединений продемонстрировали эффективность равную препарату сравнения. 2 соединения уступали эффекту диазепамы, на что указывает низкий показатель времени нахождения в светлом рукаве, но превосходящий диапазон значений контрольной группы. И 4 исследуемые вещества оказались неактивными при введении животным, так как результат опытных групп аналогичен результату контрольных животных, и даже ниже, что отмечалось в сокращении время нахождения в открытом рукаве по сравнению с контрольной группой.

Так активными веществами являются ДАБ-18, ДАБ-19 и ДАБ-23, а животные, которым вводили данные соединения, проявили наибольшую активность. Время нахождения в открытом рукаве животных данных групп статистически значимо увеличивалось в 3,5-5 раз, а латентное время выхода в открытый рукав статистически значимо сокращалось по сравнению с группой контроля. По эффективности исследуемые соединения превосходили показатели препарата сравнения. Так самым активным соединением является ДАБ-19, животные выходили из темного рукава в течение $23,8 \pm 10,29$ сек., а находились в открытом рукаве $124,0 \pm 12,06$ сек., что явно превосходит показатели группы препарата сравнения диазепамы ($90,3 \pm 20,64$ сек., $74,5 \pm 19,32$ сек. соответственно). Введение животным соединения ДАБ-19 вызывало увеличение количества выходов в светлый рукав, но на количество свешиваний и выглядываний не оказывало влияния.

Время пребывания животных в открытом рукаве при введении соединений ДАБ-7, ДАБ-13, ДАБ-17, ДАБ-20, и ДАБ-30 находилось в диапазоне от 65 до 87 сек., в то время как показатель препарата сравнения диазепамы составлял

74,5±19,32 сек. Все соединения при однократном внутрибрюшинном введении сокращали латентный период выхода из темного рукава по сравнению с показателями контрольной группы животных в 1,5-2 раза (ДАБ-13, ДАБ-17, ДАБ-20), а некоторые в 3,5 и 9 раз (ДАБ-30 и ДАБ-7 соответственно). Количество выходов в светлый рукав и количество свешиваний достоверно увеличивалось в группах животных, которым вводили ДАБ-7 и ДАБ-13, а количество выглядываний достоверно увеличивалось при введении ДАБ-13. Показатели других опытных групп от контрольных значений не отличались. Полученные результаты могут свидетельствовать о снижении эмоциональной тревожности и повышении исследовательской и поисковой активности.

Опытные группы животных, которым вводили соединения ДАБ-15 и ДАБ-26 по времени нахождения в открытом рукаве превосходили по результатам контрольную группу, но заметно уступали группе препарата сравнения. Так животные под действием исследуемых веществ в течение 47-50 сек. выходили из темного рукава, что в 2 раза быстрее контрольных животных и в 1,8 раз быстрее животных группы препарата сравнения. Опытные животные проводили в открытом рукаве 51-53 сек., что так же в 2 раза превышает показатели группы контроля. По количеству выходов в светлый рукав, свешиваниям и выглядываниям достоверных отличий не было.

Результаты, полученные при однократном внутрибрюшинном введении соединений под лабораторными шифрами ДАБ-4, ДАБ-5, ДАБ-24, соответствовали по показателю времени нахождения в открытом рукаве результатам группы животных, которым вводили физ. раствор (38,4 – 47,4 сек.). Но если под действием соединения ДАБ-4 латентное время выхода в открытый рукав не отличалось от контрольных значений, то соединения ДАБ-5 и ДАБ-24 сокращали данный показатель в 1,8 и 1,3 раза соответственно. По количеству выходов в светлый рукав, свешиваниям и выглядываниям достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось.

Неактивным соединением является вещество под лабораторным шифром ДАБ-25, под действием которого животные не находились в открытом рукаве

более 6 сек. При изучении дополнительных показателей выявлено, что данное соединение увеличивает латентный период выхода животных из темного рукава в светлый, сокращает количество таких выходов, что в свою очередь может указывать на наличие тревожности у животных. Количество выглядываний опытных животных из темного рукава не отличается от показателей животных контрольной группы, а количество свешиваний незначительно возрастает.

Таким образом, среди исследуемых производных диазепинобензимидазола при изучении поведения животных на установке приподнятый крестообразный лабиринт выявлены соединения, такие как ДАБ-7, ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-20 и ДАБ-23, которые проявляют анксиолитическую активность, увеличивая время нахождения в открытом рукаве, превосходя по активности препарат сравнения диазепам.

Таблица 4.1 - Влияние диазепама и производных диазепинобензимидазола (в дозах эквимолярных препарату сравнения) при однократном внутривенном введении на поведение мышей в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта, ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Время нахождения в откр. рукаве (сек)	Лат. время выхода в светлый рукав, сек	Количество выходов в светлый рукав	Количество свешиваний	Количество выглядываний
1	Контроль	-	25,2 ± 6,47	102,5 ± 12,93	1,3 ± 0,43	2,1 ± 0,50	2,0 ± 0,30
2	ДАБ-19	2,9	124,0 ± 12,06*	23,8 ± 10,29*	3,0 ± 0,89*	3,3 ± 0,86	1,4 ± 0,70
3	ДАБ-18	2,9	95,2 ± 23,32*	9,2 ± 2,70*	1,8 ± 0,65	2,8 ± 0,97	2,6 ± 0,87
4	ДАБ-23	2,6	89,2 ± 11,52*	47,0 ± 23,65*	3,7 ± 1,33*	9,4 ± 2,49*	3,3 ± 0,94
5	ДАБ-20	2,5	87,9 ± 24,30	57,0 ± 21,84	2,9 ± 1,12	8,6 ± 2,48*	2,1 ± 0,70
6	ДАБ-7	2,5	81,0 ± 11,68*	11,5 ± 2,18*	3,3 ± 0,86*	7,0 ± 2,76*	0,4 ± 0,25
7	ДАБ-17	3,1	77,0 ± 36,19	65,0 ± 31,78	0,9 ± 0,6	4,6 ± 1,99	3,8 ± 2,13
8	ДАБ-13	2,6	66,4 ± 16,01*	51,0 ± 20,49	4,5 ± 0,31*	8,1 ± 1,94*	3,5 ± 0,61*
9	ДАБ-30	2,2	65,0 ± 18,84*	29,0 ± 19,47*	1,8 ± 0,60	0,6 ± 0,40	3,0 ± 1,14
10	ДАБ-26	3,1	53,8 ± 19,47	47,0 ± 33,59	2,4 ± 0,91	1,8 ± 0,80	2,6 ± 1,12
11	ДАБ-15	2,3	51,8 ± 2,59	50,7 ± 6,39*	1,7 ± 0,24	0,5 ± 0,50	3,3 ± 0,95

Окончание таблицы 4.1

12	ДАБ-5	3,6	47,4 ± 21,01	55,3 ± 32,65	1,9 ± 0,68	3,8 ± 1,07	4,6 ± 1,12
13	ДАБ-24	2,5	45,0 ± 23,07	80,3 ± 36,52	1,6 ± 0,88	1,3 ± 0,75	3,3 ± 1,44
14	ДАБ-4	2,9	38,4 ± 15,49	103,5 ± 34,34	2,2 ± 0,86	2,0 ± 1,09	3,6 ± 0,68*
15	ДАБ-25	2,5	3,4 ± 2,93	146,2 ± 33,30	0,4 ± 0,24	2,8 ± 1,31	1,4 ± 0,51
16	Диазепам	2,0	74,5 ± 19,32*	90,3 ± 20,64	1,9 ± 0,99	5,2 ± 1,33*	1,5 ± 0,58

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

4.2 Зависимость анксиолитической активности производных диазепинобензимидазола от химической структуры

По результатам исследования поведения животных в установке приподнятый крестообразный лабиринт на наличие психотропной активности был проведен анализ, отображающий связь химических структур изучаемых соединений и проявления фармакологического эффекта.

Исследуемые соединения относятся к двум классам производных диазепино[1,2а]бензимидазола (табл. 4.2), а именно: 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды и 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды.

Таким образом, в группе производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола 33,3% соединений проявили активность выше препарата сравнения, активность 16,7% соединений соответствовала эффективности препарата сравнения, и 50% уступали по времени нахождения в открытом рукаве диазепаму, но все же превышали значения, полученные в группе интактных животных.

В результате исследования химической структуры изучаемых соединений группы 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов наиболее активными веществами оказались ДАБ-19, ДАБ-20 и ДАБ-23.

При введение перечисленных субстанций у животных снижалось проявление естественного страха у животных и большую часть времени они проводили в открытом рукаве, что является статистически значимо по отношению к группе контрольных животных.

Соединения ДАБ-13 и ДАБ-30 при однократном внутрибрюшинном введении не уступали препарату сравнения по времени нахождения животных в открытом рукаве крестообразного лабиринта. Животные, которым вводили субстанции ДАБ-15 и ДАБ-26, в открытом рукаве находились меньше время, чем животные, которым вводили диазепам, но превосходили результаты, полученные у интактных животных.

И только при введении соединения ДАБ-25 животные почти не выходили из темного рукава, и основной показатель времени нахождения в открытом рукаве был значительно ниже контрольных значений.

Таблица 4.2 – Анализ групп, исследуемых производных диазепинобензимидазола на психотропную активность

Группы исследуемых веществ Изучаемые показатели	11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино [1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды	11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино [1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды
Всего исследуемых веществ	8	6
Абсолютное кол-во веществ по активности превышающее диазепам	3	2
Относительное кол-во веществ по активности превышающее диазепам	37,5 %	33,3 %
Абсолютное кол-во веществ по активности соответствующее диазепаму	2	1
Относительное кол-во веществ по активности соответствующее диазепаму	25 %	16,7 %
Абсолютное кол-во веществ по активности уступающих диазепаму	2	3
Относительное кол-во веществ по активности уступающих диазепаму	25 %	50 %

Окончание таблицы 4.2		
Абсолютное кол-во веществ по активности уступающих контролю	1	0
Относительное кол-во веществ по активности уступающих контролю	12,5 %	-

Таким образом, в группе производных 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола 37,5% соединений проявили активность выше препарата сравнения, 25% соединений по эффективности соответствовали и 25% уступали диазепаму, и лишь 12,5% соединений не проявили изучаемого фармакологического эффекта, продемонстрировав результаты ниже контрольной группы (табл. 4.3, рисунок 4.1).

В результате исследования наиболее активным соединением было вещество, относящееся к группе производных 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола под лабораторным шифром ДАБ-19, так как при введении его животным, изменялось поведение испытуемых, и снижались признаки естественного страха – животные находились в открытом рукаве крестообразного лабиринта дольше ($124,0 \pm 12,06$ сек.), чем под действием препарата сравнения ($74,5 \pm 19,32$ сек.).

При анализе выявлено, что диазепинобензимидазольный скаффолд соединения ДАБ-19 связан короткой цепью (-CH₂-) с бензольным кольцом, у которого триметильный заместитель находится в пара-положении. Если основной каркас будет связан с таким же радикалом посредством метоксо группы, как у соединения ДАБ-26, время нахождения животных в открытом рукаве снижается более чем в 2 раза ($53,8 \pm 19,47$ сек.).

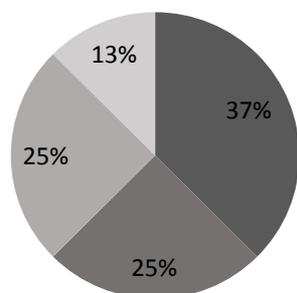
Но в то же время, если на месте триметильного заместителя окажется электроотрицательный атом хлора (ДАБ-13) активность соединения ($66,4 \pm 16,01$ сек.) будет соответствовать препарату сравнения. А при замещении атому хлора на более электроотрицательный атом фтора, на примере соединения ДАБ-25,

происходит резкое снижение активности и животные в открытом рукаве приподнятого крестообразного лабиринта находятся $3,4 \pm 2,93$ сек., что даже меньше результата контрольной группы ($25,2 \pm 6,47$ сек.).

Рисунок 4.1 – Анализ исследуемых производных диазепинобензимидазола на время нахождения в открытом рукаве (ВНОР) животных для: а). 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов; б). 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов

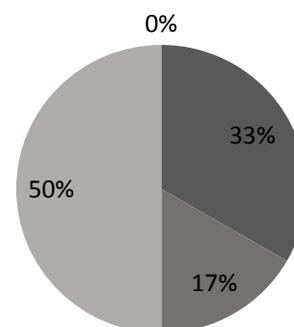
а).

■ ВНОР > диазепам ■ ВНОР ≈ диазепам
■ ВНОР < диазепам ■ ВНОР < контроль



б).

■ ВНОР > диазепам ■ ВНОР ≈ диазепам
■ ВНОР < диазепам ■ ВНОР < контроль



Возвращаясь к влиянию длины цепи соединяющей основной каркас и радикал, можно выделить соединение ДАБ-15, характеризующееся средней активностью. Так при введении субстанции животные проводили в открытом рукаве $51,8 \pm 2,59$ сек., что незначительно уступает препарату сравнения и более чем в 2 раза уступает соединению ДАБ-19, хотя отличаются данные производные только заместителями в бензольном кольце. Так наличие у соединения ДАБ-15 сильного электроотрицательного атома фтора приводит к снижению изучаемой активности.

Следующие рассматриваемые соединения – ДАБ-23 и ДАБ-20, при введении которых животные выходили из темного рукава приподнятого крестообразного лабиринта на $89,2 \pm 11,52$ и $87,9 \pm 24,30$ сек. соответственно, что превышало показатели группы препарата сравнения. В обоих соединениях диазепинобензимидазольный скаффолд соединен этильной цепью с атомом азота,

но в случае соединения ДАБ-23 этот атом входит в цикл морфолина, а в соединении ДАБ-20 раскрытая структура диэтиламина. Вероятно, морфолиновый фрагмент более реакционноспособный.

Соединение ДАБ-30 похоже по строению на соединение ДАБ-15, связь с фторбензольным радикалом обусловлена короткой цепью, однако, diazepinobenzimidazole каркас сопряжен с радикалом через атом азота в положении. Возможно, именно поэтому при введении субстанции животным в тесте приподнятого крестообразного лабиринта увеличивалось время нахождения в открытом рукаве ($65,0 \pm 18,84$ сек.), но полученные результаты незначительно уступали препарату сравнения диазепаму.

Среди изучаемых производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола наиболее активное соединение ДАБ-18, однократное внутрибрюшинное введение которого приводило к достоверному увеличению продолжительности пребывания животных в открытом рукаве ($95,2 \pm 23,32$ сек.). В структуре ДАБ-18 diazepinobenzimidazole скаффолд соединен с пирокатехолом альдегидной группой, что является показателем высокой реакционной способности.

При замещении гидроксо-групп в радикале на метоксо-группы, как в соединении ДАБ-17, снижается время нахождения животных в открытом рукаве на 20% относительно соединения ДАБ-18 до $77,0 \pm 36,19$ сек., что соответствует результатам, полученным в группе препарата сравнения.

Соединение ДАБ-7 имеет аналогичное строение, но через альдегидную группу diazepinobenzimidazole каркас молекулы соединен с триметильным радикалом, что незначительно снижает активность соединения по отношению к наиболее активному веществу в группе производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола. Так при введении субстанции ДАБ-7 время нахождения в открытом рукаве приподнятого крестообразного лабиринта составляет $81,0 \pm 11,68$ сек., что превышает результат препарата сравнения.

Животные, которым однократно вводили субстанцию ДАБ-5, в открытом рукаве приподнятого крестообразного лабиринта находились в течение $47,4 \pm 21,01$

сек., что в 1,5 раза меньше группы препарата сравнения диазепама и в 2 раза меньше группы соединения ДАБ-18. Вероятно, это обусловлено более устойчивой структурой бензольного радикала, в которой гидроксо-группа в пара-положении окружена триметильными заместителями в орто-положениях.

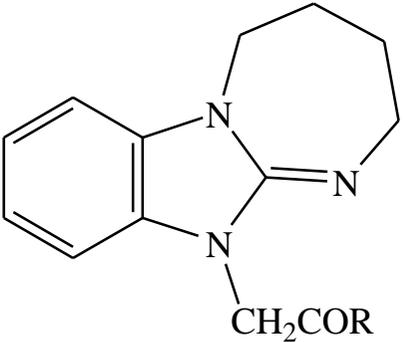
Удлинение цепи, связующей диазепинобензимидазольный скаффолд и бензольный радикал, гетероатомом азота в случае вещества ДАБ-24 также снижало активность, и время нахождения в открытом рукаве животных, которым вводили данную субстанцию, составляло $45,0 \pm 23,07$ сек., уступая препарату сравнения на 40%.

При замещении в пара-положении радикала гидроксильной группы на электроотрицательный атом хлора – соединение ДАБ-4 – и введение вещества животным, уменьшало время выхода их в открытый рукав до $38,4 \pm 15,49$ сек., приближаясь к результатам контрольной группы и в 2 раза уступало значениям, полученным в группе препарата сравнения диазепама.

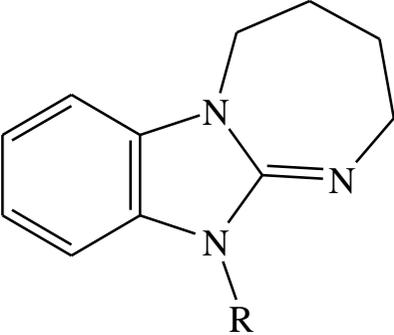
Таким образом, при анализе группы производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола можно сделать вывод о том, что наибольшей активностью обладают соединения с бензольным радикалом, у которых заместители гидроксо- и метоксо- группы находятся в 3 и 4 положении, а так же бензольный радикал замещен на триметильный. Внедрение в мета-положения триметильных заместителей и электроотрицательного атома в пара-положение бензольного кольца приводит к резкому снижению активности соединений, так же как и удлинение цепи, между диазепинобензимидазольным каркасом молекулы и радикалом.

В группе производных 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола наибольшую активность проявили соединения с короткой цепью, соединяющей диазепинобензимидазольный скаффолд и циклический радикал. Появление в структуре радикала электроотрицательных атомов галогенов - фтора и хлора приводило к снижению активности исследуемых соединений, так же как включение метоксо-группы в связующую цепь.

Таблица 4.3 - Влияние диазепама и производных диазепинобензимидазола (в дозах эквимольных препарату сравнения) при однократном внутривенном введении на поведение мышей в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта, ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Формула вещества	R	nX	Доза вещества, мг/кг	Время нахождения в откр. рукаве (сек)
	Контроль	-	-	-	-	25,2 ± 6,47
11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидробромиды						
						
1	ДАБ-18	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃ *HBr	C ₆ H ₃ (OH) _{2-3,4}	HBr	2,9	95,2 ± 23,32*
2	ДАБ-7	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O*HBr	C(CH ₃) ₃	HBr	2,5	81,0 ± 11,68*
3	ДАБ-17	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₃ *HBr	C ₆ H ₃ (OCH ₃) _{2-3,4}	HBr	3,1	77,0 ± 36,19
4	ДАБ-5	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₂ *HBr	C ₆ H ₂ OH-4-[C(CH ₃) ₃] _{2-3,5}	HBr	3,6	47,4 ± 21,01

Продолжение таблицы 4.3

5	ДАБ-24	$C_{19}H_{20}N_4O \cdot HCl$	NHC_6H_5	HCl	2,5	$45,0 \pm 23,07$
6	ДАБ-4	$C_{19}H_{18}ClN_3O \cdot HBr$	C_6H_4Cl-4	HBr	2,9	$38,4 \pm 15,49$
11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-a]бензимидазола гидрогалогениды						
						
1	ДАБ-19	$C_{22}H_{27}N_3 \cdot HBr$	$CH_2C_6H_4C(CH_3)_3$	HBr	2,9	$124,0 \pm 12,06^*$
2	ДАБ-23	$C_{17}H_{24}N_4O \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(CH_2CH_2)_2O$	2HCl	2,6	$89,2 \pm 11,52^*$
3	ДАБ-20	$C_{17}H_{26}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2NEt_2$	2HCl	2,5	$87,9 \pm 24,30$
4	ДАБ-13	$C_{19}H_{20}ClN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4Cl-4$	HBr	2,6	$66,4 \pm 16,01^*$
5	ДАБ-30	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl	2,2	$65,0 \pm 18,84^*$
6	ДАБ-26	$C_{23}H_{29}N_3O \cdot HBr$	$CH_2CH_2OC_6H_4C(CH_3)_3-4$	HBr	3,1	$53,8 \pm 19,47$
7	ДАБ-15	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl	2,3	$51,8 \pm 2,59$
8	ДАБ-25	$C_{19}H_{20}FN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4F-4$	HCl	2,5	$3,4 \pm 2,93$

Окончание таблицы 4.3

Препарат сравнения						
1	Диазепам	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	-		2,0	$74,5 \pm 19,32^*$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

4.3 Влияние производных диазепинобензимидазола на двигательную активность мышей в установке «актометр»

Большинство производных бензодиазепина, снижающих тревожные состояния, страх, обладают и побочными эффектами, такими как миорелаксирующий, седативный, что затрудняет применение препаратов в повседневной жизни [6]. Актуально было изучить влияние всех исследуемых соединений, проявивших различный анксиолитический уровень, на двигательную активность мышей, для этого использовали установку «актометр» (табл. 4.4).

Исследование проводили на 160 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 16 групп по 10 особей в каждой. Животным группы препарата сравнения однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозе 2 мг/кг, животным опытных групп вводили исследуемые вещества в эквимолярных препарату сравнения дозах. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

В ходе эксперимента среди 14 исследуемых производных диазепинобензимидазола было выявлено только 3 соединения, однократное введение которых, вызывало у животных изменение локомоторной активности. Так вещества ДАБ-18 и ДАБ-24 при внутрибрюшинном введении достоверно снижали количество переходов животных в актометре на 88% ($47,8 \pm 7,98$) и 57% ($162,0 \pm 39,45$) соответственно, относительно результатов контрольной группы животных ($378,0 \pm 35,64$), достоверных отличий от результатов группы препарата сравнения не наблюдалось. При введении соединения ДАБ-26, наоборот, увеличивалось количество переходов животных в установке на 78% ($674,2 \pm 32,93$) относительно результатов контрольной группы, что свидетельствует о росте активности подопытных животных.

Показатель числа переходов в установке «актометр» остальных исследуемых соединений находился в диапазоне значений от 224 до 495, что статистически незначимо не отличается от количества переходов контрольных

животных, но превышает значения, полученные в группе животных, которым вводили диазепам ($85,9 \pm 28,32$) в 2,6-5,8 раз.

Таблица 4.4 - Влияние диазепама и производных диазепинобензимидазола (в дозах эквимолярных препарату сравнения) при однократном внутрибрюшинном введении на двигательную активность в установке «актометр», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Количество переходов
1	Контроль		$378,0 \pm 35,64$
2	ДАБ-4	2,0	$495,6 \pm 42,92$
3	ДАБ-5	3,6	$465,8 \pm 42,65$
4	ДАБ-7	2,5	$400,4 \pm 71,36$
5	ДАБ-13	2,6	$333,6 \pm 25,21$
6	ДАБ-15	2,3	$333,0 \pm 4,51$
7	ДАБ-17	3,1	$323,0 \pm 78,91$
8	ДАБ-18	2,9	$47,8 \pm 7,98^*$
9	ДАБ-19	2,9	$382,6 \pm 50,91$
10	ДАБ-20	2,5	$248,5 \pm 96,04$
11	ДАБ-23	2,6	$267,0 \pm 121,00$
12	ДАБ-24	2,5	$162,0 \pm 39,45^*$
13	ДАБ-25	2,5	$388,8 \pm 40,62$
14	ДАБ-26	3,1	$674,2 \pm 32,93^*$
15	ДАБ-30	2,2	$224,4 \pm 66,71$
16	Диазепам	2,0	$85,9 \pm 28,32^*$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

Таким образом, полученные результаты можно интерпритировать как отсутствие у большинства исследуемых веществ миорелаксирующего эффекта.

4.4 Влияние производных диазепинобензимидазола на продолжительность гексеналового сна.

По изменению продолжительности гексеналового сна под действием исследуемых соединений оценивали гипногенный эффект.

