

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

На правах рукописи

Калитин Константин Юрьевич

**ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПАРАГАЛОГЕНФЕНИЛ
ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель
Академик РАН,
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор А.А. Спасов

Научный консультант
Доктор медицинских наук
О.Ю. Гречко

Волгоград - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ И БЕЗОПАСНЫХ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА	13
1.1 Современные стратегии поиска фармакологических мишеней и создания новых противоэпилептических препаратов	13
1.2 Противосудорожные свойства производных бензимидазола	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Материалы исследования	45
2.2. Методы исследования	48
<i>2.2.1 Направленный поиск соединений с антиконвульсивной активностью</i>	48
<i>2.2.2 Изучение спектра противосудорожной активности соединения-лидера на острых моделях эпилептогенеза</i>	51
<i>2.2.3 Определение антиконвульсивной активности соединения-лидера при его хроническом введении</i>	55
<i>2.2.4 Влияние на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры</i>	57
<i>2.2.5 Влияние на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга</i>	58
<i>2.2.6 Механизм антиконвульсивного действия</i>	58
<i>2.2.7 Взаимодействия с анализаторами нейромедиаторных систем</i>	62
<i>2.2.8 Влияние соединения-лидера на развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены</i>	63

<i>2.2.9 Изучение вторично-подкрепляющих и аверсивных свойств соединения РУ-1205</i>	64
<i>2.2.10 Изучение общетоксических свойств</i>	65
<i>2.2.11 Методы статистической обработки</i>	68
ГЛАВА 3. НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИКОНВУЛЬСИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА	69
3.1 Компьютерный прогноз биологической активности в системе PASS	70
3.2 Экспериментальный поиск соединений с антиконвульсивными свойствами среди производных бензимидазола	72
3.3 Зависимость противосудорожных свойств производных бензимидазола от химической структуры	75
3.4 Определение показателей ЭД₅₀ противосудорожного действия, ЛД₅₀, протективного и терапевтического индекса соединения-лидера	78
3.5 Заключение	79
ГЛАВА 4. СПЕКТР АНТИКОНВУЛЬСИВНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205	81
4.1 Изучение противосудорожной активности соединения РУ-1205 на острых моделях эпилептогенеза	81
<i>4.1.1 Определение судорожного порога на модели коразоловых судорог</i>	81
<i>4.1.2 Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 в тесте максимального электрошока</i>	83
<i>4.1.3 Изучение антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных пикротоксином</i>	84
<i>4.1.4 Исследование антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных ингибитором синтеза ГАМК изониазидом</i>	85

4.1.5 Оценка антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных стрихнином	86
4.1.6 Изучение антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных блокатором каналов K^+ аминопиридином	87
4.1.7 Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных <i>N</i> -метил- <i>D</i> -аспаратом.....	87
4.2 Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 при его хроническом введении	88
4.2.1 Изучение антиконвульсивной активности соединения РУ-1205 на модели киндлинг прогрессии с коразолом.....	88
4.2.2 Противосудорожная активность соединения РУ-1205 на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя	90
4.3. Оценка биоэлектрической активности нейронов под влиянием соединения РУ-1205	92
4.3.1 Влияние соединения РУ-1205 на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры крыс	92
4.3.2 Влияние соединения РУ-1205 на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга крыс	94
4.4 Заключение.....	96
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ АНТИКОНВУЛЬСИВНОГО ДЕЙСТВИЯ И СПЕКТР НЕЙРОПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205	98
5.1 Изучение механизма противосудорожного действия соединения РУ-1205 <i>in vitro</i>	99
5.1.1 Влияние соединения РУ-1205 на сокращение препаратов изолированного семявыносящего протока кролика	99

5.1.2 Влияние соединения РУ-1205 на ионные токи Ca^{2+} и Na^{+} нейронов моллюска в тесте <i>patch clamp</i>	101
5.2 Электрофизиологические исследования механизмов противосудорожного действия соединения РУ-1205	103
5.2.1 Влияние соединения РУ-1205 на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную антагонистом ГАМК _A -рецепторов пикротоксином	103
5.2.2 Влияние соединения РУ-1205 на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную блокатором ГАМК _A -р рецепторов ТРМРА	106
5.3 Изучение механизма противосудорожного действия соединения РУ-1205 <i>in vivo</i>	108
5.3.1 Влияние селективного блокатора каппа-рецепторов <i>por-VNI</i> на противосудорожную активность соединения РУ-1205	108
5.3.2 Влияние блокатора бензодиазепинового сайта флумазенила на противосудорожную активность соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных коразолом	109
5.4 Взаимодействие соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем	110
5.4.1 Воздействие соединения РУ-1205 на фенаминовую гиперактивность	110
5.4.2 Изучение влияния соединения РУ-1205 на эффекты L-ДОФА	111
5.4.3 Влияние соединения РУ-1205 на каталептогенный эффект галоперидола	112
5.4.4 Влияние соединения РУ-1205 на гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном у мышей	113
5.4.5 Действие соединения РУ-1205 на эффекты резерпина	115

5.4.6 <i>Эффект соединения РУ-1205 на ареколиновый тремор</i>	116
5.4.7 <i>Эффект соединения РУ-1205 на никотиновый тремор</i>	116
5.5 Заключение	117
ГЛАВА 6. СОПУТСТВУЮЩИЕ, НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ И	
ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 ...	119
6.1 Влияние соединения РУ-1205 на развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены	119
6.2 Изучение вторично-подкрепляющих и аверсивных свойств соединения РУ-1205	121
6.2.1 <i>Влияние соединения РУ-1205 на формирование условного рефлекса</i> <i>предпочтения или избегания места</i>	121
6.2.2 <i>Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста неизбежного</i> <i>плавания</i>	122
6.3 Общетоксические свойства соединения РУ-1205	123
6.3.1 <i>Определение острой токсичности соединения РУ-1205</i>	123
6.3.2 <i>Изучение нейротоксикологического профиля соединения РУ-1205 с</i> <i>помощью системы многотестового наблюдения по Ирвину</i>	124
6.4 Заключение	128
ГЛАВА 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ВЫВОДЫ	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	152
ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По данным Международной противоэпилептической лиги в Западной и Центральной Европе эпилепсией страдают 6 млн. человек, в течение ближайших 20 лет предположительно будут болеть около 15 млн. Соответствующие показатели для России составляют около полумиллиона больных эпилепсией, при заболеваемости 245,4 на сто тысяч человек по данным за 2015 год [Толмачев П. А. и др., 2017]. Альтернативные методы лечения только в редких случаях оказываются эффективными, при этом не существует профилактических мер по предотвращению развития эпилепсии. Противоэпилептические препараты первого и второго поколений представляются эффективными только для купирования остро возникающих приступов, а также некоторых симптомов, связанных с хроническим течением болезни [Насырова Р. Ф. и др., 2017], наряду с этим современные средства не представляют кардинальных терапевтических преимуществ по сравнению с более ранними препаратами.

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

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

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

Для поиска новых соединений с антиконвульсивной активностью были выбраны конденсированные производные бензимидазола, которые проявляют разнообразные виды биологической активности, и играют важную роль в медицинской химии [Spasov A.A. et al., 1999; Bansal Y., 2012]. Бензимидазолы проявляют аффинитет к различным видам рецепторов, энзимов и протеиновых комплексов. Даже незначительные модификации структуры приводят к существенным изменениям их биологической активности [Voiani M., 2005].

Класс производных бензимидазола интенсивно изучается на базе кафедры фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета (ВолгГМУ). Перспективность класса в качестве источника средств с противосудорожной активностью была показана в ряде предварительных исследований. Литературные данные подтверждают наличие антиконвульсивных свойств у различных производных бензимидазола [Narasimhan B., 2012; Sharma S. et al., 2011; Shaharyar M. et al., 2011; Siddiqui N., 2010].

Исходя из этого, представляется актуальным направленный поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных бензимидазола.

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протокол №9 от 11 мая 2012 г.) и включена в план НИР.

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

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

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

Задачи исследования.

1. Направленный поиск веществ с противосудорожной активностью в ряду парагалогефенил производных имидазо[1,2- α]бензимидазола с помощью методов *in silico* и *in vivo*.
2. Анализ зависимости между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений с применением логико-структурных методов.
3. Исследовать острую токсичность наиболее активного соединения, рассчитать его эффективную противосудорожную дозу, протективный и терапевтический индексы.
4. Определить спектр противосудорожного действия активного соединения на моделях хемо- и электроиндуцированных судорог.
5. Исследовать воздействие перспективного соединения на электрофизиологические проявления эпилептической активности.

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

Научная новизна исследования. В ходе исследований впервые была проведена оценка антиконвульсивной активности ряда N_1 и N_9 производных имидазо[1,2- α]бензимидазола. Впервые были выявлены закономерности между противосудорожной активностью производных имидазо[1,2- α]бензимидазола и их структурой.

Впервые установлено, что вещество РУ-1205 оказывает выраженную антиконвульсивную активность на различных моделях хемо- и электроиндуцированных судорог у мышей. В ходе электрофизиологических тестов определено влияние соединения на эпилептиформную и фоновую активность соматосенсорных нейронов крыс. Показано, что соединение РУ-1205 по механизму действия является агонистом каппа-опиоидных рецепторов, оказывает влияние на кальциевые и натриевые ионные токи, модулирует ГАМК-ергическую и глутаматергическую системы. Впервые изучен спектр нейротропной активности соединения РУ-1205 и его нейротоксикологические свойства. Установлено, что после хронического введения изучаемое соединение не вызывает признаков толерантности, феномена «рикошета» и синдрома отмены. У исследуемого вещества не выявлены аддиктивные (вторично-подкрепляющие) и аверсивные свойства.

Теоретическая и практическая значимость работы. Найденные структурные закономерности соединений могут быть использованы для

направленного поиска, конструирования и синтеза новых противоэпилептических средств.

Получены данные о наличии значимых противосудорожных свойств у соединения РУ-1205 на экспериментальных моделях судорог, вызванных максимальным электрошоком, коразолом, бикикуллином, пикротоксином, N-метил-D-аспаратом, отменой алкоголя. Выявлена противосудорожная активность на фоне хронического введения соединения РУ-1205 без признаков физической зависимости и аддикции. В совокупности это позволяет считать исследуемое вещество перспективным для расширенного доклинического изучения в качестве противосудорожного средства.

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

Положения, выносимые на защиту.

1. N₁ и N₉ фторфенил производные имидазо[1,2- α]бензимидазола представляются перспективным классом для поиска и разработки новых высокоэффективных противосудорожных средств.
2. Соединение РУ-1205 проявляет выраженную противосудорожную активность и превосходит референтные препараты вальпроат натрия и карбамазепин на острых и хронических моделях эпилептогенеза.
3. Изучаемое вещество подавляет формирование фоновой фокальной и эпилептиформной (вызванной пикротоксином или электрическими стимулами) активности нейронных колонок соматосенсорной коры крыс.

4. Механизм противосудорожного действия соединения РУ-1205 связан с активацией каппа-опиоидных рецепторов, а также угнетением натриевых и кальциевых ионных токов.
5. Вещество РУ-1205 не вызывает развития толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены при хроническом введении, не обладает аддиктивными (вторично-подкрепляющими), аверсивными свойствами.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, выполненных на кроликах, крысах и мышах с использованием высокотехнологического оборудования и современных подходов, в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противосудорожной активностью, а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

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

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

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

ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ И БЕЗОПАСНЫХ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

1.1 Современные стратегии поиска фармакологических мишеней и создания новых противоэпилептических препаратов

Первым синтетическим препаратом, способным эффективно снижать частоту тонико-клонических и, в меньшей степени, парциальных судорог стал фенобарбитал. Противоэпилептические свойства фенобарбитала были обнаружены в 1912 году [Lerman-Sagie T., 1999].

Позднее в ходе целенаправленного скрининга в 1930 году Merritt и Putnam [Merritt H. H., 1938] выявили новое фенил-производное гидантиона - фенитоин, обладающее выраженным противосудорожным действием с относительно низкой токсичностью и лишенное седативных свойств. Антиконвульсивные свойства фенитоина были изучены к 1936 году на модели электроиндуцированных судорог на кошках Putman и Merritt [Putnam T. W., 1937]. Данный препарат широко применяется в клинической практике и в настоящее время [Caudle K. E. et al., 2014].

До 1965 года все доступные противоэпилептические средства имели структурное сходство с молекулой фенобарбитала, включая фенитоин и его производные, а также имиды янтарной кислоты (этосуксимид).

Позднее в клинической практике начали применяться совершенно новые по структуре противоэпилептические препараты (ПЭП). Так в 1962 году были обнаружены противоэпилептические свойства у вальпроевой кислоты, которая ранее использовалась как растворитель для органических соединений [Meunier H., 1963].

Значительным шагом стало открытие в 1965 году антиконвульсивного действия у производного иминостильбена (карбамазепин), который изначально использовался для лечения невралгии тройничного нерва [Schindler W., 1954; Okuma T., 1998], а также широкое применение бензодиазепинов в 1970-е годы (клоназепам, диазепам) [Mehdi T., 2012].

В конце 1980-х и начале 90-х было разработано **второе поколение ПЭП** [Lasoń W. et al., 2011; Łuszczki J. J., 2009] (таблица 1.1).

Таблица 1.1

Второе поколение ПЭП

Препарат	Химическая группа	Химическая формула
Фелбамат	Диуретаны	(3-Карбамоилокси-2-фенилпропил) карбамат
Габапентин	Циклические аналоги ГАМК	1-(Аминометил)циклогексануксусная кислота
Ламотриджин	Фенилтриазины	6-(2,3-Дихлорфенил)-1,2,4-триазин-3,5-диамин
Топирамат	Сульфаматзамещенные моносахариды	2,3:4,5-Ди-О-изопропилиден-бета-D-фруктопиранозы сульфамат
Тиагабин	Производное нипекотиновой кислоты	(-)-(R)-1-[4,4-бис-(3-Метил-2-тиенил)-3-бутенил]нипекотиновая кислота
Окскарбазепин	Иминостильбены	10,11-Дигидро-10-оксо-5H-добенз[b,f]азепин-5-карбоксамид
Леветирацетам	Производное пирролидона	(αS)-α-Этил-2-оксо-1-пирролидинацетамид
Зонисамид	Производное бензоизоксазола	Бензо[d]изоксазол-3-илметанезил-сульфонамид
Клобазам	Бензодиазепины	7-Хлор-1-метил-5-фенил-1H-1,5-бензодиазепин-2,4(3H,5H)-дион
Вигабатрин	Винил-производное ГАМК	4-Амино-5-гексеновая кислота

К преимуществам новых ПЭП по сравнению с препаратами первого поколения можно отнести: относительно высокую эффективность в сочетании с более низкой токсичностью, лучшую переносимость и удобство применения (отсутствие необходимости проведения регулярного мониторинга концентрации препарата в крови) [Ochoa J. G. et al., 2012].

К сожалению, после внедрения в клиническую практику ПЭП второго поколения окончательно не удалось решить проблему оптимального ведения

пациентов с эпилепсией и достигнуть адекватного контроля припадков [Bialer M., 2006]. Новые ПЭП были одобрены, главным образом, для применения в качестве адьювантной терапии [Юрьев К.Л., 2004]. Некоторые препараты второго поколения оказались высокотоксичными. Так, применение фелбамата нередко осложнялось случаями апластической анемии и печеночной недостаточности [Borowicz K.K., 2004].

За последние годы было представлено более 20 новых противоэпилептических средств **третьего поколения**, при этом многие из них были получены путем химической модификации [Łuszczki J. J., 2014]. Наиболее изученные средства перечислены в таблице 1.2.

Таблица 1.2

Третье поколение ПЭП.

Препарат	Предшественник	Химическая группа
Бриварацетам	Леветирацетам	Производное пирролидона
DP-VPA	Вальпроевая кислота	Производное вальпроевой кислоты
Эсликарбазепин	Оскарбазепин	Иминостильбены
Ганаксолон	Аллопрегнанолон	Производное синтетического нейростероида аллопрегнанолона
Лакозамид		Производное серинамида
Прегабалин	Габапентин	Циклические аналоги ГАМК
Ретигабин		Производное 1,2,4-триаминобензена
Руфинамид		Производное триазола
Стирипентол		Ароматические аллиловые спирты
Перампанел	Талампанел	Замещенное производное бипиридина
Карисбамат	Фелбамат	Диуретаны

Несмотря на достигнутый прогресс большинство новых соединений не обладают желательным уровнем эффективности. В настоящее время многие средства третьего поколения находятся в фазе доклинических испытаний.

Таким образом, на данный момент имеется широкий выбор противоэпилептических средств с различными характеристиками спектра противосудорожной активности, фармакокинетики и токсичности. Тем не менее у

30-40% пациентов по-прежнему не удается достигнуть ремиссии [Löscher W., 2011; Ochoa J. G. et al., 2012].

Накопленные научные данные позволяют заключить, что современные ПЭП и препараты предыдущих поколений незначительно отличаются друг от друга с точки зрения терапевтической эффективности. Как правило, новые препараты обладают лишь меньшей частотой или выраженностью побочных эффектов.

Механизм действия ПЭП

Согласно данным Sills [Sills G.J., 2010] предлагается классификация ПЭП по механизму действия:

- 1) блокаторы быстрых каналов натрия (фенитоин, карбамазепин, ламотриджин, окскарбазепин, руфинамид, эсликарбазепин),
- 2) блокаторы медленных натриевых каналов (лакозамид),
- 3) блокаторы высокопороговых кальциевых каналов (габапентин, прегабалин),
- 4) блокаторы низкопороговых кальциевых каналов (этосуксимид),
- 5) активаторы калиевых каналов (ретигабин)
- 6) активаторы ГАМК_A-рецепторов (фенобарбитал, бензодиазепин, стирипентол),
- 7) ингибиторы ГАМК-трансаминазы (вигабатрин),
- 8) ингибиторы обратного захвата ГАМК (тиагабин),
- 9) лиганды SV2A (леветирацитам),
- 10) препараты с комплексным механизмом действия (вальпроат, фелбамат, топирамат, зонисамид).

В действительности, большинство ПЭП обладают полимодальным механизмом действия, хотя клиническая значимость различных мишеней (например, ионный канал, мембранный рецептор или фермент) существенно различается. Поэтому предлагается иная классификация ПЭП, с выделением первичных, вторичных и третичных механизмов действия.

1. Хорошо изученные первичные механизмы, такие как модулирование ГАМК-ергической передачи, блокирование каналов натрия и кальция являются наиболее важными с точки зрения профилактики приступов (за счет повышения судорожного порога) и купирования текущей аномальной нейрональной активности.

2. Вторичные механизмы действия могут включать взаимодействия с белковыми мишенями, такими как карбоангидраза или эндогенными противосудорожными молекулами (аденозин, нейростероиды, нейропептиды, антиоксидантные системы). Вторичные механизмы могут действовать в синергизме или дополнять первичные механизмы.

3. Под третичными механизмами действия ПЭП следует понимать долгосрочные эффекты на нейропластические процессы (нейротрофин, цитокины, синтез и высвобождение гормонов) и генетический аппарат, а также эпигенетические эффекты, которые препятствуют морфологическим изменениям ЦНС, влияют на нейропластичность и тормозят эпилептогенез [Basta-Kaim A. et al., 2008; Kersanté F. et al., 2013].

Несмотря на то, что первичный механизм действия играет первостепенную роль, вторичные и третичные механизмы не следует упускать из внимания, поскольку они могут придавать уникальные характеристики ПЭП. Остается открытым вопрос является ли настолько полная нейрохимическая характеристика потенциальных ПЭП полезной в прогнозе их спектра клинической эффективности и токсического профиля по сравнению с более простой системой классификации, основанной только на первичном механизме действия. Согласно Gil-Nagel [Gil-Nagel A., 2010], механизм действия позволяет в некоторой степени предсказать спектр активности и побочные эффекты ПЭП. Например, селективные блокаторы каналов натрия (фенобарбитал, карбамазепин, окскарбамазепин, эсликарбазепин) эффективны при парциальных и вторично-генерализованных тонико-клонических судорогах, тогда как препараты с ГАМК-ергическим механизмом действия вероятнее будут эффективны для лечения парциальных судорог. В тоже время ПЭП с комплексным механизмом действия (топирамат, леветирацитам, вальпроат,

ламотриджин, зонисамид) обладают широким спектром активности и могут быть эффективны для лечения фармакорезистентных форм эпилепсии.

В настоящее время наиболее важными молекулярными мишенями для противосудорожных средств являются: потенциал-зависимые каналы натрия, калиевые каналы, h-каналы, ГАМК_A-рецепторы, рецепторы возбуждающих аминокислот, некоторые ферменты и синаптические протеины [Rogawski M. A., 2006; Rostock A. et al., 1996; Sabers A., 2000]. ГАМК-миметический эффект и блокирование потенциал-зависимых каналов натрия являются доминирующими механизмами в классе ПЭП [Sabers A., 2000; Bialer M. et al., 2007; Czapinski P., 2005; Czuczwar S. J., 2001; Meldrum B. S., 2007; Poolos N. P., 2002; White H. S., 2007].

ГАМК-ергические средства

Баланс возбуждающей и тормозной нервной передачи зависит в основном от правильной анатомической и функциональной организации нейронной сети, которая строится на взаимодействии глутаматергических и ГАМК-ергических нейронов [Schousboe A., 2007; Rowley N. M. et al., 2012]. Несмотря на то, что только 10-20% нейронов коры у млекопитающих синтезируют ГАМК, эта аминокислота эффективно контролирует уровень активности практически всех кортикальных нейронов. Один ГАМК-ергический нейрон может иннервировать несколько тысяч глутаматергических нервных клеток. В тоже время, множество ГАМК-ергических нейронов могут конвергироваться на одном глутамат-ергическом нейроне [Basta-Kaim A. et al., 2008]. Даже незначительный дефицит ГАМК-ергической передачи приводит к гипервозбудимости нейронов и формированию патологического очага возбуждения [Mathews G. C., 2007]. ГАМК синтезируется в головном мозге из глутамата путем декарбоксилирования [Schousboe A., 2007]. После высвобождения в синаптическую щель она подвергается обратному захвату нервными и глиальными клетками, где метаболизируется ГАМК-аминотрансферазой до сукцинат-полуальдегида [Rowley N. M. et al., 2012]. Четыре транспортера (GAT1-4) участвуют в обратном захвате ГАМК [Schousboe A. et al., 2014]. ГАМК реализует свое действие через взаимодействие с мембранными ГАМК_A, ГАМК_B и ГАМК_C

рецепторами [Li C. et al., 2014]. ГАМК_A- и ГАМК_C-рецепторы являются ионотропными, то есть формируют каналы, проницаемые для ионов хлора, тогда как ГАМК_B-рецепторы являются метаботропными [Czuczwar S. J., 2001]. ГАМК_A-рецепторы участвуют в формировании быстрого тормозного постсинаптического потенциала и, как следствие, играют важную роль в развитии судорог. Агонисты ГАМК_A-рецепторов увеличивают проводимость каналов для ионов хлора, вследствие чего снижается сопротивление и развивается гиперполяризация мембраны [Enz R., 1998]. Поэтому стимуляция ГАМК_A-рецепторов, как правило, повышает судорожный порог при эпилепсии и подавляет распространение патологической активности [Czuczwar S. J., 2001; Poolos N. P., 2002; Schousboe A., 2007]. И напротив, ГАМК_A-антагонисты, такие как бикикуллин, пикротоксин или коразол являются проконвульсантами. Молекулярное клонирование позволило выявить, что ГАМК_A-рецепторы формируют пентамерные протеиновые комплексы, которые состоят из двух α -субъединиц, двух β -субъединиц, содержащих место связывания с ГАМК, а также одну γ или δ субъединицу [Fatemi S. H. et al., 2014].

Набор субъединиц и их конфигурация детерминируют фармакодинамическую эффективность агонистов, модуляторов и антагонистов ГАМК_A-рецепторов. Усиление тормозной ГАМК-ергической передачи лежит в основе действия антиконвульсивных средств, которые напрямую связываются и активируют ГАМК_A-рецепторы или оказывают влияние на синтез, высвобождение, транспорт и биодegradацию ГАМК [Rowley N. M. et al., 2012].

Одним из самых применяемых противоэпилептических препаратов с ГАМК-ергическим механизмом действия является вальпроевая кислота. В исследованиях было показано, что вальпроевая кислота повышает уровень ГАМК в ЦНС за счёт ингибирования фермента ГАМК-трансферазы и снижения обратного захвата ГАМК-нейронами, а также оказывает непосредственное влияние на постсинаптические ГАМК_A-рецепторы [Rogawski M. A., 2015].

Класс психотропных средств, представленных бензодиазепинами обладает широким спектром противосудорожной активности. Бензодиазепины действуют

как позитивные аллостерические модуляторы ГАМК_A-рецепторов, то есть повышают проницаемость канала для ионов хлора, когда ГАМК уже связана с рецептором [Rudolph U., 2006]. Бензодиазепины, такие как диазепам, клобазам и клоназепам могут применяться как при генерализованных, так и при фокальных припадках. Однако к этим препаратам быстро вырабатывается толерантность и зависимость, что делает их малоприменимыми для долгосрочного лечения эпилепсии [Shorvon S. D., 2009].

Второстепенно действие карбамазепина связано с усилением проводимости хлорных каналов, выражающимся в кратковременном взаимодействии с субъединицами $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ ГАМК_A-рецепторов. Какой вклад вносит данный механизм в антиконвульсивную активность карбамазепина остается под вопросом. Такой же, хотя и более выраженный, механизм действия имеет фенитоин [Granger P., 1995].

В настоящее время синтезируются и активно изучаются ингибиторы транспортеров ГАМК, а также соединения, подавляющие ГАМК-аминотрансферазу [Rudolph U., 2006]. Высокую селективность по отношению к GAT1 проявляют новые соединения NNC-711 и NO-711 [Xu X. H. et al., 2014]. Также проходят доклинические испытания ингибитор GAT3 под лабораторным шифром SNAP-5114 [Kersanté F. et al., 2013].