Исследование проводили на 80 половозрелых мышах-самцах массой 19-30 г, которые были разделены случайным образом на 8 групп по 10 особей в каждой. Животным первой группы однократно внутрибрюшинно вводили препарат сравнения диазепам в дозе 2 мг/кг, обладающий гипногенным эффектом. Животным пяти опытных групп вводили исследуемые производные диазепинобензимидазола в эквимолярных диазепаму дозах. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Исследуемые вещества вводили однократно за 30 мин. до введения гексенала. Гексенал вводили в виде свежеприготовленного водного раствора однократно внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг. Дозы в пересчете на миллилитры раствора рассчитывали индивидуально для каждого животного исходя из массы тела. Критерий эффективности – длительность сна, которую определяли, как разницу между временем засыпания и временем пробуждения. Препарат считали необладающим гипногенной активностью в случае, если он обеспечивал снижение длительности сна по сравнению с контрольной группой животных; а наличие гипногенного эффекта оценивали по увеличению продолжительности сна (табл. 4.5).

В результате проведенной работы выявлено, что при введении гексенала контрольным животным, сон наступал в течение $3,7 \pm 0,33$ мин. и продолжался $37,9 \pm 8,60$ мин., а предварительное введение препарата сравнения диазепама усиливало эффект гексенала, сокращая период засыпания до $1,8 \pm 0,22$ мин., а также продлевая сон до $70,0 \pm 3,83$ минут. Введение животным опытной группы соединения ДАБ-18 почти не влияло на эффект гексенала, так как латентное время засыпания и продолжительность гексеналового сна статистически незначимо отличались от показателей контрольной группы животных. Так при

однократном внутривенном введении соединения ДАБ-18 длительность сна у животных увеличивалась на 15% ($43,9 \pm 7,62$ мин.), а время наступления сна уменьшалось на 17% ($3,1 \pm 0,26$ мин.), но данные показатели значительно отличались от показателей препарата сравнения, который продлевает гексеналовый сон на 85% и в 2 раза ускоряет процесс засыпания.

Таблица 4.5 Влияние диазепама и соединений ДАБ-8, ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-20, ДАБ-21, ДАБ-23, ДАБ-31 на продолжительность гексеналового сна

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Гексеналовый сон	
			Продолжительность сна (мин)	Лат. время засыпания (мин)
1	Контроль	-	$37,9 \pm 8,60$	$3,7 \pm 0,33$
2	ДАБ-8	2,8	$54,3 \pm 4,49$	$2,6 \pm 0,25$
3	ДАБ-18	2,9	$43,9 \pm 7,62$	$3,1 \pm 0,26$
4	ДАБ-19	2,9	$54,7 \pm 3,34$	$2,5 \pm 0,22$
5	ДАБ-20	2,5	$93,0 \pm 9,86^*$	$3,0 \pm 0,45$
6	ДАБ-23	2,6	$64,8 \pm 14,99$	$2,8 \pm 0,41$
7	ДАБ-31	3,3	$59,5 \pm 16,29$	$3,7 \pm 0,42$
8	Диазепам	2,0	$70,0 \pm 3,83^*$	$1,8 \pm 0,22^*$

Примечание: *-данные достоверны по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

В группах соединений ДАБ-8, ДАБ-19 и ДАБ-31 продолжительность сна увеличивалась по сравнению результатами контрольной группы животных в 1,4, 1,5 и 1,6 раз соответственно, но латентное время засыпания в группе животных, которым вводили соединение ДАБ-8, снижалось на 30% ($2,6 \pm 0,25$ мин.), так же как у животных, которым вводили субстанцию ДАБ-19 ($2,5 \pm 0,22$ мин.), а в группе животных, которым вводили соединение ДАБ-31, не отличалось ($3,7 \pm 0,42$ мин.) от контрольных значений.

При введении животным соединения ДАБ-23 проявлялось усиление эффекта гексенала, так как латентное время засыпания снижалось в 1,3 раза по сравнению с группой контроля, а продолжительность сна приближалась к результатам группы препарата сравнения. Соединение ДАБ-20 при однократном внутрибрюшинном введении не влияло на процесс засыпания животных после введения гексенала, так латентное время незначительно уменьшалось (на 19%) относительно группы контроля, а продолжительность сна увеличивалась в 2,5 раза ($93,0 \pm 9,86$ мин.) по сравнению с контрольной группы, даже превосходя результаты препарата сравнения в 1,3 раза.

Таким образом, среди изученных производных диазепинобензимидазола выявлены соединения ДАБ-8, ДАБ-18, ДАБ-19 и ДАБ-31 не обладающие выраженным гипногенным эффектом, так как именно эти соединения не продлевают гексеналовый сон, в отличие от соединения ДАБ-20, которое по эффективности превосходит препарат сравнения диазепам.

4.5 Влияние производных диазепинобензимидазола на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.

Исследование проводили на 90 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 9 групп по 10 особей в каждой. Животным двух групп препаратов сравнения трехкратно внутрибрюшинно вводили препараты сравнения amitriptyline (10 мг/кг) и imipramine (15 мг/кг). Третьей группе животных вводили diazepam в дозе 2 мг/кг, а опытным группам вводили исследуемые производные diazepinobenzimidazole в эквимолярных diazepam дозах. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

Принудительное плавание в контрольной группе грызунов вызывало реакцию иммобилизации (табл. 4.6), продолжительность которой составляла $94,2 \pm 10,45$ секунд, что было в 2,2 раза меньше, чем время, затраченное на попытки активного сопротивления ($205,8 \pm 10,45$ секунд).

Трехкратное введение соединений с антидепрессантной активностью – амитриптилина и имипрамина – достоверно сокращало время иммобильности животных (до $43,7 \pm 9,03$ сек. и $32,3 \pm 3,40$ сек. соответственно), увеличивая активное сопротивление.

Введение же диазепама, соединений ДАБ-19 и ДАБ-23 не влияло на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt и значения, полученные в ходе эксперимента, статистически не отличались от группы контрольных животных – $123,5 \pm 16,85$ сек., $98,0 \pm 10,42$ сек. и $110,0 \pm 7,02$ сек., соответственно.

Таблица 4.6. Влияние диазепама и соединений ДАБ-8, ДАБ-19, ДАБ-21, ДАБ-23, ДАБ-31 на поведение отчаяния в тесте Porsolt

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Время иммобильности, сек
1	Контроль	-	$94,2 \pm 10,45$
2	ДАБ-8	2,8	$46,5 \pm 19,72$
3	ДАБ-19	2,9	$98,0 \pm 10,42$
4	ДАБ-21	2,5	$55,8 \pm 5,46$
5	ДАБ-23	2,6	$110,0 \pm 7,02$
6	ДАБ-31	3,3	$57,7 \pm 6,98$
7	Амитриптилин	10,0	$43,7 \pm 9,03^*$
8	Имипрамин	15,0	$32,3 \pm 3,40^*$
9	Диазепам	2,0	$123,5 \pm 16,85$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

При введении животным соединения ДАБ-8 время иммобильности сокращалось в 2 раза ($46,5 \pm 19,72$ сек.) относительно контрольной группы, но все равно уступало препаратам с известной антидепрессантной активностью. Введение соединений ДАБ-21 и ДАБ-31 так же уменьшало продолжительность

пассивного плавания до $55,8 \pm 5,46$ и $57,7 \pm 6,98$ сек. соответственно, но отличия статистически недостоверны, хоть и отличаются от группы контрольных животных в 1,6 раз.

Таким образом, среди исследуемых производных диазепинобензимидазола обнаружены соединения – ДАБ-8, ДАБ-21 и ДАБ-31 - снижающие состояние отчаяния в тесте принудительного плавания по Porsolt относительно контрольной группы животных, но не превосходящие по эффективности препараты сравнения. Также есть и соединения ДАБ-19 и ДАБ-23, которые не влияют на время иммобильности животных.

4.6 Влияние производных диазепинобензимидазола на возникновение судорог, вызванных коразолом

Исследование проводили на 90 половозрелых мышах самцах массой 19-30 г, которые были разделены случайным образом на 9 групп по 10 особей в каждой. Животным первой группы однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозе 2 мг/кг, обладающий противосудорожным эффектом. В качестве препарата сравнения также использовали противосудорожное средство – вальпроат натрия (90 мг/кг) - применяемое в клинике. Животным третьей группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярной диазепаму дозе 2,9 мг/кг. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Исследуемые вещества вводили однократно за 30 мин. до введения коразола. Коразол вводили в виде свежеприготовленного водного раствора однократно внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг. Дозы в пересчете на миллилитры раствора рассчитывали индивидуально для каждого животного исходя из массы тела.

У всех животных контрольной группы фиксировали латентное время возникновения судорог (табл. 4.7), в результате оно составило $184,0 \pm 30,96$ сек. Внутрибрюшинное введение диазепама достоверно увеличивало латентный период возникновения судорожных приступов на 126% (до $417,5 \pm 29,3$ сек.), а

препарат сравнения вальпроат натрия статистически значимо увеличивал данный показатель на 360% ($847 \pm 81,4$ сек.), относительно контрольной группы.

Таблица 4.7 - Влияние диазепама, вальпроата натрия и производных диазепинобензимидазола при однократном внутривенном введении на латентное время возникновения судорог и летальность в тесте с коразолом (80 мг/кг), ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время возникновения судорог, сек	Летальность, %
1	Контроль	-	$184,0 \pm 30,96$	47,06
2	ДАБ-8	2,8	$205,5 \pm 12,02^{***}$	0
3	ДАБ-19	2,9	$140,2 \pm 7,85^{***}$	16,7
4	ДАБ-20	2,5	$93,0 \pm 9,86^{***}$	50
5	ДАБ-21	2,5	$83,0 \pm 6,26^{***}$	50
6	ДАБ-23	2,6	$177,3 \pm 38,51^{***}$	33,3
7	ДАБ-31	3,3	$142,8 \pm 54,13^{***}$	50
8	Диазепам	2,0	$417,5 \pm 29,3^{***}$	10
9	Вальпроат натрия	90,0	$847 \pm 81,4^{*#}$	40

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению *- к группе контроля # - к группе препарата сравнения-диазепама, ** - к группе вальпроата натрия ($p \leq 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

В группе животных, которым вводили соединение ДАБ-8, латентный период развития коразоловых судорог увеличивался ($205,5 \pm 12,02$ сек.), но статистически незначимо относительно контрольных значений. Введение животным соединений ДАБ-20 и ДАБ-21, наоборот, снижало время до возникновения первых судорожных приступов в 1,9 и 2,2 раза соответственно, относительно группы контроля. А однократное введение соединений ДАБ-19, ДАБ-23 и ДАБ-31 не влияло на латентное время возникновения судорог, и значения, полученные в этих группах, не отличались от контрольных.

Вторым исследуемым показателем, учитываемым в эксперименте, была летальность животных. Так среди животных, которым вводили вальпроат натрия уровень летальности составлял 40%, что не сильно отличалось от результатов контрольной группы, получавшей физ. раствор, в которой гибель животных составляла 47%, а введение диазепама снижало летальность до 10%.

Среди исследуемых соединений только соединение ДАБ-8 при внутрибрюшинном введении проявило 100% выживаемость на модели коразоловых судорог, что превосходит препараты сравнения диазепам и вальпроат натрия по эффективности.

Соединение ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении вызывало гибель только 16,7% животных, что превосходит по эффективности препарат сравнения диазепам.

При введении соединения ДАБ-23 процент гибели животных составил 33%, что уступает диазепаму по выживаемости, но превосходит препарат сравнения вальпроат натрия.

Среди остальных опытных групп, которым вводили соединения ДАБ-20, ДАБ-21 и ДАБ-31 выживаемость животных составляла 50%, то есть почти не отличается от контрольной группы, и значительно уступает препаратам сравнения диазепаму и вальпроату натрия.

Таким образом, среди производных диазепинобензимидазола обнаружено вещество ДАБ-8, которое продлевает латентный период развития судорог, уступая по эффективности препаратам сравнения, а также снижает летальность животных в тесте с коразолом до 0%, превосходя выживаемость животных как в группе диазепама, так и в группе вальпроата натрия. А также выявлено снижение летальности у соединения ДАБ-19, превосходящее по эффективности препарат сравнения диазепам.

4.7 Изучение анальгетической активности производных диазепинобензимидазола на установке «Горячая пластина»

Исследование проводили на 80 половозрелых мышах самцах массой 19-30 г, которые были разделены случайным образом на 8 групп по 10 особей в каждой. Одной группе животных однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозе 2 мг/кг. Группа препарата сравнения получала буторфанол (1 мг/кг), а животные контрольной группы физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Остальным опытным группам животных вводили исследуемые производные диазепинобензимидазола в эквимолярных диазепаму дозах. (табл. 4.8)

Таблица 4.8 - Влияние диазепама, буторфанола и производных диазепинобензимидазола при однократном внутрибрюшинном введении на анальгетическую активность в установке «Горячая пластина», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время облизывания задней лапки на установке «Горячая пластина», сек
1	Контроль	-	13,0 ± 0,99
2	ДАБ-8	2,8	15,25 ± 1,44
3	ДАБ-19	2,9	12,8 ± 1,02
4	ДАБ-21	2,5	19,5±0,81*
5	ДАБ-23	2,6	14,0±1,23
6	ДАБ-31	3,3	19,7±1,36*
7	Диазепам	2,0	15,0 ± 3,69
8	Буторфанол	1,0	19,7 ± 1,20*

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению

*- к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна).

При помещении мыши на горячую поверхность и достижении порога болевой чувствительности латентный период ноцицептивной реакции в виде облизывания задней лапы в контрольной группе животных составил $13,0 \pm 0,99$ секунд.

Субстанции соединений ДАБ-8, ДАБ-19 и ДАБ-23 при внутрибрюшинном введении не влияли на латентный период болевой реакции, так же, как и введение диазепама, полученные результаты не отличались от контрольной группы – $15,25 \pm 1,44$ сек., $12,8 \pm 1,02$ сек., $14,0 \pm 1,23$ сек. и $15,0 \pm 3,69$ сек., соответственно.

А введение соединений ДАБ-21 и ДАБ-31 приводило к достоверному увеличению болевого порога и удлинению латентного времени ответа на термический раздражитель (облизывание задней лапы) до $19,5 \pm 0,81$ и $19,7 \pm 1,36$ сек. соответственно, чем не уступали препарату сравнения буторфанолу ($19,7 \pm 1,20$ сек.)

Таким образом, в ряду производных диазепинобензимидазола обнаружены соединения ДАБ-21 и ДАБ-31, увеличивающие латентное время облизывания задней лапы на установке «горячая пластина», не уступающие по активности препарату сравнения буторфанолу.

4.8 Поиск и изучение ДПП-4 ингибиторных свойств производных диазепино[1,2a]бензимидазола

Одной из перспективных возможностей целенаправленного регулирования проявления тревоги является воздействие на систему нейропептидов. Имеются данные о существенной роли пептидергических механизмов в патогенезе тревоги [118]. Многие исследования подтверждают возможность использования в качестве анксиолитиков препаратов, модулирующих активности ферментативных систем, субстратами которых являются нейропептиды, в частности, пролинспецифических пептидаз дипептидилпептидазы-IV (ДПП-4) и пролилэндопептидазы (ПЭП), которые расщепляют множество биологически активных пептидов, в том числе участвующих в механизмах тревоги и депрессии

[41]. Клинические исследования и экспериментальные данные подтверждают вовлеченность указанных ферментов, модулирующих уровень регуляторных нейропептидов, в патофизиологические механизмы этих нарушений. Выявлена взаимосвязь изменения активности ДПП-4 в сыворотке и плазме крови с выраженностью симптомов тревожности и депрессии у больных психиатрического и непсихиатрического профиля [128]. В настоящее время в терапии тревожных расстройств активно применяются препараты бензодиазепинового ряда, но получены данные о новых перспективных препаратах, относящихся к производным бензимидазола.[182, 16, 8, 37].

Активно исследуется новый класс пероральных антидиабетических препаратов - ингибиторы дипептидилпептидазы 4-го типа (ДПП-4). Как известно частью внутренней физиологической системы регуляции гомеостаза глюкозы являются инкретины - глюкагоноподобный пептид-1 и глюкозозависимый инсулилотропный пептид, которые секретируются в кишечнике в течение суток, их уровень повышается в ответ на прием пищи. При нормальном или повышенном уровне глюкозы крови гормоны семейства инкретинов способствуют увеличению синтеза инсулина, а также его секреции β -клетками поджелудочной железы. ГПП-1 быстро расщепляется с помощью фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). Поэтому, чтобы решить эту проблему, необходимо либо управлять ГПП-1 в непрерывном режиме или ингибировать фермент ДПП-4.

Ингибиторы дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП-4) являются перспективным, активно развивающимся классом антидиабетических препаратов, применяемым в комплексной рациональной фармакотерапии сахарного диабета типа 2. В настоящее время в клинической практике применяются следующие препараты данной группы: ситаглиптин (янувия), вилдаглиптин (гальвус), саксаглиптин (онглиза), находятся на последних этапах клинических испытаний алоглиптин и линаглиптин [128].

Следует отметить, что в литературе описано большое количество ингибиторов ДПП-4 относящихся к различным химическим классам. Wallace M.

В. и соав. изучили серию нековалентных ингибиторов на основе N-метилбензимидазола, среди которых найдено соединение с высоким уровнем ингибирующей активности ($IC_{50}=8$ нМ) [41, 153].

Таким образом, было актуально изучить ряд производных диазепино[1,2a]бензимидазола на наличие ДПП-4 ингибирующей активности.

4.8.1 Изучение ДПП-4 ингибирующей активности производных диазепинобензимидазола in vitro

Плазма крови человека и животных имеет способность отщеплять N-терминальный X-Pro фрагмент (X – любая аминокислота) и может использоваться в качестве источника протеинов, обладающих ДПП-4-подобной ферментной активностью. Для оценки ингибиторной активности смешивали 10 мкл. раствора исследуемого соединения в концентрации 10мМ с 50 мкл. 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 8,4) и 40 мкл плазмы человека. Анализируемую смесь преинкубировали при 37°C в течение 5 мин. После преинкубации добавляли 100 мкл. 1 мМ субстрата реакции – Гли-Про-р-нитроанилида (Sigma, США) и полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин.

Развития желтого окрашивания из-за высвобождения 4-нитроанилина определяли при 405 нм используя прибор для считывания планшетов (Infinite M200, Tecan, Австрия) [34].

В качестве препаратов сравнения были выбраны ситаглиптин (Merck Sharp & Dohme, Нидерланды) и вилдаглиптин (Novartis Pharma, Швейцария). Соединения и препараты сравнения исследовали в конечной концентрации 1000 нМ.

Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле: (контроль – тест/контроль) *100%. Значения ингибирующей концентрации (IC_{50}) подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK).

В результате исследования все производные диазепинобензимидазола проявили различный уровень дипептидилпептидаза-4 ингибирующей активности.

В зависимости от полученных результатов исследуемые вещества можно условно разделить на 4 группы: высоко активные, активные, умеренно активные и неактивные (табл. 4.9). Так к высоко активным веществам можно отнести соединения под лабораторными шифрами ДАБ-13, ДАБ-24 и ДАБ-15, ДПП-4 ингибирующая активность составляла 82,1%, 75,8% и 71,8% соответственно, у которых величина ингибирования является наиболее близкой по значению к препарату сравнения ситаглиптину (94,3%) и вилдаглиптину (88,55%).

К активным соединениям были отнесены исследуемые вещества, величина ингибирования фермента ДПП-4 которых находилась в диапазоне 40-69%, то есть ДАБ-4, ДАБ-23, ДАБ-21, ДАБ-22, ДАБ-7 и ДАБ-12. Они уступали по эффективности препаратам сравнения в 1,5-2 раза.

Соединения под лабораторными шифрами ДАБ-25, ДАБ-27, ДАБ-8, ДАБ-20, ДАБ-14, ДАБ-5 и ДАБ-28 были отнесены к умеренно активным веществам, так как ингибировали дипептидилпептидазу типа 4 на 20-39%, то есть в 2,2-4,5 раза.

Низко активными веществами являются соединения ДАБ-19, ДАБ-29 и ДАБ-30, так как их величина ингибирования ДПП-4 не превышала 20%.

Таблица 4.9 - Влияние производных диазепинобензимидазола на активность дипептидилпептидазы-4 (исследование *in vitro* спектрофотометрическим методом), ($M \pm m$)

№	Концентрация Соединения	Величина ингибирования, %
		$10^{-4}M$
1	ДАБ-13	$-82,1 \pm 3,32$
2	ДАБ-24	$-75,8 \pm 7,98$
3	ДАБ-15	$-71,8 \pm 17,15$
4	ДАБ-4	$-59,2 \pm 10,26^*$
5	ДАБ-23	$-58,5 \pm 8,53^*$
6	ДАБ-21	$-54,3 \pm 9,82^*$
7	ДАБ-22	$-53,2 \pm 8,56^*$
8	ДАБ-7	$-45,4 \pm 29,24^*$
9	ДАБ-12	$-41,7 \pm 17,82^*$
10	ДАБ-25	$-39,4 \pm 8,14^*$
11	ДАБ-27	$-36,5 \pm 7,51^*$
12	ДАБ-8	$-30,4 \pm 15,98^*$
13	ДАБ-20	$-29,6 \pm 6,26^*$
14	ДАБ-14	$-25,9 \pm 17,89^*$
15	ДАБ-5	$-20,5 \pm 20,25^*$
16	ДАБ-28	$-20,4 \pm 7,67^*$
17	ДАБ-29	$-19,9 \pm 20,31^*$
18	ДАБ-19	$-13,3 \pm 3,67^*$
19	ДАБ-30	$-10,2 \pm 5,45^*$
20	Ситаглиптин	$-94,3 \pm 0,76$
21	Вилдаглиптин	$-88,5 \pm 3,98$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе препарата сравнения ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна).

4.8.2 Определение показателя IC50 для наиболее активных производных диазепинобензимидазола

Для соединений с наибольшим уровнем блокирования фермента дипептидилпептидазы типа 4 ДАБ-4, ДАБ-13, ДАБ-15 и ДАБ-24 были определены концентрации ингибирования (табл. 4.10).

Таблица 4.10 - Влияние производных диазепинобензимидазола на активность дипептидилпептидазы-4 в зависимости от концентрации, величина ИК50 (*in vitro* спектрофотометрическим методом), (M±m)

№	Вещества	ДПП-4 ингибирующая активность, ВИ, %			ИК50, М
		10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	
1	ДАБ-4	59,2±10,26	32,7±12,04	25,5±11,03	43,65*10 ⁻⁴
2	ДАБ-13	82,1±3,32	62,6±2,86	46,3±2,85	1,74*10 ⁻⁴
3	ДАБ-15	71,8±17,15	56,4±23,89	43,6±18,96	4,07*10 ⁻⁴
4	ДАБ-24	75,8±7,98	49,5±9,92	39,0±14,09	5,62*10 ⁻⁴
5	Ситаглиптин				1,84*10 ⁻⁸
6	Вилдаглиптин				5,81*10 ⁻⁸

В данной тест системе (спектрофотометрическим методом) были протестированы известные ингибиторы ДПП-4, вилдаглиптин и ситаглиптин. Выявлена нелинейная зависимость доза – эффект, а показатель ИК50 для вилдаглиптина составил 58,16 нМ (34,23 – 98,83 нМ, 95% С.І), а для ситаглиптина был несколько выше и равен 18,35 нМ (10,95 – 98,83 нМ, 95% С.І) [34].

4.8.3 Зависимость ДПП-4 ингибирующей активности производных диазепинобензимидазола от химической структуры

По результатам исследования *in vitro* спектрофотометрическим методом дипептидилпептидаза-4 ингибирующей активности был проведен анализ,

отображающий связь химических структур изучаемых соединений и проявления фармакологического эффекта (табл. 4.11).