Глутаматергические средства

Глутамат – это основной возбуждающий нейротрансмиттер в ЦНС, который активирует ионотропные рецепторы, названные в соответствии со специфическими агонистами: AMPA (α-amino-3 hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate), NMDA (N-метил-D-аспартат) и каинатные рецепторы (каиновая кислота), а также метаботропные рецепторы, связанные с G-белками и вторичными системами мессенджеров. NMDA-рецепторы состоят из NR1 субъединицы, соединенной с одной или более NR2 (A–D) субъединицами, которые в свою очередь формируют каналы, проницаемые для ионов натрия и кальция. Активность NMDA-рецепторов регулируется посредством стрихнин-нечувствительного глицинового сайта и

других модулирующих сайтов, таких как полиамин, Zn^{2+} , H^+ . При потенциале покоя просвет данного рецептора блокируется ионом магния, который удаляется после деполяризации мембраны. Роль NMDA-рецепторов в экспериментальном эпилептогенезе, нейропластичности, развитии судорог и эксайтотоксичности подтверждена различными исследованиями: антагонисты NMDA-рецепторов, такие как дизоцилпин или кетамин, подавляют судороги, вызванные коразолом, пилокарпином, максимальным электрошоком или сенсорной стимуляцией, однако наряду с этим они проявляют выраженные побочные эффекты (психомоторные, мнестические и другие когнитивные нарушения, а также оказывают психотомиметическое действие), при этом данные побочные эффекты усиливаются на экспериментальных моделях эпилепсии [Barnes G. N., 2003; Löscher W., 2010; Löscher W., 1988; Poolos N. P., 2002]. Поэтому некоторые аллостерические модуляторы NMDA-рецепторов, взаимодействующие со стрихнин-нечувствительным глициновым сайтом и полиамин-связывающим сайтом, являются более перспективными соединениями с антиконвульсивными свойствами [Kalia L. V., 2008; Matute C., 2011; Poolos N. P., 2002]. Антагонисты глицин-связывающих сайтов и полиамин-связывающих сайтов NMDA проявляют высокий аффинитет к NR1/NR2A субъединицам и NR1A/NR2B комплексам соответственно. Частичный агонист глицин-связывающего сайта D-циклосерин, вероятнее всего, оказывает антиконвульсивное действие за счет десенситизации NMDA-рецепторов. Также это соединение потенцирует противосудорожное действие некоторых других ПЭП и в низких дозах оказывает положительное влияние на мнестические процессы [Feld G. V. et al., 2013]. Лакозамид (LCM) - антагонист глицин-связывающего сайта NMDA-рецепторов был зарегистрирован как противоэпилептический препарат в 2008 г. [Beyreuther V. K. et al., 2007; Doty P. et al., 2007; Harris J. A., 2011; Stöhr T. et al., 2007]. Еще один пример – фелбамат, который блокирует потенциал-зависимые каналы натрия и проявляет антагонистическую активность по отношению к глицин-связывающему сайту NMDA-рецепторов [Brodie M. J. et al., 1993; Poolos N. P., 2002].

Глутаматергические AMPA-рецепторы играют важную роль в передаче возбуждающих импульсов в ЦНС. AMPA-рецепторные комплексы состоят из различных комбинаций четырех гомологичных GluR1-GluR4 субъединиц и функционируют как катионные каналы проницаемые для Na^+ и K^+ ионов, а также в некоторых конфигурациях для ионов Ca^{2+} . Комплексы, которые содержат GluR2 субъединицы, обладают низкой проницаемостью для ионов Ca^{2+} . Под влиянием агонистов AMPA-рецептор подвергается десенситизации. Однако существует ингибитор десенситизации, циклотиазид, являющийся позитивным аллостерическим модулятором этого рецептора [Sarro G. D. et al., 2005]. К негативным аллостерическим модулятором AMPA-рецепторов относятся 2,3-бензодиазепины. NMDA-опосредованный вход кальция в клетку и последующая активация протеинкиназ приводит к фосфорилированию AMPA-рецепторов и усилению их активности. Этот процесс может лежать в основе патологической гипервозбудимости глутаматергической системы и развития очага патологической активности. Фосфатазы, включая кальциневрин, дефосфорилируют AMPA-рецепторы и снижают их активность. Антагонисты AMPA- и каинатных рецепторов подавляют хемоиндуцированные судороги (коразоловые, бикикуллиновые), а также проявляют антиконвульсивную активность на генетических моделях судорог [Jakus R. et al., 2004]. Кроме того, они потенцируют антиконвульсивное действие классических ПЭП, таких как фенобарбитал и вальпроат натрия [Czapinski P., 2005]. Данные соединения в меньшей степени оказывают влияние на координацию и память, по сравнению с антагонистами AMPA-рецепторов. Среди уже зарегистрированных ПЭП способностью блокировать AMPA-рецепторы обладают барбитураты и топирамат.

Неконкурентный антагонист AMPA-рецепторов талампанел проявляет широкий спектр антиконвульсивной активности [Howes J. F., 2007; Iwamoto F. M. et al., 2010].

Каинатные рецепторы менее распространены в головном мозге, по сравнению с AMPA-рецепторами. Каинатные рецепторы состоят из GluR5-GluR7 и KA1-KA2 субъединиц, их активность регулируется теми же лигандами, которые

связываются с АМРА-рецепторами, однако с разным уровнем аффинитета. GluR5 и GluR6 субъединицы формируют гомомерные каналы, однако другие субъединицы являются частями гетеромерных комбинаций GluR5 и GluR6 субъединиц. Активация постсинаптических каинатных рецепторов ведет к длительной деполяризации нейронов, и усиливает внутриклеточный ток ионов кальция, что может объяснять развитие проконвульсивных и нейротоксических эффектов каината. Выраженные проконвульсивные и нейротоксические эффекты каината могут быть также связаны с пресинаптическим подавлением высвобождения ГАМК, поскольку каинат угнетает ГАМК_A и ГАМК_B рецептор-зависимые тормозные синаптические потенциалы в зоне гиппокампа CA1. Стимуляция пресинаптических каинатных рецепторов может также опосредованно усиливать высвобождение глутамата и повышать концентрацию ионов кальция в синапсосамах [Leśkiewicz M., 2007; Löscher W., 2010; Poolos N. P., 2002; Sabers A., 2000]. Из этого следует, что модуляторы каинатных рецепторов могут рассматриваться как потенциальные ПЭП [Löscher W., 1998; Sabers A., 2000; Sarro G. D. et al., 2005].

Помимо ионотропных, существуют шесть подтипов метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR), которые подразделяются на три группы на основании сходства аминокислотных последовательностей, характера связывания со специфическими лигандами и их систем пострецепторного сопряжения. Активация первой группы mGluRs (mGlu1 и mGlu5) запускает инозитолфосфатный каскад реакций и мобилизацию кальция из внутриклеточных депо. Агонисты II группы (mGlu2 и mGlu3) и III группы (mGlu4 и mGlu6-8) mGluRs ингибируют аденилатциклазу. Также была обнаружена четвертая группа mGluRs, сопряжённая с фосфолипазой D [Byrnes K. R., 2009]. Первая группа mGluRs локализуется постсинаптически на кортикальных и гипоталамических глутаматергических нейронах, а также на ГАМК-ергических вставочных нейронах. Их возбуждение вызывает фосфолирирование и инактивацию некоторых типов каналов калия [Levy M. et al., 1998], что приводит к деполяризации и нейрональной гипервозбудимости. II и III группы mGluRs являются тормозными пресинаптическими

ауторецепторами, расположенными на глутаматергических нейрональных окончаниях, или тормозными пресинаптическими гетерорецепторами, локализованными на некоторых ГАМК-ергических нейрональных терминалях [Iwamoto F. M. et al., 2010; Pinheiro P. S., 2008]. Агонисты I группы mGluRs вызывают судороги у экспериментальных животных и длительную потенциацию нейронов гиппокампа [Le Duigou C., 2011]. Их антагонисты действуют противоположным образом. Некоторые антагонисты mGlu1 и mGlu5 рецепторов, и некоторые агонисты III группы mGluRs проявляют антиконвульсивную активность на моделях генерализованных судорог у животных и могут рассматриваться как потенциальные ПЭП [Kłodzińska A. et al., 2000; Moldrich R. X. et al., 2003; Sabers A., 2000]. Более того, агонист II группы mGluRs под лабораторным шифром LY354740 значительно усиливает антиконвульсивную активность диазепама [Pinheiro P. S., 2008]. После высвобождения в ЦНС, глутамат подвергается обратному захвату пятью подтипами высоко аффинных натрий-зависимых транспортеров возбуждающих аминокислот (ЕЕАТs), которые локализованы в клеточных мембранах астроцитов (ЕААТ1, ЕААТ2) и нейронов (ЕААТ3-5). Повышенная активность глутаматергической системы играет важную роль в патогенезе судорожных припадков различной этиологии [Poolos N. P., 2002; Sarro G. D. et al., 2005]. Ослабление возбуждающей нейротрансмиссии может быть достигнуто различными способами: посредством угнетения синтеза глутамата, через модуляцию пресинаптических рецепторов или кальций-зависимого высвобождения глутамата, за счет увеличения обратного захвата глутамата, а также блокирования постсинаптических глутаматных рецепторов [Poolos N. P., 2002; Sarro G. D. et al., 2005]. Некоторые ПЭП угнетают глутаматергическую передачу, однако это вносит незначительный вклад в механизм их действия.

Средства, блокирующие каналы натрия

Потенциал-зависимые каналы натрия (VDSCs) являются белками, образованными четырьмя повторяющимися доменами, состоящими из шести трансмембранных сегментов, которые формируют натрий-селективные фильтры. В

головном мозге имеется I, II, III, IV и VI подтипы каналов натрия, чувствительные к тетродотоксину, их электрическая проводимость варьирует от 2.5 до 25 pS. VDSCs участвуют в генерации потенциала действия и являются главной фармакологической мишенью для многих ПЭП, включая фенитоин, карбамазепин и ламотриджин [Miller A. A. et al., 1986; Poolos N. P., 2002; Rogawski M. A., 1990; Sabers A., 2000; Schousboe A., 2007; Walker M. C., 1999]. Данные препараты блокируют каналы натрия. В терапевтических концентрациях они не оказывают влияния на нормальную синаптическую трансмиссию, однако угнетают высокочастотные серии потенциалов действия и препятствуют распространению эпилептиформной активности.

Механизм действия вальпроевой кислоты отчасти связан с блокированием потенциал-зависимых натриевых каналов [Farber N. B. et al., 2002].

Также последнее время активно изучаются механизмы, которые в норме противодействуют гипервозбудимости нейронов. Высокочастотные потенциалы действия приводят к медленной инактивации каналов натрия и препятствуют дальнейшему возбуждению. Было показано, что препарат лакозамид способствует медленной инактивации натриевых каналов [Errington A. C. et al., 2008]. Таким образом, данный препарат может селективно подавлять высокочастотную импульсацию, без изменения нормальной нейрональной активности.

Средства, блокирующие каналы кальция

Потенциал-зависимые каналы кальция (VDCCs) делятся на несколько типов в соответствии с их электрофизиологическими характеристиками: высокопороговые каналы (подтипы L, N, P/Q, и R) и низкопороговые (T-типа). Каналы кальция сформированы $\alpha 1$ субъединицей, чувствительной к изменению потенциала, а также $\alpha 2$, β , δ и γ субъединицами, которые регулируют кинетику и амплитуду тока кальция [Moldrich R. X. et al., 2003]. Блокада N или P/Q каналов приводит к снижению пресинаптического высвобождения возбуждающих аминокислот. Однако роль этих каналов в механизме действия ПЭП не установлена.

Два структурных аналога ГАМК (габапентин и прегабалин), успешно применяемые для лечения парциальных судорог, селективно связываются с $\alpha 2\delta$ -1 и $\alpha 2\delta$ -2 субъединицами [Dooley D. J. et al., 2007; Taylor C. P., 2007]. Несмотря на то, что получены надежные доказательства связывания, ни один из препаратов не оказывает влияния на ток кальция. Предполагается, что прегабалин и габапентин снижают высвобождение возбуждающих нейромедиаторов из пресинаптических окончаний. Многие применяемые противоэпилептические препараты (фенобарбитал, леветирацетам, тамотриджин, фелбамат, окскарбазепин, топирамат) связываются с высокопороговыми каналами кальция и снижают высвобождение медиаторов [Rho J., 2010].

Низкопороговые кальциевые каналы Т-типа участвуют в механизме таламо-кортикальной осцилляторной активности и генерации пиковых разрядов [Moldrich R. X. et al., 2003; Sabers A., 2000; Schousboe A., 2007]. Низкопороговые каналы кальция Т-типа играют важную патофизиологическую роль в развитии абсансов. Для лечения абсансов широко применяется этосуксимид, который ингибирует каналы Т-типа [Broicher T. et al., 2007].

Средства, модулирующие каналы калия

Калиевые каналы подразделяются на суперсемейство потенциал-зависимых калиевых каналов внутреннего выпрямления K_{iR} , которое включает рецептор-сопряженные АТФ-чувствительные и потенциал-зависимые каналы, а также Shaker-суперсемейства калиевых каналов, включающее кальций-активируемые калиевые каналы. Мускариночувствительный тип каналов калия Kv7 (KCNQ), проводящих медленно активирующие токи, порог которых близок к потенциалу покоя, играет важную роль в реполяризации и гиперполяризации нейронов, следующей за пароксизмальными деполяризационными сдвигами [Barrese V. et al., 2010; Maljevic S. et al., 2010; Wickenden A. D., 2002; Willmore L. J., 2000; Wulff H., 2009; Wuttke T. V., 2006]. В исследованиях установлено Kv7/KCNQ/M каналы опосредуют М-токи, которые препятствуют распространению патологической импульсации. Выделяют четыре субъединицы Kv7 рецептора (Kv7.2– Kv7.5),

являющихся мишенями для некоторых новых соединений с антиконвульсивной активностью (ретигабин и проходящий клинические испытания ICA-105665) [Barrese V. et al., 2010; Broicher T. et al., 2007; Taylor C. P., 2007; Wickenden A. D., 2002]. Некоторые из этих каналов, например, мускариночувствительный KCNQ2, являются регуляторами нервной возбудимости. Вовлеченность каналов калия в механизм действия ПЭП, за исключением ретигабина, остается недостаточно доказанной [Schousboe A., 2007].

В исследованиях сообщается, что вальпроевая кислота устраняет гипервозбудимость нейронов за счет влияния на Kv7.2 каналы, отчасти с этим может быть связан ее механизм антиконвульсивного действия [Kau H. Y. et al., 2015].

Подтверждено, что механизм действия некоторых ПЭП второго поколения (топирамат [Herrero A. I. et al., 2002], леветирацетам [Madeja M. et al., 2003] и окскарбазепин [Huang C. W. et al., 2008]) также связан с модулированием токов калия. Активно ведется изучение 4-хлор-N-(6-хлор-пиридин-3-ил)-бензамида - нового селективного активатора KCNQ2 с противосудорожными свойствами [Boehlen A. et al., 2013].

Активаторы HCN-каналов

Гиперполяризационно-активируемые управляемые циклическими нуклеотидами каналы (HCN) состоят из четырех субъединиц, которые формируют канал, проницаемый для ионов Na^+ и K^+ . HCN каналы экспрессируются главным образом в нейрональных дендридах таламуса и гиппокампа. В отличие от других потенциал-активируемых каналов они не классифицируются как тормозные или активирующие, поскольку h-токи одновременно возбуждающие и тормозные. Активация HCN каналов происходит при гиперполяризации нейрона, что ведет к его деполяризации с последующей деактивацией каналов. В целом HCN каналы стабилизируют мембранный потенциал (сохраняют потенциал покоя) и препятствуют гиперполяризации и деполяризации [Poolos N. P., 2005].

Ламотриджин, используемый для лечения абсансов, активирует h-токи в гиппокампальных пирамидальных нейронах, снижая напряжение мембраны и препятствуя возникновению потенциала действия [Ying S. W. et al., 2007]. Также было показано, что габапентин усиливает h-токи, вызывает слабую деполяризацию и снижает напряжение мембраны [Surges R., 2004].

Лиганды синаптического везикулярного протеина 2А (SV2А)

SV2А – это мембранный гликопротеин, который обнаруживается практически во всех синаптических окончаниях в составе везикул. Экспериментально показано, что мыши с нокаутированным геном SV2А склонны к развитию судорог, при этом выявляется значительный дефицит ГАМК-ергической передачи [Crowder K. M. et al., 1999; Custer K. L. et al., 2006]. Было установлено, что SV2А является мишенью для леветирацетама [Gillard M., 2006]. Позднее был создан более активный аналог бриварацетам (ucb 34714), ставший одним из первых высокоэффективных противоэпилептических препаратов, полученных в результате рационального дизайна [Rogawski M. A., 2008].

Каппа-агонисты

Большое внимание в литературе уделяется антиконвульсивным свойствам каппа-агонистов. Эндогенный каппа-агонист динорфин является по своей природе нейропептидом, и принимает важную роль в эпилептогенезе. В 1980-х годах были получены доказательства, что опиоиды, в том числе динорфин, являются регуляторами возбудимости нейронов [Henriksen S. J. et al., 1982; Siggins G. R. et al., 1986; Wagner J. J., 1993; Weisskopf M. G., 1993]. Люди с недостаточной экспрессией гена динорфина проявляют большую склонность к развитию эпилепсии [Gambardella A. et al., 2003; Stögmann E. et al., 2002]. У пациентов с мезиальной лобной эпилепсией и гиппокампальным склерозом выявляется меньшая активность генов, кодирующих продинорфин [Kauffman M. A. et al., 2008].

Экспериментально было установлено, что эндогенная опиоидная система модулирует возбудимость в ЦНС, при этом особое значение отводится каппа-рецепторному комплексу. Введение селективного агониста каппа-опиоидных рецепторов U-50,488 вызывает подавление судорожной активности, однако это не наблюдалось после введения мю-агониста DAMGO. Предварительное введение каппа-селективного антагониста GNTI полностью блокировало противосудорожное действие U-50,488 [Loacker S. et al., 2007]. На классической модели коразолового киндлинга у мышей с нокаутированными генами динорфина значительно быстрее развивались клонические судороги, по сравнению с контрольными животными. Более того, у мышей с нокаутированными генами через три недели после введения каиновой кислоты в гиппокамп (CA1) наблюдалась массовая гибель нейронов, главным образом в области росто-каудальной оси гиппокампа [Loacker S. et al., 2007]. Полученные данные подчеркивают важную функцию динорфина в нейрональной возбудимости гиппокампа и подтверждают перспективность каппа-агонистов в качестве антиконвульсивных средств.

В ряде исследований на различных экспериментальных моделях было показано, что каппа-агонисты обладают противосудорожным, антиэпилептогенным и нейропротективным действиями [Kaminski R. M., 2007; Schunk E. et al., 2011; Zangrandi L., 2011; Zangrandi L., 2012]. Например, селективный каппа-агонист PY-1203 уменьшал выраженность тонико-клонических судорог в тесте с коразолом и максимальном электрошоке, а также предотвращал гибель мышей [Гречко О.Ю., 2012].

Каппа-агонисты способны устранять главный патогенетический фактор нейродегенерации, развивающейся на фоне эпилепсии – эксайтотоксичность, которая сопровождается чрезмерным поступлением ионов Ca^{2+} в клетку и последующим запуском апоптоза [Meldrum B. S., 2002; Silkina I. V. et al., 2005]. До настоящего времени вопрос о механизме угнетения высвобождения глутамата остается открытым, тем не менее есть данные, что это может быть связано с модулированием каналов калия и ингибированием токов кальция [Hjelmstad G. O., 2003]. Полагают, что пресинаптическая активация каппа-рецепторов уменьшает

N-, L-, P/Q-опосредованные Ca^{2+} токи и угнетает высвобождение глутамата, тогда как постсинаптические эффекты каппа-лигандов связаны с десенситизацией NMDA рецепторов.

Некоторые каппа-агонисты, включая U50,488, способны ингибировать натриевые ионные каналы [Su X. et al., 2009].

Таблица 1.3

Влияние каппа-опиоидных рецепторов на ионные каналы

Ионный канал	Эффект при активации КОР
TTX-г тип NaV	↓
N-тип CaV	↓
P/Q- тип CaV	↓
L- тип CaV	↓
NMDA	↓
HCN	↑
Kv 1.1 (K _A)	↑
Kv 1.7 (K _M)	↑
GIRK	↑

Таким образом, каппа-опиоидная система играет существенную роль в регуляции нервной возбудимости. Каппа-опиоидные рецепторы взаимосвязаны со многими другими фармакологическими мишенями, в том числе ионными каналами (таблица 1.3), которые могут быть важными посредниками в реализации антиконвульсивного действия каппа-агонистов.

Помимо перечисленных существует множество других мишеней, принимающих участие в эпилептогенезе, такие как карбоангидраза [De Simone G. et al., 2005; Dodgson S. J., 2000; Shank R. P., 2008], аденозиновые рецепторы [Williams-Karnesky R. L. et al., 2013], нейростероиды [Dhir A., 2012], медиаторы воспаления [Li G. et al., 2011], а также дофаминергическая [Clinckers R. et al., 2004; Werhahn K. J. et al., 2006], серотонинергическая [Isaac M., 2005] и холинергическая системы [Zimmerman G. et al., 2008], тем не менее высокоэффективные селективные препараты с такими механизмами действия пока не найдены.

Необходимо отметить, что механизм действия большинства противосудорожных средств отличается сложностью и до настоящего времени недостаточно изучен [Prasad P. M. K., 2017]. Токсичность, плохая переносимость и недостаточная эффективность являются основными недостатками применяемых противосудорожных средств. Данное обстоятельство стимулирует поиск и разработку новых соединений с противосудорожной активностью.

Стратегии поиска ПЭП

С точки зрения поиска новых ПЭП, **одним из стратегических направлений** является изучение химических производных уже существующих препаратов. Примером такого подхода для создания более эффективных и безопасных лекарств, является биоизостерическая замена. Биоизостером называется соединение, получающееся путем замены атома или группы атомов на другой атом или группу атомов, но при этом сохраняющее биологическую активность исходного соединения. Таким образом могут быть созданы новые вещества с улучшенными, по сравнению с родительским соединением, свойствами [Зефирова О. Н., 2002]. Новые ПЭП могут превосходить прототипные оригиналы по фармакокинетическим показателям, обладать устойчивостью к действию ферментативных систем организма, иметь более выгодные пути метаболизма или проявлять иной уровень аффинитета к Р-гликопротеинам и другим связывающим протеинам, ответственным за развитие резистентности, а также обуславливающих способность проникать через ГЭБ [Ochoa J. G. et al., 2012; Stępień K. M. et al., 2012].

Например, окскарбазепин, 10-кетоаналог карбамазепина, который хотя и не превосходит по эффективности последний, имеет более предпочтительные фармакокинетические параметры и реже вызывает побочные реакции [Bialer M., 2006; Freidel M. et al., 2007; Schmidt D., 2004].

В отличие от карбамазепина, который окисляется ферментами цитохрома P450, окскарбазепин быстро образует высокоактивный метаболит — 10-моногидрокси-10-окскарбазепин, который затем конъюгируется в печени и экскретируется с мочой [Ragsdale D. S., 1998; Rogawski M. A., 2008]. Позднее был

разработан новый препарат второго поколения ликарбазепин - активный метаболит окскарбазепина [Ragsdale D. S., 1998]. Еще одним моногидрокси производным является эликарбазепин, проявляющий высокую эффективность и хорошую переносимость в клинических исследованиях [Ragsdale D. S., 1998].

Вальпроевая кислота и ее соли являются в настоящее время наиболее часто используемым противоэпилептическим средством, благодаря наличию широкого спектра противосудорожной активности. Однако ее применение может ограничиваться гепатотоксичностью и высоким тератогенным потенциалом [Ragsdale D. S., 2004; Trojnar M. K. et al., 2004]. После того, как был идентифицирован фрагмент молекулы ответственный за тератогенные свойства, появились основания для поиска новых структурных модификаций. Также вальпроаты вызывают повреждения печени, ассоциированные с метаболитами 4-ene-VPA и 2,4-diene-VPA, которые блокируют активность ацетил-коэнзима А. Последующий поиск структурных аналогов был направлен на выявление молекул с новыми метаболическими характеристиками. Было получено несколько алифатических амидных аналогов (валноктамид, пропилизопропил валноктамид, диизопропил ацетамид, 3-метилбутанамид – NPS 1776), циклопропиловых аналогов (2,2,3,3-тетраметилциклопропанкарбоциклическая кислота - TACE), конъюгатов вальпроевой кислоты и глицинамида (валроцемид). Среди всей серии этих соединений только NPS 1776 и валроцемид дошли до стадии клинических испытаний.

Относительно недавно было синтезировано новое производное фенитоина [Botros S. et al., 2013]. Авторы сообщили в 2013 году, что синтезировали ряд гибридных молекул фенитоина и тиосемикарбазона. Одно из соединений схожее с фенитоином показало высокую эффективность в тесте максимального электрошока на мышах.

Вторая доминирующая стратегия поиска заключается в эмпирическом скрининге большого количества структурно новых химических соединений на предмет антиконвульсивной активности.

После открытия антиконвульсивных свойств у фенитоина удобная и хорошо воспроизводимая электросудорожная модель стала широко применяться в поиске новых противосудорожных средств для лечения тонико-клонических припадков.

Еще одна наиболее часто используемая модель хемоиндуцированных судорог на грызунах с введением коразола позволила выявить ряд эффективных средств для лечения миоклонических судорог [Ochoa J. G. et al., 2012].

К сожалению, до настоящего времени не создано ни одной высокопродуктивной методики скрининга *in vitro*, а многие противоэпилептические препараты начинают применяться в клинике еще до понимания их механизма действия [Rogawski M. A., 2008].

Третья стратегия основывается на знаниях патофизиологии судорожной активности и различных биологических мишенях, через которые можно прерывать эпилептиформную активность нейронов. Данная стратегия является одной из самых современных, и часто описывается как рациональный дизайн лекарств.

В 1970-е годы изучение тормозной функции ГАМК в ЦНС позволило синтезировать соединения, которые регулировали эндогенную биodeградацию ГАМК, и таким образом подавляли патологическую активность. Так был создан препарат вигабатрин, который увеличивает внутриклеточную концентрацию ГАМК за счет угнетения ГАМК-трансаминазы [Jung M. J. et al., 1977], а также тиагабин, который повышает межсинаптическую концентрацию ГАМК за счет угнетения обратного захвата транспортером GAT1 [Horton R. W. et al., 1979].

В 1993 году появились сведения, что габапентин имеет высокий аффинитет к $\alpha_2\delta$ субъединице потенциал-зависимых каналов кальция [Gee N. S. et al., 1996]. Это послужило началом новой эры, когда особое внимание стало уделяться молекулярным мишеням.

В настоящее время фактически любая структура в центральной нервной системе, которая участвует в регуляции возбудимости, рассматривается как потенциальная мишень. К подобным мишеням относятся компоненты ионных каналов, нексусы, рецепторы, сопряженные с G-белком, мембранные транспортеры, ферменты и др. [Meldrum B. S., 2007; Rogawski M. A., 2008]. Тем не

менее, главными мишенями антиконвульсивных средств остаются потенциал-зависимые каналы натрия, кальция, а также ГАМК-рецепторный комплекс [Ragsdale D. S., 2004; Rogawski M. A., 2004].

Активно изучаются противосудорожные средства, блокирующие глутамат-индуцированную эксайтотоксичность [Urbanska E. M. et al., 1998]. Так, ретрометаболическим способом открыт талампанел – неконкурентный антагонист ионотропных AMPA-рецепторов, активация которых, как было показано, приводит к снижению порога электроиндуцированных судорог и нивелирует антиконвульсивное действие некоторых противозэпилептических средств у мышей [Czuczwar S. J. et al., 1998]. Клинические испытания данного вещества были приостановлены в связи с плохой переносимостью и рядом фармакокинетических недостатков. Однако недавно в США и Европе был зарегистрирован аналог перампанел, который начал применяться для лечения парциальных судорог со вторичной генерализацией [Zaccara G. et al., 2013] и первичных генерализованных тонико-клонических судорог [Besag F. M. C., 2016] в комбинации с другими ПЭП.

Следует отметить, что практически все поисковые стратегии (химические модификации существующих активных молекул, поиск новых активных структур и рациональный синтез на основании механизма действия) предполагают наличие антиконвульсивной активности на скрининговых моделях первично-генерализованных судорог с коразолом и максимального электрошока. Данные модели широко применяются в настоящее время, в том числе входят в программу разработки новых противозэпилептических средств ADDP (Antiepileptic Drug Development Program). Выбор для первой стадии скрининга противосудорожных веществ именно тестов максимального электрошока и антагонизма с коразолом обусловлен качественными различиями в развитии и проявлении этих судорожных явлений [Swinyard E. A., 1969; White H.S., 1992]. Принято считать, что судороги, вызываемые максимальным электрошоком, моделируют «большие, grand mal» судорожные приступы, а судороги, вызываемые подкожным введением коразола — «малые, petit mal» припадки [Воронина Т.А., 2012]. По этой причине на модели максимального электрошока проявляют высокую активность такие препараты как

карбамазепин, фенитоин, механизм действия которых связан преимущественно с блокированием потенциал-зависимых каналов натрия [Rogawski M. A., 2016]. На модели коразоловых судорог более эффективны ГАМК-ергические средства (вальпроевая кислота, бензодиазепины), а также блокатор кальциевых каналов этосуксемид [Perrine K. R., 2017].

Согласно заключению Löscher [Löscher W., 2011], любое потенциально активное соединение, выявленное с помощью указанных экспериментальных подходов, вероятнее всего будет обладать схожими фармакологическими характеристиками с уже существующими противоэпилептическими средствами.

К одному из **фундаментальных методов** изучения ПЭП относят модели хронического эпилептогенеза или киндлинга, в ходе которых реализуется возможность оценки влияния нового соединения на зарождение и развитие эпилептиформной активности еще до проявления клинических признаков патологии [Sills G.J., 2010]. Кроме того, данные модели позволяют производить поиск средств, эффективных для лечения фармакорезистентных форм эпилепсии. Необходимо также отметить, что некоторые из препаратов второго (леветирацетам) и третьего поколения (бриварацетам) не проявляют антиконвульсивную активность на острых моделях эпилептогенеза. На модели киндлинга высокую эффективность демонстрируют многие препараты нового поколения, в том числе габапентин, прегабалин, леветирацетам, лакозамид и ретигабин [Löscher W., 2011; Sills G.J., 2010].

В последнее время особое внимание уделяется **системной фармакологии** и новой информационной парадигме поиска лекарственных средств, основанной на построении семантической сети [Chen B. et al., 2014]. Системная фармакология базируется на принципах системного анализа и предполагает изучение влияния соединений на биологическую систему в целом, а не на отдельные ее компоненты. Частным направлением системной фармакологии является **сетевая фармакология**. Семантическая сеть – это способ представления знаний, который делает возможным системную обработку данных машинными средствами с получением логических умозаключений по заданным вопросам, а также

фасилитирует валидизацию полученных научных данных [Pesquita C. et al., 2009]. Онтологическая систематизация, мапирование, интеграция и перевод гетерогенных научных данных из различных областей знаний на язык, понятный компьютерным системам, позволяет раскрыть целостный комплекс механизмов действия и других фармакологических свойств вещества. Семантические вики-платформы за последние несколько лет получили широкое распространений в биомедицинской области и фармакологии в частности [Boulos M. N. K., 2009; Bundschus M. et al., 2008; Splendiani A. et al., 2011; Qu X. A. et al., 2007].

Сложность и недостаточная изученность механизма действия многих противоэпилептических препаратов затрудняет применение методик рационального дизайна лекарственных средств [White H.S., 1992]. В этих условиях особую перспективность представляют различные фармакофоры, которые выявляются в ходе анализа структурных характеристик клинически эффективных препаратов и других соединений с противосудорожной активностью [White H.S., 1992].

1.2 Противосудорожные свойства производных бензимидазола

Бензимидазол представляет собой бициклическое ароматическое соединение, состоящее из имидазольного кольца с двумя атомами азота в 1 и 3 положении и бензольного кольца [Yerragunta V. et al., 2014].

Бензимидазолы являются фармакологически важной группой гетероциклических соединений, проявляющих разнообразные виды биологической активности [Woolley D. W., 1944]. Бензимидазол и его производные обладают аффинитетом к различным видам рецепторов, энзимов и протеиновых комплексов. Даже незначительные изменения в структуре приводят к существенным изменениям их биологической активности. Нередко один ряд соединений может проявлять сразу несколько видов активности [Voiani M., 2005]. Бензимидазолы отнесены к классу привилегированных структур [Pathak D., 2010].

Терапевтический потенциал бензимидазольного ядра начал обсуждаться с 1944 года, когда Woolley предположил, что данное соединение может оказывать

разнообразное биологическое действие, поскольку структурное сходство с эндогенными пуринами (убиквитарные молекулы аденина, гуанина, основания нуклеиновых кислот, мочевиная кислота, кофеин и др.) [Kamal A. et al., 2008] позволяет легко вступать во взаимодействие с биополимерными структурами живых организмов [Woolley D. W., 1944].

Пять лет спустя Brink обнаружил 5,6-диметилбензимидазол, как продукт деградации витамина B₁₂, и затем изучил несколько его производных, схожих по активности с витамином B₁₂ [Brink N. G., 1949; Emerson G. et al., 1950].

Полученная информация спровоцировала рост интереса научного сообщества к изучению активности производных бензимидазола. В настоящее время бензимидазол рассматривается как важная фундаментальная полициклическая система, позволившая создать множество различных классов лекарственных средств, среди которых наибольшее распространение получили противопаразитарные, гипотензивные, противоязвенные, противовирусные, противогрибковые, антигистаминные средства, а также антикоагулянты и анальгетики [Göker H. et al., 2002; Kalyankar T. M. et al., 2012].

В последние годы наблюдается неуклонный рост исследований, связанных с поиском и разработкой противосудорожных лекарственных средств на основе гетероциклических систем [Nusrat B. et al., 2014], в том числе бензимидазола [Gurvinder S., 2013].

Химические свойства бензимидазолов

Впервые бензимидазол был синтезирован Ноебрекер в 1872 году, путем редукции 2-нитро-4-метилацетанилида. Несколько лет позднее Ladenburg получил то же соединение в сухой форме путем дефлегмации 3,4-диаминотолуола с уксусной кислотой [ur Rehman M. et al., 2013]. Бензимидазолы реже встречаются под другими наименованиями: «бензимидазолы», «бензоглиоксалины», 1, 3-бензодиазолы и производные *o*-фенилендиамина [Bansal Y., 2012].

Атом водорода в положении N-1 легко таутомеризируется, с чем связана изомеризация производных соединений [Singh S. P., 1977].

Бензимидазольное ядро часто рассматривается как перспективный скаффолд, поскольку обладает амфотерными свойствами, и все 7 положений могут быть замещены разнообразными химическими радикалами и функциональными молекулярными фрагментами. Однако большинство биологически активных соединений имеют заместители в 1, 2, 5, 6 положениях. При этом среди гетероциклических систем наибольший интерес представляют те, которые содержат 5 и 6 атомов углерода в кольце [Bansal Y., 2012]. Также известно, что введение гетарильных заместителей в конденсированные системы с общим атомом азота оказывает существенное влияние на биологическую активность соединений [Анисимова В. А. и др., 2002].

Химическое разнообразие производных и их высокая биомедицинская значимость привели к созданию обширных баз данных. Изучено множество способов синтеза бензимидазола и его производных.

Антиконвульсивные свойства бензимидазолов

В 1946 году опубликованы данные Toman J., E. Swinjard и L. Goodman по изучению противосудорожной активности бензимидазола. В тесте максимального электрошока протективная доза ($ЭД_{50}$ по способности устранять тоническую экстензию) бензимидазола составила 50, 100 и 135 мг/кг интраперитонеально (и.п.) у крыс, кроликов и кошек соответственно [Toman J. E. P., 1946].

Одними из первых на наличие антиконвульсивных свойств также были исследованы 2,3-дигидро-1,2,4-триазоло[3,2-*a*]бензимидазолы [Singh J. M., 1969; Singh J. M., 1970; Singh S. P., 1977; Спасов А. А. и др., 2002]. В 1950-х годах было доказано, что антиконвульсивными свойствами обладает отечественный препарат дибазол (производное 2-(фенилметил)-1H-бензимидазола), применяемый в клинической практике в качестве гипотензивного средства [Спасов А. А. и др., 2002].

В 1989 году положительные результаты были получены при изучении алкоксизамещенных бензимидазолов в тесте максимального электрошока на мышцах. Соединение с заместителем - SCH_3 показало максимальную активность ($ЭД_{50}$ 36 мг/кг, и.п.) при этом терапевтический индекс ($ЛД_{50}/ЭД_{50}$) превышал

таковой у фенобарбитала в 34 раза. При совместном применении замещенных бензимидазолов с фенобарбиталом наблюдалось усиление противосудорожного действия [Оводенко Л.А., 1989].

Ряд производных 2-аминобензимидазола (пропиламид N-2-(1-бутилбензимидазолил) сукцинаминовой кислоты и бензиламид N-2-(1-бензилбензимидазолил) сукцинаминовой кислоты) угнетали поведенческую активность животных и увеличивали продолжительность этаминалового сна [Авдеева Е.В., 1995]. Показано, что дибазол и 5,6-диметилбензимидазол (димедазол, димезол) способны устранять неврологические нарушения при экспериментальной травме головного мозга [Розин М.А., 1951; 1971; Шаймарданов Г.С. и др., 1992].

Изучение противосудорожных свойств полициклических систем на основе конденсированных и неконденсированных производных имидазобензимидазола в рамках оценки нейропсихотических свойств новых соединений проводилось на кафедре фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета в 1960-х и 70-х годах. В опытах на мышах было установлено, что производные имидазобензимидазола способны сокращать время восстановления после припадка на различных моделях судорог, вызванных коразолом, камфарой и стрихнином, а также увеличивают выживаемость животных [Ивановская С.В., 1979; Фомин Ю.В., 1975].

В 2011 году у схожих по структуре 3,4-дигидро-2-замещенных фенилимидазо[4,5-*b*]индолов были выявлены антиконвульсивные свойства, при этом высокой активностью отличались галогенфенил замещенные производные [Kumar N. et al., 2011]. Shaikh I. и Kallappa M. изучили карбониламид производные бензимидазола [Shaikh I. N. et al., 2012]. SAR исследование показало, что хлор- в *para*-положении фенильного кольца был одним из ключевых факторов наличия антиконвульсивной активности. В 2016 году была изучена серия 2-[2-(феноксиметил)-1H-бензимидазол-1-ил]ацетогидразидов, где высокую антиконвульсивную активность проявили соединения с электронакцепторными заместителями фтором и хлором на фенильном кольце в *para*-положении

[Shaharyar M. et al., 2016]. По мнению авторов, эти заместители сыграли важную роль в наличии антиконвульсивного действия соединений. В 2017 году в исследовании Partap S. сообщается об антиконвульсивных свойствах производных бензимидазола-пиридазинона, при этом авторы также отмечают важность дистального фенильного кольца [Partap S. et al., 2017].

В новых исследованиях [Siddiqui N. et al., 2016; Yadav G., 2015] сообщается, что бензимидазольный скаффолд является «фармакофором выбора» для разработки новых противосудорожных средств, которые могут действовать на различные мишени.

Механизм противосудорожного действия бензимидазолов

Производные бензимидазола оказывают полимодальное влияние на нервную систему. Предполагается, что механизм действия бензимидазола реализуется за счет уменьшения возбудимости подкорковых областей головного мозга (лимбическая система, таламус, гипоталамус), ответственных за осуществление эмоциональных реакций, торможения взаимодействия этих структур с корой головного мозга, а также угнетения полисинаптических спинальных рефлексов [Гамма Т.В., 2013].

Бензимидазол может повышать чувствительность ГАМК-рецепторов, что выражается в усилении тока ионов хлора в клетку [Гамма Т.В., 2010].

У некоторых производных бензимидазола обнаружены различные по силе и механизму психостимулирующие [Розин, 1951; 1971], нейролептические [Спасов А. А. и др., 1999], антидепрессантные [Шаймарданова Г. С. и др., 1992], транквилизирующие (анксиолитические) [Киричек Л.Т., 1991], противосудорожные [Михайлов И. Б., 1997] и снотворные [Бугаева Л. И. и др., 2000] свойства. Предусматривается несколько возможных механизмов противосудорожного действия производных бензимидазола.

По данным Maryanoff В.Е. анксиолитическая и антиконвульсивная активность производных пиридо[1,2- α]бензимидазола обусловлена связыванием с бензодиазепиновыми сайтами и аллостерической активацией ГАМК_A-рецепторов

[Maryanoff V. E. et al., 2005]. ГАМК-ергический механизм действия был установлен радиолигандным методом на тканях головного мозга кошек [Спасов А. А. и др., 2002; Trapani G. et al., 1997]. Позднее другими авторами было подтверждено ГАМК_A-миметическое действие у N,N-двузамещенных бензимидазол-1-ил-ацетамидов [Falcó J. L. et al., 2006] и нитрозамещенных производных бензимидазола [Jain P. et al., 2010]. С помощью методов фиксации потенциала и концентрационного скачка обнаружено, что производные имидазобензимидазола дозозависимо увеличивают амплитуду ГАМК-активируемых хлорных токов в изолированных клетках Пуркинье мозжечка крысы и сдвигают влево кривую доза-ответ для ГАМК, не влияя на максимальный ответ [Шаронова Н. И. и др., 2005].

В отношении бемитила (2-этилтиобензимидазола гидробромид), который обладает противосудорожными свойствами [Михайлов И. Б., 1995] наряду с различными видами нейрорепрессивной активности, было установлено, что в основе механизма его действия лежит активация синтеза эндогенной РНК в результате взаимодействия препарата с геномом, благодаря структурной схожести производных бензимидазола с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот - аденина и гуанина [Рамш С. М., 2011; Смирнов А.В., 1993]. Также было установлено, что при непосредственной аппликации бемитила на нейроны моллюска снижаются максимумы скоростей нарастания и спада потенциала действия [Гамма Т.В., 2003; Коренюк И. И., 2004].

Экспериментально подтверждено, что бензимидазол, 2-бензилбензимидазол, 2-этилтио-бензимидазол, 2-метил-бензимидазол, 2-этил-бензимидазол в дозах 50, 100 и 150 мг/кг обладают нейротропной активностью, подавляют двигательную активность и психоэмоциональное состояние крыс (что по мнению авторов обусловлено бензимидазольным фрагментом молекулы и не зависит от радикала), могут вызывать реорганизацию нейронных связей ганглиев улитки *Helix albescens* Rossmassler, а именно подавлять пейсмекерную активность и облегчать трансинаптическую передачу на мембрану сомы нейронов [Гамма Т.В., 2006; Гамма Т.В., 2010; Gamma T.V., 2008]. Впоследствии на нейронах улитки было установлено, что механизм влияния на электрогенез нейронов у

бензимидазола и его производных обусловлены подавлением скорости ионных токов Na^+ , Ca^{2+} , а в некоторых случаях и активацией Cl^- токов, что выражается в появлении как тормозных постсинаптических потенциалов на мембране сомы пейсмейкерных и непейсмейкерных нейронов, а также глубокой гиперполяризации мембраны [Коренюк И. И., 2008; Gamma T. V. et al., 2001; Gamma T. V. et al., 2002].

Сообщается, что некоторые производные бензимидазола являются антагонистами кальция, так как обладают способностью блокировать медленные кальциевые токи [Анисимова В.А. и др., 1995]. Было установлено, что производные имидазо[1,2- α]бензимидазола, а именно 2-фторфенил-9-пирролидиноэтилимидазо[1,2- α]бензимидазол и 2-фторфенил-9-морфолиноэтилимидазо[1,2- α]бензимидазол обладают выраженным мембраностабилизирующим действием на нейроны моллюска прудовика, которое проявляется в дозозависимом подавлении ионных токов потенциал-зависимых ионных каналов Na^+ и Ca^{2+} [Гречко О. Ю. и др., 2012].

На протяжении последних лет разрабатываются и активно изучаются антагонисты глутаматных рецепторов, проявляющие на моделях *in vivo* выраженные противосудорожные и нейропротективные свойства.

QSAR исследование показало, что NMDA рецепторы могут быть потенциальной мишенью для 1,2-замещенных производных бензимидазола, что представляет интерес для разработки противосудорожных средств [Harika M. S., 2017].

Reinhardt B. Vaudy и соавторы изучили серию 2-амино-(фосфоноалкил)-1H-бензимидазол-2-алкановых кислот. Наибольший аффинитет к NMDA рецепторам проявило соединение [R(-)]-2-амино-3-(5-хлоро-1-фосфометил-1H-бензимидазол-2-ил)-пропионовая кислота. IC_{50} в радиолигандном анализе конкурентного вытеснения [3H]CPP составила 7.1 нМ. ЭД₅₀ по способности снижать гибель на фоне введения ЛД₅₀ NMDA у мышей составила 0.13 мг/кг и.п. [Vaudy R. B. et al., 2001] Также было отмечено, что способность снижать гибель животных в летальной модели с введением NMDA прямо коррелирует с уровнем аффинитета.

Было установлено, что ряд производных бензимидазола [Davies D. J. et al., 2012], включая бензимидазол-2-карбоксамиды [Borza I. et al., 2006; Borza I. et al., 2007] и 5-замещенные бензимидазолы [McCauley J. A. et al., 2004], проявляют антагонизм и высокий аффинитет [Fuchigami T. et al., 2010] к NR2B субъединице NMDA рецепторов, подавляют внутриклеточный ток кальция и обладают выгодными фармакокинетическими характеристиками.

Также сообщается о серии замещенных бензимидазолов, блокирующих глициновый сайт NMDA рецепторов, которые в будущем могут быть использованы для лечения эпилептического статуса и ишемических заболеваний ЦНС [Dannhardt G., 2000; Louvet P. et al., 1993].

Синтезированы 5-замещенные бензимидазолы, способные ингибировать GluN1/GluN2B рецепторы путем прямого связывания с N-концевым доменом GluN2B субъединицы [Wee X. K. et al., 2010].

Дизайн, основанный на структуре мишени, который концептуально опирается на принцип «один ген – один протеин – одна функция», на практике не показал высокую эффективность по отношению к разработке новых ПЭП и других нейротропных средств [Enna S. J., 2009]. На данный момент большинство высокоэффективных ПЭП имеют мультитаргетный механизм действия, в то время как монотаргетные препараты немногочисленны и ограничены в применении вследствие высокой токсичности [Bialer M., 2012]. Кроме того, мультитаргетные соединения потенциально более эффективны в отношении рефрактерных форм эпилепсии [Wee X. K. et al., 2010].

Многие препараты из класса производных бензимидазола обладают мультитаргетным механизмом действия и широким диапазоном нейрорегуляторной активности. Например, отечественный препарат афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) проявляет анксиолитическое, антидепрессивное, антирадикальное, ноотропное, антимуtagenное и адаптогенное действия, при этом потенцирует действие антиконвульсантов (карбамазепина). Исследования показали, что афобазол обладает ГАМК-ергическим действием, стимулирует релизинг фактора роста

нервов и нейротрофический фактор мозга, является антагонистом MT1 и MT3 рецепторов и антагонистом сигма-рецепторов [Antipova T. A. et al., 2009; Silkina I. V. et al., 2005; Seredin S. B. et al., 2006; Seredenin S. B. et al., 2009].

Ранее изученное конденсированное производное имидазобензимидазола - соединение РУ-1203 модулирует ГАМК-ергическую передачу, активирует каппа-рецепторы, а также подавляет ионные токи Na^+ и Ca^{2+} [Гречко О.Ю., 2012].

Среди множества гетероциклических соединений производные бензимидазола обладают уникальными структурными свойствами и широким спектром биологической активности, что позволяет их отнести к разряду привилегированных структур. Скаффолд бензимидазола активно эксплуатируется при создании препаратов различных фармакотерапевтических групп. Анализ литературных данных отражает неуклонную тенденцию в сторону роста числа исследований по изучению антиконвульсивной активности новых производных бензимидазола. Данные факты позволяют заключить, что производные бензимидазола являются перспективным химическим классом для поиска и изучения соединений с противосудорожным действием.

1.3 Заключение

К настоящему времени разработано три поколения противоэпилептических средств и достигнуты существенные успехи в изучении механизма действия, однако это незначительно поспособствовало разработке новых более эффективных антиконвульсивных средств. Даже при использовании современных препаратов и комбинированной терапии у 30-40% пациентов не удается добиться стойкой ремиссии. С точки зрения актуальных стратегий фармакологического поиска, учитывая наличие противосудорожных свойств у многих соединений БИ ряда и потенциальную возможность мультитаргеного взаимодействия, в качестве основы для разработки ПЭП представляются перспективными производные из класса бензимидазолов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Для оценки *in silico* с помощью системы PASS перспективности класса производных имидазо[1,2-*a*] бензимидазола как источника веществ, обладающих противосудорожной активностью, на основе банка данных по структуре производных конденсированных азолов кафедры фармакологии ВолгГМУ была сформирована рабочая база данных из 647 соединений с общей формулой, в их числе 519 N₉-замещенных, 126 N₁-замещенных и два N₁,N₉-замещенных имидазо[1,2-*a*] бензимидазола (таблица 2.1).

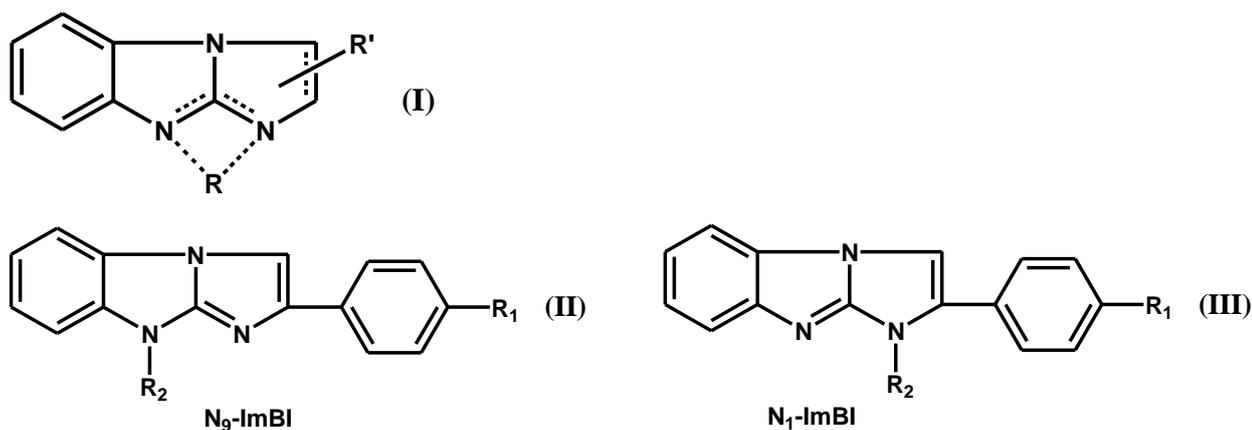


Рисунок 2.1 I - общая структурная формула изучаемых производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (пунктир означает возможное наличие связи); II - структурная формулы N₉ производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола; III - структурная формулы N₁ производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

В экспериментальных исследованиях *in vivo* было изучено 15 2-(4-фенил)-производных имидазо[1,2-*a*] бензимидазола (рисунок 2.1) из них восемь N₉-замещенных и семь N₁-замещенных имидазо[1,2-*a*] бензимидазола. Все соединения были синтезированы в НИИ физико-органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).¹

Для проведения экспериментальных работ также использовались реактивы: вальпроат натрия («Конвулекс», G.L.PHARMA GmbH, Австрия), диазепам (Реланиум, «Польфа», Польша), карбамазепин («Sigma», США), коразол («Sigma»,

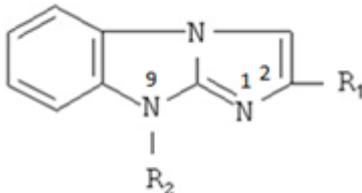
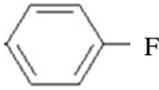
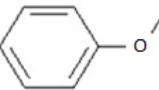
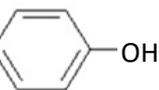
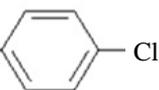
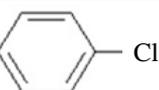
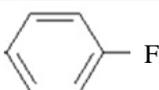
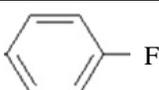
¹ Выражаем признательность ведущему научному сотруднику лаборатории синтеза биологически активных соединений, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для настоящего исследования

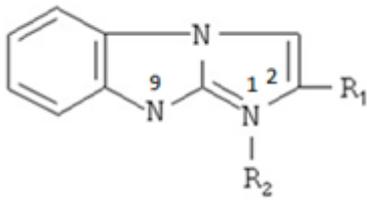
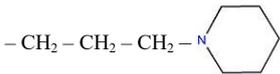
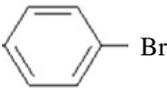
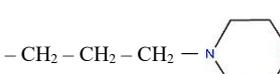
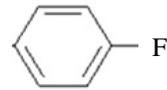
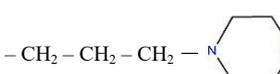
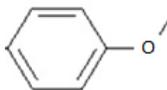
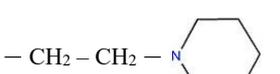
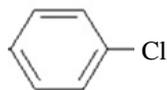
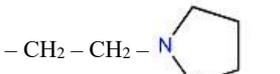
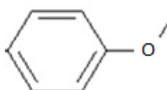
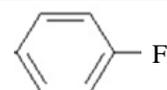
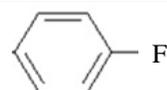
США), бикукуллин («Sigma», США), пикротоксин «ICN Biomedical», США), 1,2,5,6-тетрагидропирид-4-илметилфосфиновая кислота (TPMPA), N-метил-D-аспаратат («Sigma», США), стрихнин («Sigma», США), изониазид («Sigma», США), 4-аминопиридин («Sigma», США), U-50,488 («Sigma», США), норбиналторфимин (nor-BNI) («Sigma», США), флумазенил («Sigma», США), никотин («Sigma», США), ареколин («Фармакон», Россия), резерпин («Sigma», США), галоперидол («Мосхимфармпрепараты», Россия), L-3,4-диоксифенилаланин (L-ДОФА) («Sigma», США), 5-гидрокси-L-триптофан («Sigma», США), натрия хлорида раствор 0,9% («Эском», Россия), этанол 95%.

Исследования были выполнены на 1155 белых нелинейных половозрелых мышах массой 20-30 г, 68 белых аутбредных крысах массой 180-320 г, 15 кроликах породы «Шиншилла» массой 4-4,8 кг. Животные доставлялись из питомников: ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва), ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово), ФГУП "НИИ ГТП" ФМБА России (г. Волгоград). Все животные содержались в специально оборудованном виварии кафедры фармакологии ВолГМУ с натуральным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на полнорационной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты выполнялись с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ, в соответствии с требованиями государственных стандартов РФ (ГОСТ Р 50258-92), Директивы Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях 2010/63/EU от 22.09.2010 г, приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и приказом Минздравсоцразвития России протокол №6 от 22.12.2012 г. Все экспериментальные исследования были согласованы с Региональным независимым этическим комитетом при ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» от 17.12. 2011 г, протокол № 149-2012.

Таблица 2.1

Химические структуры изучаемых соединений из ряда конденсированных производных имидазо[1,2- α]бензимидазола.