Таблица 4.11 – Анализ групп, исследуемых производных диазепинобензимидазола на дипептидилпептидаза-4 ингибирующую активность

Группы исследуемых веществ Исследуемые показатели	11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды	11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды
Всего исследуемых веществ	13	6
Абсолютное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью выше 60%	2	1
Относительное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью выше 60%	16,7 %	16,7 %
Абсолютное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью 50%-60%	3	1
Относительное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью выше 50%-60%	25 %	16,7%
Абсолютное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью 10%-49%	7	4
Относительное кол-во веществ с ДПП-4 ингибирующей активностью выше 10%-49%	58,3 %	66 %

Исследуемые соединения относятся к двум классам производных диазепинобензимидазола, а именно: 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды и 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды. Все вещества проявили различный уровень активности, но следует отметить, что 2 соединения – ДАБ-13 и ДАБ-15 ингибировали фермент ДПП-4 *in vitro* более чем на 71%, и

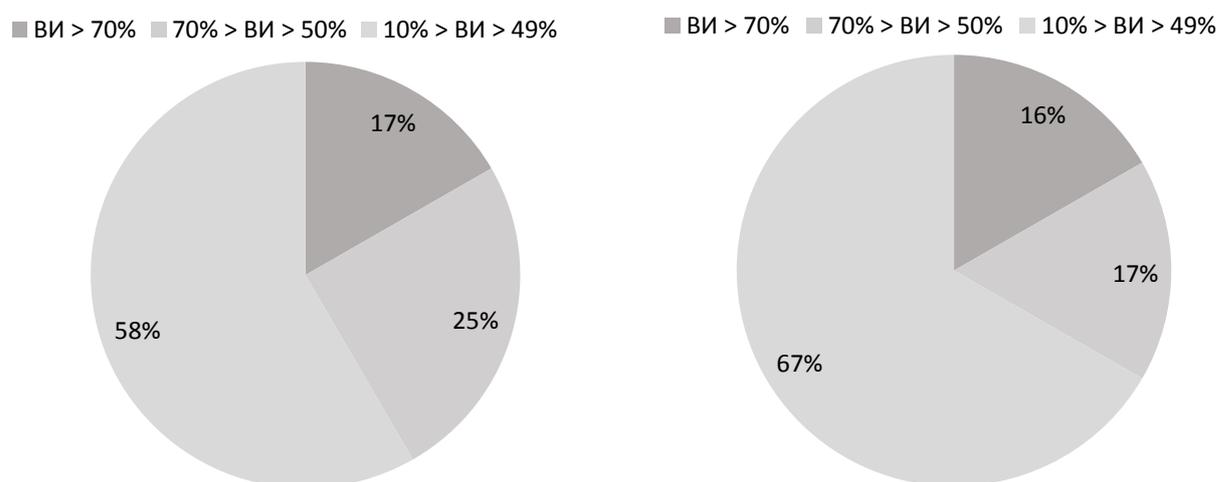
являлись производными 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола. Так же к этой группе относились вещества ДАБ-21, ДАБ-22 и ДАБ-23, ДПП-4 ингибирующая активность которых превышала 53%. Среди производных 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола соединение ДАБ-24 ингибировало фермент ДПП-4 на 75%, а соединение ДАБ-4 –на 59%.

Таким образом, в классе 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов 41,7% исследуемых соединений, проявили активность выше 50%, а среди производных 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов только 33% веществ ингибировали фермент ДПП-4 более чем на 50 % (рисунок 4.2).

Рисунок 4.2 – Анализ исследуемых производных диазепинобензимидазола на величину ингибирования (ВИ) дипептидилпептидазы-4 для: а). 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов; б). 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов

а).

б).



В результате исследования химической структуры изучаемых соединений (табл. 4.12) группы 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов выявлено соединение с наибольшей ДПП-4 ингибирующей

активностью под лабораторным шифром ДАБ-13. У данного вещества метоксо-группа находится в 11 положении и соединяет diazepinobenzimidazole-ный фрагмент с хлорбензолом в пара-положении. Но аналогичная структура обнаружена у соединения ДАБ-25, только в пара-положении бензола атом хлора замещен на атом фтора, что приводит к резкому уменьшению способности ингибировать дипептидилпептидазу типа 4 в 2 раза. Замещение атома хлора и фтора на метоксо-группу также приводило к снижению ДПП-4 ингибирующей активности еще в 1,5 раза, что выявлено при изучении соединения ДАБ-14, у которого величина ингибирования не превышала 25,9%. Можно сделать вывод, что наличие сильных электроотрицательных атомов, таких как фтор и кислород, в пара-положении бензольного радикала приводит к стабилизации структуры, снижая активность в отношении фермента ДПП-4.

Соединение ДАБ-15 в результате исследования ингибировало дипептидилпептидазу типа 4 на 71,8%. В его химической структуре diazepinobenzimidazole-ный scaf-fold соединен с фторбензолом короткой цепью (-CH₂-), так же, как и у соединения ДАБ-27, но в пара-положении которого заместителем является трифторметил. Величина ингибирования при замещении фторбензола на трифтортолуольный радикал снижается в 2 раза и находится в диапазоне 36,5±7,51%.

Введение в основной diazepinobenzimidazole-ный scaf-fold ДАБ-15 двух метильных заместителей в 8 и 9 положение приводит к снижению ДПП-4 ингибирующей активности в 3 раза, что выявлено при исследовании соединения ДАБ-28 (ВИ = 20,4±7,67%).

Соединение ДАБ-29 рассматривалось с точки зрения аналогии структуры с соединениями ДАБ-15, ДАБ-27 и ДАБ-28: связь с diazepinobenzimidazole-ным каркасом с радикалом опосредована через короткий метильный фрагмент, как у описанных веществ, в пара-положении толуольного радикала находился трифторметильный заместитель, так же как у соединения ДАБ-27, а в 8 и 9 положении diazepinobenzimidazole-ного scaf-fold метильные заместители, как у соединения ДАБ-28. Результатом такой модификации стало снижение ДПП-4

ингибирующей активности до 19,9%. А при замещении атомом фтора на метильные структуры, активность достигала только 13% (ДАБ-19). Таким образом, встраивание трифторметильного и триметильного заместителей в структуру радикала, и диметильных заместителей в основной каркас молекулы приводит к снижению исследуемой активности *in vitro*, что объясняется перераспределением электрической плотности и стабилизацией структуры.

Соединения ДАБ-20, ДАБ-21, ДАБ-22 и ДАБ-23 имели схожие структуры, с короткой этильной цепью, связывающей diazepinobenzimidazole каркас с радикалами. Наиболее активным соединением рассматриваемой группы оказался ДАБ-23 (ВИ = $58,5 \pm 8,53\%$), у которого радикалом являлся морфолин. При замещении радикала на пирролидиновый, как у соединения ДАБ-21, происходит незначительное снижение ДПП-4 ингибиторной активности до $54,3 \pm 9,82\%$. При встраивании пиперидина в структуру diazepinobenzimidazole, активность ингибирования фермента ДПП-4 так же снижается, что видно по результатам, полученным при исследовании субстанции ДАБ-22. Наименее активным соединением с аналогичным строением оказался ДАБ-20, который по ДПП-4 ингибирующей активности уступал веществам данной группы в 2 раза. Вероятно, такое снижение эффективности объясняется стабильной химической структурой, опосредованной диэтиламиновым радикалом.

Среди изучаемых 11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогенидов наибольшей ДПП-4 ингибирующей активностью обладали соединения ДАБ-24 (ВИ = $75,8 \pm 7,98\%$) и ДАБ-4 (ВИ = $59,2 \pm 10,26\%$). Diazepinobenzimidazole скаффолд у наиболее активного вещества ДАБ-24 соединен через атом азота с бензольным кольцом, а в случае вещества ДАБ-4 он связан с хлорбензольным радикалом посредством ацильной цепи, что значительно снижает ДПП-4 ингибиторную активность. Но при анализе соединения ДАБ-8, у которого атом хлора в пара-положении, аналогичном структуре ДАБ-4, замещен атомом фтора, что приводит к снижению активности ингибирования дипептидилпептидазы типа 4 в 2 раза. Таким образом, отсутствие в цепи, соединяющей основной каркас молекулы и радикал, атома азота, а также

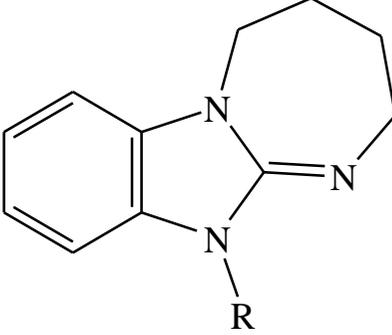
внедрение в структуру бензольного радикала более электроотрицательного атома снижает эффективность соединения по отношению к ферменту ДПП-4.

У соединения ДАБ-7 радикалом является триметил, также соединенный с диазепинобензимидазольным фрагментом посредством ацильной цепи, но ДПП-4 ингибирующая активность снижалась до $45,4 \pm 29,24\%$.

Наличие в структуре исследуемой группы толуольного радикала, связанного с основным диазепинобензимидазольным скаффолдом, на примере соединения ДАБ-12, приводило к ингибированию дипептидилпептидазы *in vitro* на 41,7%. А замещение метильной группы у фенильного радикала на гидроксогруппу в пара-положении и добавление двух триметильных заместителей в орто-положения, как у соединения ДАБ-5, понижало ДПП-4 ингибиторную активность в 2 раза.

Таким образом, на основании проведенного структурного анализа, выявлена следующая закономерность: при наличии бензольного кольца в радикале количество заместителей не должно быть больше двух; у соединений с метоксо- и ацилметильной группой заместителем должен быть атом с электроотрицательностью не больше атома Cl; встраивание в структуру диазепинобензимидазольного каркаса в 8 и 9 положении метильных заместителей приведет к снижению активности.

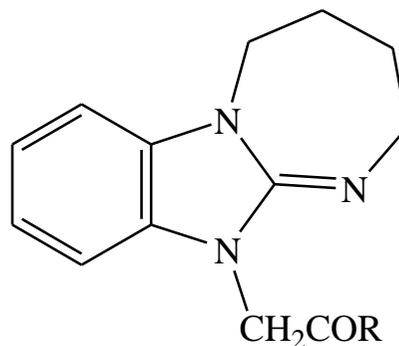
Таблица 4.12 - Влияние производных diazepинобензимидазола на активность дипептидилпептидазы-4 в дозе $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (исследование *in vitro* спектрофотометрическим методом), ($M \pm m$)

№	Соединения	Формула вещества	R	nX	Величина ингибирования, %
11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды					
					
1	ДАБ-13	$C_{19}H_{20}ClN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4Cl-4$	HBr	$-82,1 \pm 3,32$
2	ДАБ-15	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl	$-71,8 \pm 17,15$
3	ДАБ-23	$C_{17}H_{24}N_4O \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2N(CH_2CH_2)_2O$	2HCl	$-58,5 \pm 8,53^*$
4	ДАБ-21	$C_{17}H_{24}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2NC_4H_5$	2HCl	$-54,3 \pm 9,82^*$
5	ДАБ-22	$C_{18}H_{26}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2NC_5H_{10}$	2HCl	$-53,2 \pm 8,56^*$
6	ДАБ-25	$C_{19}H_{20}FN_3O \cdot HCl$	$CH_2CH_2OC_6H_4F-4$	HCl	$-39,4 \pm 8,14^*$

Продолжение таблицы 8.4

7	ДАБ-27	$C_{19}H_{18}F_3N_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4CF_3-4$	HCl	$-36,5 \pm 7,51^*$
8	ДАБ-20	$C_{17}H_{26}N_4 \cdot 2HCl$	$CH_2CH_2NEt_2$	2HCl	$-29,6 \pm 6,26^*$
9	ДАБ-14	$C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot HBr$	$CH_2CH_2OC_6H_4OCH_3-4$	HBr	$-25,9 \pm 17,89^*$
10	ДАБ-28	$C_{20}H_{22}FN_3$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl	$-20,4 \pm 7,67^*$
11	ДАБ-29	$C_{21}H_{22}F_3N_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4CF_3-4$	HCl	$-19,9 \pm 20,31^*$
12	ДАБ-19	$C_{22}H_{27}N_3 \cdot HBr$	$CH_2C_6H_4C(CH_3)_3$	HBr	$-13,3 \pm 3,67^*$
13	ДАБ-30	$C_{18}H_{18}FN_3 \cdot HCl$	$CH_2C_6H_4F-4$	HCl	$-10,2 \pm 5,45^*$

11-Ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидробромиды



1	ДАБ-24	$C_{19}H_{20}N_4O \cdot HCl$	NHC_6H_5	HCl	$-75,8 \pm 7,98$
2	ДАБ-4	$C_{19}H_{18}ClN_3O \cdot HBr$	C_6H_4Cl-4	HBr	$-59,2 \pm 10,26^*$
3	ДАБ-7	$C_{17}H_{23}N_3O \cdot HBr$	$C(CH_3)_3$	HBr	$-45,4 \pm 29,24^*$

Окончание таблицы 8.4					
4	ДАБ-12	$C_{20}H_{21}N_3O^* HBr$	$CH_2COC_6H_4CH_3$	HBr	$-41,7 \pm 17,82^*$
5	ДАБ-8	$C_{19}H_{18}FN_3O^* HBr$	$CH_2COC_6H_4F-4$	HBr	$-30,4 \pm 15,98^*$
6	ДАБ-5	$C_{27}H_{35}N_3O_2^* HBr$	$C_6H_2OH-4-[C(CH_3)_3]_2-3,5$	HBr	$-20,5 \pm 20,25^*$
Препараты сравнения					
	Ситаглиптин	$C_{16}H_{15}F_6N_5O$	-	-	$-94,27 \pm 0,76$
	Вилдаглиптин	$C_{17}H_{25}N_3O_2$	-	-	$88,55 \pm 3,98^*$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе препарата сравнения ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

4.9 Заключение

В результате проведенной работы было выявлено, что новый класс производных диазепинобензимидазола, полученный путем комбинации двух привилегированных подструктур, является перспективным с точки зрения широты разнообразия фармакологических активностей.

Так среди изученных представителей данного класса были обнаружены соединения, проявляющие аксиолитическую активность – ДАБ-7, ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-20 и ДАБ-23, которые в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при однократном внутрибрюшинном введении сокращали латентное время выхода животных в открытый рукав и увеличивали длительность пребывания в нем, превосходя по эффективности препарат сравнения диазепам.

Большинство изученных соединений не оказывало угнетающего влияния на локомоторную активность животных и не влияло на количество переходов в установке «актометр», результаты опытных групп не отличались от группы контроля. Исключение составили соединения под лабораторными шифрами ДАБ-18 и ДАБ-24, которые снижали количество переходов при однократном внутрибрюшинном введении, и соединение ДАБ-26, увеличивающее локомоторную активность животных.

Гипногенный эффект на модели гексеналового сна при введении соединений ДАБ-8, ДАБ-21 и ДАБ-31 не выявлен. А у животных, которым вводили соединение ДАБ-20, увеличивалась продолжительность гексеналового сна, превышая даже эффект препарата сравнения диазепама.

В тесте принудительного плавания по Porsolt оценивали наличие антидепрессивной активности по времени иммобилизации животных. Так под действием соединений ДАБ-8, ДАБ-21 и ДАБ-31 период бездействия животных уменьшался относительно контрольной группы, но не превосходил по активности известные антидепрессанты имипрамин и амитриптилин. Введение соединения под лабораторным шифром ДАБ-23, наоборот, увеличивало у животных период иммобильности, оказывая депрессогенный эффект.

Наличие противосудорожного эффекта на модели коразоловых судорог выявлено у соединения ДАБ-8, при однократном введении которого увеличивался латентный период возникновения судорожных приступов, уступая по активности препаратам сравнения диазепаму и вальпроату натрия. Но выживаемость в группах животных, которым вводили субстанции ДАБ-8 и ДАБ-19, составляла 100% и 83,3%, соответственно, что превышает показатель групп препаратов сравнения.

При исследовании анальгетической активности на установке «горячая пластина» однократное внутривентральное введение животным опытных групп соединений ДАБ-21 и ДАБ-31 вызывало увеличение латентного периода облизывания задней лапы в ответ на термическое раздражение, не уступающее препарату сравнения буторфанолу по эффективности.

По результатам исследования новых производных диазепинобензимидазола выявлены соединения, обладающие высокой ДПП-4 ингибирующей способностью, приближающейся к препаратам сравнения по эффективности в тесте *in vitro* спектрофотометрическим методом. Актуальным остается поиск новых соединений среди производных диазепинобензимидазола, а также модификация структур с целью получения более эффективных соединений.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПСИХОТРОПНЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19

С каждым годом растет распространенность заболеваний, связанных с тревогой и стрессом, в связи с этим актуален поиск препаратов, снижающих проявление страха, эмоциональных расстройств и депрессии [13, 41]. Поэтому своевременное выявление и устранение тревожно-депрессивных расстройств является важной задачей, а наиболее широко применяемыми в клинической практике среди препаратов психотропного действия являются анксиолитические средства. Большинство типичных анксиолитиков обладают миорелаксирующим, противосудорожным, седативным и снотворным эффектами, а также могут вызывать физическую и психическую зависимость [2, 8]. Препаратами первого ряда среди транквилизаторов являются бензодиазепины [16], которые обладают высокой эффективностью, но наряду с этим имеют ряд нежелательных побочных эффектов. В результате исследований была выявлена анксиолитическая активность у производных бензимидазола, у которых снижен риск развития побочных эффектов [182, 16]. В связи с этим очевидна перспективность объединения привилегированных структур для получения высокоэффективных препаратов с минимальным проявлением нежелательных эффектов [7, 39, 38]. Так при поиске биологически активных веществ, учитывая концепцию "привилегированных подструктур [76, 153] были синтезированы производные диазепинобензимидазола.

Среди изученных производных диазепинобензимидазола было обнаружено соединение ДАБ-19, которое в тесте приподнятого крестообразного лабиринта снизило тревожность у животных и тем самым сократило латентное время выхода в открытый рукав, а также увеличило общее время нахождения в открытом рукаве. Целесообразно было изучить обнаруженное соединение на психотропные виды активности и влияние на ЦНС.

5.1 Влияние соединения ДАБ-19 на поведение мышей в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»

Для наиболее активного соединения с точки зрения показателя времени нахождения в открытом рукаве было проведено исследование зависимости эффекта от дозы вводимого вещества (табл. 5.1).

Исследование проводили на 70 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 7 групп по 10 особей в каждой. Животным трех групп препарата сравнения однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг. Животным трех опытных группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярных дозах – 0,75; 1,45 и 2,9 мг/кг. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

В результате исследования выявлена прямая зависимость: так соединение ДАБ-19 наибольшую эффективность демонстрировало в дозе 2,9 мг/кг, что эквимолярно соответствует дозе 2 мг/кг препарата сравнения, и время нахождения опытных животных в открытом рукаве составляло $124,0 \pm 12,06$ сек., что превышало исследуемый показатель группы диазепама в 1,6 раз. Снижение дозы соединения ДАБ-19 в 2 раза приводило к уменьшению времени нахождения животных в открытом рукаве до 61 сек, в то время как эквимолярная доза диазепама 1 мг/кг, вводимая животным приводила к снижению времени нахождения в светлом рукаве до 43 сек. Дальнейшее уменьшение дозы изучаемых веществ еще в 2 раза снова уменьшало исследуемый показатель для групп соединений ДАБ-19 и диазепама до 41 сек. и 36 сек. соответственно.

Таким образом, существует прямая зависимость доза-эффект как у препарата сравнения диазепама, так и у исследуемого вещества, изучаемых в эквимолярных дозах. Причем, наиболее эффективной дозой для соединения ДАБ-19 является 2,9 мг/кг. Согласно полученным данным, был рассчитан

показатель ED50, который для вещества ДАБ-19 и диазепама составил 1,38 и 1,67 мг/кг, соответственно.

Таблица 5.1 – Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозах эквимольных препарату сравнения) при однократном внутривнутрибрюшинном введении на поведение мышей в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта, ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Время нахождения в откр. рукаве (сек)	Лат. время выхода в светлый рукав, сек	Количество выходов в светлый рукав	Количество свешиваний	Количество выглядываний
1	Контроль	-	25,2 ± 6,47	102,5 ± 12,93	1,3 ± 0,43	2,1 ± 0,50	2,0 ± 0,30
2	Диазепам	0,5	36,1 ± 19,83	124,2 ± 27,93	0,4 ± 0,33	1,1 ± 0,45	3,7 ± 0,87*
3	Диазепам	1,0	43,1 ± 14,96	100,1 ± 21,08	0,7 ± 0,33	3,1 ± 0,89	3,2 ± 0,74*
4	Диазепам	2,0	74,5 ± 19,32*	90,3 ± 20,64	1,9 ± 0,99	5,2 ± 1,33*	1,5 ± 0,58
5	ДАБ-19	0,75	41,3 ± 12,16	37,7 ± 16,61*	1,6 ± 0,44	2,2 ± 0,72	2,8 ± 0,68
6	ДАБ-19	1,45	61,5 ± 13,02*	58,7 ± 17,46*	1,5 ± 0,49	3,7 ± 1,17	6,5 ± 1,15*
7	ДАБ-19	2,9	124,0 ± 12,06*	23,8 ± 10,29*	3,0 ± 0,89*	3,3 ± 0,86	1,4 ± 0,70

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

5.2 Влияние соединения ДАБ-19 на поведение мышей в установке «темная/светлая камера»

Исследование проводили на 30 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 3 группы по 10 особей в каждой. Животным первой группы однократно внутрибрюшинно вводили препарат сравнения диазепам в дозе 2,0 мг/кг. Животным второй группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярной диазепаму дозе 2,9 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

В установке «темная/светлая камера» изучили влияние производного диазепинобензимидазола под лабораторным шифром ДАБ-19. (табл. 5.2). В качестве основного показателя использовали общее время нахождения животных в светлом отсеке, но также учитывались и другие показатели: латентное время выхода в светлый отсек, количество переходов между отсеками, количество выглядываний и вертикальных стоек, а так же отношение времени нахождения в светлом/темном отсеках.

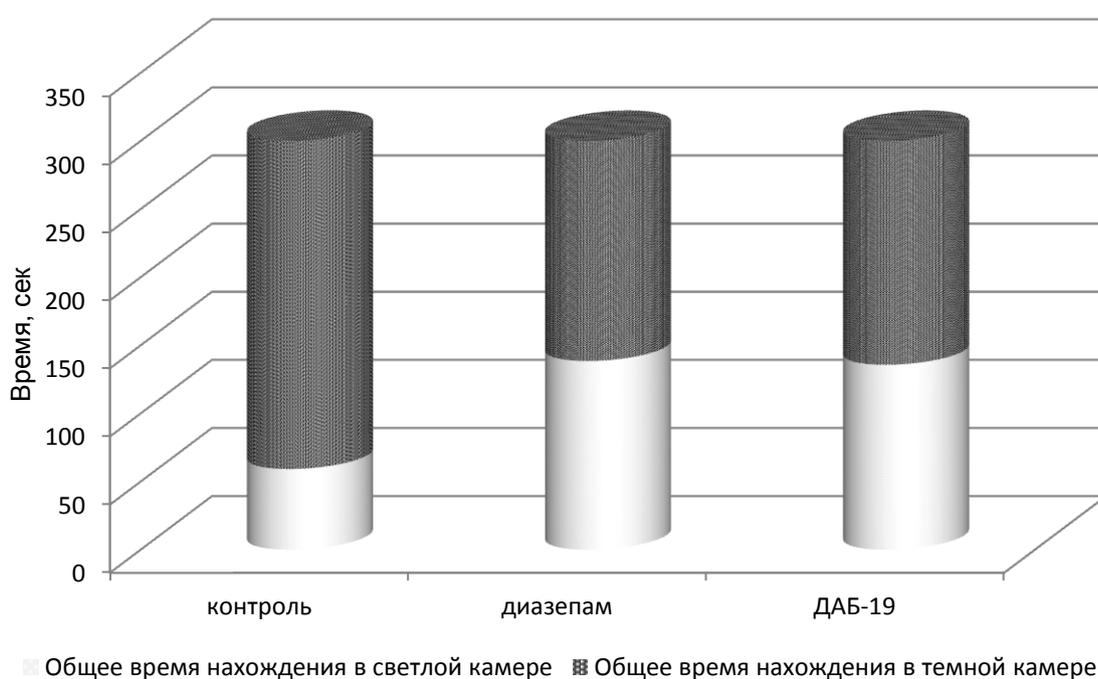
В результате исследования было выявлено увеличение общего времени нахождения в светлом отсеке животных, которым однократно внутрибрюшинно вводили соединение ДАБ-19, в 2,2 раза относительно показателей контрольной группы, получавшей физ. раствор (рисунок 5.1). Животные опытной группы проводили на открытом пространстве $135,7 \pm 14,87$ сек., что соответствует исследуемому показателю группы препарата сравнения диазепаму ($138,5 \pm 14,87$ сек.).

При введении препарата сравнения животным, сокращалось латентное время выхода в светлый отсек до $39,3 \pm 5,52$ сек., а введение соединения ДАБ-19 приводило к снижению данного показателя до $29,8 \pm 6,84$ сек., что в 1,8 и в 2,4 раза меньше, чем результат группы интактных животных ($71,9 \pm 9,44$ сек.).