№	Шифр соединения	R ²	R ¹	Брутто формула	Солевое основание	Молек. масса
N ₉ -замещенные производные имидазо[1,2- α]бензимидазола						
						
1	ПУ-1204	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{FN}_4$	2HCl	435,365
2	ПУ-67	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$	2HCl	447,401
3	ПУ-87	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$	2HCl	433,374
4	ПУ-273	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_4$	2HCl	378,898
5	ПУ-285	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$	2HCl	453,793
6	ПУ-1205	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}$	2HCl	437,338
7	ПУ-1203	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 		$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{FN}_4$	2HCl	421,339
8	ПУ-1359	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$		$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{FN}_3$	HCl	291,322

№	Шифр соединения	R ²	R ¹	Брутто формула	Солевое основание	Молек. масса
N ₁ -замещенные производные имидазо[1,2-α]бензимидазола						
						
1	РУ-727			C ₂₃ H ₂₇ BrCl ₂ N ₄	2HCl	510,297
2	РУ-1277			C ₂₂ H ₂₅ Cl ₂ FN ₄ O	2HCl	451,365
3	РУ-731			C ₂₃ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₂	2HCl	463,4
4	РУ-598			C ₂₂ H ₂₅ Cl ₃ N ₄	2HCl	451,82
5	РУ-630			C ₂₂ H ₂₆ Cl ₂ N ₄ O	2HCl	433,374
6	РУ-1274	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N-(CH ₂ -CH ₃) ₂		C ₂₂ H ₂₇ Cl ₂ FN ₄	2HCl	437,381
7	РУ-1273	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -Br		C ₁₈ H ₁₆ Br ₂ FN ₃	HBr	453,146

2.2. Методы исследования

Методы экспериментальных исследований выбраны и реализованы с учетом рекомендаций по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств Т.А. Ворониной и соавторов (2012).

2.2.1 Направленный поиск соединений с антиконвульсивной активностью

Компьютерный прогноз спектра биологической активности *in silico* выполнен с помощью программы PASS (версия 10.4) на основании статистического

анализа частоты встречаемости структурных фрагментов в классах активных и неактивных соединений [Поройков В. В. и др., 2009].

Система PASS использует байесовский подход в оценке вероятностей и позволяет прогнозировать активность соединений со средней ошибкой 5,308% (скользящий контроль с исключением по одному) на основе анализа обучающей выборки, содержащей информацию о более чем 260 000 лекарственных субстанций и биологически активных соединений. PASS анализ выполнялся с заданным порогом вероятности наличия ($P_a > 20\%$) и отсутствия ($P_i < 10\%$) противосудорожной активности у конкретного соединения, в результате чего были отобраны наиболее перспективные вещества.

Оценка противосудорожной активности в тесте судорог, вызванных коразолом. Животным опытных групп интраперитонеально (и.п.) вводились исследуемые соединения в скрининговой дозе 10 мг/кг, не вызывающей видимых моторных нарушений. Животные из группы позитивного контроля получали вальпроевую кислоту в дозе 130 мг/кг интраперитонеально [Luszczyski J. J., 2008]. Группа негативного контроля получала эквивалентные количества растворителя (дистиллированной воды) интраперитонеально.

Судорожное состояние у животных моделировалось путем однократного подкожного введения коразола в область шейного отдела в дозе 75 мг/кг ($ЭД_{97}$) спустя 60 минут после введения изучаемых веществ или растворителя.

На протяжении 30 минут проводилась HD видеорегистрация с последующим подсчетом судорожных явлений и летальностью. Животные, у которых не наблюдались повторяющиеся клонические судороги длительностью более чем 3 секунды после инъекции вещества и затем коразола в течение 30 минут, рассматривались как защищенные.

Для расчёта медианной эффективной дозы наиболее активное соединение назначалось животным интраперитонеально в возрастающих дозах 1, 5, 7, 10, 15 мг/кг. Вальпроат натрия вводился внутрибрюшинно в дозах 5, 30, 60, 100, 120, 280 мг/кг.



Рисунок 2.2 Видеорегистрация судорожных явлений и гибели

Методика изучения общетоксических свойств соединений описана в разделе 2.2.9.

Метод проведения анализа зависимости между противосудорожной активностью и химической структурой исследуемых веществ. Для изучения зависимости между структурой и биологической активностью соединений использовался эмпирический метод Фри-Уилсона [Kubinyi H., 1988], учитывающий вклад базовой структуры и заместителей в рядах N_9 - и N_1 -производных в уровень противосудорожной активности.

Использованный подход предполагал, что вклад каждого заместителя в противосудорожную активность суммируется с другими, что можно выразить в линейном регрессионном уравнении:

$$A = a_0 + a_1s_1 + a_2s_2 + a_3s_3 + \dots + a_ns_n$$

$s_{1,2,3,\dots,n}$ – набор заместителей;

a_0 – базовая активность ряда;

$0,1,2,3,\dots,n$ – вклады заместителей в суммарную активность соединений.

При этом каждый элемент s принимает два значения: 1, если соответствующий заместитель присутствует в соединении; 0, если соответствующий заместитель отсутствует в молекуле. Переменные переводились в бинарные, облегчая нахождение коэффициентов регрессии. Для определения вкладов заместителей в проявление биологического ответа использовалось уравнение:

$$A = \sum a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n / \sum s_1 + s_2 + s_3 + \dots + s_n - a_0$$

2.2.2 Изучение спектра противосудорожной активности соединения-лидера на острых моделях эпилептогенеза

Определение судорожного порога на модели коразоловых судорог. Для определения судорожного порога коразол (1% раствор или 10 мг/мл) титровался внутривенно в хвостовую вену мышей со скоростью 0,1 мл/мин с помощью шприцевого дозатора (LineOmat, Германия).

У контрольных животных после инфузии развивались следующие типы судорог: 1) одно или более миоклонических подергиваний всего тела; 2) повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 секунды без потери рефлекса переворачивания; 3) генерализованные клонические судороги (клонус) передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания; 4) клонические судороги, за которыми следовала тоническая экстензия передних конечностей с потерей рефлекса переворачивания; 5) тоническая экстензия задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания.

В качестве критерия оценки противосудорожного действия вещества использовалась его способность предупреждать развитие 1 и 3-й стадий судорог.

При определении порога судорожной реакции для указанных стадий животные были разделены на группы по 10 особей. Исследуемые вещества вводились интраперитонеально, и затем через 1 час начиналось титрование коразолом.

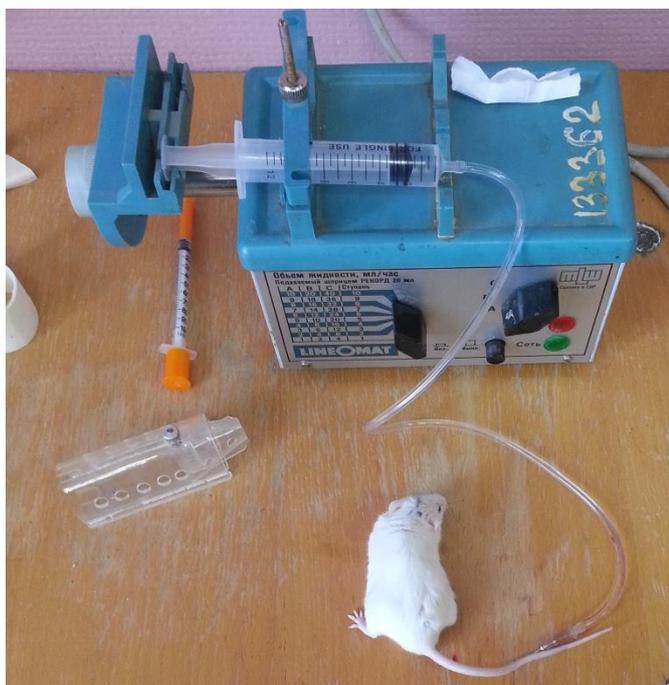


Рисунок 2.3 Изучение судорожного порога в тесте с коразолом

Эффект изучаемых веществ учитывался отдельно для каждой стадии как процент увеличения количества коразола, провоцирующего развитие судорожных явлений. Пороговая доза коразола рассчитывалась по формуле [Mandhane S. N., 2007]:

*Скорость введения (0,1 мл/мин) x латентный период (с) x
x концентрация раствора коразола (10 мг/мл) x 1000 / 60 x масса животного (г)*

Показатели TID₅₀ (threshold increasing dose — доза, увеличивающая порог судорог к коразолу на 50%) рассчитывались методом линейной регрессии.

Антиконвульсивная активность в тесте максимального электрошока.

При изучении антиконвульсивной активности по методике максимального электрошока [Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., 2012] животные получали через корнеальные электроды электрические стимулы (50 Hz, 50 mA), длительностью 0,2 с. Тестируемое вещество и препарат сравнения карбамазепин изучались в диапазоне доз 1–50 мг/кг и.п. Оценивалась способность веществ предупреждать развитие тонической экстензии у мышей.

Изучение антиконвульсивного действия на модели судорог, вызванных пикротоксином. Способность вызывать тремор и повторяющиеся клонические судороги связана с антагонистическим влиянием пикротоксина в отношении

ГАМК_A – рецепторов [Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012]. Исследование проводилось на мышах самцах. Контрольная группа получала пикротоксин 3,5 мг/кг и.п. Двум опытным группам вводилось изучаемое соединение в дозе 10 и 20 мг/кг и.п. и через 30 минут пикротоксин. После введения веществ в течение 1 часа вели наблюдение за животными, отмечая латентный период появления и продолжительность тремора, латентный период развития судорог и количество судорожных припадков. Изменение регистрируемых показателей в опытных группах сравнивалось с контрольными показателями.

Изучение антиконвульсивного действия на модели судорог, вызванных ингибитором синтеза ГАМК изониазидом. Для провокации судорог [Bernasconi R. et al., 1988], белым мышам самцам вводился изониазид и.п. в дозе 250 мг/кг спустя 60 минут после интраперитонеального введения изучаемых соединений. Животные были разделены на группы:

- 1) Изониазид + 0,2 мл дистилл. воды (контроль)
- 2) Изониазид + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)
- 3) Изониазид + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)
- 4) Изониазид + диазепам (3 мг/кг, и.п.)

На протяжении 120 минут регистрировалось время наступления клонических судорог и гибель животных. Высокую эффективность на данной модели проявляют препараты с анксиолитической активностью, например, бензодиазепины [Vogel H., 2007].

Оценка антиконвульсивного действия на модели судорог, вызванных стрихнином. Стрихнин блокирует глициновые рецепторы, которые являются аллостерическими регуляторами ГАМК-комплекса [Lehmann J. et al., 1988].

Судорожное состояние вызывалось стрихнинина нитратом (2,5 мг/кг, п.к.) у белых мышей самцов через 60 минут после интраперитонеального введения изучаемых соединений. Было выделено четыре группы животных:

- 1) Стрихнин + 0,2 мл дистилл. воды (контроль)
- 2) Стрихнин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)
- 3) Стрихнин + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)
- 4) Стрихнин + диазепам (3 мг/кг, и.п.)

Животные, выжившие к 10-й минуте наблюдения, рассматривались как защищенные.

Изучение антиконвульсивного действия на модели судорог, вызванных аминопиридином. 4-аминопиридин является блокатором калиевых каналов. Возникновение судорог после введения аминопиридина связывают с его способностью инициировать выделение некоторых медиаторов из синаптических окончаний, среди которых доминируют возбуждающие аминокислоты [Vogel H., 2007].

В данной модели высокую эффективность проявляют препараты с профилем близким к вальпроату натрия.

В эксперименте использовались мыши самцы, которые были разделены на четыре группы по 12 животных:

- 1) Аминопиридин + 0,2 мл дистилл. воды (контроль)
- 2) Аминопиридин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)
- 3) Аминопиридин + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)
- 4) Аминопиридин + вальпроат натрия (301 мг/кг, и.п.)

Аминопиридин вводился в дозе 13,3 мг/кг, п.к. (ЛД₉₇) через 30 минут после инъекций изучаемых соединений или эквивалентного объема дистиллированной воды.

Антиконвульсивная активность на модели судорог, вызванных N-метил-D-аспартатом. NMDA является агонистом ионотропных глутаматных рецепторов.

Для моделирования судорог мыши самцы были разделены на группы, получавшие:

- 1) NMDA + 0,2 мл дистилл. воды (контроль)
- 2) NMDA + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)
- 3) NMDA + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)

NMDA вводился подкожно в дозе 75 мг/кг через 60 минут после введения исследуемых веществ. Наблюдения продолжались последующие 30 минут. Животные считались незащищенными, если демонстрировали вращательное

поведение: два и более последовательных круговых движений на 360 градусов [Вум Е. Н. et al., 2011].

2.2.3 Определение антиконвульсивной активности соединения-лидера при его хроническом введении

Изучение антиконвульсивной активности на модели киндлинг прогрессии с коразолом. Фармакологический киндлинг моделировался путем повторных введений коразола по схеме каждые 48 часов в подпороговой дозе 35 мг/кг и.п., не вызывающих судорожных состояний на начальных этапах [Спасов А. А. и др., 2015]. Эксперимент выполнялся в утренние часы в период с 9:00 до 12:00. Животные были разделены на 3 группы (n=15). Исследуемое вещество и референтный препарат вводились каждый день (за 30 минут до введения коразола, либо в 9:00). В качестве эталонного препарата использовался вальпроат натрия в дозе 100 мг/кг, и.п. Исследуемое вещество вводилось в дозе 10 мг/кг, и.п. Группа негативного контроля получала растворитель (0,2 мл дистиллированной воды и.п.).



Рисунок 2.4 Схема введения тестируемых веществ

Оценку судорожных реакций у животных определяли по суммарной балльной шкале:

- 0 баллов — отсутствие изменений;
- 1 балл — оживленное поведение, активное обнюхивание, неподвижное положение;
- 2 балла — единичные миоклонические подергивания головы или отдельных мышц тела;
- 3 балла — серийные подергивания всего тела, симптом Штраубе;
- 4 балла — «барабанный бой», «дикий бег»;
- 5 баллов — генерализованные клонико-тонические судороги с падением набок (утратой рефлекса переворачивания). Тонические судороги.

Наблюдение проводилось в течение 30 мин после введения коразола с помощью HD видеорегистрации. Суммарный подсчет баллов проводился

индивидуально для каждого животного. Затем выполнен подсчет среднего балла для каждой группы с расчетом стандартной ошибки (m).

Противосудорожная активность соединения на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя.

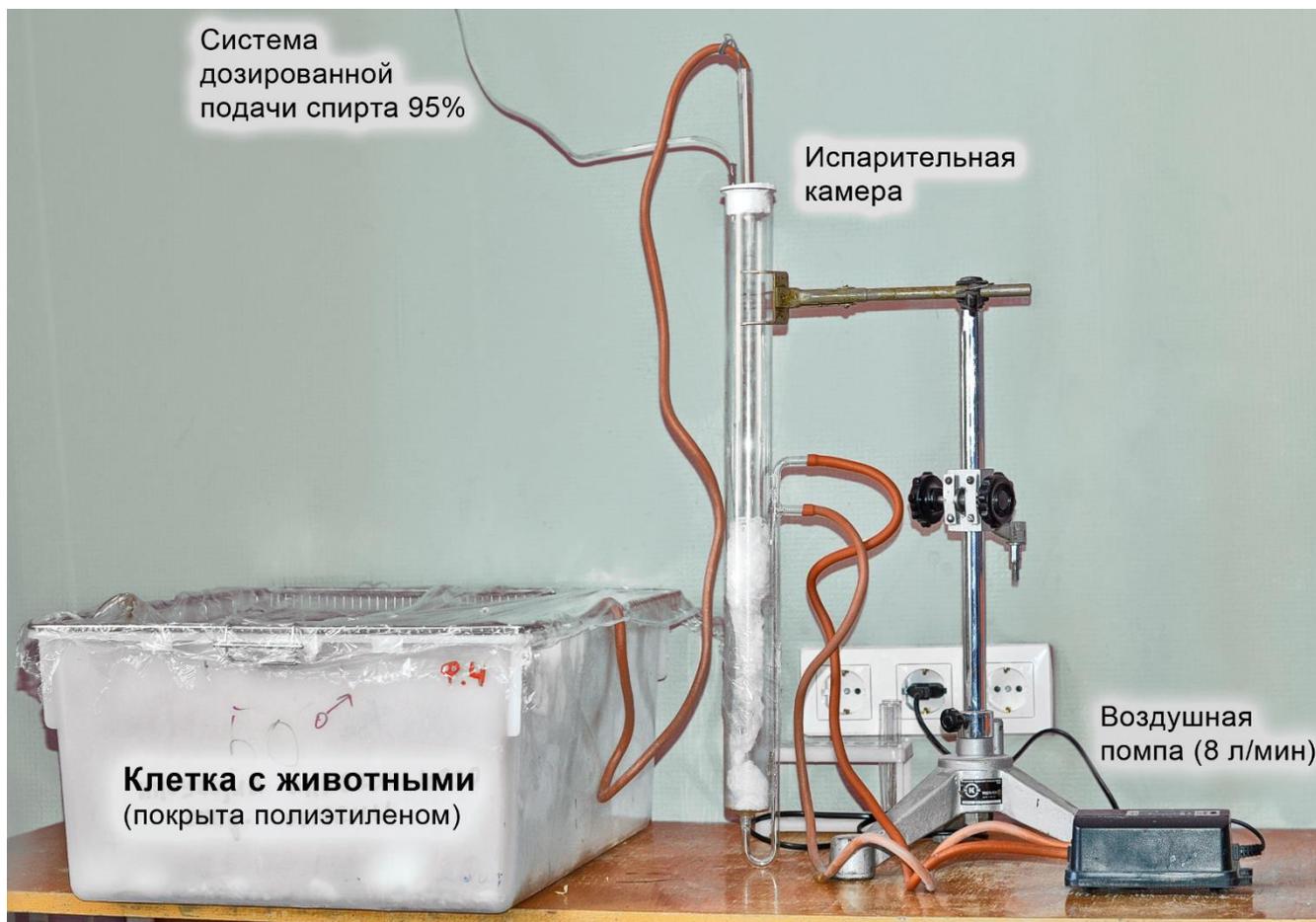


Рисунок 2.5 Устройство установки для интермиттирующей подачи паров алкоголя

Пары этанола в концентрации 15 мг/л нагнетались воздушной помпой со скоростью 8 л/мин в ингаляционную камеру с животными (рисунок 2.5).

В течение 4 дней животные подвергались интермиттирующему воздействию алкоголя (16 ч/день с последующей отменой на 8 часов).

Было выделено 4 группы животных:

- 1) Воздух + растворитель (дистиллированная вода в объеме 0,1 мл на 10 г веса)
- 2) Пары алкоголя + растворитель
- 3) Пары алкоголя + вальпроат натрия в дозе 300 мг/кг, внутрибрюшинно
- 4) Пары алкоголя + РУ-1205 (10 мг/кг внутрибрюшинно).

Каждый день через 6 часов после прекращения подачи алкоголя (пик проявления эпилептической активности) производилась оценка судорожной активности по шкале НИС (Handling-induced convulsions – судороги, вызванные «хендлингом») (таблица 2.2), а на 4 сутки ежечасно вплоть до 8 ч.

Таблица 2.2

Шкала оценки НИС

Баллы	Поведенческая реакция
0	Нет реакции при поднятии за хвост и вращении на 180-360 градусов
1	Подергивания мимических мышц после вращения на 180-360 градусов
2	Тонические судороги при вращении на 180-360 градусов
3	Тонико-клонические судороги при вращении на 180-360 градусов
4	Тонические судороги при поднятии за хвост
5	Тонико-клонические судороги при поднятии за хвост с задержкой на 1–2 с
6	Выраженные тонико-клонические судороги при поднятии за хвост
7	Спонтанные тонико-клонические судороги

2.2.4 Влияние на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры²

Микроапликация соединения-лидера осуществлялась на расстоянии до 50 мкм от регистрирующих микроэлектродов на глубине 1000 мкм [Сухов А.Г. и др., 2009]. Объем раствора составлял менее 1 мкл, время микроапликации занимало менее 30 с. Отведение внеклеточной фоновой активности мозга крыс осуществлялось монополярно, референтным электродом являлся один из зажимов головодержателя. Для определения фокальной активности исследуемых структур мозга использовались стеклянные микроэлектроды, наполненные 2,5 М раствором NaCl с сопротивлением 1–5 МОм и диаметром кончика 2-3 мкм. Регистрацию фоновой фокальной проводили на жесткий диск компьютера с помощью 16-канального АЦП L-761 (L-Card, Россия) с частотой дискретизации сигнала 1 кГц.

² Исследование выполнено на базе НИИ нейрокибернетики им. А.Б.Когана Южного федерального университета

2.2.5 Влияние на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга³

Для исследования антиэпилептиформных свойств использовали метод искусственного генеза эпилептиформности с помощью электрической стимуляции поверхности мозга (ритмическая стимуляция током с параметрами: напряжение 120 В, длительность 10 с, частота стимуляции 10 Гц) [Сухов А.Г. и др., 2009]. Для усиления биоэлектрической активности использовался 10-канальный усилитель УБС 1/10 (Россия) с полосой пропускания от 0,1 Гц до 2000 Гц. Диапазон усиливаемых напряжений от ± 5 мкВ до ± 10 мВ. Входное сопротивление не менее 10 МОм. Выходное сопротивление не более 0,1 кОм. Регистрация вызванной биоэлектрической активности проводилась на жесткий диск компьютера с помощью 16-канального АЦП L-761 (L-Card, Россия) с частотой дискретизации сигнала 1 кГц. Для стимуляции использовались электростимуляторы ЭСЛ-2 (Россия), ГЭФИ-3-БУ (Россия). Управление стимуляцией производилось через TTL выходы платы L-761 (L-Card, Россия) и задавалось программно.

2.2.6 Механизм антиконвульсивного действия

Влияние соединения на сокращение препаратов изолированного семявыносящего протока кролика. Механизм каппа-рецепторного действия оценивался по способности угнетать вызванные низкочастотной электрической стимуляцией (10 Гц, амплитуда 50 В, 2 мс) сокращения изолированного семявыносящего протока кролика (СПК), эксклюзивно экспрессирующего каппа-подтип опиоидных рецепторов [Ока Т. et al., 1981]. Эксперимент выполнялся на установке для работы с изолированными органами Ugo Basile (Италия). Выделенный препарат СПК длиной 10-15 мм закреплялся между двумя электродами и помещался в емкость объемом 10 мл, содержащую изотонический раствор при температуре 37°C и постоянной аэрации воздухом. Учитывался исходный сократительный ответ органов [Гречко О. Ю. и др., 2014].

³ Исследование выполнено на базе НИИ нейрокибернетики им. А.Б.Когана Южного федерального университета

Исследуемое вещество, а также референтные препараты (высокоселективный агонист каппа-опиоидных рецепторов – U-50,488 и буторфанола тартрат) добавлялись в емкость в возрастающих концентрациях. О каппа-рецепторной активности судили по разнице сократительного ответа, вызванного электрической стимуляцией между опытными и контрольными значениями.

С помощью метода регрессионного анализа рассчитывались величины ЭК₅₀ – концентрации вещества, ингибирующие сократительный ответ гладкомышечного органа на 50%. Для оценки вклада каппа-агонистического действия изучаемых веществ на сократительный ответ изолированных препаратов, проводились тесты с предварительным добавлением селективного каппа-антагониста – норбиналторфимина (nor-BNI).

Влияние соединения на ионные токи Ca²⁺ и Na⁺ нейронов моллюска.⁴
Для изучения влияния на натриевые и кальциевые трансмембранные ионные токи использовали метод внутриклеточного диализа и фиксации мембранного потенциала (patch clamp) на нейронах моллюска прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) [Вислобоков А. И. и др., 2001]. Изолированную клетку помещали на полиэтиленовую пипетку (при фиксированном потенциале -90 мВ). При создании толчков отрицательного гидростатического давления мембрана нейрона разрушалась, создавался электрический контакт внутриклеточного содержимого с неполяризуемым электродом, соединенным с усилителем фиксации потенциала. Соединение исследовали в диапазоне концентраций 1–1000 мкМ. После измерения суммарных ионных токов выполняли замену внутриклеточного и наружного растворов на растворы для регистрации отдельных токов. Выделение чистых кальциевых или натриевых токов со стабильными параметрами, которые принимали за исходные значения (контроль), происходило через 3–5 мин. после полной замены растворов. Далее раствор в камере с нейроном заменяли раствором с исследуемым веществом. Когда изменения ионных токов, вызванные действием изучаемого вещества, стабилизировались (через 2–3 минуты), вновь

⁴ Исследование выполнено на базе НИИ фармакологии им. А.В. Вальдмана

регистрировали величины токов (эффект). После этого раствор заменяли исходным, и наблюдали динамику восстановления токов (отмывание).

На основании полученных данных с помощью компьютера были построены вольтамперные характеристики (ВАХ) мембраны ионных каналов и зависимости "концентрация-эффект". Исходные величины токов принимали за 100%, а установившиеся при действии соединения выражали в % от исходных значений.

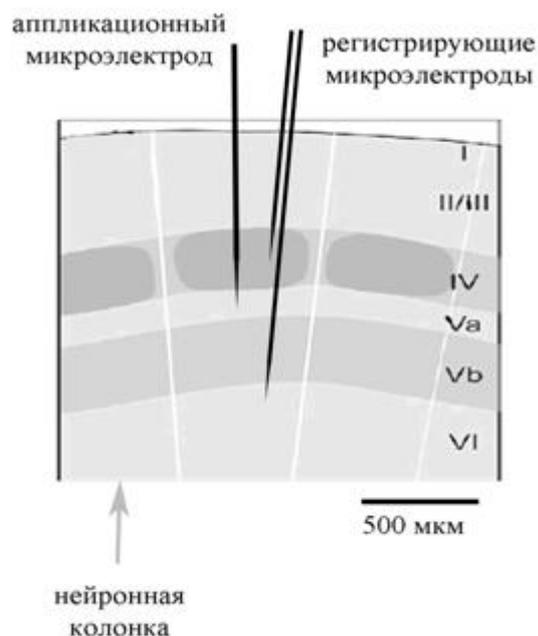


Рисунок 2.6 Микроаппликация биологически активных веществ.

Влияние на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную введением пикротоксина.⁵ Электрофизиологические тесты по изучению влияния соединения-лидера на эпилептиформную активность, вызванную пикротоксином в концентрации 75 мкМ выполнялись на крысах с использованием методики микроэлектродной микроаппликации растворов [Сухов А.Г. и др., 2009]. Микроаппликация осуществлялась на расстоянии до 50 мкм от регистрирующих микроэлектродов на глубине 1000 мкм. Отведение внеклеточной активности мозга крыс осуществляли монополярно, референтным электродом являлся один из зажимов головодержателя. Для регистрации фокальной активности исследуемых

⁵ Исследование выполнено на базе НИИ нейрокибернетики им. А.Б.Когана Южного федерального университета

структур мозга использовались стеклянные микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором NaCl с сопротивлением 1–5 мОм и диаметром кончика 2–3 мкм.

Влияние на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную предварительным введением ТРМРА.⁶ Влияние соединения-лидера на эпилептиформную активность, вызванную специфическим блокатором ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА в миллимолярной концентрации, выполнялись на крысах с использованием методики микроэлектродной микроаппликации растворов [Сухов А.Г. и др., 2009]. Отведение внеклеточной активности мозга крыс осуществляли монополярно, референтным электродом являлся один из зажимов головодержателя. Для регистрации фокальной активности исследуемых структур мозга использовались стеклянные микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором NaCl с сопротивлением 1–5 мОм и диаметром кончика 2–3 мкм.

Влияние селективного блокатора каппа-рецепторов nor-BN1 на противосудорожную активность соединения-лидера. Вклад каппа-опиоидной рецепторной системы в противосудорожную активность исследуемого вещества и референтного соединения U-50,488 изучался на модели судорог, вызванных бикикуллином на фоне введения антагониста каппа-рецепторов Nor-BN1 [Yajima Y. et al., 2000]. Было выделено 6 групп животных, протокол назначения веществ приведен в таблице 2.3.