У животных опытной группы, которой вводили соединение ДАБ-19, и группы препарата сравнения относительно животных, получавших физ. раствор,

увеличивались следующие показатели: число переходов между отсеками, количество выглядываний и вертикальных стоек; по этим же показателям вещество ДАБ-19 превосходило эффективность диазепама, но отличия не были достоверны.

Рисунок 5.1 - Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозе эквимолярной препарату сравнения) при однократном внутрибрюшинном введении на поведение лабораторных животных в установке «темная/светлая камера»



Таким образом, при исследовании влияния соединения ДАБ-19 на поведение животных в установке темная/светлая камера было выявлено, что однократное внутрибрюшинное введение субстанции вызывает снижение тревожности у животных - это проявляется увеличением времени нахождения животных в светлой камере и уменьшением латентного периода выхода из темной камеры. Результаты, полученные в группе исследуемого вещества ДАБ-19, не отличаются от результатов группы препарата сравнения диазепама.

Таблица 5.2 - Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозе эквимолярной препарату сравнения) при однократном внутрибрюшинном введении на поведение лабораторных животных в установке «темная/светлая камера», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время первого выхода в светлый отсек, сек	Общее время нахождения в светлом отсеке, сек	Общее время нахождения в темном отсеке, сек	Относительное время нахождения в светлом/темном отсеках, %	Число переходов между отсеками	Кол-во выглядываний	Кол-во вертикальных стоек
1	Контроль	-	71,9 ± 9,44	59,2 ± 8,79	240,8 ± 8,79	20 / 80	5,0 ± 0,68	7,3 ± 0,89	5,6 ± 0,79
2	Диазепам	2,0	39,3 ± 5,52	138,5 ± 21,84*	161,5 ± 21,84*	46 / 54	6,2 ± 1,07	9,7 ± 1,50	5,8 ± 1,14
3	ДАБ-19	2,9	29,8 ± 6,84*	135,7 ± 14,87*	164,3 ± 14,87*	45 / 55	9,3 ± 1,36	9,2 ± 0,99	10,1 ± 1,28

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

5.3 Влияние соединения ДАБ-19 в разных дозах на двигательную активность мышей в установке «актометр»

Соединение ДАБ-19, при введении которого животные продемонстрировали наибольшее время нахождения в открытом рукаве, свидетельствуя о наличии анксиолитического эффекта, было решено испытать в нескольких дозах на способность влияния на локомоторную активность (табл. 5.3).

Исследование проводили на 70 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 7 групп по 10 особей в каждой. Животным трех групп препарата сравнения однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг. Животным трех опытных группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимоляльных диазепаму дозах – 0,75; 1,45 и 2,9 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

Таблица 5.3 - Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозах эквимоляльных препарату сравнения) при однократном внутрибрюшинном введении на двигательную активность в установке «актометр», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Количество переходов
1	Контроль	-	378,0 ± 35,64
2	Диазепам	0,5	217,7 ± 12,99*
3	Диазепам	1,0	208,6 ± 39,49*
4	Диазепам	2,0	85,9 ± 28,32*
5	ДАБ-19	0,75	316,1 ± 26,19
6	ДАБ-19	1,45	330,3 ± 37,22
7	ДАБ-19	2,9	382,6 ± 50,91

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению *- к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

В результате исследования установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении соединения ДАБ-19, количество переходов почти не изменяется относительно контроля, так как значения, полученные в опытных группах животных, статистически не отличаются от значений контрольной группы, которой вводили физ. раствор. Однако, относительно препарата сравнения, исследуемого в эквимолярных дозах, отличия были значительны.

При введении ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг отличие от группы, которой вводили диазепам в эквимолярной дозе составляло 78%. Снижение дозы диазепама приводило к возрастанию значений количества переходов ($208,6 \pm 39,49$), а введение соединения ДАБ-19 в эквимолярной дозе - к уменьшению количества переходов в актометре ($330,3 \pm 37,22$). Так отличие результатов группы препарата сравнения и опытной группы ДАБ-19 сокращалось до 63%. При дальнейшем уменьшении дозы исследуемых соединений отличие еще больше сокращалось до 32%, так как в группе диазепама число переходов росло, а в группе соединения ДАБ-19 уменьшалось.

Таким образом, в результате исследования установлена обратная зависимость влияния диазепама на локомоторную активность в актометре, так как с увеличением дозы изучаемого вещества уменьшалось количество переходов. А при исследовании соединения ДАБ-19 отмечена недостоверная прямая зависимость, так как при увеличении дозы вводимого вещества возрастало количество переходов животных, но все значения статистически незначимы и соответствуют результатам контрольной группы.

5.4 Влияние соединения ДАБ-19 на продолжительность гексеналового сна

По изменению продолжительности гексеналового сна под действием исследуемых соединений можно оценить гипногенный эффект.

Исследование проводили на 30 половозрелых мышках самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 3 группы по 10 особей в каждой. Животным первой группы однократно внутрибрюшинно вводили

препарат сравнения диазепам в дозе 2 мг/кг, обладающий гипногенным эффектом. Животным второй группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярной дозе диазепаму дозе 2,9 мг/кг.

Таблица 5.4 - Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозе эквимолярной препарату сравнения) при однократном внутрибрюшинном введении на продолжительность сна, вызванного гексеналом (60 мг/кг), ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Гексеналовый сон	
			Лат. время засыпания, мин.	Продолжительность сна, мин.
1	Контроль	-	$3,7 \pm 0,33$	$37,9 \pm 8,60$
2	Диазепам	2,0	$1,8 \pm 0,22^*$	$70,0 \pm 3,83^*$
3	ДАБ-19	2,9	$2,5 \pm 0,22$	$54,7 \pm 3,34$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Исследуемые вещества вводили однократно за 30 мин. до введения гексенала.

Гексенал вводили в виде свежеприготовленного водного раствора однократно внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг. Дозы в пересчете на миллилитры раствора рассчитывали индивидуально для каждого животного исходя из массы тела. Критерий эффективности – длительность сна, которую определяли, как разницу между временем засыпания и временем пробуждения. Препарат считали обладающим антитоксической активностью в случае, если он обеспечивал снижение длительности сна по сравнению с контрольной группой животных; а наличие гипногенного эффекта оценивали по увеличению продолжительности сна (табл. 5.4).

Животные контрольной группы засыпали в течение 4 минут, а средняя длительность гексеналового сна составила $37,9 \pm 8,60$ мин. Введение препарата сравнения диазепама приводило к достоверному снижению латентного времени засыпания в 2 раза ($1,8 \pm 0,22$ мин.) и увеличению продолжительности

гексеналового сна на 85% ($70,0 \pm 3,83$ мин). Исследуемое вещество ДАБ-19 статистически недостоверно укорачивало латентное время засыпания до $2,5 \pm 0,22$ мин., и продлевало сон на 44% ($54,7 \pm 3,34$ мин.), относительно результатов контрольной группы, но заметно уступало препарату сравнения диазепаму.

Таким образом, у соединения ДАБ-19 установлена недостоверная способность сокращать латентное время засыпания и статистически незначимо продлевать гексеналовый сон, в то время как препарат сравнения диазепам достоверно сокращал латентное время засыпания и увеличивал продолжительность гексеналового сна.

5.5 Изучение соединения ДАБ-19 на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.

Данный тест свидетельствует о психодепрессорной активности веществ [Porsolt, R.D., 1977; Lim, W.C., 2005].

Исследование проводили на 50 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 10 особей в каждой. Животным двух групп препаратов сравнения трехкратно внутрибрюшинно вводили препараты сравнения amitriptilin (10 мг/кг) и imipramin (15 мг/кг). Третьей группе животных вводили diazepam в дозе 2 мг/кг, четвертой группе вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярной дозе diazepam дозе 2,9 мг/кг. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

Принудительное плавание в контрольной группе грызунов вызывало реакцию иммобилизации (табл. 5.5), продолжительность которой составляла $94,2 \pm 10,45$ секунд, что было в 2,2 раза меньше, чем время, затраченное на попытки активного сопротивления ($205,8 \pm 10,45$ секунд).

Трехкратное введение соединений с антидепрессантной активностью – amitriptilina и imipramina – достоверно сокращало время иммобильности

животных (до $43,7 \pm 9,03$ сек. и $32,3 \pm 3,40$ сек. соответственно), увеличивая активное сопротивление.

Таблица 5.5 - Влияние диазепама, соединения ДАБ-19, amitriptилина и имипрамина при трехкратном внутрибрюшинном введении на поведение отчаяния в тесте принудительного плавания по Porsolt, ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Время иммобильности, сек
1	Контроль	-	$94,2 \pm 10,45$
2	Амитриптилин	10,0	$43,7 \pm 9,03^*$
3	Имипрамин	15,0	$32,3 \pm 3,40^*$
4	Диазепам	2,0	$123,5 \pm 16,85$
5	ДАБ-19	2,9	$98,0 \pm 10,42$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

Введение же диазепама и соединения ДАБ-19 не влияло на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt и значения, полученные в ходе эксперимента, статистически не отличались от группы контрольных животных – $123,5 \pm 16,85$ сек. и $98,0 \pm 10,42$ сек. соответственно.

Таким образом, соединение ДАБ-19 при введении животным проявляет активность подобную контрольной группе, а значит, не обладает антидепрессантным эффектом.

5.6 Противосудорожная активность соединения ДАБ-19 на модели коразоловых судорог

Исследование проводили на 40 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 4 группы по 10 особей в каждой. Животным первой группы однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозе 2 мг/кг, обладающий противосудорожным эффектом. В качестве

препарата сравнения также использовали противосудорожное средство – вальпроат натрия (90 мг/кг) - применяемое в клинике. Животным третьей группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярной диазепаму дозе 2,9 мг/кг. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутривентриально в эквивалентном объеме. Исследуемые вещества вводили однократно за 30 мин. до введения коразола. Коразол вводили в виде свежеприготовленного водного раствора однократно внутривентриально в дозе 80 мг/кг. Дозы в пересчете на миллилитры раствора рассчитывали индивидуально для каждого животного исходя из массы тела.

У всех животных контрольной группы фиксировали латентное время возникновения судорог (табл. 5.6), в результате оно составило $184,0 \pm 30,96$ сек. Внутривентриальное введение диазепамы достоверно увеличивало латентный период возникновения судорожных приступов на 126% (до $417,5 \pm 29,3$ сек.), а препарат сравнения вальпроат натрия статистически значимо увеличивал данный показатель на 360% ($847 \pm 81,4$ сек.), относительно контрольной группы. Латентное время возникновения судорог у животных, получавших соединение ДАБ-19, статистически не отличалось ($140,2 \pm 7,85$ сек.) от контрольных значений и значительно уступало препаратам сравнения диазепаму и вальпроату натрия.

Вторым исследуемым показателем, учитываемым в эксперименте, была летальность животных. Так среди животных, которым вводили вальпроат натрия, уровень летальности составлял 40%, что не сильно отличалось от результатов контрольной группы, получавшей физ. раствор, в которой гибель животных составляла 47%.

Внутривентриальное введение вещества ДАБ-19 приводило к снижению показателя летальности до 16,7%, что превосходило по эффективности препарат сравнения вальпроат натрия, но всё же уступало препарату сравнения диазепаму, который снижал процент гибели животных до 10%.

Таким образом, соединение ДАБ-19 уступает препаратам сравнения диазепаму и вальпроату натрия по показателю латентного времени возникновения судорог, но превосходит вальпроат натрия по выживаемости животных.

Таблица 5.6 - Влияние диазепама, вальпроата натрия и соединения ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении на латентное время возникновения судорог и летальность в тесте с коразолом (80 мг/кг), ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время возникновения судорог, сек	Летальность, %
1	Контроль	-	$184,0 \pm 30,96$	47,06
2	Диазепам	2,0	$417,5 \pm 29,3^*$	10
3	Вальпроат натрия	90,0	$847 \pm 81,4^{* \#}$	40
4	ДАБ-19	2,9	$140,2 \pm 7,85^{\# **}$	16,7

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению *- к группе контроля [#] - к группе препарата сравнения-диазепама, ** - к группе вальпроата натрия ($p \leq 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

5.7 Анальгетическая активность соединения ДАБ-19 на установке «Горячая пластина» и модели отдергивания хвоста на установке «Tail flick»

Для каждой модели оценки болевой чувствительности использовали по 60 половозрелых мышей самцов массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 6 групп по 10 особей в каждой. Двум группам животных однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозах 1 и 2 мг/кг. Еще двум опытных группам животных вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярных дозах – 1,45 и 2,9 мг/кг. Группа препарата сравнения получала буторфанол (1 мг/кг), а животные контрольной группы физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

При помещении мыши на горячую поверхность и достижении порога болевой чувствительности латентный период ноцицептивной реакции в виде облизывания задней лапы в контрольной группе животных составил $13,0 \pm 0,99$ секунд (табл. 5.7).

Таблица 5.7 - Влияние диазепама, соединения ДАБ-19 (в дозах эквимолярных диазепаму), буторфанол и морфина при однократном внутривбрюшинном введении на анальгетическую активность в установке «Горячая пластина» и «Tail Flick», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время облизывания задней лапки на установке «Горячая пластина», сек	Латентное время одергивания хвоста на установке «Tail Flick», сек
1	Контроль	-	$13,0 \pm 0,99$	$3,6 \pm 0,36$
2	Диазепам	2,0	$15,0 \pm 3,69$	$11,5 \pm 6,34^*$
3	Диазепам	1,0	$9,3 \pm 1,44$	$4,7 \pm 0,78$
4	ДАБ-19	2,9	$12,8 \pm 1,02$	$2,3 \pm 0,58$
5	ДАБ-19	1,45	$19,7 \pm 3,18^*$	$4,4 \pm 0,99$
6	Буторфанол	1,0	$19,7 \pm 1,20^*$	-
7	Морфин [#]	10,0	-	$11,2 \pm 7,15$

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению *- к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна), # - данные взяты из источника [Paudel KR, et. al, 2007].

Субстанция соединения ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг при внутривбрюшинном введении не влияла на латентный период болевой реакции, так же как и введение диазепама в дозе 2 мг/кг, полученные результаты не отличались от контрольной группы – $12,8 \pm 1,02$ сек. и $15,0 \pm 3,69$ сек. соответственно.

Снижение вводимой животным дозы диазепама в 2 раза приводило к недостоверному сокращению латентного времени облизывания задней лапы до $9,3 \pm 1,44$ сек., но и эти значения входили в диапазон результатов интактных животных. А понижение дозы вводимого вещества ДАБ-19 до 1,45 мг/кг статистически значимо увеличивало латентный период болевой реакции

максимально на 58% ($19,7 \pm 3,18$ сек.), что соответствовало анальгетической активности препарата сравнения буторфанолола в эквимолярной дозе 1 мг/кг ($19,7 \pm 1,20$ сек.).

В установке «Tail flick» проявление болевой чувствительности оценивали по латентному времени отдергивания хвоста. Данный показатель в группе контрольных животных составил $3,6 \pm 0,36$ сек. Вещество ДАБ-19 в дозах 2,9 мг/кг и 1,45 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении не влияло на ноцицептивную систему, так как латентное время ответа на раздражитель укладывалось в диапазон контрольных значений и составляло $2,3 \pm 0,58$ сек. и $4,4 \pm 0,99$ сек соответственно. У животных, которым вводили диазепам в дозе 1 мг/кг, время одергивания хвоста также не имело достоверных отличий от интактных животных ($4,7 \pm 0,78$ сек.). Но введение диазепама в дозе 2,0 мг/кг статистически значимо увеличивало время проявления болевой чувствительности до $11,5 \pm 6,34$ сек., что соответствовало данным, полученным при введении морфина в эквимолярной дозе 10 мг/кг ($11,2 \pm 7,15$ сек.)

5.8 Заключение.

В результате исследования соединения ДАБ-19 в диапазоне доз от 0,75 мг/кг до 2,9 мг/кг на установке приподнятый крестообразный лабиринт при однократном внутрибрюшинном введении была выявлена прямая зависимость доза-эффект по показателю времени нахождения животных в открытом рукаве. Наиболее эффективной дозой для соединения ДАБ-19 является 2,9 мг/кг, что по активности превосходит препарат сравнения в эквимолярной дозе 2,0 мг/кг. Показатель ED₅₀ вещества ДАБ-19 был ниже показателя препарата сравнения диазепама – 1,38 и 1,67 мг/кг, соответственно.

Изучение поведения животных в установке «темная/светлая камера» при однократном внутрибрюшинном введении соединения ДАБ-19 подтверждало наличие анксиолитической активности у исследуемой субстанции, что

проявлялось увеличением времени нахождения животных в светлом отсеке установки, не уступающее препарату сравнения диазепаму.

Влияния на локомоторную активность животных в установке «актометр» при введении им соединения ДАБ-19 не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии психостимулирующего и психоугнетающего действия.

На модели гексеналового сна установлено, что введение животным субстанции ДАБ-19 приводит к незначительному снижению латентного времени засыпания и увеличению продолжительности сна, но достоверного гипногенного эффекта не выявлено.

В тесте принудительного плавания по Porsolt не обнаружено влияния на активность животных, так как показатели опытной группы, которой вводили соединение ДАБ-19 не отличались от контрольных, а значит антидепрессантным действием субстанция не обладает.

При изучении противосудорожных свойств на модели коразоловых судорог введение соединения ДАБ-19 не влияло на латентное время возникновения судорожных приступов, однако, снижало гибель животных до 16,7%, что превосходило по эффективности препарат сравнения вальпроат натрия.

Наличие анальгетической активности у соединения ДАБ-19 выявлено в дозе 1,45 мг/кг, при введении которой у животных на установке «Горячая пластина» увеличивалось латентное время облизывания задней лапки, соответствуя показателю препарата сравнения буторфанолу. В тесте одергивания хвоста анальгетическая активность соединения ДАБ-19 не выявлена.

ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦЕНТРАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19

Известно, что подавляющее количество веществ, селективно взаимодействующих с рецепторами биологически активных веществ, являются производными циклических азотсодержащих гетеросистем, к которым относятся производные бензимидазола. Так, например, описаны бензимидазолы - антагонисты гистаминовых H1- [2], H3- [1; 4] и H4-рецепторов [84], парциальные агонисты серотониновых 5-HT1A- [7,8,9], 5-HT2A [171, 77], агонисты и антагонисты 5-HT4-рецепторов (Lopez-Rodriguez M.L. et al., 2002, 2003; Lelong V. et al., 2003), антагонисты 5-HT6 [74] рецепторов. Отмечаются взаимодействия производных бензимидазола и с другими рецепторами [77, 183].

Диазепины также имеют способность взаимодействовать с различными типами рецепторов: серотониновыми и дофаминовыми [100, 150] и, конечно, с ГАМК-ергической системой [167].

В связи с таким разнообразием рецепторных взаимодействий двух привилегированных подструктур, входящих в состав исследуемого соединения – производного диазепинобензимидазола – ДАБ-19, подводит к необходимости проведения фармакологического анализа на возможность проявления иных нейромедиаторных взаимодействий.

6.1 Влияние флумазенила на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», вызванное введением соединения ДАБ-19

Взаимодействие тормозных и возбуждающих систем нейротрансмиссии в ЦНС является основой для обработки и сохранения информации мозгом. Нарушение баланса между этими системами приводит к развитию серьезных патологических сдвигов в ЦНС.

ГАМК (γ -аминомасляная кислота) – основной тормозный нейротрансмиттер в ЦНС, который действует на две основные группы молекулярных рецепторов –

ионотропные рецепторы типа ГАМК_A/ГАМК_C и метаботропные рецепторы типа ГАМК_B.

В ГАМК_A-рецепторе существует целый ряд модуляторных сайтов, отличных от сайта связывания агониста. Вещества, воздействующие на данные сайты, повышают или, наоборот, снижают эффективность активации ГАМК_A-рецепторов агонистом. Одним из таких сайтов аллостерических модуляторов является бензодиазепиновый сайт. Этот сайт представляет собой мишень для ряда препаратов, используемых в клинической практике, – транквилизаторов, антиконвульсантов, седативных и гипногенных средств. Активация бензодиазепинового сайта ведет к увеличению аффинности по отношению к агонисту у определенной группы, но не у всех ГАМК_A-рецепторов. Так как соединение ДАБ-19 является производным, имеющим в своей структуре диазепиновый фрагмент, актуально изучить возможное влияние на бензодиазепиновый рецептор [23].

Исследование проводили на 50 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 10 особей в каждой. Животным одной группы однократно внутрибрюшинно вводили препарата сравнения диазепам в дозу 2,0 мг/кг. Животным второй группы вводили исследуемое соединение ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг, эквимолярной 2 мг/кг диазепама. Животным третьей и четвертой групп наряду с диазепамом и соединением ДАБ-19 вводили антагонист бензодиазепиновых рецепторов – флумазенил (1,0 мг/кг). Контрольная группа животных получала физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

В результате исследования, проведенного с антагонистом бензодиазепиновых рецепторов – флумазенилом (табл. 6.1), было установлено ингибирование эффекта соединения ДАБ-19 на поведение мышей в установке «приподнятый крестообразный лабиринт».

Введение соединения ДАБ-19 вызывало статистически значимое увеличение времени нахождения животных в открытом рукаве относительно контрольной группы в 11 раз, так же, как и в группе препарата сравнения

диазепама. Количество выходов в открытый рукав у животных, получавших исследуемое вещество и диазепам, так же достоверно возрастало в 3-4 раза, а латентное время выхода в открытый рукав сокращалось в 3-5 раз (рисунок 6.1).

Таблица 6.1- Влияние антагониста бензодиазепиновых рецепторов – флумазенила (1 мг/кг) на поведение животных в установке «приподнятый крестообразный лабиринт» при однократном внутрибрюшинном введении диазепам (2,0 мг/кг) и соединения ДАБ-19 (в дозе эквимолярной препарату сравнения), ($M \pm m$)

№		Доза вещества, мг/кг	Латентное время выхода в светлый рукав, сек	Количество выходов в светлый рукав	Общее время нахождения в светлом рукаве, сек
1	Контроль	-	169,7 ± 10,33	0,5 ± 0,50	7,2 ± 5,42
2	Диазепам	2,0	53,0 ± 15,70*	2,0 ± 0,71*	76,6 ± 13,61*
3	ДАБ-19	2,9	34,3 ± 11,33*	1,8 ± 0,58*	78,6 ± 12,13*
4	Флумазенил + Диазепам	1,0 2,0	174,3 ± 3,93 [#]	0,2 ± 0,13 [#]	7,1 ± 4,11 [#]
5	Флумазенил + ДАБ-19	1,0 2,9	168,6 ± 11,40 ^{##}	0,4 ± 0,27 ^{##}	6,7 ± 4,59 ^{##}

Примечание - отличия статистически достоверны по отношению *- к группе контроля; [#] - к группе диазепам; ^{##} - к группе ДАБ-19 ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

При введении животным флумазенила действие соединения ДАБ-19 и диазепам не проявлялось. Так исследуемые показатели – время нахождения в открытом рукаве и количество выходов достоверно уменьшались, а латентное время выхода в открытый рукав достоверно возрастало относительно результатов групп животных, которым не вводили антагонист бензодиазепиновых рецепторов, - не отличались от значений контрольной группы животных

Рисунок 6.1 - Влияния антагониста бензодиазепиновых рецепторов – флумазенила на поведение животных в установке «приподнятый крестообразный лабиринт» при однократном внутрибрюшинном введении диазепама и соединения ДАБ-19



6.2 Влияние соединения ДАБ-19 на судорожный эффект пикротоксина

Исследование противосудорожной активности проводили 20 на беспородных белых мышах-самцах массой 19-29 г., которые были разделены на 2 группы по 10 особей в каждой. Исследуемое соединение в скрининговой дозе вводили животным однократно внутрибрюшинно за 30 минут до введения пикротоксина. Пикротоксин вводили в дозе, вызывающей судороги у 97% животных (2,5 мг/кг), подкожно в область шейного отдела спины. Контрольной группе животных вводили физ. раствор в эквивалентном объеме.

За животными вели наблюдение в течение 60 минут после введения пикротоксина. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества использовали его способность подавлять развитие повторяющихся клонических судорог передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 секунды без потери рефлекса переворачивания [3].

Так латентный период возникновения тремора у животных в группе контроля составлял в среднем 480 секунд (табл. 6.2) после введения пикротоксина, спустя еще 75 секунд у животных возникали судороги. За период

наблюдения в контрольной группе количество приступов судорог было около 14 повторений. В ходе исследования летальность животных, которым вводили пикротоксин, составила 50%.

Таблица 6.2 - Влияние соединения ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении на латентное время возникновения тремора и судорог, количество судорожных приступов и летальность в тесте с пикротоксином (2,5 мг/кг), (M±m)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Латентное время возникновения тремора, сек	Латентное время возникновения судорог, сек	Количество судорожных приступов	Летальность, %
1	Контроль	-	480,0 ± 54,77	555,0 ± 66,52	14,25 ± 2,43	50
2	ДАБ-19	2,9	420,0 ± 24,49	460,20 ± 20,00	21,00 ± 0,82	100

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

В группе с предварительно введенным соединением ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг отмечалось недостоверное сокращение латентного периода возникновения тремора на 20 секунд и судорог на 90 секунд. Также, в опытной группе исследуемого вещества количество приступов судорог возрастало в 1,5 раза. У опытных животных также отмечалось увеличение показателя летальности до 100%.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что соединение ДАБ-19 не обладает способностью снижать эффект пикротоксина.

6.3 Действие соединения ДАБ-19 на эффекты L-ДОФА

По результатам проведенного исследования установлено, что L-ДОФА после введение в дозе 500 мг/кг (контроль 1) приводила к повышению двигательной активности мышей с элементами стереотипного поведения.

Максимальная выраженность эффекта была отмечена на 30 минуте после введения L-ДОФА (табл. 6.3), когда интенсивность стереотипии достигала 2,66 балла по 3-х балльной шкале.

Таблица 6.3 - Влияние соединения ДАБ-19 при однократном внутривнутрибрюшинном введении на эффекты L-ДОФА, ($M \pm m$)

Мин.	Выраженность стереотипии, баллы		
	Контроль 1 (L-ДОФА 500 мг/кг)	Контроль 2 (L-ДОФА 100 мг/кг)	ДАБ-19 (2,9 мг/кг) + L-ДОФА (100 мг/кг)
30	2,66 ± 0,33	2,0 ± 0	1,67 ± 0,33
60	2,33 ± 0,33	1,33 ± 0,33	1,0 ± 0,58
90	2,0 ± 0,58	0,66 ± 0,33	0,66 ± 0,33

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

При введении L-ДОФА в дозе 100 мг/кг (контроль 2) выраженной стереотипии, характерной для высоких доз, отмечено не было, хотя незначительные проявления отмечались [Андреева Н.И., 2005]. Соединение ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг не потенцировало эффектов малых доз L-ДОФА. На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение ДАБ-19 не обладает MAO-ингибирующим действием, основанном на потенцировании эффектов L-ДОФА.

6.4 Действие соединения ДАБ-19 на стереотипное поведение, вызванное апоморфином

В результате полученных данных апоморфин приводил к возникновению стереотипного поведения у животных [Раевский К.С., Наркевич В.Б., 2005]. Так, на 30 минуте после введения дофаминового агониста показатель составлял 3 бала, дальнейшее наблюдение показывало постепенное снижение эффектов апоморфина (табл. 6.4).

Соединение ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг не изменяло выраженность апоморфинового ответа у животных.

Таблица 6.4 - Влияние соединения ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении на стереотипию, вызванную апоморфином (0,1 мг/кг), ($M \pm m$)

Время	Выраженность стереотипии, баллы	
	Контроль	ДАБ-19 + апоморфин
Мин.		
30	3,0 ± 0	3,0 ± 0
60	2,33 ± 0,33	2,0 ± 0
90	1,33 ± 0,33	1,67 ± 0,33
120	0,67 ± 0,33	1,0 ± 0,58

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

На 90 и 120 минуте у животных, которым вводили соединение ДАБ-19 незначительно проявлялось стереотипное поведение, по баллам превышающее стереотипию животных контрольной группы, но отличия были статистически незначимы. Таким образом, по результатам эксперимента установлено, что для соединения ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг отмечалось незначительное увеличение действия апоморфина.

6.5 Влияние соединения ДАБ-19 на каталептогенный эффект галоперидола

Галоперидол при внутрибрюшинном введении в контрольной группе животных приводил к возникновению каталепсии [Карпов В.Н., 1976; Маймете М.О. и соавт., 1985; Андреева Н.И., 2005].

Максимальный эффект галоперидола отмечался уже на 15 минуте исследования и соответствовал в группе контроля максимальному баллу (табл. 6.5). Соединение ДАБ-19 в изучаемой дозе незначительно снижал выраженность

каталептического эффекта галоперидола. Таким образом, соединение ДАБ-19 не оказывало существенного влияния на дофаминергические эффекты галоперидола.

Таблица 6.5 - Влияние соединения ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении на каталепсию, вызванную галоперидолом (3 мг/кг), $M \pm m$

Время	Выраженность каталепсии, баллы	
	Контроль (галоперидол)	ДАБ-19 (2 мг/кг) + галоперидол
15	$3,0 \pm 0$	$2,0 \pm 0,58$
30	$3,0 \pm 0$	$2,3 \pm 0,67$
45	$3,0 \pm 0$	$2,3 \pm 0,33$
60	$3,0 \pm 0$	$2,3 \pm 0,33$
120	$3,0 \pm 0$	$2,3 \pm 0,33$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

6.6 Заключение

При изучении поведения животных в условиях методики ПКЛ было выявлено антагонистическое влияние флумазенила на эффекты соединения ДАБ-19 и диазепама, что предполагает взаимодействие исследуемого вещества с бензодиазепиновым рецептором. Судороги, вызванные введением пикротоксина соединением ДАБ-19 не купирует. У исследуемого вещества не выявлено потенцирования стереотипии под влиянием L-ДОФА и апоморфина. Каталептогенный эффект галоперидола соединением ДАБ-19 не изменяет.

ГЛАВА 7. ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-19

7.1 Изучение двигательной координации и мышечно-расслабляющего действия соединения ДАБ-19

Исследование проводили на 70 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г, которые были разделены случайным образом на 7 групп по 10 особей в каждой. Животным трех групп препарата сравнения однократно внутрибрюшинно вводили диазепам в дозах 0,5; 1,0 и 2,0 мг/кг. Животным трех опытных группы вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19 в эквимолярных дозах – 0,75; 1,45 и 2,9 мг/кг. Животные контрольной группы получали физ. раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме.

Оценку влияния соединения ДАБ-19 на двигательную и мышечную координацию (миорелаксантное действие) выполняли с помощью следующих тестов: двигательной (расстройство равновесия, дискоординация, тонус конечностей, «Ротарод тест») и мышечной («тест удержания на проволоке и сетке») координацией, регистрация реактивности (время начала движения животного с места) и спонтанной двигательной активности (актометр).

При введении животным соединения ДАБ-19 внутрибрюшинно наблюдали развитие дискоординации, но изменения тонуса конечностей и нарушения равновесия не выявлено (табл. 7.1).

Начиная, с дозы 0,75 мг/кг были выявлены нарушения со стороны двигательной координации. Так в тесте «Ротарод» было показано, что через 30 мин. после введение исследуемого вещества ДАБ-19 происходило снижение двигательной координации на 63% соответственно по отношению к контрольной группе ($p > 0,05$). При оценке мышечного тонуса в тестах удержание на проволоке и сетке достоверных изменений не наблюдалось.

При однократном внутрибрюшинном введении эквимолярной дозы препарата сравнения (0,5 мг/кг) у животных не отмечались нарушения

координации движений и снижение тонуса конечностей, что проявлялось в длительном удержании животных на установке «Ротарод» $23,1 \pm 4,39$ сек., на сетке и проволоке всеми конечностями, аналогично контрольной группе животных.

Таблица 7.1 - Влияние диазепама и соединения ДАБ-19 (в дозах эквимоляльных препарату сравнения) при однократном внутривенном введении на двигательную координацию и мышечный тонус в тестах «удержание на сетке и проволоке» и на установке «ротарод», ($M \pm m$)

№	Шифр вещества	Доза вещества, мг/кг	Удержание на установке Ротарод, сек	Удержание на сетке (количество конечностей, которыми животное держится)	Удержание на проволоке (количество конечностей, которыми животное держится)
1	Контроль	-	$23,0 \pm 2,27$	$4,0 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,01$
2	Диазепам	0,5	$23,1 \pm 4,39$	$3,7 \pm 0,14$	$3,7 \pm 0,14$
3	Диазепам	1,0	$12,5 \pm 2,88^*$	$3,3 \pm 0,21$	$3,1 \pm 0,19$
4	Диазепам	2,0	$3,8 \pm 1,65^*$	$2,5 \pm 0,48^*$	$2,0 \pm 0,41^*$
5	ДАБ-19	0,75	$8,4 \pm 1,21^*$	$4,0 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,20$
6	ДАБ-19	1,45	$10,3 \pm 1,33^*$	$3,9 \pm 0,13$	$3,9 \pm 0,13$
7	ДАБ-19	2,9	$8,0 \pm 0,58^*$	$4,0 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,01$

Примечание - * отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уолиса с посттестом Данна)

При введении животным соединения ДАБ-19 в дозах 1,45 и 2,9 мг/кг изменений не выявлено, так в тесте «Ротарод» животные находились на вращающейся установке не более 10 сек., что в 2 раза меньше результатов животных, которым вводили физ. раствор ($23,0 \pm 2,27$ сек.). Удержание на сетке и проволоке оставалось сходным с контрольной группой животных.

Препарат сравнения диазепам продемонстрировал зависимость двигательной и мышечной координации от вводимой дозы. Так увеличение концентрации до 1,0 и 2,0 мг/кг приводило к снижению времени удержания на установке «Ротарод» на 46% и 83% соответственно относительно результатов интактных животных. Мышечный тонус снижался, что проявилось уменьшением количества лапок, которыми животное держалось на сетке и проволоке, а в дозе 2,0 мг/кг полученные результаты уже статистически значимо отличались от контрольных значений в 1,5-2 раза.

7.2 Определение острой токсичности соединения ДАБ-19

Исследование проводили на 24 половозрелых мышах самцах массой 22-28 г. Животным однократно внутрибрюшинно вводили исследуемое соединение-лидер ДАБ-19.

Соединение ДАБ-19 исследовали на острую токсичность (табл. 7.2). Так однократное внутрибрюшинное введение субстанции ДАБ-19 в дозе 100 мг/кг вызывало 100% гибель животных. Введение соединения ДАБ-19 в дозах 50 и 25 мг/кг приводило к гибели 83% и 50%, соответственно. А снижение дозы вводимого вещества до 12,5 мг/кг не вызывало гибель животных.

Таблица 7.2 – Исследование острой токсичности соединения ДАБ-19

№	Доза исследуемого вещества, мг/кг	Общее количество животных	Число погибших животных	Летальность, %
1	12,5	6	0	0
2	25	6	3	50
3	50	6	5	83
4	100	6	6	100

Клинические проявления токсичных доз заключались в угнетении дыхания, которое становилось поверхностным, а дыхательные движения учащались, у животных отмечался цианоз и фокальные судороги сменялись генерализованными, после чего животное погибало.

На основании полученных результатов был определен показатель острой токсичности (табл. 7.3, рисунок 7.1).

Рисунок 7.1. Зависимость показателя летальности от концентрации исследуемого вещества

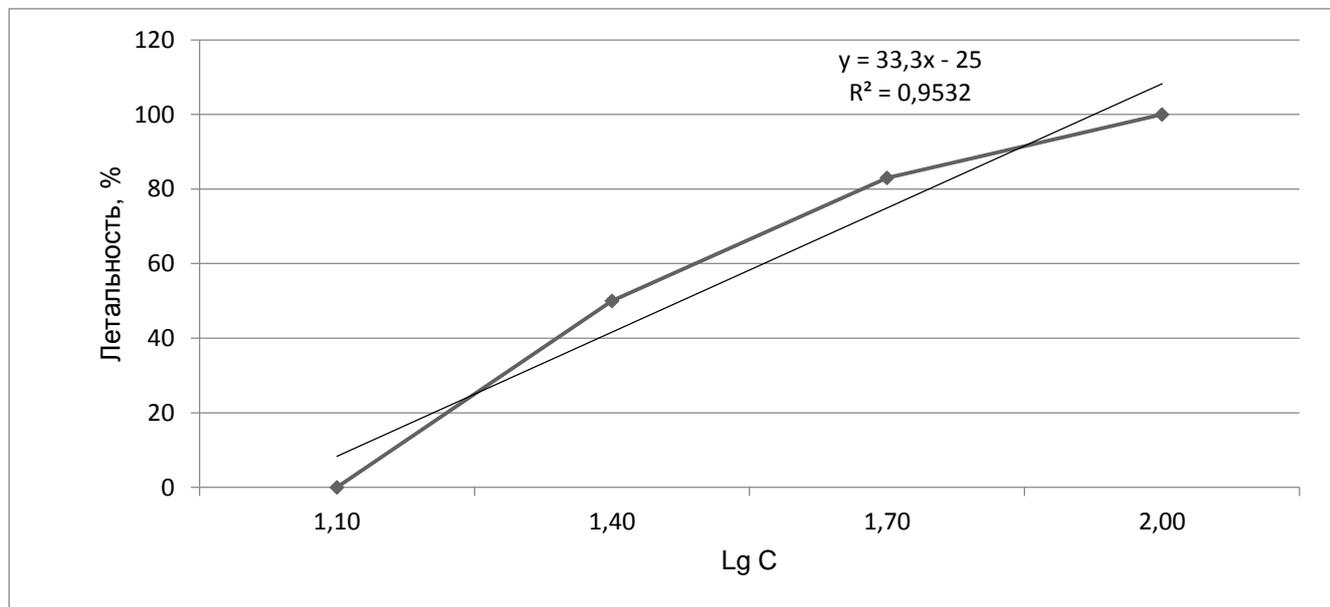


Таблица 7.3 - Острая токсичность диазепама и соединения ДАБ-19 при однократном внутрибрюшинном введении

№	Вещество	LD ₅₀ , мг/кг
1	Диазепам	37,0*
2	ДАБ-19	27,4

Примечание - * данные взяты из источника

Таким образом, показатель LD₅₀ для вещества ДАБ-19 и препарата сравнения незначительно различался – 27,4 мг/кг и 37,0 мг/кг соответственно, что свидетельствует о перспективности его дальнейшего исследования.

На основании полученных данных вычислили величину терапевтического индекса (ТИ), так ТИ_{ДАБ-19} = 19,86, а ТИ_{Диазепам} = 22,16.

7.3 Заключение.

Таким образом, в результате исследования выявлено, что соединение ДАБ-19 при внутрибрюшинном введении не влияет на мышечный тонус, однако,

способствует недостоверным расстройством координации движений. При определении острой токсичности установлен показатель LD50, который соответствует 27 мг, что незначительно уступает препарату сравнения. Показатель $TI_{\text{ДАБ-19}} = 19,86$ почти не отличается от показателя $TI_{\text{Диазепам}} = 22,16$, что предполагает перспективность дальнейшего изучения соединения ДАБ-19.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время накоплен фактический материал о перспективности класса производных бензимидазола в качестве основы лекарственных средств мультитаргетного действия [87, 103, 110,123]. Соединения данного класса имеют широкий спектр фармакологической активности: антиагрегантные свойства, ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4, противосудорожный, анальгетический, транквилизирующий эффекты, противовирусное и антибактериальное, а также противоопухолевое действие [82, 83, 86, 109, 113, 135, 189]. При лечении неврологических расстройств активно применяются препараты диазепинового ряда, обладающие седативными, анксиолитическими, противосудорожными и антидепрессантными свойствами. Но, несмотря на высокую эффективность используемых в клинической практике анксиолитиков производных бензодиазепина, открытой остается проблема высокой степени риска развития неблагоприятных эффектов, наряду с возникновением лекарственной зависимости [2, 6, 119, 125]. Так новой концепцией при создании лекарственных средств является комбинирование привилегированных структур [80, 101 ,110], входящих в состав препаратов, в одном соединений, что снизит риск возникновения побочных реакций. Благодаря современным технологиям при создании новых лекарственных средств активно используется компьютерное моделирование для построения молекул с заданной структурой и дальнейшее изучение вероятности наличия фармакологической активности при помощи программ прогнозирования [40].

Так на базе Волгоградского государственного медицинского университета были изучены производные нового класса производных диазепино[1,2a]бензимидазола, синтезированные сотрудниками НИИ ФОХ ЮФУ. Изученные вещества представляют собой комбинацию двух привилегированных подструктур – бензимидазола и диазепина, которые являются перспективными с точки зрения широкого спектра действия в связи с большим числом мишеней и высокой эффективностью.

При выборе класса соединений так же руководствовались проведенными ранее исследованиями, как на базе Волгоградского государственного медицинского университета [30, 31, 32, 33], так и данными литературных источников [55, 59, 123, 135, 155, 171, 174]. В ходе работы были получены результаты компьютерного прогнозирования вероятности наличия фармакологической активности в тест-системе PASS, которые позволяют предполагать высокую вероятность наличия у соединений производных diazepino[1,2a]benzimidazole психотропной активности.

Для исследования было выбрано 23 гетероциклических соединения, являющихся производными diazepino[1,2a]benzimidazole, состоящих из двух привилегированных подструктур.

Отсутствие в базе данных информации о видах активности нового класса соединений определили первый этап исследования - проведение компьютерного прогноза изучаемых соединений *in silico* в тест-системе PASS. По результатам прогноза производные diazepinobenzimidazole проявили широкий спектр вероятных видов активности*³:

1. нейropsychotropic эффекты – психотропная, лечение расстройств настроения, лечение фобий, антидепрессантная, лечение острых неврологических расстройств, анксиолитическая, ноотропная, антиневротическая, противосудорожная, лечение нейродегенеративных заболеваний, анальгетическая;

2. влияние на сердечно-сосудистую систему – антиишемическая, вазодилатационная, лечение инфаркта миокарда, кардиотоническая, антимигренозная;

3. иммуностропные эффекты – лечение аллергического конъюнктивита, антиэкзематическая, противозудная;

4. другие прогнозируемые менее значимые эффекты - антинеуротоксическая, лечение заболеваний репродуктивной системы,

³ названия видов активностей приводится в редакции системы PASS

стимулирующая функции почек, антидискинетическая, антидиабетическая, антиостеопоротическая, лечение офтальмологических заболеваний, антинефротоксическая.

Среди широкого спектра фармакологических активностей для изучения были выбраны нейрпсихотропные свойства производных нового класса диазепино-[1,2a]бензимидазола, так как одной из привилегированных подструктур, входящих в состав соединений, является диазепиновый фрагмент, взаимодействующий с бензодиазепиновыми рецепторами и в результате проявляющий анксиолитический, противосудорожный и седативный эффекты [2, 119, 125]. А также актуально было изучение ДПП-4 ингибирующей активности, так как среди прогнозируемых свойств новых производных выявлена вероятность наличия антидиабетического эффекта, а психотропные средства, применяемые в клинической практике способны ингибировать фермент ДПП-4 [118].

На втором этапе были изучены нейрпсихотропные свойства производных диазепинобензимидазола. Так наличие анксиолитической активности изучали в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Основным показателем оценки транквилизирующего эффекта было выбрано время нахождения животных в открытом рукаве установки ПКЛ. Все изученные соединения демонстрировали различный уровень влияния на поведение мышей. Вещества разделили на 4 группы в зависимости от проявляемого эффекта: высоко активные соединения – то есть превосходящие по активности препарат сравнения; активные соединения, сопоставимые показателям препарата сравнения; соединения с умеренной активностью – уступающие диазепаму, но превосходящие показатели контрольной группы и неактивные. Среди изученных производных диазепино[1,2a]бензимидазола только 3 соединения (ДАБ-18, ДАБ-19 и ДАБ-23) превосходили влияние препарата сравнения диазепама по времени нахождения животных в открытом рукаве. Еще 5 соединений по эффективности не отличались от препарата сравнения, 2 соединения уступали эффекту диазепама, и 4 исследуемых вещества оказались неактивными.

В ходе исследования отмечалась зависимость проявляемой активности изучаемых соединений от их химической структуры. Исследуемые вещества относятся к двум классам производных диазепино[1,2-а]бензимидазола, а именно: 11-*R*-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды и 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола гидрогалогениды.

В результате исследования наиболее активным соединением является вещество, относящееся к группе производных 11-*R*-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола под лабораторным шифром ДАБ-19, так как при введении его животным снижались признаки естественного страха – животные находились в открытом рукаве крестообразного лабиринта дольше, чем под действием препарата сравнения. При анализе выявлено, что диазепинобензимидазольный скаффолд связан коротким линкером (-CH₂-) с бензольным кольцом, у которого триметильный заместитель находится в пара-положении. Если основной каркас связать с таким же радикалом метоксо-группой (ДАБ-26), то время нахождения животных в открытом рукаве снизится более чем в 2 раза. Если триметильную группу заменить электроотрицательным атомом хлора (ДАБ-13), то активность соединения будет соответствовать препарату сравнения. Замещение атома хлора на более электроотрицательный атом фтора приведет к резкому снижению анксиолитической активности соединения (ДАБ-25).

В случае связи диазепинобензимидазольного каркаса с атомом азота морфолинового цикла посредством этильной цепи анксиолитическая активность соединения (ДАБ-23) также превышает препарат сравнения. Если этот атом азота находится в раскрытой структуре диэтиламина, активность соединения (ДАБ-20) незначительно снижается, но по эффективности не уступает диазепаму.

При изучении группы производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола установлено, что в структуре наиболее активного соединения диазепинобензимидазольный скаффолд соединяется с пирокатехолом альдегидной группой, что является показателем высокой реакционной способности (ДАБ-18). Замещение гидроксо-групп в радикале на

метоксо-группы (ДАБ-17) снижает время нахождения животных в открытом рукаве. Соединение через альдегидную группу диазепинобензимидазольного каркаса молекулы с триметильным радикалом (ДАБ-7) незначительно снижает анксиолитическую активность соединения.

Удлинение цепи, связывающей бензольный радикал с диазепинобензимидазольным скаффолдом (ДАБ-24), гетероатомом азота также снижает транквилизирующую активность. Замещение в пара-положении радикала гидроксильной группы электроотрицательным атомом хлора так же не приводит к усилению анксиолитического действия.

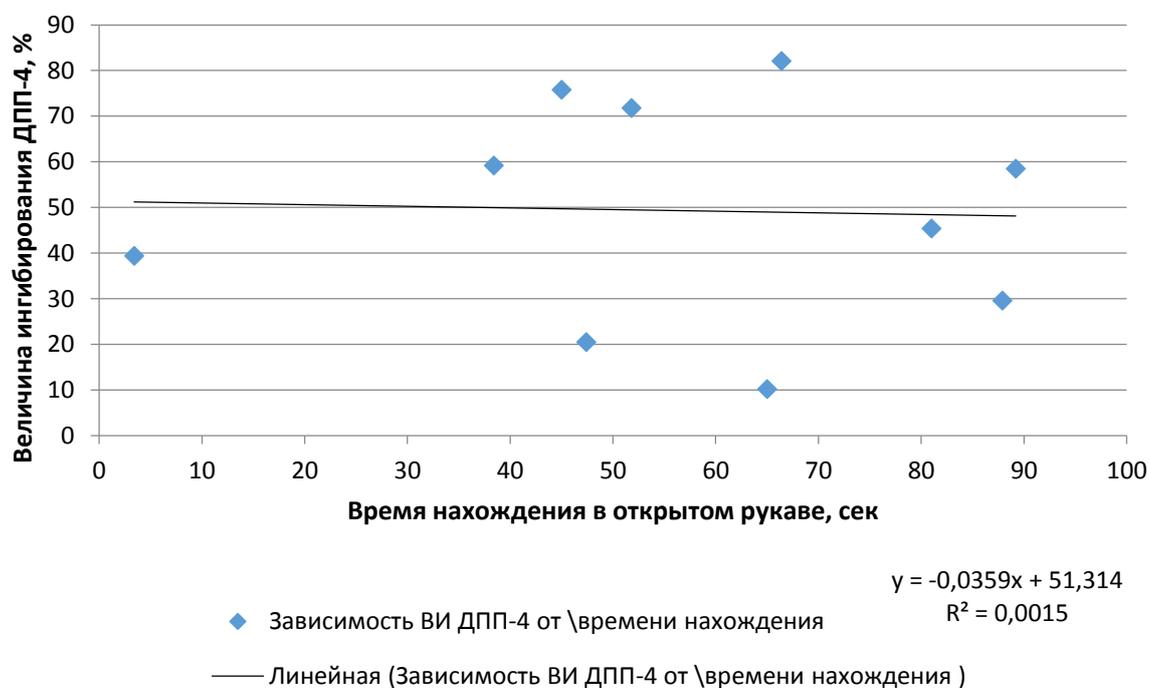
Таким образом, анализ группы производных 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола выявил, что наибольшей активностью обладают соединения с бензольным радикалом, подобно производным бензодиазепина [21, 28], у которых заместители гидроксо- и метоксо- группы находятся в 3 и 4 положении, а так же бензольный радикал замещен на триметильный. Встраивание в мета-положения триметильных заместителей и электроотрицательного атома в пара-положение бензольного кольца приводит к резкому снижению активности соединений, так же как и удлинение линкера, между диазепинобензимидазольным каркасом молекулы и радикалом.