Таблица 2.3

Протокол введения изучаемых соединений на модели судорог, вызванных бикикуллином.

Группы (n=10)	0 мин.	через 90 мин.	через 120 мин.
Контроль	0,1 мл/кг дист. воды	0,1 мл/кг дист. воды	Бикикуллин 5,5 мг/кг
Nor-BN1	5 мг/кг Nor-BN1	0,1 мл/кг дист. воды	
PY-1205	0,1 мл/кг дист. воды	10 мг/кг PY-1205	
Nor-BN1 + PY-1205	5 мг/кг Nor-BN1	10 мг/кг PY-1205	
U-50,488	0,1 мл/кг дист. воды	4,1 мг/кг U-50,488	
Nor-BN1 + U-50,488	5 мг/кг Nor-BN1	4,1 мг/кг U-50,488	

⁶ Исследование выполнено на базе НИИ нейрокибернетики им. А.Б.Когана Южного федерального университета

Все соединения и растворитель вводились интраперитонеально. Бикукуллин растворялся в дистиллированной воде с добавлением 0.1 М HCl до pH 3.0. Период наблюдения составлял 30 минут.

Влияние блокатора бензодиазепинового сайта флумазенила на противосудорожную активность соединения на модели судорог, вызванных коразолом. Роль бензодиазепинового сайта ГАМК-рецепторов в противосудорожном действии исследуемого вещества и препарата сравнения диазепама изучалась на модели судорог, вызванных коразолом у мышей на фоне введения антагониста бензодиазепинового сайта флумазенила [Hosseinzadeh H., 2004].

Таблица 2.4

Протокол введения изучаемых соединений в тесте судорог, вызванных коразолом у мышей.

Группы (n=10)	0 мин.	через 5 мин.	через 35 мин.
Контроль	0,1 мл/кг дист. воды	0,1 мл/кг дист. воды	Коразол 75 мг/кг, п.к.
Флумазенил	10 мг/кг флумазенил	0,1 мл/кг дист. воды	
РУ-1205	0,1 мл/кг дист. воды	10 мг/кг РУ-1205	
Флумазенил+РУ-1205	10 мг/кг флумазенил	10 мг/кг РУ-1205	
Диазепам	0,1 мл/кг дист. воды	1 мг/кг диазепам	
Флумазенил+диазепам	10 мг/кг флумазенил	1 мг/кг диазепам	

Было выделено 6 групп животных, протокол введения соединений представлен в таблице 2.4.

Изучаемые соединения, флумазенил и растворитель (дистиллированная вода) вводились и.п. После введения коразола наблюдение продолжалось в течение 30 минут.

2.2.7 Взаимодействия с анализаторами нейромедиаторных систем

Нейропсихотропные средства, в том числе соединения с антиконвульсивной активностью, реализуют свои эффекты с вовлечением различных медиаторных систем мозга. Исследование нейрхимических особенностей влияния молекул на нейрорегуляторные процессы в центральной нервной системе представляет

интерес не только с точки зрения выявления общих принципов их действия, но и дальнейшей разработки рациональных путей поиска новых лекарственных средств с заданными свойствами и минимальными побочными эффектами.

Для оценки нейрохимического спектра действия исследуемого вещества применялись различные методические приемы при сочетанном введении исследуемого соединения с анализаторными агентами [Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012]. Влияние на моноаминергические структуры мозга изучали в тестах с фенамином (5 мг/кг, и.п.), L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.), галоперидолом (1 мг/кг, и.п.), 5-гидрокситриптофаном (300 мг/кг, и.п.), резерпином (2,5 мг/кг, и.п.); холинергическое действие определялось с учетом модуляции эффектов ареколина (25 мг/кг, п.к.), никотина (6 мг/кг, п.к.). Соединение РУ-1205 вводили интраперитонеально в дозе 1, 10 и 30 мг/кг.

2.2.8 Влияние соединения-лидера на развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены

Исследуемые соединения или растворитель (физиологический раствор) вводились 2 раза в сутки на протяжении 28 дней:

- 1) группа негативного контроля (n=10) получала растворитель (0,01 мл на 1 г веса и.п.);
- 2) группа позитивного контроля (n=10) получала раствор диазепамы 5 мг/кг и.п. (TID₂₀₀);
- 3) группа (n=10) получала раствор соединения РУ-1205 в дозе 31 мг/кг и.п. (TID₂₀₀)

Судорожный порог (подробно методика описана в разделе 2.2.2) определялся за день до начала введения изучаемых веществ, на 1, 14, 28 день через 30 минут после введения соединений или эквивалентного объема физиологического раствора, а также на 2, 4 и 7 день после отмены хронического введения антиконвульсивных веществ или растворителя [Löscher W. et al., 1996]. Внутривенная инфузия коразола прекращалась после появления миоклонических подергиваний. Пороговая доза коразола рассчитывалась по формуле, приведенной выше.

Признаки синдрома отмены оценивались на второй день после отмены вещества, при этом регистрировали двигательную активность (в тесте открытое

поле), ушной и корнеальный рефлекс, наличие судорог, тремора, птоза, прыжков, встряхиваний, стука зубами, синдрома Штраубе, чесания, чихания, бокового положения. Критерием развития синдрома отмены считали появление спонтанных судорог, повышение двигательной активности и изменение общего состояния животных, относительно контрольной группы, хронически получавших растворитель. Развитие толерантности выражалось в снижении противосудорожной активности вещества, а феномен «рикошета» характеризовался повышением судорожного порога после отмены введения изучаемых по сравнению с контролем.

2.2.9 Изучение вторично-подкрепляющих и аверсивных свойств соединения РУ-1205

Влияние соединения РУ-1205 на формирование условного рефлекса предпочтения или избегания места. Оценка вторично-подкрепляющих свойств исследуемого вещества проводилась на 30 самцах белых беспородных мышей, массой 20-25 г, разделенных на 3 группы. Нейтральные обстановочные раздражители в сочетании с «награждающим» эффектом аддиктивных средств могут приобретать собственные «аттрактивные» качества, на основе которых вырабатываются инструментальные реакции второго и более высоких порядков, которые подкрепляются этими условнорефлекторными раздражителями (УРПМ) [Звартау М. В. и др., 2007]. Если тестируемое вещество проявляет аверсивные свойства, то вырабатывается условнорефлекторная реакция избегания места (УРИМ) [Bruchas M. R. et al., 2007].

Методика выработки УРПМ или УРИМ проводилась в условиях при исходно равносбалансированном выборе отсеков экспериментальных камер, различающихся по цвету стенок и текстуре пола. В эксперимент брали животных, не предпочитавших ни один из отсеков. Исследование предусматривало периоды обуславливания и тестирования. Период фармакологического обуславливания продолжался 4 дня по две сессии в день. Перед помещением в один из отсеков (отсек № 1) на 30 минут животным интраперитонеально вводили 0,2 мл

дистиллированной воды. Во время второй сессии перед помещением грызунов в противоположный отсек (отсек № 2) вводили исследуемое соединение в дозе TID_{200} (диазепам 5 мг/кг, РУ-1205 31 мг/кг, и.п), на тот же период времени (30 минут). Во время обуславливания отсеки камеры отделялись перегородкой. Заключительное тестирование выработки уловного рефлекса предпочтения/избегания места проводилось через 72 часа после последнего обуславливания. Из камеры вынималась перегородка между отсеками, и в течение 15 минут мыши свободно исследовали камеру. Регистрировалось время нахождения грызунов в отсеках и количество переходов из одного отсека в другой.

Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста неизбежного плавания. Тест принудительного плавания по Порсольту [Porsolt R.D., 1977; McLaughlin J. P. et al., 2003] выполнялся на 36 самцах белых нелинейных мышей в два этапа. В первый день обучающей сессии мыши помещались на 15 минут в емкость (50 см высотой x 25 см в диаметре), заполненную водой $t 27 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 24 часа животным вводились исследуемое вещество в дозе TID_{200} (диазепам 5 мг/кг, РУ-1205 31 мг/кг, и.п) или эквивалентный объем растворителя. Через 60 минут после введения изучаемых веществ или растворителя мышей помещали в сосуд с водой на 5 мин. В описанной парадигме повторное неизбежное плавание индуцирует прогрессивное увеличение продолжительности пребывания животного в неподвижной позе. В ходе тестовой сессии регистрировалось общее время нахождения мыши в состоянии иммобилизации (животное пассивно плавает в воде со слегка поднятой головой). Увеличение продолжительности иммобилизации расценивалось как отказ животного от активных действий при аверсии и психической подавленности.

2.2.10 Изучение общетоксических свойств

Определение острой токсичности. Острая токсичность была изучена в соответствии с требованиями системы оценки общетоксического действия фармакологических веществ и методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [Арзамасцев Е.В., 2012].

Вещество РУ-1205 в дозах 100, 200, 300, 500, 700, 1000 мг/кг вводилось мышам интраперитонеально однократно. Интактная группа контроля была включена в эксперимент для выполнения сравнительной оценки состояния и поведения особей в контрольной и опытных группах. Наблюдение за животными проводилось в течение 14 дней: первые 10 часов осуществляли непрерывное наблюдение, в последующие дни - 2 раза в сутки. Регистрировали динамику и клинические признаки отравления веществом, летальность и реабилитационные процессы у выживших животных.

Оценку общего состояния и поведения животных проводили по следующим показателям: характеру двигательной активности, наличию судорог, координации движений, наличию тремора, рефлекторных реакций на внешние раздражители (тактильные и звуковые), состояние шерстного покрова (шерсть гладкая или взъерошенная, тусклая или блестящая), а также рефлексам положения по принятой шкале при визуальном наблюдении [Irwin S., 1964]. Расчет ЛД₅₀, ЛД₁₆, и ЛД₈₄ производили с помощью построения нелинейной регрессионной модели методом наименьших квадратов.

Изучение нейротоксикологического профиля с использованием системы многотестового наблюдения по Ирвину. Изучение нейротоксикологических свойств выполнялось по методике многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin S., 1964]. Соединение вводилось интраперитонеально однократно мышам в возрастающих дозах: 1, 10, 25, 50 и 100 мг/кг. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода. Контрольная группа животных получала растворитель в эквивалентном объеме. Перед введением растворов веществ определялись исходные показатели. Мыши были разделены на экспериментальные группы по 8 особей в каждой. За мышами наблюдали в течение 3 часов после инъекции соответствующей дозы вещества во временных интервалах – 30, 60, 120 и 180 минут с момента измерения исходных значений. Производилась оценка следующих параметров:

1. Интегральные показатели: состояние слизистых оболочек (наличие и характер выделений, окраска, отечность), характер шерстного покрова, оформленность и цвет фекалий.

2. Изменение эмоционального состояния (вокализации, агрессии, пугливости, настороженности), нарушения со стороны ЦНС (синдром Штраубе, парезы, тремор, судорожные явления), рефлексы (слуховой, ипсилатеральный сгибательный, роговичный).

3. Двигательную и поисковую активность, мышечную координацию оценивали в тестах «ротарод», удержание на сетке, «открытое поле».

4. Функциональное состояние вегетативной нервной системы: частота дыхательных движений, ректальная температура, наличие или отсутствие экзофтальма, пилоэрекции, птоза, саливации.

Пугливость и настороженность животных оценивалась при прикосновении к животному кончиком и при использовании стандартного звукового раздражителя в форме громкого хлопка. Тремор, судороги, походка, изменения положения тела и конечностей оценивались визуально.

Для исследования нейротоксичности (ТД) проводили «Ротарод тест», во время которого регистрировали продолжительность удержания животного на металлическом стержне диаметром 3 см, вращающемся со скоростью 10 оборотов в минуту. Если животное удерживалось на стержне более 120 секунд, это расценивали как показатель отсутствия неврологического дефицита.

Влияние соединения на мышечную координацию оценивалось в «тесте удержания на сетке». Отмечали количество лап мыши, зафиксированных на сетке, переводя затем в баллы (1 лапа – 1 балл).

Слуховой и роговичный рефлекс оценивались по реакции отдергивания головы при механическом раздражении роговицы или слухового прохода. Ипсилатеральный сгибательный рефлекс измеряли путем сдавливания лапы зажимом с постоянным уровнем компрессии и последующей оценкой времени возникновения и силы реакции.

В тесте «открытое поле» оценивалась двигательная активность, а также ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального состояния животных [Воронина Т.А., 2005]. Установка «открытого поля» представляла собой квадратную площадку размером 80x80 см с имеющимися 16 отверстиями в полу, разделенную на 25 равных квадратов с выделением центральной зоны поля. Освещенность площадки составляла 90 Лк. Мышей помещали в центральный квадрат площадки хвостом, направленным к исследователю. Наблюдение за мышами проводили на протяжении 2 минут и фиксировали следующие показатели: число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность), число вставаний на задние лапы (вертикальная двигательная активность) и число заглядываний в отверстия (ориентировочно-исследовательская активность), число выходов в центральную зону, количество фекальных болюсов (эмоциональное состояние) [Буреш Я., 1991].

Ректальная термометрия проводилась при помощи электронного термометра («OMRON», Германия) путем введения в прямую кишку на глубину 15 мм. Частота дыхательных движений (ЧДД) определялась при визуальном подсчете за 1 минуту.

2.2.11 Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программ «GraphPad Prism 7.0», Microsoft Office Excel 2017 (Microsoft, США) с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп Манна-Уитни (U-test), рангового однофакторного анализа Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна или Tukey, точного критерия Фишера для альтернативных реакций, либо при помощи однофакторного дисперсионного анализа или теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных. Результаты динамических наблюдений обобщались с помощью двухфакторного ANOVA метода. Показатели ЭД₅₀, ЭК₅₀, ЛД₅₀ и ТД₅₀ рассчитывались методом наименьших квадратов и пробит-анализа, с построением регрессионных моделей.

ГЛАВА 3. НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИКОНВУЛЬСИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

Общей патогенетической характеристикой для всех судорожных состояний является дисбаланс между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией. На основании данных, полученных в ходе изучения механизмов возникновения парциальных и вторично-генерализованных приступов, была выдвинута концепция о корковом эпилептогенном очаге, играющем роль «водителя ритма» [Крыжановский Г.Н., 1988, Карлов В. А., 2017]. Предполагается, что гиперсинхронный разряд из первичного эпилептогенного очага распространяется на другие участки мозга, вследствие чего формируется динамичная эпилептическая система с образованием вторичных эпилептогенных очагов, которые в свою очередь приобретают детерминантные свойства [Воронина Т.А., 1982, Гусев Е.И., 2004, Середенин С.Б. и др., 2007]. Поэтому клиническое применение находят средства с различными механизмами действия, которые способны подавлять формирование патологических деполяризационных сдвигов и стабилизировать мембранный потенциал [Воронина Т. А., 2015].

Активно развиваемым направлением в создании новых противосудорожных средств является поиск и разработка биологически активных соединений на основе гетероциклических систем, к которым относятся производные бензимидазола [Gurvinder S., 2013; Nusrat V. et al., 2014]. Структурное родство бензимидазола и его производных с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот – аденином и гуанином детерминирует широкий спектр биологической активности у данного класса веществ [Pathak D. et al., 2010]. В исследованиях сообщается о наличии нейрпсихотропных [Бугаева Л.И. и др., 2000; Гамма Т. В и др., 2012] и противосудорожных свойств в частности [Shingalapur R. V. et al., 2010]. Также было выявлено взаимодействие некоторых производных бензимидазолов с ГАМК_A-рецепторами, которые играют ключевую роль в регуляции нервной возбудимости [Jain P. et al., 2010].

Фторфенилимидазо[1,2- α]бензимидазол рассматривается как перспективный скаффолд для создания высокоселективных агонистов каппа-опиоидных рецепторов [Гречко О. Ю. и др., 2016], которые принимают участие в эпилептогенезе и в последнее время активно изучаются в качестве мишеней для новых противоэпилептических средств.

Среди производных бензимидазола представляется перспективным ряд замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов (ИмБИ), у которых обнаружены различные виды нейрорепродуктивной активности. Некоторые соединения обладали модулирующим влиянием на ионные токи нейронов, что может вносить вклад в их противосудорожную активность [Анисимова В. А. и др., 2005].

На этапе скрининга использовался направленный подход к поиску новых молекул, учитывая свойства ранее выявленных базовых структур. Компьютерный прогноз биологической активности позволяет отобрать наиболее активные соединения для экспериментальной проверки противосудорожного действия, что существенно снижает затраты на синтез и проведение биологических испытаний [Филимонов Д. А., 2006].

3.1 Компьютерный прогноз биологической активности в системе PASS

Для оценки с помощью компьютерной системы PASS перспективности класса производных ИмБИ как источника веществ, обладающих противосудорожной активностью, на основе банка данных по структуре производных конденсированных азолов кафедры фармакологии ВолгГМУ была сформирована база данных из 647 соединений с общей структурной формулой, приведенной на рисунке 2.1, в их числе 521 N₉-замещенных, 126 N₁-замещенных ИмБИ.

В ходе анализа соединений на возможность проявления эффектов и механизмов действия, связанных с противосудорожной активностью (таблица 3.1), было показано, что в целом класс производных ИмБИ является перспективным для поиска веществ с противосудорожными свойствами, так как 88% из всех проанализированных веществ, вне зависимости от положения N₁ и N₉, содержали в

прогнозом спектре PASS какой-либо вид активности, связанный с противосудорожным действием. С точки зрения прогноза наличия противосудорожной активности, оба класса перспективны для поиска новых противосудорожных препаратов, однако данный эффект прогнозируется для большего числа N₉-замещенных ИмБИ, чем для N₁-замещенных ИмБИ.

При рассмотрении прогноза молекулярных механизмов противосудорожного действия выявляются различия между рядами. Как N₁, так и N₉-ИмБИ реализуют противосудорожную активность посредством блокирования натриевых каналов, при этом у N₉-производных вероятность наличия данного механизма действия несколько выше, чем у N₁-производных (таблица 3.1).

Таблица 3.1

Прогнозный спектр активностей, релевантных противосудорожной, для 647 N₉- и N₁-производных имидазо[1,2-*α*]бензимидазола из базы соединений кафедры фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета

Активность	Число активных согласно прогнозу соединений, %		
	Все ИмБИ	N ₉ -ИмБИ	N ₁ -ИмБИ
Противосудорожная	69,2	71,3	60,6
Блокирование натриевых каналов	19,0	20,0	15,0
ГАМК _A -агонистическая	68,5	66,0	78,7
Ингибирование обратного захвата ГАМК	4,0	1,2	15,7
Ингибирование ГАМК-аминотрансферазы	0,8	1,0	0,0
Глутамат-антагонистическая	4,9	4,8	5,5
Всего	87,9	87,9	88,2

Второй общий механизм антиконвульсивного действия для N₁ и N₉-производных ИмБИ, это агонистическая активность в отношении ГАМК_A-рецепторов. В этом случае, наоборот, N₁-замещенные ИмБИ имеют более высокую прогнозную оценку. Третий механизм, ингибирование обратного захвата ГАМК, характерен для N₁-ИмБИ.

Для экспериментальной оценки антиконвульсивных свойств были отобраны 15 наиболее перспективных веществ с заданным порогом вероятности наличия ($P_a > 20\%$) и отсутствия ($P_i < 10\%$) противосудорожной активности (таблица 3.2)

Таблица 3.2

Компьютерный прогноз противосудорожной активности 2-(4-фенил)-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола в системе PASS

Шифр соединения	$P_a > 0,2$	$P_i < 0,1$
<i>N₉-производные имидазо[1,2-α]бензимидазола</i>		
РУ-1204	0,398	0,019
РУ-67	0,206	0,087
РУ-87	0,204	0,088
РУ-273	0,368	0,024
РУ-285	0,379	0,073
РУ-1205	0,324	0,033
РУ-1203	0,397	0,020
РУ-1359	0,337	0,097
<i>N₁-производные имидазо[1,2-α]бензимидазола</i>		
РУ-727	0,440	0,015
РУ-1277	0,409	0,018
РУ-731	0,218	0,077
РУ-598	0,379	0,022
РУ-630	0,212	0,082
РУ-1274	0,358	0,084
РУ-1273	0,258	0,038

3.2 Экспериментальный поиск соединений с антиконвульсивными свойствами среди производных бензимидазола

В ходе экспериментального изучения фармакологической активности на модели коразоловых судорог у мышей были протестированы 15 2-(4-фенил)-

производных имидазо[1,2- α]бензимидазола в скрининговой дозе 10 мг/кг и.п. Результаты экспериментов приведены в таблице 3.3.

У всех животных контрольной группы, получавшей растворитель, после введения коразола (75 мг/кг, п.к.), развивались судорожные проявления в следующей последовательности:

1. Одно или более миоклонических подергиваний всего тела;
2. Повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания;
3. Генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания;
4. Тоническая экстензия передних конечностей с потерей рефлекса переворачивания;
5. Тоническая экстензия передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания.

У 90–100% контрольных животных после введения коразола наблюдались судорожные проявления, описанные в пунктах 1–3. Летальность в группе негативного контроля достигала 100% вслед за наступлением 5 стадии судорожного синдрома.

Вальпроевая кислота (130 мг/кг, и.п.) подавляла развитие клонических судорог, продолжительностью более чем 3 с у 40% животных, что статистически значимо выше по сравнению с группой негативного контроля ($p < 0,05$). Летальность в данной группе составила 30%.

Изучаемые соединения в различной степени влияли на развитие судорожного синдрома и частоту летальных исходов. Наиболее выраженную способность блокировать клонические судороги продолжительностью более 3 секунд проявили соединения под лабораторными шифрами: РУ-1205 > РУ-285 = РУ-1204 = РУ-1203, что статистически значимо отличалось от группы контроля ($p < 0,05$). Соединение РУ-1205 предотвращало гибель 80% животных. Соединения

РУ-67, РУ-87 и РУ-1359 сокращали летальность в равной степени с препаратом сравнения вальпроатом натрия.

Таблица 3.3

Зависимость противосудорожной активности N_1 и N_9 производных имидазо[1,2- α]бензимидазола от их химического строения в сравнении с вальпроевой кислотой на модели судорог, вызванных коразолом (75 мг/кг, п.к.)

Вещество + коразол	R ₁	R ₂	Противосудорожная протекция, %	Выживаемость, %
Контроль (вода)			0	40
Вальпроевая кислота			40	70
N_9-производные имидазо[1,2-α]бензимидазола				
РУ-67	-OCH ₃	-CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	20	70
РУ-87	-OH	-CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	10	70
РУ-273	-Cl	-CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	30	50
РУ-285	-Cl	-CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈ O	40	60
РУ-1203	-F	-CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈	40	60
РУ-1204	-F	-CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	40	60
РУ-1205	-F	-CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈ O	50	80
РУ-1359	-F	-CH ₂ CH=CH ₂	30	70
N_1-производные имидазо[1,2-α]бензимидазола				
РУ-598	-Cl	-CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	0	30
РУ-630	-OCH ₃	-CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈	0	20
РУ-727	-Br	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NC ₅ H ₁₀	10	40
РУ-731	-OCH ₃	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈ O	0	50
РУ-1273	-F	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	20	50
РУ-1274	-F	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	0	50
РУ-1277	-F	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NC ₄ H ₈ O	10	40

Примечание: положение R₁ и R₂ заместителей указано на рисунке 2.1

Положительные результаты данного исследования подтвердили теоретические предпосылки высокой перспективности изучения производных имидазо[1,2- α]бензимидазола на предмет наличия противосудорожной активности.

3.3 Зависимость противосудорожных свойств производных бензимидазола от химической структуры

С целью обеспечения представительности выборки соединений с высокими прогнозными оценками в системе PASS, помимо изменения положения N₁ и N₉-заместителей и варьирования его вида, дополнительно были рассмотрены группы, существенно изменяющие распределение электронной плотности на фенильном кольце, а именно такие, как хлор, фтор, бром, метокси-группа и др. Некоторые из них обладают выраженной электроотрицательностью (например, фтор), другие обладают электроположительными свойствами (например, метокси-группа). Таким образом, был рассмотрен такой набор групп, вводимых в бензольное кольцо 2-фенил-имидазобензимидазола, который обеспечивал достаточную вариабельность распределения электронной плотности на выбранном скаффолде.

Математический расчет вкладов заместителей и базовой структуры производных бензимидазола в противосудорожную активность и показатель выживаемости по методу Фри-Вилсона позволили выявить четыре высоко достоверных зависимости «структура-активность» ($p < 0,01$); результаты приведены в таблице 3.4.

В ходе анализа вкладов заместителей в противосудорожную активность по методу Фри-Вилсона было показано, что для N₉-замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола выраженным положительным влиянием обладают 2-(4-фтор), 9-морфолиноэтил и 9-пирролидиноэтил, а умеренным – 2-(4-хлор). Для N₁-замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов выраженный положительный вклад в активность вносит 9-(3-бромпропил); для 2-(4-фтор), 2-(4-бром) и 9-пиперидинопропила характерно умеренное положительное влияние.

Таблица 3.4

Вклад заместителей и базовой структуры в противосудорожную активность испытанных N₉-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола по методу Фри-Вилсона

Заместитель	Вклад заместителя			
	N ₉ -ИмБИ		N ₁ -ИмБИ	
	Противосудорожная протекция, %	Выживаемость, %	Противосудорожная протекция, %	Выживаемость, %
R₁				
4-метокси	-12,50	5,00	-5,71	-5,00
4-гидрокси	-22,50	5,00	—	—
4-хлор	2,50	-10,00	-5,71	-10,00
4-фтор	7,50	2,50	4,29	6,67
4-бром	—	—	4,29	0,00
R₂				
3-бромпропил	—	—	14,29	10,00
Пиперидиноэтил	-7,50	-2,50	-5,71	-10,00
Пиперидинопропил	—	—	4,29	0,00
Морфолиноэтил	12,50	5,00	—	—
Морфолинопропил	—	—	-0,71	5,00
Диэтиламинопропил	—	—	-5,71	10,00
Пирролидиноэтил	7,50	-5,00	-5,71	-20,00
Аллил	-2,50	5,00	—	—
Базовая структура	32,50	65,00	5,71	40,00
Достоверность модели, p	0.00060	0.00105	0.00146	0.00865

Вклад базовой структуры в противосудорожную активность соединений у N₉-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола существенно выше, чем у N₁-производных.

Что касается выживаемости, то в ряду N₉-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола заместителей с ярко выраженным положительным инкрементом не найдено, все пять положительно влияющих заместителей: 2-(4-метокси), 2-(4-гидрокси), 2-(4-фтор), 9-морфолиноэтил и 9-аллил – вносят умеренный вклад в общую активность. Напротив, в ряду N₁-производных выраженный положительный вклад имеют три заместителя: 2-(4-фтор), 9-(3-бромпропил) и 9-

диэтиламинопропил; 9-морфолинопропил обладает умеренным положительным влиянием.

Вклад базовой структуры в показатель выживаемости у N₉-производных также выше, чем у N₁-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола.

При сравнении двух рядов между собой по совокупности параметров выявлены следующие закономерности. По противосудорожной активности базовая структура N₉-замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов имеет высокий вклад в активность и более восприимчива к введению заместителей, ее повышающих: три заместителя имеют выраженное положительное влияние и один – умеренное. Базовая структура N₁-замещенных производных имидазо[1,2- α]бензимидазола обладает значительно меньшим вкладом в активность и менее восприимчива к введению заместителей, ее повышающих: только один заместитель имеет выраженное положительное влияние, а три – умеренное.