Наибольшая активность в группе производных 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола отмечена у соединения с короткой цепью, соединяющей диазепинобензимидазольный скаффолд и циклический радикал. Появление в структуре радикала электроотрицательных атомов галогенов - фтора и хлора приводило к снижению активности исследуемых соединений, так же как включение метоксо-группы в связующую цепь.

Так как многими исследованиями подтверждены ДПП-4 ингибирующие свойства веществ, проявляющих анксиолитическую активность [118], была проведена корреляция между изученными эффектами производных диазепино[1,2а]бензимидазола (рисунок 8.1). В результате статистической обработки корреляционной зависимости между двумя видами активности не выявлено, однако, производные диазепинобензимидазола остаются достаточно

перспективнм классом соединений для дальнейшего изучения на наличие не только анксиолитической, но и ДПП-4 ингибирующей активности.

Рисунок 8.1. Зависимость величины ингибирования ДПП-4 от анксиолитического эффекта (времени нахождения в открытом рукаве ПКЛ).



Большинство соединений, содержащих в своей химической структуре диазепиновый фрагмент отличаются наличием таких побочных эффектов как седативный и миорелаксирующий [2, 125], в связи с этим было проведено исследование, позволившее установить отсутствие у производных изучаемой группы диазепино[1,2a]бензимидазола снижения локомоторной активности в установке актометр. Количество переходов животных, которым вводили экспериментальные субстанции, находилось в пределах контрольных значений, что позволяет сделать вывод о нормальной двигательной способности. Отмечено, что в группе препарата сравнения, у животных, получавших инъекцию диазепамма (2 мг/кг), сокращалось количество переходов в актометре, а значит, препарат сравнения снижал двигательную активность испытуемых, что подтверждает литературные данные. Таким образом, полученные результаты доказывают

отсутствие нежелательной реакции – снижения локомоторной активности, характерного для diazепиновых препаратов.

У производных diaзепина, применяемых в клинической практике, отмечается высокий риск развития такого неблагоприятного эффекта как гипногенное действие [2, 125], поэтому в ходе исследования было проведено изучение влияния нового класса производных diaзепино[1,2a]бензимидазола на гексеналовый сон. В результате работы экспериментальные субстанции при однократном внутривентральном введении проявили различное влияние на продолжительность сна и время засыпания. В группе, получавшей инъекцию препарата сравнения diaзепам в дозе 2 мг/кг, у животных сокращалось латентное время засыпания, и достоверно увеличивалась продолжительность гексеналового сна, то есть проявлялось наличие гипногенного эффекта. Однако в опытных группах, которым вводили производные diaзепино[1,2a]бензимидазола, эффекты отличались, но большинство соединений (ДАБ-8, ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-31) гипногенным эффектом не обладало. Отсутствие снотворного действия производных нового класса соединений подтверждает актуальность исследования.

В тесте принудительного плавания по Porsolt среди исследуемых производных diaзепино[1,2a]бензимидазола были обнаружены соединения, снижающие состояние отчаяния относительно контрольной группы животных (ДАБ-8, ДАБ-21, ДАБ-31), демонстрируя снижение времени иммобильности животных, которым однократно внутривентральным введением вводили исследуемые субстанции, но не превосходящие по эффективности препараты сравнения имипрамин(10 мг/кг) и amitриптилин(15 мг/кг). Также выявлены соединения, которые не влияют на время иммобильности животных (ДАБ-19). Введение животным diaзепам (2 мг/кг) продлевало период иммобильности животных, что указывало на развитие депрессогенного эффекта. Таким образом, исследуемые соединения не оказывают антидепрессантное действие, либо эффект незначителен.

При изучении влияния производных диазепино[1,2a]бензимидазола на противосудорожную активность, которая проявляется у соединений, содержащих диазепиновый scaффолд в химической структуре, было установлено, что большинство вводимых субстанции сокращает латентное время развития судорог, уступая по эффективности препаратам сравнения вальпроату натрия (90 мг/кг) и диазепаму (2 мг/кг). Однако, выявлены вещества (ДАБ-19, ДАБ-23), однократное введение которых снижает летальность животных при введении коразола, превосходя по активности вальпроат натрия. В результате исследования можно сделать вывод о перспективности изучения производных диазепинобензимидазола как соединений ГАМКергического действия.

Руководствуясь результатами компьютерного прогноза было проведено исследование анальгетической активности ряда производных диазепино[1,2a]бензимидазола, в результате чего были выявлены соединения (ДАБ-21, ДАБ-31), введение которых увеличивало латентное время облизывания задней лапы на установке «горячая пластина», не уступая по активности препарату сравнения буторфанолу (1 мг/кг), что подтверждает наличие у них обезболивающих свойств, а значит обоснованным является поиск соединений с анальгетической активностью среди производных диазепинобензимидазола.

Многие исследования подтверждают наличие у анксиолитиков свойств, модулирующих активности ферментативных систем, субстратами которых являются нейропептиды, в частности, дипептидилпептидазы-IV (ДПП-4), которая расщепляет биологически активные пептидов, в том числе участвующих в механизмах тревоги и депрессии [118]. В связи с этим в ходе исследований провели оценку влияния производных диазепино[1,2a]бензимидазола на ДПП-4. В результате изучения *in vitro* было установлено наличие ДПП-4 ингибиторной активности у ряда представителей данного класса (ДАБ-4, ДАБ-13, ДАБ-15, ДАБ-23). Таким образом, актуальным остается поиск ингибиторов ДПП-4 среди производных диазепинобензимидазола.

В результате скрининговых исследований ряда новых соединений, было выявлено, что новый класс производных диазепино[1,2a]бензимидазола,

полученный путем комбинации двух привилегированных подструктур, является перспективным с точки зрения разнообразия фармакологических активностей и низкого риска развития нежелательных эффектов[101].

На основании проведенных исследований ряда производных диазепинобензимидазола для расширенного изучения было выбрано соединение ДАБ-19, при введении которого выявлена наибольшая анксиолитическая активность в тесте ПКЛ, снижается летальность животных при коразоловой интоксикации, отсутствует гипногенный эффект у животных в тесте гексеналового сна, а также нет угнетающего влияния на двигательную активность животных (таблица 1).

Таблица 1 – Основные эффекты соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении

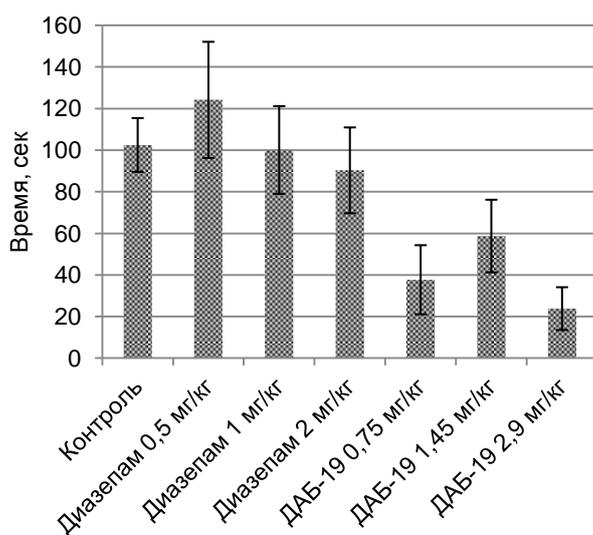
№	Вид активности	Эффект
1	Анксиолитическая (ПКЛ)	Высокая
2	Локомоторная (актометр)	Высокая
3	Противосудорожная (коразоловая интоксикация)	↓ Летальности
4	Гипногенная (гексеналовый сон)	Отсутствует
5	Антидепрессантная (Porsolt)	Отсутствует
6	Анальгетическая (горячая пластина)	Отсутствует
7	ДПП-4 ингибирующая	Отсутствует

Так третьим этапом исследований стало изучение соединения ДАБ-19. Установлено, что вещество ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг (эквимолярной 2 мг/кг препарата сравнения диазепам) обладает анксиолитической активностью – увеличивает время нахождения животных в открытом рукаве в установке ПКЛ на 66% по сравнению с результатами группы, которой вводили диазепам. Для исследуемого соединения был рассчитан показатель ED₅₀, который составил 1,38 мг/кг, в то время как у диазепам ED₅₀ оказался выше – 1,67 мг/кг.

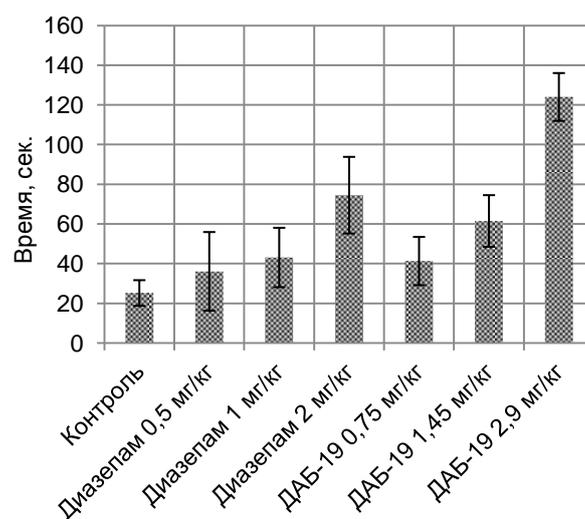
Помимо этого, при однократном внутрибрюшинном введении субстанции ДАБ-19 у животных уменьшалось проявление чувства страха, на что указывало снижение латентного времени выхода в светлый рукав в 1,5 раза, относительно группы препарата сравнения, а также возросло количество выходов в светлый рукав у опытной группы животных на 57% (рисунок 8.2).

Рисунок 8.2. Анализ действия соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) и диазепама (2 мг/кг) в эквимоляльных дозах при однократном внутрибрюшинном введении на поведение животных в условиях методики «приподнятый крестообразный лабиринт»

а). общее время нахождения
в открытом рукаве



б). латентное время выхода
в светлый рукав



Для подтверждения наличия анксиолитической активности использовали установку «темная/светлая камера». В результате исследования установлено достоверное увеличение общего времени нахождения в светлом отсеке животных, которым однократно внутрибрюшинно вводили соединение ДАБ-19 (2,9 мг/кг) в эквимоляльной препарату сравнения дозе, причем показатели соответствовали результатам группы диазепама (2 мг/кг).

При введении препарата сравнения животным, сокращалось латентное время выхода в светлый отсек, а введение соединения ДАБ-19 приводило к еще

большему снижению данного показателя. У животных опытной группы, которой вводили соединение ДАБ-19, и группы препарата сравнения относительно животных, получавших физ. раствор, увеличивались также и другие показатели: число переходов между отсеками, количество выглядываний и вертикальных стоек; по этим же показателям субстанция ДАБ-19 превосходила эффективность диазепама, но отличия не были достоверны. Данное исследование подтверждает наличие анксиолитической активности у изучаемого соединения ДАБ-19.

Производные бензодиазепинов вызывают седацию, что может проявляться снижением двигательной активности [2, 125, 151]. Изучение в установке «актометр» соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении животным выявило отсутствие влияния на локомоторную активность, в отличие от вводимого препарата сравнения диазепама (2 мг/кг), который значительно снижал количество переходов животных. Следовательно, соединение ДАБ-19 лишено такого побочного эффекта, как влияние на двигательную активность, что обосновывает возможность применения данного вещества при работе, требующей концентрации внимания и точности движений.

Наличие гипногенного эффекта оценивали на модели гексеналового сна. Установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) животным недостоверно сокращалось латентное время засыпания и статистически незначимо увеличивалась продолжительность гексеналового сна, в то время как при введении препарата сравнения диазепама (2 мг/кг) достоверно сокращалось у животных латентное время засыпания и увеличивалась продолжительность гексеналового сна. Таким образом, соединение ДАБ-19 не обладает снотворным действием, свойственным производным диазепамина, что доказывает перспективность изучения данного вещества.

В тесте принудительного плавания по Porsolt введение животным субстанции ДАБ-19 (2,9 мг/кг) не приводило к изменению времени иммобильности, в отличие от группы, получавшей инъекцию диазепама (2 мг/кг), в которой время иммобильности значительно увеличивалось. В группах препаратов сравнения amitriptyline (15 мг/кг) и imipramine (10 мг/кг) время

иммобильности животных значительно сокращалось, подтверждая антидепрессантный эффект препаратов. Таким образом, можно предположить, что у соединения ДАБ-19 отсутствует МАО-ингибирующий эффект, и оно не является ингибитором неронального захвата моноаминов.

Для определения противосудорожной активности использовали модель коразоловых судорог. В результате введения животным соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) латентное время возникновения судорог уменьшалось относительно препаратов сравнения диазепама (2 мг/кг) и вальпроата натрия (90 мг/кг). Однако, показатель летальности в группе животных, которым вводили исследуемое производное diazepino[1,2a]benzimidazole, не уступала показателям группы вальпроата натрия. Таким образом, установлено, что соединение ДАБ-19 обладает противосудорожной активностью при внутривентральном введении, но не блокирует действие коразола, а только снижает токсичность, а значит, вероятно, не является агонистом ГАМК.

Изучение анальгетической активности субстанции ДАБ-19 было проведено на двух моделях – на установке «горячая пластина» и «Tail flick». Так при введении животным соединения ДАБ-19 (1,45 мг/кг) увеличивался показатель обезболивающей активности при помещении животных на горячую пластину, что проявлялось удлинением латентного времени облизывания задней лапки испытуемых, по эффективности, не уступая препарату сравнения буторфанолу в эквимолярной дозе (1 мг/кг), превосходя диазепам (1 мг/кг). При оценке болевой чувствительности на установке «Tail flick» наличие анальгетической активности у вещества ДАБ-19 не установлено. Таким образом, у изучаемого производного diazepino[1,2a]benzimidazole, вероятно, проявляются анальгетические эффекты на спинальном уровне, но подкорковые структуры мозга не вовлекаются в процесс обезболивания.

Выявление широкого спектра активностей исследуемого соединения ДАБ-19 привело к актуальности дополнительного фармакологического анализа. Исходя из химического строения производного diazepino[1,2a]benzimidazole, было решено изучить влияние на него блокатора бензодиазепиновых рецепторов

флумазенила. В результате экспериментальных исследований было установлено антагонистическое влияние флумазенила на введение животным соединения ДАБ-19. Так при введении исследуемого вещества, аналогично препарату сравнения диазепаму, при изучении анксиолитических свойств на установке ПКЛ, у животных снижалась тревожность, что проявлялось сокращением времени выхода в открытый рукав и увеличением времени нахождения в нем. Введение животным препарата флумазенила приводило к блокированию анксиолитического эффекта, что проявлялось увеличением латентного времени выхода в открытый рукав и сокращением времени нахождения в нем. Таким образом, можно предположить, что действие исследуемого вещества ДАБ-19 проявляется за счет сродства к бензодиазепиновому рецептору.

Влияния субстанции ДАБ-19 (2 мг/кг) при однократном введении животным на судороги, вызванные пикротоксином (2,5 мг/кг) установлено не было. У животных, которым вводили исследуемое вещество, быстрее развивались судорожные приступы, и увеличивалось их количество относительно группы контрольных животных. Можно предположить, что исследуемое соединение не действует на медиаторные механизмы системы ГАМК.

При исследовании влияния соединения ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг на проявление стереотипии, вызванной L-ДОФА (100 мг/кг), эффекта потенцирования не выявлено. На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение ДАБ-19 не обладает MAO-ингибирующим действием, основанном на потенцировании препарата L-ДОФА.

Соединение ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг не достоверно влияло на выраженность апоморфинового ответа у животных. Но, у животных, которым вводили соединение ДАБ-19, незначительно проявлялось стереотипное поведение, по баллам превышающее стереотипию животных контрольной группы. Таким образом, в результате эксперимента установлено, что для соединения ДАБ-19 в дозе 2,9 мг/кг свойственно незначительное увеличение действия апоморфина, что может свидетельствовать о его незначительном влиянии на дофаминовые рецепторы.

При изучении влияния соединения ДАБ-19 (2,9 мг/кг) выявлено незначительное снижение выраженности каталептического эффекта галоперидола. В целом, введение соединения ДАБ-19 не приводило к существенным изменениям эффекта галоперидола, но предполагается наличие у изучаемого вещества влияния на дофаминовые рецепторы.

На заключительном этапе в результате исследования побочных эффектов при введении субстанции ДАБ-19 установлены незначительные нарушения координации животных на установке ротарод, которые также отмечались у животных группы препарата сравнения. Но при изучении мышечного тонуса на проволоке и сетке у животных, которым вводили соединение ДАБ-19, отклонений не выявлено, в отличие от показателей группы диазепама, где установлен миорелаксирующий эффект. Таким образом, можно утверждать об отсутствии влияния на мышечный тонус изучаемого вещества.

По результатам изучения острой токсичности показатель LD50 соединения ДАБ-19 (27,4 мг/кг) оказался незначительно ниже показателя LD50 препарата сравнения диазепама (37 мг/кг), что предполагает перспективность его дальнейшего доклинического исследования, так как терапевтический индекс соединения ДАБ-19 незначительно отличался от рассчитанного показателя диазепама – 19,86 и 22,16, соответственно.

Подводя итоги проведенной работы, следует отметить, что в ходе скрининговых исследований производных диазепино[1,2а]бензимидазола были выявлены соединения, обладающие анксиолитической (ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-23), противосудорожной (ДАБ-19, ДАБ-21), анальгетической (ДАБ-21, ДАБ-31), антидепрессантной (ДАБ-8, ДАБ-19, ДАБ-21, ДАБ-31), ДПП-4 ингибирующей активностью (ДАБ-4, ДАБ-13, ДАБ-15, ДАБ-23) и представляющие интерес для дальнейшего изучения.

На основании фармакологического анализа соединения ДАБ-19 выявлено снижение транквилизирующего действия изучаемого вещества под влиянием

флумазенила, что свидетельствует о связи ДАБ-19 с бензодиазепиновыми рецепторами.

На основании полученных нами новых данных о фармакологических свойствах соединений ДАБ-8, ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-20 целесообразно проведение дальнейших расширенных доклинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные diaзепинобензимидазола являются новым и малоизученным классом соединений, в связи с этим, методом *in silico* для 23 химических структур представителей данного класса с помощью системы PASS было спрогнозировано наличие широкого спектра фармакологических активностей. Так изучаемые соединения согласно прогнозу, должны проявлять эффективность при лечении заболеваний сердечно сосудистой системы, нейропсихотропные и иммуотропные свойства.

Учитывая наличие diaзепинового фрагмента в строении нового класса химических соединений, исследования проводили на наличие нейропсихотропных эффектов. Все изученные соединения, синтезированные в лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ЮФУ (Ростов-на-Дону), проявили различный уровень активности. Анксиолитические свойства, выраженные увеличением времени нахождения в открытом рукаве в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, выявлены у соединений ДАБ-18, ДАБ-19, ДАБ-20 и ДАБ-23. Наличие антидепрессантного эффекта в тесте принудительного плавания по Porsolt, определяемого снижением времени иммобильности животных, отмечалось у субстанций ДАБ-8, ДАБ-21 и ДАБ-31. Противосудорожное действие установлено у соединений ДАБ-19 и ДАБ-23, которые снижали летальность животных при коразоловой интоксикации. На установке «горячая пластина» вещества ДАБ-21 и ДАБ-31 при внутрибрюшинном введении снижали болевую чувствительность, увеличивая латентное время облизывания задней лапки животными, что свидетельствует о наличии анальгетической активности.

Учитывая возможность влияния психотропных препаратов на ферментные системы, при изучении ДПП-4 ингибиторных свойств было установлено, что соединения ДАБ-13, ДАБ-15, ДАБ-24 при спектрофотометрическом исследовании *in vitro* способны подавлять дипептидилпептидазу типа 4 на 71-82%. В связи с различным уровнем анксиолитической и ДПП-4 ингибиторной активностей для производных 11-R-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола и 11-ацилметил-2,3,4,5-тетрагидродиазепино[1,2-а]бензимидазола определены значимые заместители, определяющие эффективность. У большинства изучаемых соединений установлен низкий риск развития нежелательных реакций. Только соединения ДАБ-18 и ДАБ-24 при однократном введении снижают двигательную активность животных в установке «актометр», остальных производные диазепинобензимидазола таким седативным действием не обладают. Гипногенный эффект отмечен только у вещества ДАБ-20, которое пролонгировало гексеналовый сон.

При расширенном изучении фармакологических свойств соединения ДАБ-19, проявившего наибольшую анксиолитическую активность в тесте ПКЛ, которая превышает по эффективности препарат сравнения диазепам, транквилизирующий эффект был также подтвержден в установке «темная/светлая камера», в которой под действием исследуемого вещества животные длительное время находились в светлом отсеке, не уступая по показателям препарату сравнения. На модели коразоловых судорог при введении животным субстанции ДАБ-19 повышалась выживаемость в опытной группе, превосходящая препарат сравнения вальпроат натрия. Наличие анальгетической активности, не уступающей буторфанолу, у исследуемого вещества выявлено на установке «горячая пластина», однако, в тесте отдергивания хвоста обезболивающего эффекта не наблюдалось. Соединение ДАБ-19 при внутрибрюшинном введении не вызывает развития побочных эффектов снижения двигательной активности в актометре, пролонгации действия гексенала, не влияет на мышечный тонус животных при исследованиях на сетке и проволоке. У субстанции также не

установлено антидепрессантное действие в тесте принудительного плавания по Porsolt, так как результаты не отличаются от контрольных значений.

Установлено, что транквилизирующее действие соединения ДАБ-19 в тесте ПКЛ блокируется введением животным флумазенила, что позволяет предположить у него бензодиазепиновый механизм развития анксиолитического эффекта. Анальгетический эффект, вероятно, имеет спинальную природу, но подкорковые структуры мозга в обезболивание не вовлекаются. Отсутствие ГАМКергического действия можно обосновать неэффективностью соединения ДАБ-19 на пикротоксиновой модели судорог. При введении субстанции ДАБ-19 не происходит потенцирования эффектов L-ДОФА, что указывает на отсутствие MAO-ингибирующих свойств. Исследуемое вещество незначительно увеличивает стереотипию, вызванную введением апоморфина, но снижает каталепсию, обусловленную введением галоперидола, в связи с этим, возможно, влияние соединения ДАБ-19 на дофаминовые рецепторы.

Исследования позволили установить для вещества ДАБ-19 следующие показатели: ED₅₀ = 1,37 мг/кг, LD₅₀ = 27,4 мг/кг, TI = 19,86, что доказывает целесообразность и перспективность его дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Производные diazepino[1,2a]benzimidazole - новый scaf-fold, состоящий из двух привилегированных структур diazepina и benzimidazole, который проявляет выраженные нейропсихотропные эффекты.

2. Новые производные diazepinobenzimidazole в разной степени оказывают анксиолитический эффект. Соединения ДАБ-18 (2,9 мг/кг), ДАБ-19 (2,9 мг/кг), ДАБ-23 (2,6 мг/кг) превосходят по эффективности препарат сравнения diazepam (2 мг/кг) в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

3. В тесте принудительного плавания по Porsolt соединение ДАБ-8 (2,8 мг/кг) по антидепрессантной активности не отличается от препарата сравнения amitriptyline.

4. Субстанции ДАБ-19 (2,9 мг/кг) и ДАБ-23 (2,6 мг/кг) снижают летальность животных при коразоловой интоксикации, превосходя результаты препарата сравнения вальпроата натрия в 2,4 и 1,2 раза, соответственно.

5. Соединения ДАБ-21 (2,5 мг/кг) и ДАБ-31 (3,3 мг/кг) в тесте «горячая пластина» при однократном внутрибрюшинном введении оказывают анальгетический эффект, равный препарату сравнения буторфанолу.

6. У производных диазепино[1,2а]бензимидазола не выявлены существенные влияния на двигательную активность животных в актометре и гипногенный эффект в тесте с гексеналом.

7. ДПП-4 ингибиторная активность не коррелирует с анксиолитическим влиянием изучаемых производных диазепино[1,2а]бензимидазола.

8. Соединение ДАБ-19 (2,9 мг/кг) по анксиолитической активности в тесте ПКЛ превосходит препарат сравнения диазепам (2 мг/кг) в 1,7 раз. Транквилизирующий эффект подтвержден исследованием в установке «темная/светлая камера». При коразоловой интоксикации введение субстанции ДАБ-19 (2,9 мг/кг) приводило к снижению летальности, превосходя по эффективности вальпроат натрия (90 мг/кг) в 2,2 раза. Антидепрессантным эффектом вещество ДАБ-19 не обладает.

9. У вещества ДАБ-19 не обнаружены такие побочные эффекты, как миорелаксирующий и гипногенный. У животных не выявлено снижения двигательной активности под действием изучаемого соединения. При однократном внутрибрюшинном введении $ED_{50} = 1,37$ мг/кг, $LD_{50} = 27,4$ мг/кг, $TI = 19,86$.

10. Анксиолитический эффект соединения ДАБ-19 (2 мг/кг) блокируется антагонистом бензодиазепиновых рецепторов флумазенилом (1 мг/кг).

11. Анальгетическая активность соединения ДАБ-19, выявленная на установке «горячая пластина» (1 мг/кг), равна буторфанолу (1 мг/кг).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется продолжить изучение спектра фармакологической активности, побочных эффектов и механизма действия соединения ДАБ-19 и других производных диазепино[1,2a]бензимидазола, с целью их дальнейшей разработки в качестве потенциальных препаратов нейрпсихотропного действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДПП-4 – дипептидилпептидаза типа 4

MDDR – база данных MDL Drug Data Report

5-НТ – серотониновый рецептор

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

AMPA – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

ГАМК, GABA - γ -аминомасляная кислота

АМФ – аденозинмонофосфат

HSV – вирус простого герпеса

АТ – ангиотензин

ОПСС – общее периферическое сопротивление сосудов

NMDA - рецептор связывающий N-метил-D-аспартат

MAO – моноаминооксидаза

ССК – холецистокининовый рецептор

ЦНС – центральная нервная система

DOS - diversity-oriented synthesis (концепция синтеза ориентированного разнообразия на основе привилегированных структур)

MCRs – многокомпонентные реакции

U-4CR – четырехкомпонентная реакция Уги

РНК – рибонуклеиновая кислота

SAR - Structure-Activity Relationship (зависимость структура-активность)

hNET – переносчик норадреналина человека

hSERT – переносчик серотонина человека

hDAT – переносчик дофамина человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances (программа компьютерного прогноза)

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт

ЛП – латентный период

ПЭП – пролинэндопептидазы

ГПП – глюкагоноподобный пептид

ВИ – величина ингибирования

ДОФА – диоксифенилаланин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берестовицкая, В. М. / Сопряженные нитроалкиены как перспективные реагенты для синтеза биологически активных веществ и создания лекарственных средств // Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии. – 2014. - С.18
2. Бобров, А. Е. Бензодиазепиновая проблема: о чем свидетельствует опыт применения тофизопама (Грандаксина) / А.Е. Бобров, Е.Г. Старостина, Е.Н. Мошняга // Клиника и терапия психических расстройств. - 2012. - 4. - С. 19-25.
3. Воронина, Т. А. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2005. – С. 277-295.
4. Галенко-Ярошевский, А. П. Производные имидазо[1,2-а]бензимидазола как новый класс местноанестезирующих веществ : автореферат дис. ... доктора медицинских наук: 14.00.25 / Галенко-Ярошевский Александр Павлович; [Место защиты: Всерос. науч. центр по безопасности биол. актив. веществ]. - Старая Купавна, 2009. - 51 с.
5. Галенко-Ярошевский, П. А. Производные бензимидазола: местноанестезирующие свойства, механизмы действия, перспективы использования в офтальмологии / П.А. Галенко-Ярошевский, А.П. Галенко-Ярошевский [и др.] // под редакцией П.А. Галенко-Ярошевского. – Краснодар: Просвещение-Юг. – 2015. – 781 с.
6. Городничев, А. В. Место феназепама в современном применении бензодиазепиновых транквилизаторов / А.В. Городничев, Е.Г. Костюкова // Современная терапия психических расстройств. – 2011. – 2. – С. 26-29.
7. Гудашева, Т. А. Стратегия создания дипептидных лекарств / Т.А. Гудашева // Вестн. Рос. акад. мед. наук. - 2011. - Т.7. - С. 8-15.
8. Гурович, И. Я. Купирующая терапия атипичными антипсихотиками больных с впервые возникшими психотическими состояниями / И.Я. Гурович,

А.Б. Шмуклер // Социальная и клиническая психиатрия. – 2011. - Т.21, №4. – С. 51-57.

9. Дедов, И. И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой (8-й выпуск) // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, №. 1S.

10. Дедов, И.И. Сахарный диабет: развитие технологий в диагностике, лечении и профилактике (пленарная лекция) // Сахарный диабет. - 2010. - 3. - С. 6-13.

11. Депрессия в клинике внутренних болезней: тактика терапевта: тезисы докладов X Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство». Москва, 20 апреля 2004 г.

12. Золотов, Н. Н. Активность пролинспецифических ферментов у больных с тревожными расстройствами и ее изменения при терапии феназепамом / Н.Н. Золотов, Т.С. Сюняков, О.А. Дорофеева [и др.] // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2012. – Т. 14, №. 6. – С. 4-7.

13. Иванникова, Е.В., Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм/ В.П. Жердев, С.С. Бойко, Е.В. Блынская [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2013. - 2. С. 1-17

14. Калитин, К. Поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных бензимидазола / К. Калитин // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград, сентябрь 2012). - 2012. - Т. Приложение, № б/н. - С. 179.

15. Киселев, А. В. Влияние сочетания местнообезболивающего вещества РУ-1117 с визитоном-ПЭГ на ультраструктуру эндотелия роговицы при переднекамерной анестезии глаза / А.В. Киселев, П.А. Галенко-Ярошевский, С.Н. Сахнов [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – 4 (48). – С. 39-43.

16. Колюцкая, Е.В. Терапия соматизированной тревоги: опыт применения препарата Афобазол (обзор литературы) / Е.В. Колюцкая // Психические расстройства в общей медицине. – 2013. – 2. – С. 22-25.
17. Кост Н. В. Нейропептиды в регуляции тревоги / Н.В. Кост, В. К. Мешавкин, А. А. Зозуля // Психиатрия. – 2010. – 4. – С. 64-75.
18. Мишень-ориентированный поиск антидиабетических средств / Д.А. Алешин [и др.]; под. ред. А.А. Спасова, В.И. Петрова – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – С.232.
19. Озеров А. А. Пиримидиновые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1—история разработки и перспективы / А.А. Озеров, М.С. Новиков, Ю.А. Тимофеева [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – 3 (43). – С. 10-17.
20. Незнамов, Г.Г. Активность пролинспецифических ферментов пролилэндопептидазы и дипептидилпептидазы-4 у больных с разной структурой тревожных расстройств при терапии Афобазолом / Г.Г. Незнамов, Н.Н. Золотов, Т.С. Сюняков [и др.] // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2014. – Т. 16, №. 1. – С. 16-22.
21. Разумная, Ф. Г. К фармакологии афобазола / Ф.Г. Разумная, Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – 7-4. – С. 848-855.
22. Разумная, Ф.Г. Афобазол подавляет функциональную активность Т-лимфоцитов в системе *in vitro* / Ф.Г. Разумная, М.Х. Салимгареева, Р.С. Ямиданов [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2012. – 4. – С. 45-49.
23. Семьянов, А. В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия / А.В. Семьянов // Нейрофизиология. – 2002. – Т. 34, №. 1. – С. 82-92.
24. Середенин, С. Б. К механизму противоишемического действия препарата "афобазол" / С.Б. Середенин, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №. 6. – С. 723-727.

25. Середенин, С. Б. Создание новых анксиолитиков с позиций мультифакториального контроля тревожных реакций / С.Б. Середенин // Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 7, №. 4. – С. 2-1944.
26. Середенин, С. Б. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола (реферат) / С.Б. Середенин, М.В. Воронин // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2013. – Т. 15, №. 1. – С. 59-61.
27. Середенин, С. Б. Современная фармакотерапия эмоционально-стрессовых расстройств / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8, №. 3. – С. 32-40.
28. Силкина, И. В. ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного и нейропротекторного эффектов афобазола и пикамилона / И.В. Силкина, Т.С. Ганьшина, С.Б. Середенин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, №. 1. – С. 20-24.
29. Соловьева, И.К. Анксиолитики: вчера, сегодня, завтра/ И.К. Соловьева // Русский медицинский журнал. – 2006. – Т. 14, №. 5. С.1-5.
30. Спасов, А. А. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40, №. 11. – С. 23-26.
31. Спасов, А. А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А. Спасов, В.И. Петров, Н.И. Чепляева [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68, №. 2. – С. 43-48.
32. Спасов, А. А. 5-НТ3-рецепторы - мишень для воздействия биологически активных соединений (обзор) / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, №. 8. – С. 3-8.
33. Спасов, А. А. P2Y₁-рецепторы и их влияние на процессы агрегации тромбоцитов / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11, №. 3. – С. 4-11.

34. Таран, А. С. Методы оценки дипептидилпептидаза-4 ингибирующей активности *in vitro* / А.С. Таран, Н.И. Чепляева // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – 1 (41). – С. 26-29.

35. Турилова, А. И. Антиаритмические свойства афобазола и других производных 2-меркаптобензимидазола / А.И. Турилова, Т.Я. Можаяева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, №. 5. – С. 8-11.

36. Тюренков, И. Н. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, №. 1. – С. 101-109.

37. Тюренков, И.Н. Изучение ГАМК-ергических механизмов нейропсихотропного действия нейрoглутамата / И.Н. Тюренков, В.В. Багметова, А.И. Робертус [и др.] // Нейрохимия. – 2015. – Т. 32, № 2. - С.140-152.

38. Успенский, Ю.П. Тревожные расстройства и их коррекция в гастроэнтерологической практике / Ю.П. Успенский, Е.В. Балукoва // *Consilium Medicum*. – 2008. - 08. – С. 102-105.

39. Фаттахoв, Ш.А. Направленный синтез N-сoдержащих производных фосфорилуксусных кислот, обладающих биологической активностью: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Ш.А. Фаттахoв. - Казань: КГТУ. – 2010.

40. Филимонов, Д. А. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE / Д.А. Филимонов, А.А. Лагунин, Т.А. Глоризова [и др.] // Химия гетероциклических соединений. – 2014. – 3. – С. 483-499.

41. Хабиров, Ф.А. Клинико-нейрофизиологическая оценка эффективности применения мексидола в лечении тревожных расстройств у больных рассеянным склерозом хронической ишемией головного мозга / Ф.А. Хабиров, Т.И. Хайбуллин, Н.Н. Бабичева [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2012. – Т. Приложение, № 1. - С. 6-10.

42. Хазиахметова, В. Н. Сравнительное изучение анальгетической активности отечественного анксиолитика дневного действия мебикара с amitриптилином и

дiazепамом (экспериментальное исследование) / В.Н. Хазиахметова, К.В. Лучай, Л.Е. Зиганшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №. 3. – С. 9-12.

43. Чепляева, Н. И. Поиск корректоров метаболических нарушений при сахарном диабете 2-го типа среди 5-замещенных бензимидазолов, содержащих во втором положении циклическую алкиламиногруппу / Н.И. Чепляева, В.А. Кузнецова, А.А. Спасов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – 3 (43). – С. 21-24.

44. Черников, М. В. Анализ функционально значимых структурных фрагментов веществ с гистаминергической активностью / М.В. Черников, А.А. Спасов, П.М. Васильев // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2010. – 2 (26). – С. 23-25.

45. Черников, М.В. P2Y-антагонистическая активность производных бензимидазола / М.В. Черников, А.А. Спасов // в книге: P2Y1-Рецепторы. Молекулярно- биологические, химические и фармакологические аспекты. под редакцией А.А. Спасова. - Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, Deutschland. – 2013. -С. 33-58

46. Шайкенов, Т. Е. Влияние арглабина на индукцию апоптоза опухолевых клеток и ингибирование фарнезилтрансферазы как возможный механизм действия / Т.Е. Шайкенов, Ф.Л. Бейкер, Л. Вульфенбаргер [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, №. 2. – С. 18-23.

47. Шамхалова, М. Ш. Новые перспективы терапии пациентов с сахарным диабетом 2 типа / М.Ш. Шамхалова, Н.П. Трубицина, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2012. – 4. – С. 109-114.

48. Яркова, М. А. Анализ связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМКА рецептора у мышей C57BL/6 и BALB/c при введении анксиолитиков / М.А. Яркова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, №. 8. – С. 3-7.

49. Яркова, Н. А. Место сахарного диабета 2-го типа в структуре причин развития хронической болезни почек по данным регионального регистра

Нижегородской области / Н.А. Яркова, Н.Н. Боровков, Е.Н. Соловьянова // Медицинский альманах. – 2017. – 1 (46). – С. 103-106.

50. Aastha, P. 1, 5 Benzodiazepines: overview of properties and synthetic aspects / P. Aastha, K. Navneet, A. Anshu [et al.] // Research Journal of Chemical Sciences. – 2013. – 3(7). - P. 90-103

51. Abu-Hashem, A.A. Synthesis, reactions and biological activities of furochromones: A review / A. A. Abu-Hashem, M. El-Shazly // European journal of medicinal chemistry. – 2015. – 90. – P. 633-665.

52. Ahmad, A. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy/ A. Ahmad, B. Biersack, Y. Li, D. Kong [et al.] //Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2013. – T. 13, №. 7. – P. 1002-1013.

53. Albuquerque, J. Participation of adenylyl cyclase/cAMP pathway in vasorelaxant mechanism of the pyranocoumarin Braylin in mesenteric artery / J. Albuquerque, W. Santos, R. Jesus [et al.] //The FASEB Journal. – 2016. – T. 30, №. 1 Supplement. – P. 1201-10.

54. Ali, S. Chemistry and biology of indoles and indazoles: a mini-review / S. Ali, N. Ali, B. Ahmad Dar [et al.] //Mini reviews in medicinal chemistry. – 2013. – T. 13, №. 12. – P. 1792-1800.

55. Anandarajagopal, K. et al. 2-Mercaptobenzimidazole derivatives: synthesis and anticonvulsant activity / K. Anandarajagopal, R.N. Tiwari, K.G. Bothara [et al.] // Adv Appl Sci Res. – 2010. – T. 1, №. 2. – P. 132-138.

56. Andrić, D. Synthesis, binding properties and receptor docking of 4-halo-6-[2-(4-arylpiperazin-1-yl) ethyl]-1H-benzimidazoles, mixed ligands of D 2 and 5-HT 1A receptors / D. Andrić, G. Roglić, V. Šukalović // European journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 43, №. 8. – P. 1696-1705.

57. Arora, R. K. Novel coumarin–benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents / R.K. Arora, N. Kaur, Y. Bansal //Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2014. – T. 4, №. 5. – P. 368-375.

58. Asif, M. Antipsychotic agents: pharmacological activities of compounds containing arylpiperazines / M. Asif // *International Journal of Current Research in Applied Chemistry & Chemical Engineering*. – 2016. – T. 2, №. 1. – P. 1-30.
59. Bansal, Y. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review / Y. Bansal, O. Silakari // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2012. – T. 20, №. 21. – P. 6208-6236.
60. Barber, D. M. Optical control of AMPA receptors using a photoswitchable quinoxaline-2, 3-dione antagonist / D.M. Barber, S.A. Liu, K. Gottschling [et al.] // *Chemical Science*. – 2017. – T. 8, №. 1. – P. 611-615.
61. Bariwal, J. B. 1, 5-Benzothiazepine, a versatile pharmacophore: a review / J.B. Bariwal, K.D. Upadhyay, A.T. Trivedi [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2008. – T. 43. – №. 11. – P. 2279-2290.
62. Behrami, A. Antibacterial activity of coumarin derivatives synthesized from hydroxy-4-2H-[1]-Benzopyran-2-one. The comparison with standard drug / A. Behrami, K. Vaso, I. Krasniqi // – 2016. – P. 247-252.
63. Blankson, G. A. Structure-activity studies on bacterial efflux inhibitors: Doctoral dissertation, Rutgers University-Graduate School-New Brunswick. - 2016.
64. Bongarzone, S. The concept of privileged structures in rational drug design: focus on acridine and quinoline scaffolds in neurodegenerative and protozoan diseases / S. Bongarzone, M.L. Bolognesi // *Expert opinion on drug discovery*. – 2011. – T. 6, №. 3. – P. 251-268.
65. Borza, I. Benzimidazole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists / I. Borza, S. Kolok, A. Gere [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2006. – T. 16, №. 17. – P. 4638-4640.
66. Bostwick, J. R. Benzodiazepines: A versatile clinical tool; evidence supports their use for alcohol withdrawal, insomnia, anxiety disorders, and other conditions / J. R. Bostwick, M. I. Casher, S. Yasugi // *Current Psychiatry*. – 2012. – T. 11, №. 4. – P. 54.
67. Chaubey, A. Pyridine: a versatile nucleuse in pharmaceutical field / A. Chaubey, S. N. Pandeya // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* – 2011. – T. 4, №. 4. – P. 5-8.

68. Chen, L. H. A novel mechanistic study on ultrasound-assisted, one-pot Synthesis of functionalized benzimidazo [2, 1-b] quinazolin-1 (1 H)-ones / L.H. Chen, T.W. Chung, B.D. Narhe [et al.] // ACS combinatorial science. – 2016. – T. 18, №. 3. – P. 162-169.
69. Chen, L. H. Divergent synthesis of unsymmetrical annulated biheterocyclic compound libraries: benzimidazole linked indolo-benzodiazepines/quinoxaline / L.H. Chen, C.M. Chang, D.B. Salunke [et al.] // ACS combinatorial science. – 2011. – T. 13, №. 4. – P. 391-398.
70. Chen, Y. Discovery of novel 1, 5-benzodiazepine-2, 4-dione derivatives as potential anticancer agents / Y. Chen, V. Le, X. Xu [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2014. – T. 24, №. 16. – P. 3948-3951.
71. Chen, Z. Z. Efficient method for the synthesis of fused benzimidazole–imidazoles via deprotection and cyclization reactions / Z.Z. Chen, S.Q. Li, W.L. Liao [et al.] // Tetrahedron. – 2015. – T. 71, №. 44. – P. 8424-8427.
72. Civiello, R. L. Synthesis and SAR of calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonists containing substituted aryl-piperazines and piperidines / R.L. Civiello, X. Han, B.R. Beno [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2016. – T. 26, №. 4. – P. 1229-1232.
73. Cole, D. C. Benzimidazole-and indole-substituted 1, 3'-bipyrrolidine benzamides as histamine H 3 receptor antagonists / D.C. Cole, J.L. Gross, T.A. Comery [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2010. – T. 20, №. 3. – P. 1237-1240.
74. de la Fuente, T. Benzimidazole derivatives as new serotonin 5-HT₆ receptor antagonists. Molecular mechanisms of receptor inactivation / T. de la Fuente, M. Martin-Fontecha, J. Sallander [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 2010. – T. 53, №. 3. – P. 1357-1369.
75. Desai, A. J. Molecular mechanism of action of triazolobenzodiazepinone agonists of the type 1 cholecystokinin receptor. Possible cooperativity across the receptor homo-dimeric complex / A.J. Desai, P.C. Lam, A. Orry [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 2015. – T. 58, №. 24. – P. 9562.

76. DeSimone, R. W. Privileged structures: applications in drug discovery / R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell [et al.] // *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. – 2004. – T. 7, №. 5. – P. 473-493.

77. Di Giovanni, G. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence / G. Di Giovanni, V. Di Matteo, M. Pierucci, E. Esposito // *Prog. Brain Res.* – 2008. – 172. – P. 45-71.

78. Digwal, C. S. VOSO 4 catalyzed highly efficient synthesis of benzimidazoles, benzothiazoles, and quinoxalines / C.S. Digwal, U. Yadav, A.P. Sakla [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2016. – T. 57, №. 36. – P. 4012-4016.

79. Do, C. V. Synthesis and biological evaluation of thiophene and benzo [b] thiophene analogs of combretastatin A-4 and isocombretastatin A-4: A comparison between the linkage positions of the 3, 4, 5-trimethoxystyrene unit / C.V. Do, A. Faouzi, C. Barette [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2016. – T. 26, №. 1. – P. 174-180.

80. 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.M. Fraga // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2007. – T. 7, №. 11. – P. 1108-1119.

81. Eleftheriadis, N. One-pot microwave assisted synthesis of new 2-alkoxycarbonylmethylene-4-oxo-1, 5-benzo-, naphtho-, and pyridodiazepines and assessment of their cytogenetic activity / N. Eleftheriadis, C.G. Tsoleridis, J. Stephanidou-Stephanatou [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2013. – 67. – P. 302-309.

82. El-Feky, S. A. H. Synthesis, molecular docking and anti-inflammatory screening of novel quinoline incorporated pyrazole derivatives using the Pfitzinger reaction II / S.A.H. El-Feky, Z.K.A. El-Samii, N.A. Osman [et al.] // *Bioorganic chemistry*. – 2015. – 58. – P. 104-116.

83. Evans, C. W. Benzimidazole analogs inhibit respiratory syncytial virus G protein function / C.W. Evans, C. Atkins, A. Pathak [et al.] // *Antiviral research*. – 2015. – 121. – P. 31-38.

84. Fernandes, J. P. S. Molecular modeling and QSAR studies of a set of indole and benzimidazole derivatives as H4 receptor antagonists / J.P.S. Fernandes, K.F.M. Pasqualoto, E.I. Ferreira // *Journal of molecular modeling*. – 2011. – T. 17, №. 5. – P. 921-928.
85. Gaba, M. Benzimidazole derivatives: search for GI-friendly anti-inflammatory analgesic agents / M. Gaba, P. Gaba, D. Uppal [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2015. – T. 5, №. 4. – P. 337-342.
86. Gaba, M. Benzimidazole: An emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents / M. Gaba, S. Singh, C. Mohan // *European journal of medicinal chemistry*. – 2014. – 76. – P. 494-505.
87. Garuti, L. Benzimidazole derivatives as kinase inhibitors / L. Garuti, M. Roberti, G. Bottegoni // *Current medicinal chemistry*. – 2014. – T. 21, №. 20. – P. 2284-2298.
88. Ghandi, M. A novel isocyanide-based three-component synthesis of benzimidazo [1, 2-a][1, 4] diazepinones / M. Ghandi, N. Zarezadeh, A. Taheri // *Tetrahedron Letters*. – 2011. – T. 52, №. 11. – P. 1228-1232.
89. Gil, C. Solid-phase synthesis of biologically active benzoannelated nitrogen heterocycles: an update / C. Gil, S. Bräse // *Journal of combinatorial chemistry*. – 2008. – T. 11, №. 2. – P. 175-197.
90. Gonca, E. Antiarrhythmic activity of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mitochondrial ATP dependent potassium channels / E. Gonca, S. Rapposelli, F. Darici [et al.] // *Archives of pharmacal research*. – 2016. – T. 39, №. 9. – P. 1212-1222.
91. González-Vera, J. A. A new serotonin 5-HT6 receptor antagonist with procognitive activity–Importance of a halogen bond interaction to stabilize the binding / J.A. González-Vera, R.A. Medina, M. Martin-Fontecha [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – 7. - P. 1-10.
92. Gunter, B. W. Benzodiazepine and neuroactive steroid combinations in rats: anxiolytic-like and discriminative stimulus effects / B.W. Gunter, S.A. Jones, I.A. Paul [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2016. – T. 233, №. 17. – P. 3237-3247.

93. Gupta, R. Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitor class for the treatment of Type 2 Diabetes / R. Gupta, S.S. Walunj, R.K. Tokala [et al.] // *Curr Drug Targets*. – 2009. – Vol. 10, № 1. – P. 71-87.