По показателю выживаемости базовая структура N₉-замещенных ИмБИ также имеет высокий вклад в активность, но слабо восприимчива к введению заместителей, ее повышающих: все пять заместителей имеют умеренное положительное влияние. Базовая структура N₁-замещенных производных имидазо[1,2- α]бензимидазола обладает меньшим вкладом в активность, но более восприимчива к введению заместителей, ее повышающих: три заместителя имеют выраженное положительное влияние, а один – умеренное.

Таким образом, по совокупности параметров N₉-замещенные имидазо[1,2- α]бензимидазолы представляются более перспективными для поиска веществ с высокой противосудорожной активностью, чем N₁-замещенные. Для N₉-производных существенный вклад, как в противосудорожную активность, так и в показатель выживаемости, вносит базовая структура, при одновременном наличии большей чувствительности базовой структуры к введению заместителей, повышающих противосудорожную активность соединений.

Следует отметить, что итоговые результаты анализа по методу Фри-Вильсона хорошо согласуются с данными прогноза, полученными с использованием системы PASS.

3.4 Определение показателей ЭД₅₀ противосудорожного действия, ЛД₅₀, протективного и терапевтического индекса соединения-лидера

Для соединения РУ-1205, показавшего наиболее высокий уровень противосудорожной активности в тесте судорог с коразолом, и препарата сравнения вальпроата натрия были рассчитаны ЭД₅₀. Проведена сравнительная оценка токсичности, а также протективного и терапевтического индекса.

Исзуемое соединение и референтный препарат дозозависимо снижали частоту развития генерализованных судорог у экспериментальных животных (рисунок 3.1).

Было показано, что медианная антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 (ЭД₅₀=8,4 мг/кг) превышает активность вальпроата натрия (ЭД₅₀=107,0 мг/кг) в 12 раз на модели хемоиндуцированных судорог (таблица 3.5). При оценке нейротоксического действия в тесте вращающегося стержня ТД₅₀ для соединения РУ-1205 и вальпроата натрия составили 56,4 и 242,0 мг/кг соответственно. Для расчета широты безопасного действия была определена ЛД₅₀ соединения РУ-1205, которая составила 309,6 мг/кг. По величине протективного индекса тестируемое соединение превосходило вальпроат натрия в 3,2 раза. ТИ изучаемого вещества был в 8,6 раз выше по сравнению с вальпроатом натрия, что свидетельствует об относительно высокой терапевтической безопасности нового соединения.

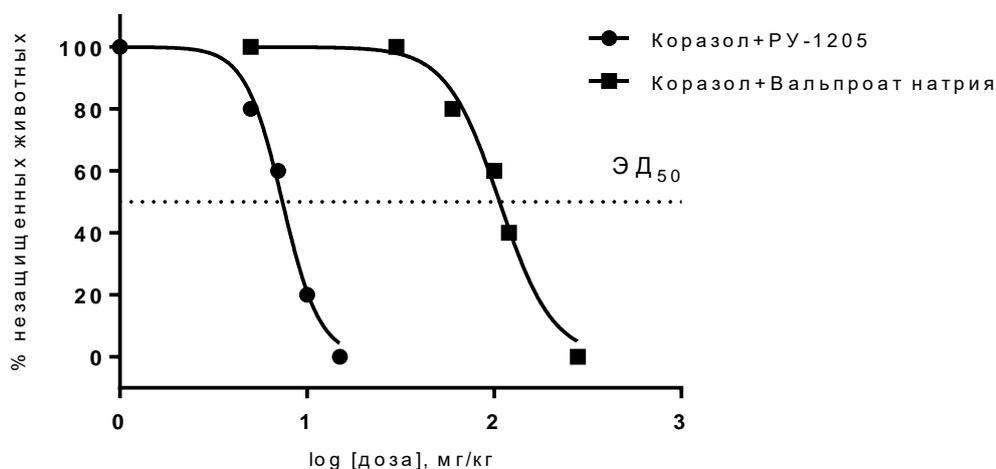


Рисунок 3.1. Влияние соединения РУ-1205 и вальпроата натрия в возрастающих дозах на судорожную активность мышей в тесте с коразолом (75 мг/кг, п.к.). Нелинейный регрессионный анализ выполнен по методу наименьших квадратов ($r^2 > 0,98$).

Более подробно токсические эффекты и другие нежелательные реакции соединения РУ-1205 описаны в главе 6.

Таблица 3.5

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

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

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

Основываясь на полученных результатах фармакологических и токсикологических исследований, соединение РУ-1205 было выбрано для дальнейшего изучения (рисунок 3.2) как наиболее перспективное.

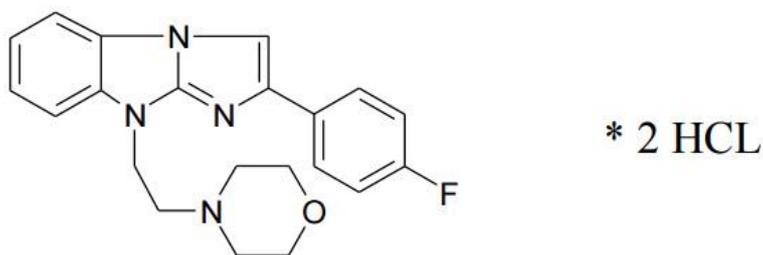


Рисунок 3.2. Структурная формула соединения РУ-1205

3.5 Заключение

На основании компьютерного прогноза биологической активности было показано, что в целом производные имидазо[1,2- α]бензимидазола представляются перспективными для поиска противосудорожных веществ. N_1 и N_9 -замещенные соединения могут различаться по механизму реализации противосудорожной активности. С точки зрения прогноза противосудорожного эффекта класс N_9 -ИмБИ является более предпочтительным для поиска новых антиконвульсантов, чем класс N_1 -ИмБИ.

Для экспериментального изучения были выбраны 15 2-(4-фенил)-производных имидазо[1,2- α]бензимидазола, имеющие высокие прогнозные оценки в системе PASS.

В ходе изучения противосудорожной активности данных соединений в тесте судорог, вызванных коразолом, были выявлены несколько высокоактивных соединений с лабораторными шифрами РУ-1205, РУ-285, РУ-1204 и РУ-1203.

Отличительной чертой активных соединений являлось наличие заместителя 4-фторфенил в положении 2 и диалкиламиноалкильного или циклоалкиламиноалкильного заместителей в положении 9 ядра имидазо[1,2- α]бензимидазола.

ЭД₅₀ наиболее активного соединения РУ-1205 составила 8,4 мг/кг, что в 12 раз ниже, чем у препарата сравнения вальпроата натрия (ЭД₅₀=107,0 мг/кг). Кроме того, изучаемое соединение превосходило препарат сравнения по терапевтическому и протективному индексу в 8,6 и 3,2 раз соответственно. Полученные результаты позволили выбрать соединение РУ-1205 для последующего изучения его фармакологической активности.

ГЛАВА 4. СПЕКТР АНТИКОНВУЛЬСИВНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205

Судорожные состояния развиваются в результате аномальных синхронизированных разрядов, возникающих среди большой популяции нейронов [Козловский В. Л., 2011]. В зависимости от вовлекаемой нейрональной популяции могут развиваться моторные и поведенческие нарушения, а также изменение сознания. Чаще всего судороги имеют однотипный паттерн у конкретного больного, но очень существенно различаются между отдельными пациентами. В соответствии с Международной классификацией эпилепсий, эпилептических синдромов и схожих заболеваний, принятой в 1989 г., эпилепсия не рассматривается как единое заболевание с различными приступами, а подразделяется на отдельные формы (эпилептические синдромы), которые имеют свои электроклинические особенности и различные подходы в фармакотерапии [Аванцини Д., 2005].

Таким образом, для определения противосудорожного профиля нового соединения требуется изучить его активность на различных моделях эпилептогенеза, что позволит определить его возможное клиническое применение в отношении определенных типов судорожных состояний.

4.1 Изучение противосудорожной активности соединения РУ-1205 на острых моделях эпилептогенеза

4.1.1 Определение судорожного порога на модели коразоловых судорог

В группе контроля, получавшей растворитель, пороговая доза коразола для миоклонических и клонических судорог составила $29,2 \pm 5,6$ мг/кг и $38,4 \pm 6,3$ мг/кг соответственно. Соединение РУ-1205, вальпроат натрия и диазепам статистически значимо ($p < 0,05$) повышали судорожный порог для миоклонических и клонических судорог у мышей. На основе полученных данных были построены линейные регрессионные модели, отражающие процентный рост дозы коразола по сравнению с контрольными животными (рисунок 4.1).

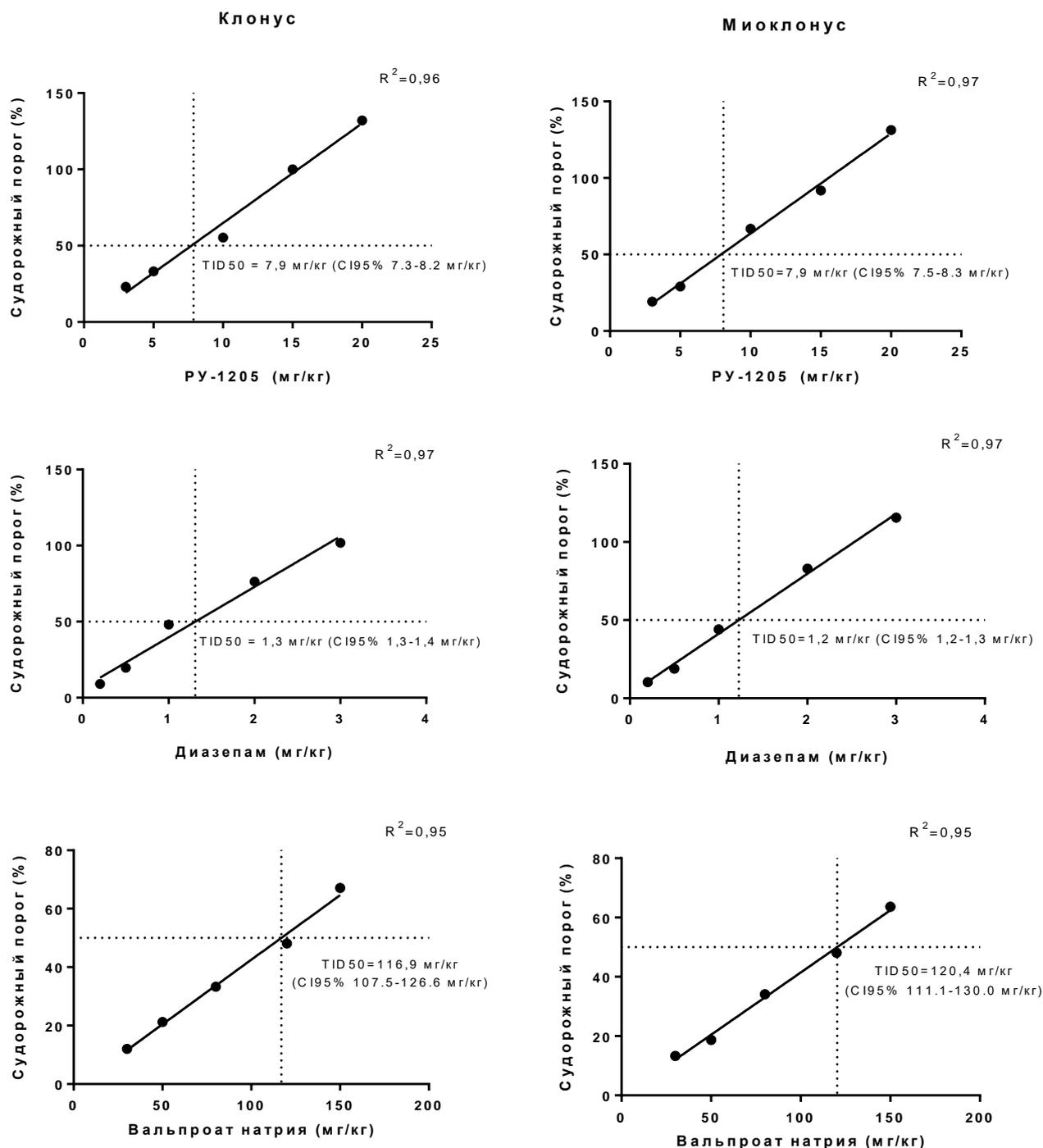


Рисунок 4.1. Влияние соединения ПУ-1205, диазепама и вальпроата натрия на порог судорожной активности (миоклонические подергивания и клонические генерализованные судороги). Линейная регрессионная кривая отражает увеличение дозы коразола, вызывающей судорожные явления у подопытных животных при введении различных доз изучаемого соединения.

TID₅₀ соединения ПУ-1205 для клонических и миоклонических судорог составила 7,9 мг/кг, что было в 15 раз ниже, чем у вальпроата натрия, и в 6 раз выше, чем у диазепама.

Результаты данного теста раскрывают возможный терапевтический потенциал изучаемого соединения в отношении генерализованных судорожных припадков, а также позволяют точнее оценить дозозависимые терапевтические характеристики соединения.

4.1.2 Антikonвульсивная активность соединения РУ-1205 в тесте максимального электрошока

Соединение РУ-1205 и препарат сравнения карбамазепин оказывали дозозависимое противосудорожное действие (рисунок 4.2).

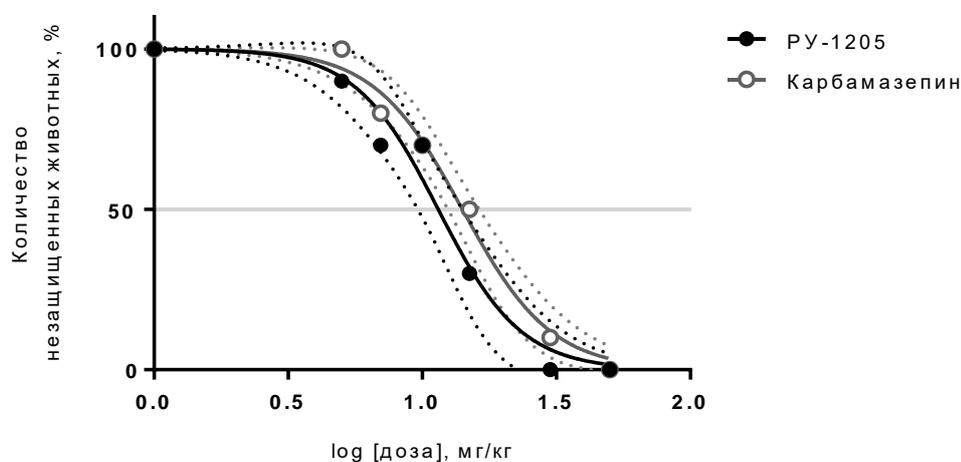


Рисунок 4.2. Влияние соединения РУ-1205 и карбамазепина в возрастающих дозах на судорожную активность мышей в тесте максимального электрошока. Пунктирными линиями обозначены 95%-е доверительные интервалы.

Результаты экспериментов по определению противосудорожной активности с расчетом ЭД₅₀, ЛД₅₀ и терапевтического индекса для соединения РУ-1205 и карбамазепина приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Величина антikonвульсивной активности (ЭД₅₀), показатель острой токсичности (ЛД₅₀) и терапевтический индекс (ТИ=ЛД₅₀/ЭД₅₀) соединения РУ-1205 и карбамазепина в тесте максимального электрошока.

Вещество	ЭД ₅₀ (СИ95%), мг/кг	ЛД ₅₀ (СИ95%), мг/кг	ТИ (ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀)
РУ-1205	11,4 (9,5-13,7)	309,6 (284,7-336,6)	27,2
Карбамазепин	14,1 (12,3-16,0)	114,0*	8,1

Примечание: * – ЛД₅₀ карбамазепина (и.п., мыши) по данным Фармакология и токсикология. – 1990 г. - Том 53. - №4. - С.19.

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

4.1.3 Изучение антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных пикротоксином

На модели судорог, вызванных антагонистом ГАМК_A-рецепторов пикротоксином [Uradhyaya S., 2017] у всех контрольных животных регистрировались клонические судороги, в среднем 4,4±0,9 приступа за период наблюдения. Изучаемое соединение в дозе 10 мг/кг статистически значимо сокращало продолжительность тремора в 2,5 раза, а также способствовало увеличению времени начала судорог и уменьшению числа приступов по сравнению с контролем. В дозе 20 мг/кг тестируемое вещество увеличивало латентный период тремора и клонических судорог на 18% и 39% соответственно, а также сокращало длительность тремора на 67% и снижало частоту судорожных приступов на 36% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Результаты отражены в таблице 4.2.

Таким образом, соединение РУ-1205 способно пролонгировать латентный период, а также ослаблять судорожные явления, обусловленные дефицитом ГАМК-ергического торможения.

Таблица 4.2

Влияние вещества РУ-1205 на судорожные эффекты пикротоксина (3,5 мг/кг и.п.) у мышей, ($M \pm SD$).

Вещество	Латентный период, с	Длительность тремора, с	Начало судорог, с	Число судорожных приступов
Контроль (пикротоксин + 0,2 мл растворителя) (n=8)	783,3±72,7	253,9±57,1	1028±108,8	4,4±0,9
Пикротоксин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) (n=8)	848,8±90,1	102,1±23,9*	1274±121,7*	3,1±0,6*
Пикротоксин + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.) (n=8)	924,9±94,0*	84,3±13,7*	1429±181,6*	2,8±0,9*

Примечание: *- статистически значимые отличия по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна)

4.1.4 Исследование антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных ингибитором синтеза ГАМК изониазидом

Данный препарат блокирует фермент глутаматдекарбоксилазу, вследствие чего снижается биосинтез ГАМК [Carta M. et al., 2008]. В результате устранения ГАМК-ергического торможения, развивается гипервозбудимость нейронов и судороги.

У всех мышей группы контроля, получавших до введения изониазида 0,2 мл растворителя, развивались генерализованные тонико-клонические судороги, заканчивающиеся гибелью в 92% случаев в период наблюдения 120 минут. Референтный препарат диазепам [Bernasconi R. et al., 1985] в дозе 3 мг/кг статистически значимо пролонгировал латентный период клонических судорог и время наступления гибели в 1,7 и 1,9 раз соответственно, наряду с этим выживаемость повысилась до 66% (таблица 4.3).

Таблица 4.3

Влияние соединения РУ-1205 и диазепама на выживаемость и латентный период судорог, вызванных ингибитором синтеза ГАМК изониазидом (250 мг/кг, и.п.), ($M \pm m$).

Группы животных	Латентный период конических судорог, сек	Время до гибели, сек	Выживаемость
Контроль (изониазид + 0,2 мл растворителя)	1657±163,6	1648±143,8	1/12
Изониазид + диазепам (3 мг/кг, и.п.)	2811±152,1*	3088±123,0*	8/12 [#]
Изониазид + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)	1910±294,1	2001±231,7	3/12
Изониазид + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)	1906±202,2	1842±192,8	3/12

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

Несмотря на имеющуюся положительную тенденциозность изменений показателей судорожной активности после введения соединения РУ-1205 в дозе 10 и 20 мг/кг, статистически значимого влияния на латентный период изониазид-индуцированных клонических судорог и выживаемость животных выявлено не

было. Это может объясняться вовлеченностью в эпилептогенез иных нервных структур, в отличие от других моделей судорог, вызванных блокаторами ГАМК_A-рецепторов [Miller J. W., 1987].

4.1.5 Оценка антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных стрихнином

Данный тест воспроизводит состояния, схожие с первично-генерализованными судорогами у человека [Li M. et al., 2013]. Противосудорожная активность соединений на данной модели может быть связана как с прямой активацией глицин-чувствительных рецепторов, так и с сопутствующей потенциацией глицин- и ГАМК-ергической активности [Khatoon H., 2015].

После введения стрихнина у 100% опытных и контрольных животных наблюдалось развитие тонико-клонических судорог. Полученные результаты отражены в таблице 4.4.

Таблица 4.4

Влияние соединения РУ-1205 и диазепама на выживаемость и латентный период судорог, вызванных стрихнином (2,5 мг/кг, п.к.), ($M \pm m$).

Группы животных	Латентный период судорог, сек	Выживаемость
Контроль (стрихнин + 0,2 мл растворителя)	188,9 ± 20,3	0/10
Стрихнин + диазепам (3 мг/кг, и.п.)	435,5 ± 82,5 [#]	8/10*
Стрихнин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)	204,2 ± 17,8	1/10
Стрихнин + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)	200,3 ± 9,9	0/10

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

В контрольной группе животных средняя продолжительность латентного периода судорог составила $188,9 \pm 20,34$ с. На фоне введения соединения РУ-1205 в дозах 10 и 20 мг/кг латентный период незначительно увеличился и составил $204,2 \pm 17,79$ и $200,3 \pm 9,891$ с соответственно. Референтный препарат диазепам увеличивал латентный период более чем в 2 раза, по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$).

Отсутствие статистически значимого изменения продолжительности латентного периода судорог, вызванных подкожным введением стрихнина у

животных, получавших соединение РУ-1205, позволяет заключить, что изучаемое соединение не оказывает значительного влияния на глицинергическую систему.

4.1.6 Изучение антиконвульсивного действия соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных блокатором каналов K^+ аминопиридином

Тест позволяет смоделировать острые генерализованные тонико-клонические судороги [Katzung B.G., 2018]. Было установлено, что антагонисты NMDA-рецепторов, блокаторы кальциевых каналов и некоторые ГАМК-ергические средства (не включая вальпроат) проявляют невысокую эффективность на данной модели [Yamaguchi S., 1992].

Все мышцы контрольной группы погибали в результате развития тонической экстензии передних и задних конечностей. Вальпроат натрия в дозе 301 мг/кг статистически значимо сокращал количество животных с судорогами и их гибель на 58%, по сравнению с контрольной группой. Соединение РУ-1205 в дозах 10 и 20 мг/кг не оказывало значительного влияния на количество защищенных животных (таблица 4.5).

Таблица 4.5

Влияние соединения РУ-1205 и вальпроата натрия на развитие фатальной тонической экстензии конечностей, вызванной аминопиридином (13,3 мг/кг, п.к.).

Группы животных	Количество защищенных животных
Контроль (аминопиридин + 0,2 мл растворителя)	0/12
Аминопиридин + вальпроат натрия (301 мг/кг, и.п.)	5/12*
Аминопиридин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)	2/12
Аминопиридин + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)	3/12

Примечание: защищенными рассматривались животные, у которых не регистрировалась тоническая экстензия и гибель.

* - статистически значимые различия с контролем ($p \leq 0,05$, точный критерий Фишера)

4.1.7 Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных N-метил-D-аспаратом

После подкожного введения N-метил-D-аспартата в группе контроля наблюдалось гиперактивное поведение, с последующей регистрацией

вращательных движений у 21 животного. В группе, получавшей соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг и.п. вращательная поведенческая реакция была зарегистрирована у 16 животных из 25. Выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группой контроля и группой, получавшей соединение РУ-1205 в дозе 20 мг/кг, где вращательное поведение было зарегистрировано у 13 животных из 25. Полученные результаты представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6

Влияние соединения РУ-1205 на вращательное поведение мышей, индуцированное введением NMDA (75 мг/кг, п.к.).

Группы животных	Количество животных, проявляющих вращательное поведение
Контроль (NMDA + 0,2 мл растворителя)	21/25
NMDA + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)	16/25
NMDA + РУ-1205 (20 мг/кг, и.п.)	13/25*

Примечание: * - статистически значимые различия с группой контроля по критерию Хи-квадрат ($p \leq 0,05$).

Таким образом, изучаемое вещество РУ-1205 проявило существенный антагонизм на модели судорог, связанных с распространением глутаматергического возбуждения, что предполагает возможную эффективность в лечении эпилептического статуса [Kasthuri S. et al., 2013] и нейропротекторную активность за счет подавления эксайтотоксичности [Chang-Mu C. et al., 2010].

4.2 Антиконвульсивная активность соединения РУ-1205 при его хроническом введении

4.2.1 Изучение антиконвульсивной активности соединения РУ-1205 на модели киндлинг прогрессии с коразолом

В группе контроля на модели киндлинга судорожная активность прогрессивно нарастала и достигала максимума к 15 дню на уровне 4,5 баллов. Затем кривая судорожной активности выходила на плато и сохранялась на протяжении эксперимента до 31-го дня. У 44% животных наблюдался генерализованный судорожный синдром с падением набок и утратой рефлекса

переворачивания, тонические судороги с последующей гибелью, что соответствует 5 баллам. В 22% случаев у животных регистрировались «барабанный бой», «дикий бег», равные 4 баллам. У 33% животных зафиксированы серийные подергивания всего тела, симптом Штраубе, что соответствует 2 и 3 баллам по шкале судорожной активности (рисунок 4.3).

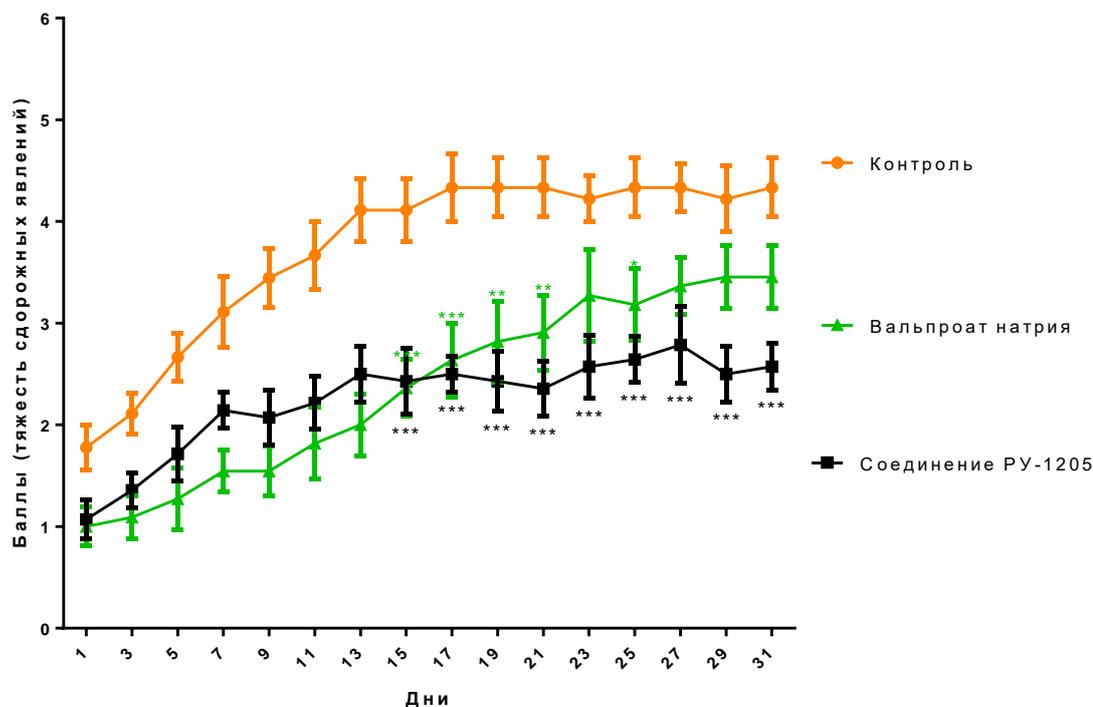


Рисунок 4.3. Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и вальпроата натрия (100 мг/кг и.п.) на развитие судорожного синдрома на модели киндлинг прогрессии ($M \pm m$). Статистическая значимость показана в сравнении с группой контроля (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, ANOVA для повторных измерений с *post-hoc* анализом Tuckey).