94. Gupta, S. Novel aryl piperazines for alleviation of ‘andropause’ associated prostatic disorders and depression / S. Gupta, D. Pandey, V. Sharma [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – 132. – P. 204-218.

95. Hamulakova, S. Targeting copper (II)-induced oxidative stress and the acetylcholinesterase system in Alzheimer's disease using multifunctional tacrine-coumarin hybrid molecules / S. Hamulakova, P. Poprac, K. Jomova [et al.] // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2016. – 161. – P. 52-62.

96. Hassan, M. Z. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents / M.Z. Hassan, H. Osman, M.A. Ali [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 123. – P. 236-255.

97. Hayashi, S. Discovery of 1-[1-(1-methylcyclooctyl)-4-piperidinyl]-2-[(3R)-3-piperidinyl]-1H-benzimidazole: Integrated drug-design and structure–Activity relationships for orally potent, metabolically stable and potential-risk reduced novel non-peptide nociceptin/Orphanin FQ receptor agonist as antianxiety drug / S. Hayashi, A. Hirao, H. Nakamura [et al.] // *Chemical biology & drug design*. – 2009. – T. 74, №. 4. – P. 369-381

98. Hayashi, T. Subcellular localization and intercellular dynamics of σ_1 receptors / T. Hayashi, T.P. Su // *Sigma Receptors*. – Springer US, 2007. – P. 151-164.

99. Hirashima, S. Benzimidazole derivatives bearing substituted biphenyls as hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: structure– activity relationship studies and identification of a potent and highly selective inhibitor JTK-109 / S. Hirashima, T. Suzuki, T. Ishida [et al.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2006. – T. 49, №. 15. – P. 4721-4736.

100. Hirokawa, Y. Synthesis and structure–activity relationships of 4-amino-5-chloro-N-(1, 4-dialkylhexahydro-1, 4-diazepin-6-yl)-2-methoxybenzamide derivatives, novel and potent serotonin 5-HT₃ and dopamine D₂ receptors dual antagonist / Y.

Hirokawa, H. Harada, T. Yoshikawa [et al.] // Chemical and pharmaceutical bulletin. – 2002. – T. 50, №. 7. – P. 941-959.

101.Horton, D. A. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures / D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe // Chemical Reviews. – 2003. – T. 103, №. 3. – P. 893-930.

102.Hranjec, M. Synthesis, crystal structure determination and antiproliferative activity of novel 2-amino-4-aryl-4, 10-dihydro [1, 3, 5] triazino [1, 2-a] benzimidazoles / M. Hranjec, G. Pavlović, G. Karminski-Zamola // Journal of molecular structure. – 2012. – 1007. – P. 242-251.

103.Hubbard, R. D. Development of multitargeted inhibitors of both the insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) and members of the epidermal growth factor family of receptor tyrosine kinases / R.D. Hubbard, N.Y. Bamaung, S.D. Fidanze [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2009. – T. 19, №. 6. – P. 1718-1721.

104.Ibrahim, M. K. Design, synthesis, molecular modeling and anti-hyperglycemic evaluation of novel quinoxaline derivatives as potential PPAR γ and SUR agonists / M.K. Ibrahim, I.H. Eissa, A.E. Abdallah [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2017. – T. 25, №. 4. – P. 1496-1513.

105.Ilango, S. S. Synthesis and antimicrobial activity of novel 1, 5-benzodiazepines / S. S. Ilango, P. U. Remya, S. Ponnuswamy // Indian Journal of Chemistry. – 2013. – 52. – P. 136-140.

106.Imamura, K. Discovery of novel and potent stearyl coenzyme a desaturase 1 (SCD1) inhibitors as anticancer agents / K. Imamura, N. Tomita, Y. Kawakita [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2017. – T. 25, №. 14. – P. 3768-3779.

107.Jabłoński, M. MS5-P4 Structure analysis of arylpiperazine derivatives displaying affinity towards 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors / M. Jabłoński, K. Rzęsikowska, J. Kalinowska-Tłuścik // Foundations of Crystallography. – 2016. – 72. – P. 205.

108.Jha, K. K. Microwave assisted synthesis, characterization & biological evaluation of benzimidazole substituted 1, 3, 4-oxadiazole / K.K. Jha, Y. Kumar, M. Shaharyar [et al.] // Int J ChemTech Res. – 2010. – 2. – P. 716-727.

109.Kankate, R. S. Design, synthesis and antifungal evaluation of novel benzimidazole tertiary amine type of fluconazole analogues / R. S. Kankate, P. S. Gide, D. P. Belsare // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2015. – P. 1-12.

110.Kaur, G. Benzimidazoles: an ideal privileged drug scaffold for the design of multitargeted anti-inflammatory ligands / G. Kaur, M. Kaur, O. Silakari // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2014. – T. 14, №. 9. – P. 747-767.

111.Kavetsou, E. Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity / E. Kavetsou, L. Gkionis, G. Galani [et al.] // *Medicinal Chemistry Research*. – 2017. – T. 4, №. 26. – P. 856-866.

112.Keller, M. Arylpiperidines as a new class of oxidosqualene cyclase inhibitors / M. Keller, A. Wolfgardt, C. Mueller [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 109. – P. 13-22.

113.Keri, R. S. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review / R.S. Keri, S. Budagumpi, R.K. Pai [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2014. – 78. – P. 340-374.

114.Keri, R. S. Comprehensive review in current developments of benzimidazole-based medicinal chemistry / R.S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi [et al.] // *Chemical biology & drug design*. – 2015. – T. 86, №. 1. – P. 19-65.

115.Khan, S. Attenuation of neuropathic pain and neuroinflammatory responses by a pyranocoumarin derivative, anomalin in animal and cellular models / S. Khan, R.J. Choi, J. Lee [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2016. – 774. – P. 95-104.

116.Khanam, H. Bioactive Benzofuran derivatives: A review / H. Khanam // *European journal of medicinal chemistry*. – 2015. – 97. – P. 483-504.

117.Khaskel, A. Benzyltrimethylammoniumfluoride hydrate: An efficient catalyst for one-pot synthesis of hantzsch 1, 4-dihydropyridines and their aromatization / A. Khaskel, P. Barman // *Heteroatom Chemistry*. – 2016. – T. 27, №. 2. – P. 114-120.

118. Krupina, N. A. Synthetic inhibitors of prolyl endopeptidase exhibit antidepressant-like effects in rat models of depressive syndrome and anxiety-depression

state / N.A. Krupina, N.N. Khlebnikova, N.N. Zolotov [et al.] // Nova Science Publishers, Inc. (USA); New York. – 2011.

119.Kumaraswamy, M. N. Synthesis of novel 2, 5-dihydro-1H-1, 5-benzodiazepines encompassing naphtho [2, 1-b] furan and evaluation of their pharmacological activities / M.N. Kumaraswamy, V.P. Vaidya, C. Chandrashekar [et al.] // International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. – 2013. – T. 3, №. 2. – P. 281-287.

120.Kurogi Y. Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using catalyst / Y. Kurogi, O. F. Guner // Current medicinal chemistry. – 2001. – T. 8, №. 9. – P. 1035-1055.

121.Leonova, E. New 1, 4-dihydropyridines down-regulate nitric oxide in animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus and protect deoxyribonucleic acid against peroxynitrite action / E. Leonova, J. Sokolovska, J. L. Boucher //Basic & clinical pharmacology & toxicology. – 2016. – T. 119, №. 1. – P. 19-31.

122.Lewis, D. Y. Assessment of [125 I] WYE-230949 as a novel histamine H 3 receptor radiopharmaceutical / D.Y. Lewis, S. Champion, D. Wyper [et al.] // PloS one. – 2014. – T. 9, №. 12. – P. e115876.

123.Li, Y. Discovery of benzimidazole derivatives as novel multi-target EGFR, VEGFR-2 and PDGFR kinase inhibitors / Y. Li, C. Tan, C. Gao [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2011. – T. 19, №. 15. – P. 4529-4535.

124.Liu, F. Structure-based optimization of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent transaminase enzyme (BioA) inhibitors that target biotin biosynthesis in mycobacterium tuberculosis / F. Liu, S. Dawadi, K.M. Maize [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – 60(13). – P.5507-5520.

125.Longo, L. Benzodiazepines–Side effects, abuse risk, and alternatives–Addiction part 1 / L. Longo, B. Johnson // American Family Physician. – 2000. – 61. – P. 2120-2130.

126.López-Rodríguez, M. L. Benzimidazole derivatives. Part 5: Design and synthesis of new benzimidazole–arylpiperazine derivatives acting as mixed 5-HT 1A/5-HT 3 ligands / M. L. López-Rodríguez, B. Benhamú, M. J. Morcillo // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2004. – T. 12, №. 19. – P. 5181-5191.

127.Madhavi, S. Synthesis of chalcone incorporated quinazoline derivatives as anticancer agents / S. Madhavi, R. Sreenivasulu, J.P. Yazala [et al.] // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2017. – T. 25, №. 2. – P. 275-279.

128.Maltsev, D.V. Anxiolytic action of a new 5-HT_{2A} antagonist RU-476 / D.V. Maltsev, D.S. Yakovlev, D.G. Matokhin // European neuropsychopharmacology. – 2013. - 23. – P. 2.

129.Mammoli, V. A novel class of dopamine D₄ receptor ligands bearing an imidazoline nucleus / V. Mammoli, A. Bonifazi, D. Dal Ben [et al.] // ChemMedChem. – 2016. – T. 11, №. 16. – P. 1819-1828.

130.Maurice, T. Cognitive effects of σ receptor ligands / T. Maurice // Sigma Receptors. – Springer US, 2007. – P. 237-271.

131.Mavrova, A. T. Design, synthesis and antiproliferative properties of some new 5-substituted-2-iminobenzimidazole derivatives / A.T. Mavrova, D. Wesselinova, N. Vassilev [et al.] // European journal of medicinal chemistry. – 2013. – 63. – P. 696-701.

132.Me, M. O. N. H. N. M. 4.8 Biological activity of imidazo [1, 5-a]-and imidazo [1, 2-a] quinoxalines / M.O.N.H.N.M. Me, H. Me // Quinoxalines: Synthesis, Reactions, Mechanisms and Structure. – 2016.

133.Meanwell, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design / N. A. Meanwell // Journal of medicinal chemistry. – 2011. – T. 54, №. 8. – P. 2529-2591.

134.Mitra, S. Efficient synthesis of imidazole-fused benzodiazepines using palladium-catalyzed intramolecular C–N bond formation reaction / S. Mitra, H. Darira, P. Chattopadhyay // Synthesis. – 2013. – T. 45, №. 01. – P. 85-92.

135.Mohammed, A. F. Design, synthesis and molecular docking of some new 1, 2, 4-triazolobenzimidazol-3-yl acetohydrazide derivatives with anti-inflammatory-analgesic activities / A. F. Mohammed, S. G. Abdel-Moty, M. A. Hussein // Archives of pharmacal research. – 2013. – T. 36, №. 12. – P. 1465-1479.

136.Mor, M. Synthesis, biological activity, QSAR and QSPR study of 2-aminobenzimidazole derivatives as potent H₃-antagonists / M. Mor, F. Bordi, C. Silva [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2004. – T. 12, №. 4. – P. 663-674.

137.Murayama, T. Anti-cytomegalovirus effects of tricliniric acid are dependent on CXCL11 / T. Murayama, Y. Li, T. Takahashi [et al.] // *Microbes and infection*. – 2012. – T. 14, №. 12. – P. 1086-1092.

138.Nagamallu, R. Synthesis of novel coumarin appended bis (formylpyrazole) derivatives: Studies on their antimicrobial and antioxidant activities / R. Nagamallu, B. Srinivasan, M. B. Ningappa // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2016. – T. 26, №. 2. – P. 690-694.

139.Nair, N. P. In-silico docking studies of coumarin derivatives as caspase 8 and PDE4 antagonist / N. P. Nair, J. Joy, S. S. Kumar // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2016. – T. 9, №. 12. – P. 2199-2204.

140.Narasimhan, B. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety / B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar // *Medicinal Chemistry Research*. – 2012. – T. 21, №. 3. – P. 269-283.

141.Newman, A. H. Medicinal chemistry: New chemical classes and subtype-selective ligands / A. H. Newman, A. Coop // *Sigma Receptors*. – Springer US, 2007. – P. 25-44.

142.Nikalje, A. P. G. GABA modulating agents: a brief review / A. P. G. Nikalje, M. Ghodke, A. Girbane // *Asian Journal of Biological Sciences*. – 2011. – T. 4, №. 3. – P. 201-220.

143.Nikas, P. Modulation of native GABA A receptor activity by triazolone 1, 5-benzodiazepines / P. Nikas, E. Gatta, A. Cupello // *Neuroscience*. – 2013. – 243. – P. 158-164.

144.Nowicka, A. Syntezy wybranych leków pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu / A. Nowicka, W. P. Nawrocka // *Wiadomości Chemiczne*. – 2013. – 67, 7-8. – P. 695-714.

145.Onawole, A. T. Conformational, vibrational and DFT studies of a newly synthesized arylpiperazine-based drug and evaluation of its reactivity towards the human GABA receptor / A. T. Onawole, A. F. Al-Ahmadi, Y. S Mary [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2017. – 1147. P. 266-280.

146.Ortiz, A. M. Sa1346 Clinical experience and cardiovascular safety profile of domperidone therapy for nausea and vomiting / A. M. Ortiz, C. J. Cooper, Y. Gomez [et al.] // *Gastroenterology*. – 2014. – T. 146, №. 5. – P. S-268.

147.Owen, O. E. Mebendazole and insulin secretion from isolated rat islets / O. E. Owen, R. H. Smith, S. Caprio [et al.] // *Metabolism*. – 1985. – T. 34, №. 6. – P. 567-570.

148.Patel, S. B. Design, synthesis and anti-HIV activity of novel quinoxaline derivatives / S. B. Patel, B. D. Patel, C. Pannecouque [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 117. – P. 230-240.

149.Pereira, C. A. J. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro / C. A. Pereira, L. L. Oliveira, A. L. Coaglio [et al.] // *Veterinary Parasitology*. – 2016. – 228. – P. 160-166.

150.Phillips, S. T. Binding of 5H-dibenzo [b, e][1, 4] diazepine and chiral 5H-dibenzo [a, d] cycloheptene analogs of clozapine to dopamine and serotonin receptors / S. T. Phillips, T. de Paulis, B. M. Baron // *Journal of medicinal chemistry*. – 1994. – T. 37, №. 17. – P. 2686-2696.

151.Pinheiro, L. C. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction / L. C. Pinheiro, G. H. Oliveira-Paula, R. L. Portella [et al.] // *Redox Biology*. – 2016. – 9. – P. 134-143.

152.Pires, A. R. A. New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2 / A. D. R. A. Pires, F. Lecerf-Schmidt, N. Guragossian [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 122. – P. 291-301.

153.Polanski, J. Privileged structures - dream or reality: preferential organization of azanaphthalene scaffold / J. Polanski, A. Kurczyk, A. Bak // *Curr Med Chem*. – 2012. - 19(13). - P.1921-1945.

154.Ramakrishna, K. Influence of A1, 3 strain on the stereochemical outcome of acid-mediated amido cyclization in the synthesis of 2-(4-methoxyphenyl)-3, 4-(dihydroxy) piperidines / K. Ramakrishna, Y. Jagadeesh, K. V. Ramakrishna [et al.] // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2016. – T. 2016, №. 9. – P. 1693-1701.

155.Ravula, S. B. Lead optimization of 2-(piperidin-3-yl)-1H-benzimidazoles: Identification of 2-morpholin-and 2-thiomorpholin-2-yl-1H-benzimidazoles as selective and CNS penetrating H₁-antihistamines for insomnia / S. B. Ravula, J. Yu, J. A. Tran [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – T. 22, №. 1. – P. 421-426.

156.Reis, J. Chromone as a privileged scaffold in drug discovery–recent advances / J. Reis, A. Gaspar, N. Milhazes [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017.

157.Rivara, M. Synthesis and biological evaluation of new non-imidazole H₃-receptor antagonists of the 2-aminobenzimidazole series / M. Rivara, V. Zuliani, G. Cocconcelli [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2006. – T. 14, №. 5. – P. 1413-1424.

158.Rizzati, V. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature / V. Rizzati, O. Briand, H. Guillou [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2016. – 254. – P. 231-246.

159.Saadeh, H. A. Design, synthesis and biological evaluation of potent antioxidant 1-(2, 5-dimethoxybenzyl)-4-arylpiperazines and N-azolyl substituted 2-(4-arylpiperazin-1-yl) / H. A. Saadeh, M. A. Khasawneh, A. Samadi [et al.] // *ChemistrySelect*. – 2017. – T. 2, №. 13. – P. 3854-3859.

160.Shalini, K. Imidazole and its biological activities: A review / K. Shalini, P. K. Sharma, N. Kumar // *Der Chemica Sinica*. – 2010. – T. 1, №. 3. – P. 36-47.

161.Sharma, M. C. 3D QSAR kNN-MFA studies on 6-substituted benzimidazoles derivatives as nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: A rational approach to antihypertensive agents / M. C. Sharma, S. Sharma, N. K. Sahu // *Journal of Saudi Chemical Society*. – 2013. – T. 17, №. 2. – P. 167-176.

162.Silva, R. O. Synthesis and structure–activity relationships of novel arylpiperazines as potent antagonists of α ₁-adrenoceptor / R. O. Silva, A.S. de Oliveira, L.F.N. Lemes [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 122. – P. 601-610.

163.Singh, S. Synthesis of 3, 5-dihydroxy-7, 8-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl) benzopyran-4-one derivatives as anticancer agents / S. Singh, A. Ahmad, D.S.

Raghuvanshi // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2016. – T. 26, №. 21. – P. 5322-5327.

164.Siracusa, M.A. Synthesis of new arylpiperazinylalkylthiobenzimidazole, benzothiazole, or benzoxazole derivatives as potent and selective 5-HT_{1A} serotonin receptor ligands / M.A. Siracusa, L. Salerno, M.N. Modica [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 51, №. 15. – P. 4529-4538.

165.Song, P. P. Evaluation of antifungal activities and structure–activity relationships of coumarin derivatives / P. P. Song, J. Zhao, Z.L. Liu // Pest management science. – 2017. – T. 73, №. 1. – P. 94-101.

166.Song, Y.L. Ionic liquid catalyzed synthesis of 2-(indole-3-yl)-thiochroman-4-ones and their novel antifungal activities / Y.L. Song, F. Wu, C.C. Zhang [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2015. – T. 25, №. 2. – P. 259-261.

167.StameniĆ, T. T. Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABA A receptors containing the $\alpha 5$ subunit / T.T. StameniĆ, M.M. Poe, S. Rehman // European Journal of Pharmacology. – 2016. – 791. – P. 433-443.

168.Sugiyama, T. New 2-(2-Phenylethyl) chromone derivatives and inhibitors of phosphodiesterase (PDE) 3A from agarwood / T. Sugiyama, Y. Narukawa, S. Shibata [et al.] // Natural product communications. – 2016. – T. 11, №. 6. – P. 795-797.

169.Szabo, M. Structure–activity relationships of privileged structures lead to the discovery of novel biased ligands at the dopamine D₂ receptor / M. Szabo, C. Klein Herenbrink, A. Christopoulos [et al.] // Journal of medicinal chemistry. – 2014. – T. 57, №. 11. – P. 4924-4939.

170.Tinoco, A. D. Investigating endogenous peptides and peptidases using peptidomics / A. D. Tinoco, A. Saghatelian // Biochemistry. – 2011. – T. 50, №. 35. – P. 7447-7461.

171.Tomić, M. Pharmacological evaluation of halogenated and non-halogenated arylpiperazin-1-yl-ethyl-benzimidazoles as D₂ and 5-HT_{2A} receptor ligands / M. Tomić, D. Vasković, G. Tovilović [et al.] // Archiv der Pharmazie. – 2011. – T. 344, №. 5. – P. 287-291.

172. Tseng, C. H. Discovery of indeno [1, 2-b] quinoxaline derivatives as potential anticancer agents / C.H. Tseng, Y.R. Chen, C.C. Tzeng [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2016. – 108. – P. 258-273.

173. Verma, G. A review exploring biological activities of hydrazones / G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman // *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. – 2014. – T. 6, №. 2. – P. 69.

174. Wallace, B. M. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors / B.M. Wallace, J. Feng, Z. Zhang // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – 18. – P. 2362-2367.

175. Wang, A. L., Iadecola C., Wang G. New generations of dihydropyridines for treatment of hypertension / A.L. Wang, C. Iadecola, G. Wang // *Journal of geriatric cardiology: JGC*. – 2017. – T. 14, №. 1. – P. 67.

176. Wang, D. Design, synthesis, and biological evaluation of a new series of biphenyl/bibenzyl derivatives functioning as dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / D.M. Wang, B. Feng, H. Fu // *Molecules*. – 2017. – T. 22, №. 1. – P. 172.

177. Welsch, M.E. Privileged scaffolds for library design and drug discovery / M.E. Welsch, S.A. Snyder, B.R. Stockwell // *Current opinion in chemical biology*. – 2010. – T. 14, №. 3. – P. 347-361.

178. Werling, L.L. Modulation of classical neurotransmitter systems by σ receptors / L.L. Werling, A.E. Derbez, S.J. Nuwayhid [et al.] // *Sigma Receptors*. – Springer US, 2007. – P. 195-214.

179. Xia, H.M. Hepatoprotective pyranocoumarins from the stems of *Clausena emarginata* / H.M. Xia, C.J. Li, J.Z. Yang [et al.] // *Phytochemistry*. – 2016. – 130. – P. 238-243.

180. Xiu, C. Novel benzopyran derivatives and their therapeutic applications: a patent review (2009–2016) / C. Xiu, Z. Hua, B.S. Xiao [et al.] // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2017. – 27(9). – P. 1-15.

181.Xu, L. Binding mechanisms of 1, 4-dihydropyridine derivatives to L-type calcium channel $Ca_v 1.2$: a molecular modeling study / L. Xu, D. Li, L. Tao [et al.] // *Molecular BioSystems*. – 2016. – T. 12, №. 2. – P. 379-390.

182.Yakovlev, D. Anxiolytic profile of 5-HT₃-antagonist RU 1204 versus tropisetron and diazepam / D. Yakovlev, N. Kolobrodova, A. Spasov // *European neuropsychopharmacology*. – 2011. - 21. – P.2.

183.Yang, C. Discovery of benzimidazole oxazolidinediones as novel and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists / C. Yang, J. Balsells, H.D. Chu [et al.] // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2015. – T. 6, №. 4. – P. 461-465.

184.Zayed, M. F. Synthesis, modelling, and anticonvulsant studies of new quinazolines showing three highly active compounds with low toxicity and high affinity to the GABA-A receptor / M.F. Zayed, S.K. Ihmaid, H.E. Ahmed [et al.] // *Molecules*. – 2017. – T. 22, №. 2. – P. 188.

185.Zhang, M. Z. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents / M.Z. Zhang, Q. Chen, G.F. Yang // *European journal of medicinal chemistry*. – 2015. – 89. – P. 421-441.

186.Zhang, P. 1-or 3-(3-Amino-2-hydroxy-1-phenyl propyl)-1, 3-dihydro-2 H-benzimidazol-2-ones: Potent, Selective, and Orally Efficacious Norepinephrine Reuptake Inhibitors / P. Zhang, E.A. Terefenko, J. Bray [et al.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2009. – T. 52, №. 18. – P. 5703-5711.

187.Zhang, R. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na^+/H^+ exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury / R. Zhang, L. Lei, Y.G. Xu [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2007. – T. 17, №. 9. – P. 2430-2433.

188.Zhang, Y. Pentafluorosulfanyl-substituted benzopyran analogues as new cyclooxygenase-2 inhibitors with excellent pharmacokinetics and efficacy in blocking inflammation / Y. Zhang, Y. Wang, C. He [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – 60(10). – P.4135.

189.Zhang, Z. Benzoylbenzimidazole-based selective inhibitors targeting *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase-1 /

Z. Zhang, K.K. Ojo, S.M. Johnson [et al.] //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – T. 22, №. 16. – P. 5264-5267.

190.Zhu, Z. GYF-17, a chloride substituted 2-(2-phenethyl)-chromone, suppresses LPS-induced inflammatory mediator production in RAW264. 7 cells by inhibiting STAT1/3 and ERK1/2 signaling pathways / Z. Zhu, Y. Gu, Y. Zhao [et al.] // International immunopharmacology. – 2016. – 35. – P. 185-192.