Соединение РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) статистически значимо снижало тяжесть судорожных явлений по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), эффективно препятствуя развитию киндлинга, а также существенно предотвращало гибель животных на протяжении всего эксперимента (таблица 4.7). При этом общий уровень судорожной активности не превышал 2,5 баллов, что проявлялось миоклоническими подергиваниями и оживленным поведением животных. К 15 дню эксперимента в 50% случаев наблюдалось оживленное поведение, активное обнюхивание, неподвижное положение и единичные миоклонические подергивания отдельных мышц тела, что по шкале судорожной активности составляет 1 - 2 балла. У 36% развивались серийные подергивания

всего тела, симптом Штраубе, что соответствует 3 баллам. Только 2 из 15 животных расценены как незащищенные и зафиксирован 1 случай гибели. В последующие дни судорожная активность значительно не изменилась.

Вальпроат натрия (100 мг/кг, и.п.) так же проявил высокую активность на начальных этапах эксперимента, равную с соединением РУ-1205 (статистически значимые различия отсутствовали), однако антиконвульсивное действие существенно снизилось к 21 дню исследования, после чего статистически значимые отличия от группы контроля отсутствовали.

В группе животных, получавших соединение РУ-1205, гибель была на 20% ниже по сравнению с группой, получавшей вальпроат натрия, и на 40% ниже по сравнению с группой негативного контроля.

Таблица 4.7

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

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

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

Соединение РУ-1205 показало высокую эффективность на киндлинг модели судорог, вызванных коразолом. Изучаемое вещество значительно сокращало тяжесть судорожных проявлений и гибель животных.

4.2.2 Противосудорожная активность соединения РУ-1205 на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя

В первые минуты экспозиции у животных, получавших пары алкоголя, наблюдалось оживленное поведение и повышение двигательной активности. Спустя 60 минут начинали доминировать седативные процессы, снижалась общая подвижность, развивались признаки моторной дискоординации по типу атаксии, что укладывается в картину алкогольной интоксикации [Philibin S. D. et al., 2010].

Оценка судорожной активности проводилась ежедневно после отмены алкоголя по шкале НИС (таблица 2.2). НИС характеризуются развитием тонико-клонических припадков различной степени выраженности при поднятии животного за хвост с последующим вращением вокруг аксиальной оси. Данная шкала позволяет выявить и оценить нарушения нейрональной активности вестибулярной системы, ретикулярной формации, околотовопроводного серого вещества и некоторых участков ствола мозга [Löscher W., 2011].

В ходе эксперимента в группах №2, №3 и №4, получавших пары алкоголя, отмечался ежедневный рост уровня судорожной активности в периоды отмены. В контрольной группе №2 на 4-й день отмены алкоголя уровень НИС достигал $4,2 \pm 0,4$ баллов к 8 часу наблюдений, при этом тонико-клонические судорожные знаки проявлялись сразу после поднятия животных за хвост. В группе негативного контроля №1, не получавшей алкоголя, судорожная активность не превышала 1 балла на протяжении всего эксперимента.

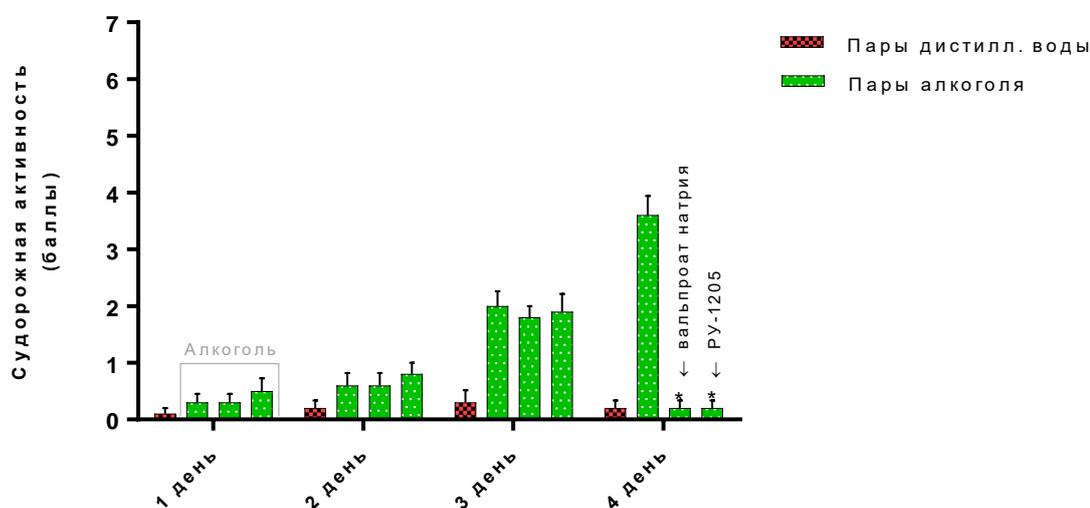


Рисунок 4.4. Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг и.п.) и вальпроата натрия (300 мг/кг и.п.) на уровень судорожной активности у мышей ($M \pm m$). Группы животных перечислены по порядку с 1 по 4 для каждого дня эксперимента.

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

На 4 день эксперимента группы животных №3 и №4 получили вальпроат натрия (300 мг/кг, и.п.) и соединение РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) соответственно через 2 часа после отмены алкоголя. Последующая оценка НИС показала полное отсутствие судорожной активности в опытных группах №3 и №4 спустя 6 часов

после отмены алкоголя, что статистически значимо отличается от группы контроля №2 (рисунок 4.4 и 4.5).

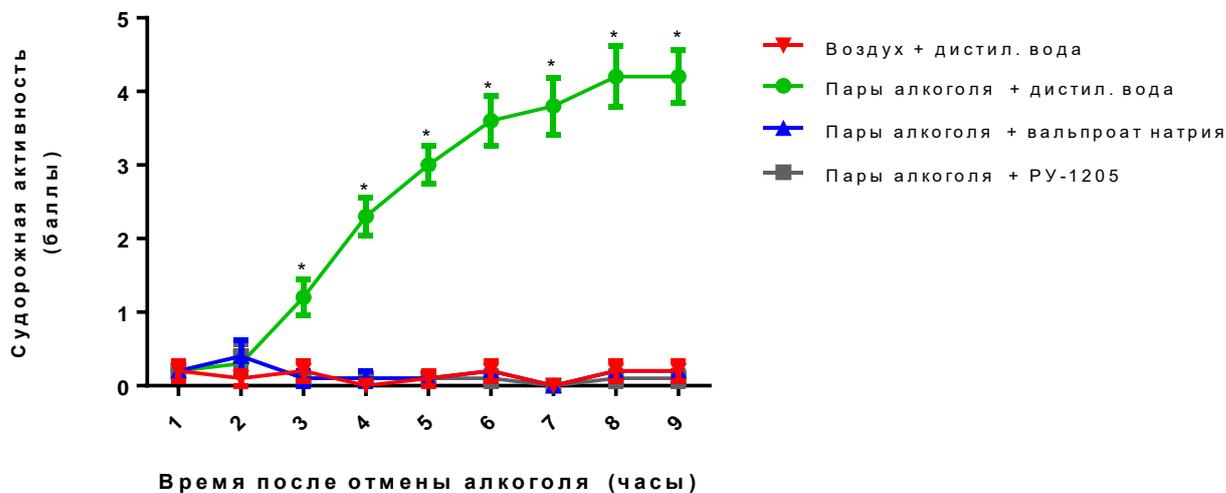


Рисунок 4.5. Влияние соединения РУ-1205 (10 мг/кг и.п.) и вальпроата натрия (300 мг/кг и.п.) на уровень судорожной активности у мышей, регистрируемый ежечасно на 4-й день отмены алкоголя ($M \pm m$).

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

Изучаемое вещество оказалось эффективным для купирования судорожных явлений, вызванных отменой алкоголя, что представляется перспективным с точки зрения лечения алкогольного абстинентного синдрома.

4.3. Оценка биоэлектрической активности нейронов под влиянием соединения РУ-1205

4.3.1 Влияние соединения РУ-1205 на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры крыс

Для более детального анализа спектра действия соединения РУ-1205 была проведена серия электрофизиологических тестов.

С помощью метода микроэлектродной регистрации (до локальной микроапликации раствора тестируемого соединения к нейронным колонкам) регистрировалась высокоамплитудная тета-частотная (7 Гц) ритмическая активность (рисунок 4.6А). Площадь под кривой спектральной плотности до

применения соединения РУ-1205 составляла $0,28 \pm 0,1$ и $0,30 \pm 0,2$ mV^2 на К1 и К2 соответственно в диапазоне 1-13 Гц. После введения изучаемого вещества (3,5 мкМ раствор) происходило существенное подавление амплитудных характеристик фокальной фоновой ритмики с преобладанием ведущей частоты 5 Гц (рисунок 4.6Б). Площадь под кривой спектральной плотности сократилась до $0,12 \pm 0,1$ на К1 и $0,10 \pm 0,1$ mV^2 на К2 ($p < 0,05$). В последующем отмечалась тенденция к восстановлению фоновой фокальной ритмической активности до исходного уровня на всех трех каналах (рисунок 4.6В и 4.6Г).

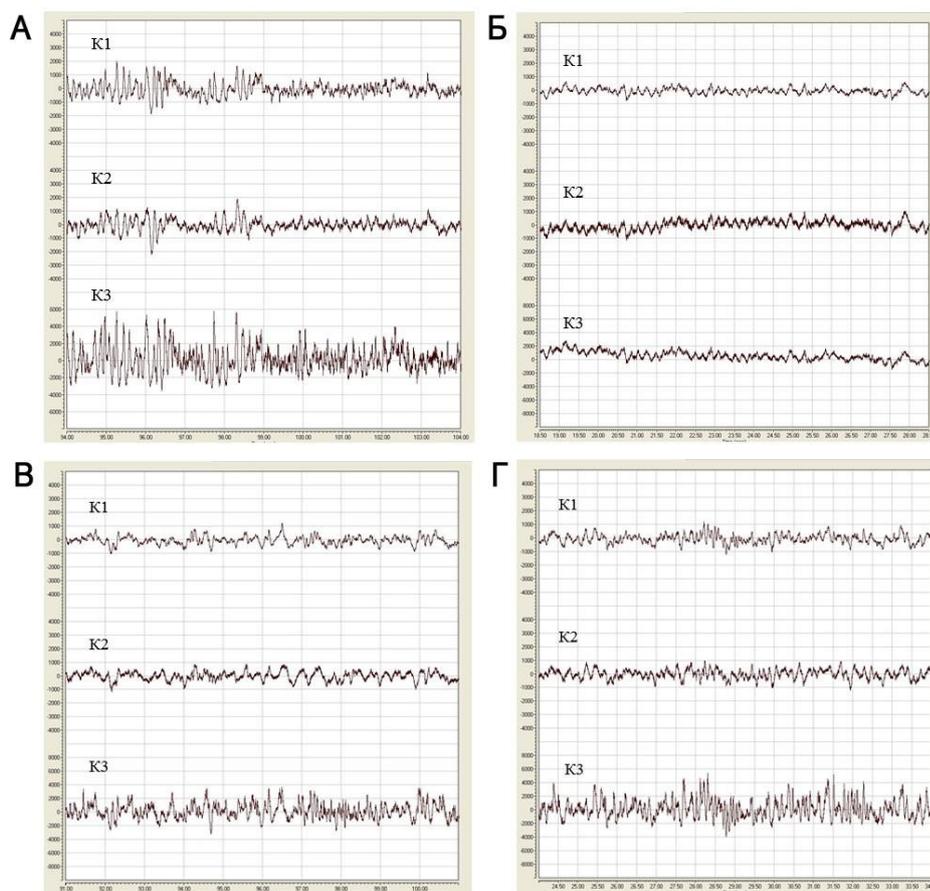


Рисунок 4.6. Влияние микроапликации соединения РУ-1205 (3,5 мкМ раствор) на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс.

А - фоновая фокальная активность нейронных колонок соматосенсорной коры до применения соединения РУ-1205; Б – ритмическая активность на фоне введения соединения РУ-1205; В – активность нейронных колонок соматосенсорной коры через 5 минут после введения соединения РУ-1205; Г – активность нейронных колонок соматосенсорной коры через 10 минут после введения соединения РУ-1205

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

В ходе данного исследования выявлены электрофизиологические закономерности действия изучаемого вещества на уровне корковых нейронов, характерные для противосудорожных средств.

4.3.2 Влияние соединения РУ-1205 на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга крыс

На модели электрической стимуляции поверхности мозга крыс были получены данные, подтверждающие наличие антиэпилептиформных свойств у соединения РУ-1205 (рисунок 4.7).

Электрическая стимуляция верхних (К1) и нижних (К2) слоев нейронной колонки соматосенсорной коры крысы вызывала длительную (более 40 с) эпилептиформную активность как в верхних, так и нижних корковых слоях.

Развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга крыс, полностью купировалось после микроапликации раствора соединения РУ-1205 (рисунок 4.7Б). При этом средние величины статистически значимо отличались от контрольных показателей ($p < 0,05$ по критерию знаков).

Продолжительность действия соединения РУ-1205 составляла 5 минут, после чего плавно угасала (рисунок 4.7В и 4.7Г). С увеличением времени после локальной микроапликации испытуемого вещества длительность эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией, возрастала до 10 с на 6 минуте после введения вещества (рисунок 4.7В) и до 20 с на 12 минуте (рисунок 4.7Г). Важно отметить, что эпилептиформная активность, развивающаяся в ответ на электрическую стимуляцию спустя длительное время после введения соединения РУ-1205, имела амплитудно-частотные параметры осцилляций фокального потенциала аналогичные завершающей стадии эпилептиформной активности, вызванной до применения изучаемого вещества.

Таким образом, на данной модели электроиндуцированного эпилептического процесса соединение РУ-1205 проявило выраженную антиэпилептиформную активность.

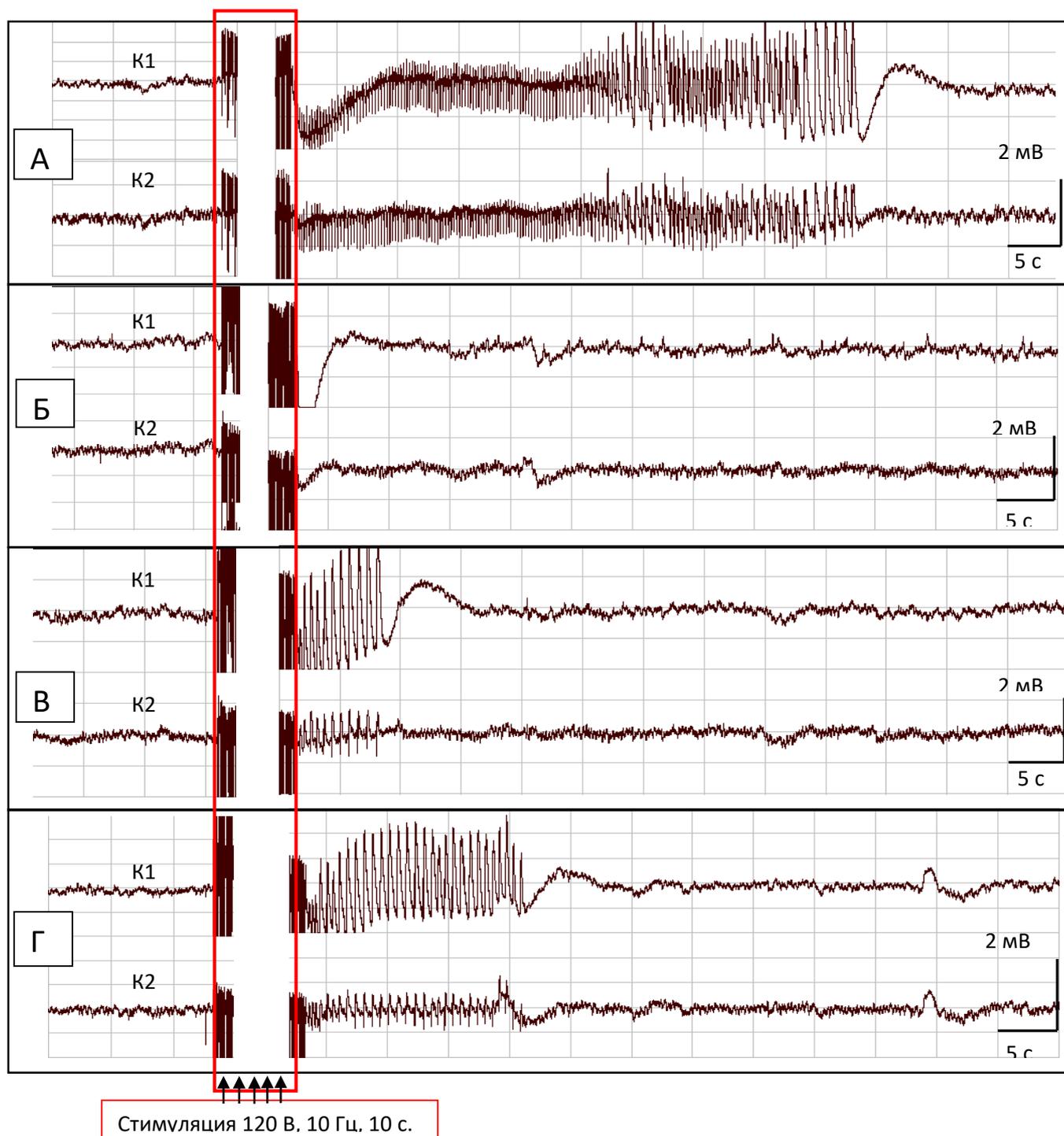


Рисунок 4.7. Влияние соединения РУ-1205 на развитие эпилептиформной активности, вызванной электрической стимуляцией поверхности мозга крыс. А – до микроапликации испытуемого вещества. Б – сразу после микроапликации соединения РУ-1205 (0,457 мМ раствор) в нейронные колонки соматосенсорной коры крыс. В – 6 минут после внутрикорковой микроапликации вещества. Г – 12 минут после локального введения соединения РУ-1205.

Обозначения: К1 – верхние (500 мкм) и К2 – нижние (1300 мкм) слои соматосенсорной коры крыс.

4.4 Заключение

В ходе проведенных экспериментов была изучена противосудорожная активность вещества РУ-1205 на различных острых и хронических моделях эпилептогенеза. Для исследования спектра антиконвульсивной активности применялась батарея тестов хемоиндуцированных судорог с коразолом, пикротоксином, изониазидом, стрихнином, 4-аминопиридином и N-метил-D-аспаратом, а также модели судорог, вызванных электрическими стимулами, отменой алкоголя и киндлинг прогрессия. Проведены электрофизиологические исследования по влиянию соединения РУ-1205 на фоновую и электроиндуцированную эпилептиформную активность нейронов соматосенсорной коры крыс.

Было установлено, что исследуемое соединение дозозависимо повышает порог коразоловых судорог ($TID_{50}=7,9$ мг/кг) и превосходит по уровню антиконвульсивной активности препарат сравнения вальпроат натрия в 15 раз. В тесте максимального электрошока соединение РУ-1205 показало высокую противосудорожную активность ($ЭД_{50}=11,4$ мг/кг), сопоставимую с препаратом сравнения карбамазепином, превосходя его по широте терапевтического действия более чем в 3 раза. В тесте пикротоксин-индуцированных судорог изучаемое вещество в дозе 10 мг/кг и.п. вызывало сокращение продолжительности тремора в 2,5 раза, увеличение времени начала судорог в 1,2 раза и уменьшение числа приступов в 1,4 раза по сравнению с контролем; в дозе 20 мг/кг и.п. наблюдалось увеличение латентного периода тремора и клонических судорог в 1,2 и 1,4 раза соответственно, а также сокращение длительности тремора в 3 раза и снижение частоты судорожных приступов в 1,6 раз по сравнению с контролем. Также изучаемое соединение на 38% предотвращало вращательное поведение у мышей, вызванное N-метил-D-аспаратом, что может указывать на вовлеченность в механизм противосудорожного действия глутаматергической системы, при этом не исключается наличие нейропротективного действия. Соединение РУ-1205 оказалось высокоэффективным при хроническом введении на модели киндлинг

прогрессии (в дозе 10 мг/кг и.п. снижение тяжести судорожных явлений почти в 2 раза и сокращение гибели на 40% по сравнению с контролем), а также предотвращало развитие судорожного синдрома после отмены алкоголя.

В электрофизиологических тестах было выявлено депримирующее действие соединения РУ-1205 на фоновую фокальную активность (сокращение площади под кривой спектральной плотности с $0,28 \pm 0,1$ и $0,30 \pm 0,2$ mV^2 до $0,12 \pm 0,1$ и $0,10 \pm 0,1$ mV^2 на К1 и К2). Изучаемое вещество полностью устраняло электроиндуцированную эпилептическую активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры крыс.

ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ АНТИКОНВУЛЬСИВНОГО ДЕЙСТВИЯ И СПЕКТР НЕЙРОПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205

Для изучения механизма противосудорожного действия на данный момент используется широкий ряд высокоинформативных методик, включающих исследования *in vitro* и *in vivo*: биохимические, иммуногистохимические и радиолигандные. При этом, несмотря на точные количественные данные о степени сродства соединений и рецепторных комплексов, получаемые при помощи этих методик, существенным их недостатком является применение в качестве объекта исследования фрагментов лиганд-связывающих рецепторных структур, а не целостные системы функционально активных рецепторов. С этой точки зрения существенными преимуществами обладают модели, основанные на изучении свойств функционально активных рецепторных комплексов в нативных условиях. В рамках данной работы для поиска мишеней противосудорожного действия соединения РУ-1205 применялся комплексный подход, включающий серию экспериментов *in vitro* на препаратах семявыносящего протока кролика, экспрессирующего каппа-рецепторы. Оценка влияния вещества на ионные токи выполнялась на изолированных нейронах моллюска прудовика ввиду общего принципа строения и функционирования Na^+ и Ca^{2+} каналов нейронов моллюсков и млекопитающих [Вислобоков А.И. и др. 2010]. Также определялось воздействие на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс на фоне блокирования ГАМК-рецепторов. Исследования *in vivo* проводились с использованием специфических блокаторов рецепторов.

Учитывая, что противосудорожные средства действуют на уровне различных нейромедиаторных систем мозга, целесообразным представлялось изучение влияния нового соединения на эффекты ряда нейромедиаторных анализаторов [Воронина Т.А., 2012]. Необходимо также отметить, что влияние на нейрональные процессы в центральной нервной системе требуется не только для выяснения общих принципов их действия, но и для разработки рациональных

путей поиска более совершенных противосудорожных средств с заданными свойствами и минимальными побочными эффектами.

Для оценки спектра нейрорепродуктивной активности широко применяются методы, основанные на совместном введении изучаемого вещества с анализаторными агентами, избирательно влияющими на те или иные нейромедиаторные системы как в результате позитивного (агонисты, предшественники моноаминов, ингибиторы MAO), так и негативного (блокаторы поглощения, депонирования медиатора, антагонисты) действия. Это позволяет оценить вклад определенных нейромедиаторов и взаимодействующих с ними структур в реализацию нейротропных эффектов вещества, а также идентифицировать нейрохимические основы его действия.

5.1 Изучение механизма противосудорожного действия соединения РУ-1205 *in vitro*

5.1.1 Влияние соединения РУ-1205 на сокращение препаратов изолированного семявыносящего протока кролика

Низкочастотная электростимуляция (10 Гц, амплитуда 50 Вт, 2 мс) изолированных фрагментов семявыносящего протока кролика провоцировала сокращение гладкомышечных препаратов. Вещество РУ-1205 проявило выраженную концентрационнозависимую активность, ингибируя вызванные электрической стимуляцией сокращения препарата семявыносящего протока кролика в диапазоне наномолярных концентраций (рисунок 5.1). Ингибирующая активность ($ЭК_{50}$) соединения РУ-1205 не превышала 2 нМ, тогда как у U-50488 $ЭК_{50}$ составила 7 нМ, а у буторфанола $ЭК_{50}$ была равна 98 мкМ (рисунок 5.2).

Эффекты соединения РУ-1205 после инкубации тканей семявыносящего протока с высокоселективным антагонистом каппа-опиоидных рецепторов норбиналторфимином (nor-BNI) в концентрации 1 μ М устранялись на 91%. Эффекты соединения U-50,488 и буторфанола Nor-BNI подавлял на 79% и 56% соответственно (рисунок 5.3).

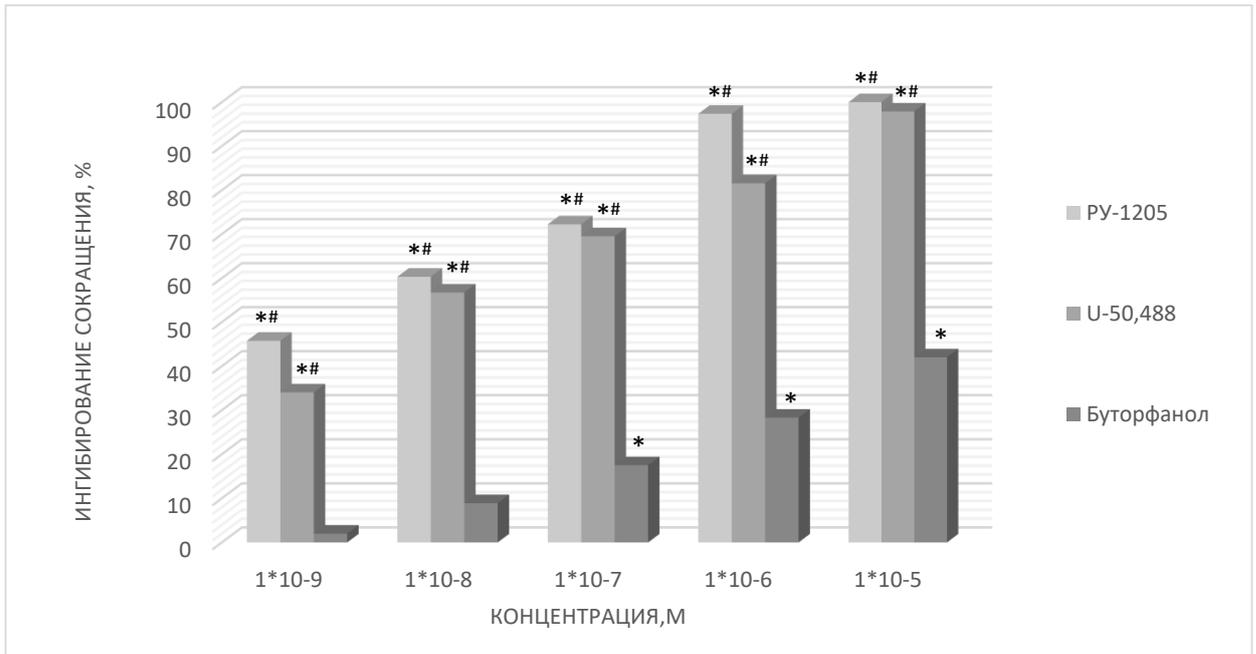


Рисунок 5.1. Влияние вещества РУ-1205, U-50,488 и буторфанола тартрата на вызванные электростимуляцией сокращения препарата семявыносящего протока кролика.

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к исходному уровню сократительной активности препарата семявыносящего протока; # - статистически значимые отличия от показателей буторфанолола ($p < 0,05$, по критерию Краскела-Уоллиса, *post-hoc* тест Данна).

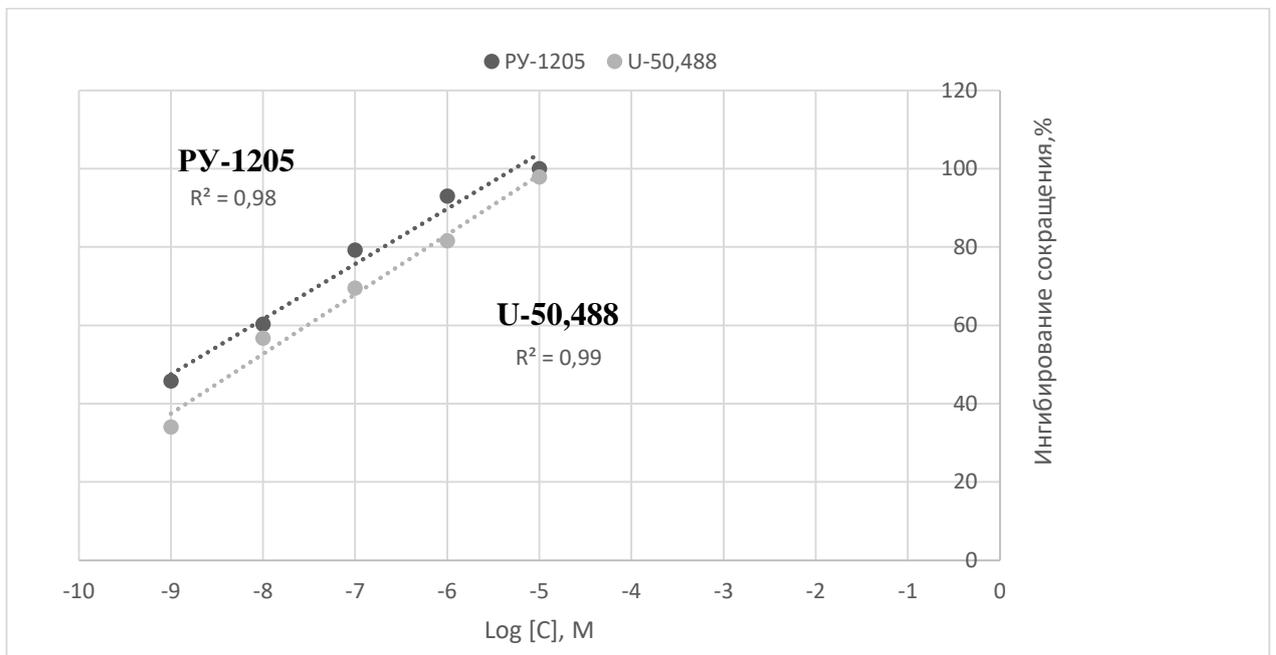


Рисунок 5.2. Определение величины эффективной концентрации ($ЭК_{50}$) для вещества РУ-1205 и U-50,488 на модели сокращения препарата семявыносящего протока кролика.

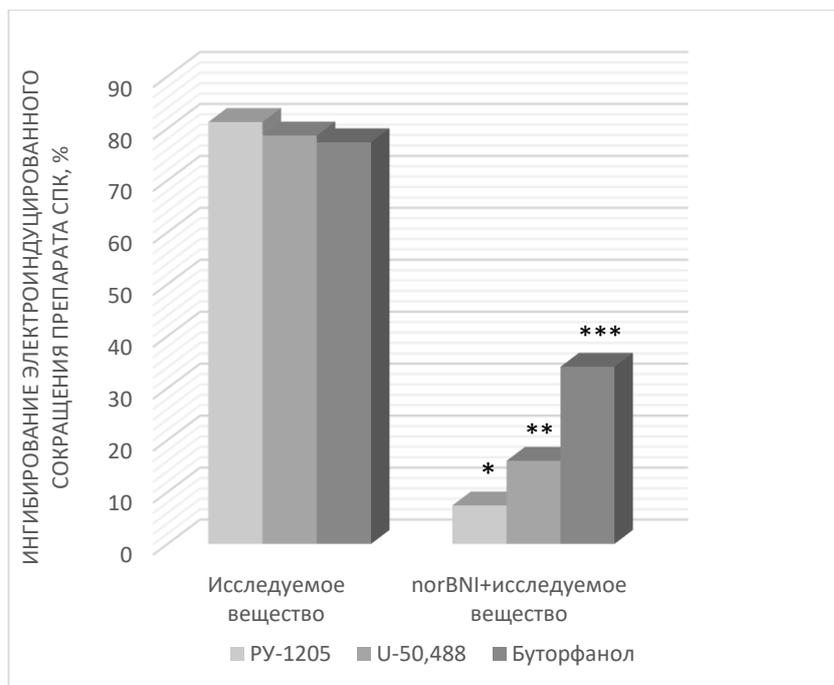


Рисунок 5.3. Влияние Nox-BNI на эффекты соединений РУ-1205, U-50,488 и буторфанола тартрата (ЭК₈₀), связанные с угнетением сокращений изолированного семявыносящего протока кролика, вызванных электростимуляцией.

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

Таким образом для соединения РУ-1205 установлен каппа-рецепторный механизм действия, который с большой степенью вероятности может вносить существенный вклад в реализацию противосудорожного действия и сопутствующих эффектов изучаемого вещества.

5.1.2 Влияние соединения РУ-1205 на ионные токи Ca^{2+} и Na^{+} нейронов моллюска в тесте *patch clamp*

Результаты изменений ионных токов нейронов прудовика под действием соединения РУ-1205 в концентрации 1-1000 мкМ представлены в таблице 5.1.

Установлено, что тестируемое соединение проявляет выраженную мембранотропную активность, концентрационнозависимо и обратимо подавляет натриевые и кальциевые ионные токи. После 5–7 минут отмывания все параметры регистрируемых токов практически полностью восстанавливаются до исходных

значений, что соответствует «средней» степени связывания вещества с молекулярными структурами ионных каналов или мембранными структурами вблизи них.

Таблица 5.1

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

Ионные токи, статистические параметры	Концентрации соединения РУ-1205 (мкМ)			
	1	10	100	1000
I _{Na} ; M± tm, %	100,0±2,2	96,7±5,3	86,5±6,3	23,0±7,2
I _{Ca} ; M± tm, %	100,0±1,3	99,5±3,1	89,6±6,7	41,3±6,9

Примечание: I_{Na} – амплитуда натриевого тока, I_{Ca} – кальциевого, M – среднее значение величины тока (% от исходного) при действии соединения в соответствующей концентрации, tm – доверительный интервал (p=95%).

Соединение РУ-1205 концентрационнозависимо подавляло входящий Na⁺ ток, кинетика активации-инактивации тока под его влиянием не изменялась. Максимум вольт-амперной характеристики (ВАХ) обратимо смещался вправо, в сторону деполяризации мембраны (рисунок 5.4А), что связано с изменением потенциала поверхностного заряда мембраны, создаваемого фиксированными зарядами.

Под влиянием соединения РУ-1205 во всех концентрациях неспецифические токи утечки мембраны снижались, что можно интерпретировать как его мембраностабилизирующее действие.

Необходимо отметить, что изменения амплитуды Ca²⁺ ионных токов под влиянием соединения РУ-1205 происходило с ускорением кинетики инактивации тока и небольшим смещением максимума ВАХ Ca²⁺-каналов вправо по оси потенциалов (рисунок 5.4Б). Кроме того, после действия вещества РУ-1205 в концентрации 1000 мкМ отмывание в течение 5–7 минут не приводило к полному восстановлению амплитуды токов.

При анализе зависимостей «концентрация-эффект» величины ЭК50 для амплитуд натриевого и кальциевого тока составили 93,5 и 95,7 мкМ соответственно.

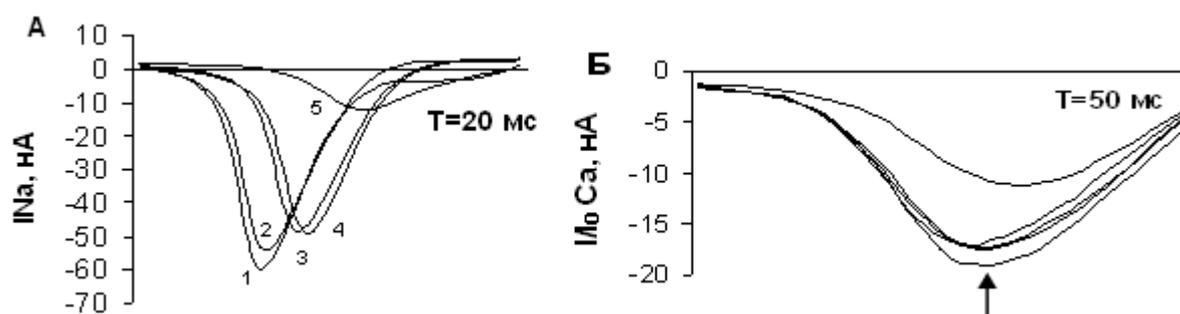


Рисунок 5.4. Влияние соединения РУ-1205 на натриевые и кальциевые ионные токи нейронов прудовика в различных концентрациях.

А – изменения ВАХ натриевых ионных каналов нейрона под влиянием вещества РУ-1205 в различных концентрациях. По оси абсцисс – время, в течение которого амплитуда пилообразного смещения потенциала изменялась от -40 до 10 мВ; по оси ординат – I_{Na} (нА); 1 – контроль, 2 – отмывание, 3 – 10 мкМ, 4 – 100 мкМ, 5 – 1000 мкМ. Под влиянием соединения РУ-1205 максимум ВАХ смещается вправо (кривые 3–5), в сторону деполяризации, примерно на 10–20 мВ.

Б – изменения ВАХ кальциевых ионных каналов нейрона под влиянием соединения РУ-1205. По оси абсцисс – пилообразное смещение потенциала от -40 до 30 мВ в течение 50 мс, по оси ординат – I_{Ca} (нА); над стрелкой: кривые снизу-вверх: 1 – контроль, 2 – 10 мкМ и 3 – отмывание (кривые почти сливаются), 4 – 100 мкМ, 5 – 1000 мкМ (смещение максимума вправо).

В ходе данного эксперимента выявлено мембранотропное действие вещества на изолированные нейроны, которое может опосредовать противосудорожные эффекты соединения РУ-1205. Каппа-опиоидные агонисты могут оказывать мембраностабилизирующее действие через каппа-рецепторы, путем передачи модулирующих сигналов на ионные каналы через соответствующие G-белки [Гречко О. Ю. и др., 2010]. Однако не исключается и прямое каналоблокирующее действие, присущее некоторым селективным каппа-агонистам.

5.2 Электрофизиологические исследования механизмов противосудорожного действия соединения РУ-1205

5.2.1 Влияние соединения РУ-1205 на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную антагонистом ГАМК_A-рецепторов пикротоксином

На рисунке 5.5А фокальная фоновая ритмика на всех 4 каналах представлена классической высокоамплитудной веретенообразной активностью.

Частота осцилляций составляла 9 Гц, что соответствует состоянию бодрствования животного. Несмотря на большую дистанцию (1700 мкм) между регистрируемыми нейронными колонками, развитие альфа-подобной ритмики по всем каналам происходило с высокой степенью синхронности.

При введении пикротоксина (специфического блокатора ГАМК_A-рецепторов) в концентрации 75 мкМ развивалась устойчивая эпилептиформная активность. Характерные высокоамплитудные разряды наиболее отчетливо видны на К1 и К2 (рисунок 5.5Б). При расчете спектральной плотности площадь под кривой составила $1,8 \pm 0,4 \text{ mV}^2$ в диапазоне 1-13 Гц.

В результате внутрикорковой микроапликации раствора РУ-1205 в концентрации 30,5 мкМ на глубине 1000 мкм происходило существенное подавление эпилептиформной активности. На рисунке 5.5В соответствующими стрелками обозначено действие вещества сразу после его микроапликации около каналов К1 и К2, а также спустя 20 с после диффузии изучаемого вещества к К3 и К4. В первую минуту после микроапликации РУ-1205 на фоне действия пикротоксина высокоамплитудные эпилептиформные разряды были практически полностью подавлены. Наблюдалось уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 12 раз до $0,15 \pm 0,1 \text{ mV}^2$ в диапазоне 1-13 Гц на всех каналах ($p < 0,05$). Имели место нечастые (1 раз в 2 с) негативные колебания, которые по своей амплитуде были значительно ниже эпилептиформных разрядов, наблюдаемых до применения РУ-1205.

Спустя 10 мин наблюдений на всех 4 каналах появились высокоамплитудные длительные во времени негативные колебания, на фоне которых развивались более высокочастотные осцилляции с большой амплитудой, характерные для эпилептиформной активности (рисунок 5.5Г).

Таким образом, установлено антиэпилептиформное действие соединения РУ-1205 на кортикальном уровне в условиях дефицита ГАМК-ергического торможения, вызванного пикротоксином.

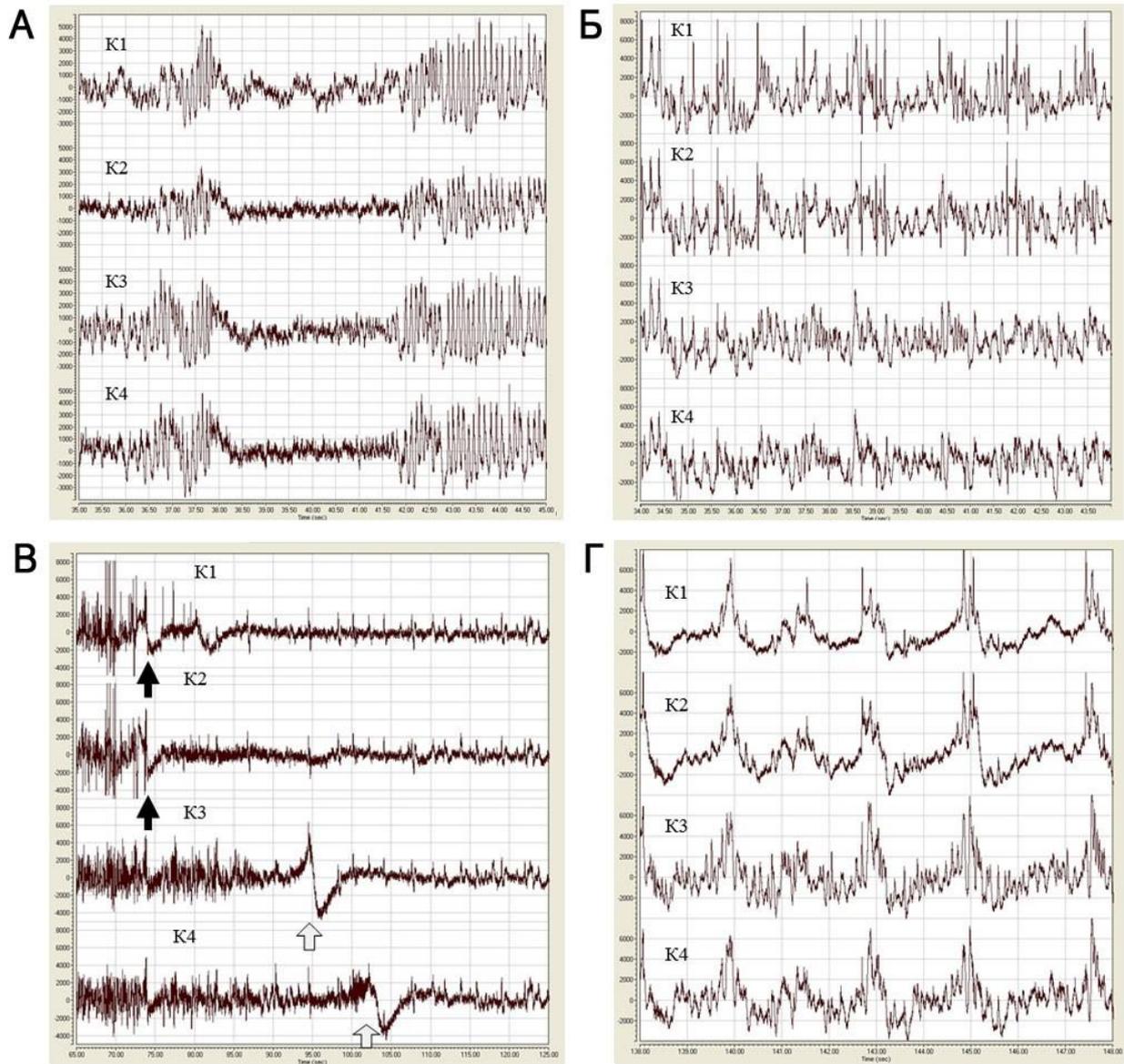


Рисунок 5.5. Влияние микроапликации соединения РУ-1205 (30,5 мкМ) на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную введением пикротоксина (75 мкМ).

А – фоновая фокальная ритмика до применения пикротоксина; Б - эпилептиформная активность сразу после нанесения пикротоксина на поверхность коры; В - эффект микроапликации соединения РУ-1205 на каналах К1 и К2 (обозначено черными стрелками). Белыми стрелками обозначена диффузия соединения РУ-1205 от опытной нейронной колонки (К1 и К2) к контрольной (К3 и К4); Г – ритмическая активность отдельных нейронных колонок 10 минут после микроапликации соединения РУ-1205 на фоне действия пикротоксина.

Обозначения: К1- верхние слои нейронной колонки (400 мкм глубина, погружения); К2- нижние слои той же нейронной колонки (1200 мкм); К3 – верхние слои (400 мкм) и К4 - нижние слои (1500 мкм) нейронной колонки, находящейся на удалении 1700 мкм от К1 и К2.

5.2.2 Влияние соединения РУ-1205 на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную блокатором ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА

ГАМК_A-р рецепторы по более ранним номенклатурным стандартами известны как ГАМК_C-рецепторы. Это лиганд-зависимые ионные каналы, экспрессируются во многих областях мозга и являются субклассом ГАМК_A-рецепторов.

На рисунке 5.6А можно отметить наличие тета-ритмики (около 5 Гц) в верхних и нижних слоях нейронной колонки.

Микроапликация специфического блокатора ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА в миллимолярной концентрации вызывала развитие устойчивой эпилептиформной активности (рисунок 5.6Б).

Последующая микроапликация раствора РУ-1205 в концентрации 3,05 мМ не оказывала существенного влияния на эпилептиформную активность, индуцированную ТРМРА (рисунок 5.6В).

После 10 минут наблюдений появились редкие высокоамплитудные негативные разряды, которые развивались регулярно на протяжении последующих наблюдений (рисунок 5.6Г).

На основании проведенной работы можно утверждать, что соединение РУ-1205 не оказывает значительного влияния на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную блокатором ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА.

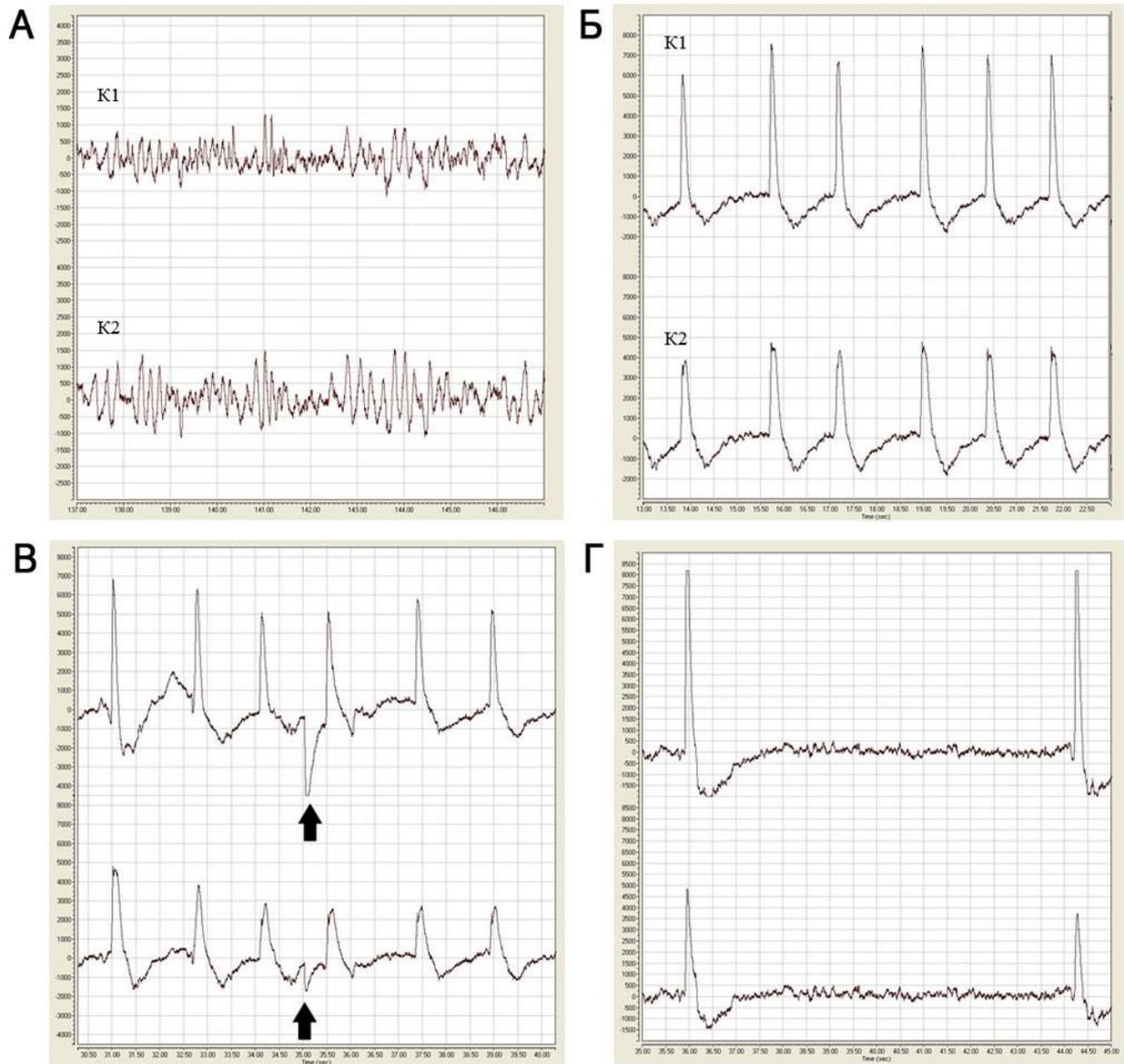


Рисунок 5.6. Влияние микроапликации соединения РУ-1205 (3,05 мМ) на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, вызванную предварительным введением блокатора ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА (6,23 мМ раствор).

А - фоновая фокальная ритмика до применения ТРМРА (блокатора ГАМК_A-р рецепторов); Б - эпилептиформная активность после применения ТРМРА; В - микроапликация соединения РУ-1205 (отмечено стрелками); Г – ритмическая активность отдельных нейронных колонок 10 минут после микроапликации соединения РУ-1205 на фоне эпилептиформной активности, вызванной введением ТРМРА.

Обозначения: К1 – верхние слои (500 мкм глубина погружения) и К2 - нижние слои (1000 мкм) нейронной колонки соматосенсорной коры.

5.3 Изучение механизма противосудорожного действия соединения РУ-1205 *in vivo*

5.3.1 Влияние селективного блокатора каппа-рецепторов *nor*-BNI на противосудорожную активность соединения РУ-1205

На модели судорог, вызванных бикикуллином, продолжительность латентного периода клонических и тонических судорог у контрольных животных составила 376 и 632 с соответственно. У мышей, которым вводился только *nor*-BNI, латентный период клонических и тонических судорог несколько сократился по сравнению с негативным контролем, однако статистический анализ не выявил значимых различий (таблица 5.2).

Таблица 5.2

Влияние селективного блокатора каппа-рецепторов *nor*-BNI (5 мг/кг, и.п.) на противосудорожную активность соединения РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) и U-50,488 (4,1 мг/кг, и.п.) на модели судорог, вызванных бикикуллином (5,5 мг/кг, и.п.), ($M \pm m$).

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

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

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

Результаты данного исследования служат фактическим основанием для принятия каппа-рецепторного механизма действия в качестве основного механизма, посредством которого реализуется противосудорожный эффект соединения РУ-1205.

5.3.2 Влияние блокатора бензодиазепинового сайта флумазенила на противосудорожную активность соединения РУ-1205 на модели судорог, вызванных коразолом

При изучении продолжительности латентного периода миоклонических и клонических судорог, вызванных коразолом, у 100% контрольных животных развивались судорожные припадки. Латентный период миоклонических и клонических судорог группы флумазенила был сопоставим с негативным контролем (таблица 5.3).

Таблица 5.3

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

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

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

Соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг вызывало статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение латентного периода миоклонических и клонических судорог в 3 и 2,5 раза соответственно по сравнению с контрольными животными, при этом флумазенил за 5 минут до инъекции соединения РУ-1205 незначительно влиял на продолжительность латентного периода миоклонических и клонических судорог.

Диазепам в дозе 1 мг/кг также пролонгировал латентный период миоклонических судорог в 3,5 раза ($p < 0,05$) и полностью предотвращал развитие клонических судорог. Данные эффекты диазепама были практически полностью устранены предварительным введением флумазенила до уровня сопоставимого с группой контроля.

Таким образом, гипотеза о возможном взаимодействии с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_A-рецепторов не находит экспериментального подтверждения.

5.4 Взаимодействие соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем

5.4.1 Воздействие соединения РУ-1205 на фенаминовую гиперактивность

Фенамин вызывает повышение двигательной активности у животных, что, в частности, связано с активацией дофаминовой нейротрансмиссии в мезолимбической системе мозга [Островская, Р.У., 2012; Lodge, D.J., 2008]. Мезолимбический тракт принимает участие в контроле двигательного акта и двигательных аффективных реакциях [Луцкий И.С., 2011].

У контрольных животных, получавших фенамин, наблюдалось повышение двигательной активности более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. Также в опытных группах, получавших соединение РУ-1205 в дозе 10 и 30 мг/кг и.п., было выявлено статистически значимое снижение гиперактивности на 53% и 71% соответственно по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили фенамин (таблица 5.4)

Эффект устранения фенаминовой гиперактивности, наблюдаемый на данной модели, соответствует литературным данным, согласно которым агонисты каппа-опиоидных рецепторов могут угнетать дофаминергическую систему на уровне мезолимбического пути [Cahill, C.M., 2014; Faure, A., 2008; Martinez, D., 2008; Trifilieff, P., 2013].

Таблица 5.4

Влияние вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на гиперактивность, вызванную фенамином (6 мг/кг, и.п.) у мышей в актометре ($M \pm m$).

Вещество/доза	Двигательная активность
Интактный контроль (физ. р-р)	120,1±8,1
Контроль (фенамин + физ. р-р)	253,6±11,9*
Фенамин + РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.)	242,4±22,3*
Фенамин + РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.)	120,3±7,7#
Фенамин + РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.)	74,5±11,7#

Примечание: * - статически значимо по отношению к интактной контрольной группе ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна); # - статически значимо по отношению к группе фенамин+физ. р-р ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

5.4.2 Изучение влияния соединения РУ-1205 на эффекты L-ДОФА

Как правило, активность в данном тесте проявляют ингибиторы МАО, которые потенцируют развитие стереотипных поведенческих реакций на фоне введения низких доз L-ДОФА [Андреева, Н.И., 2005].

В ходе эксперимента L-ДОФА в дозе 500 мг/кг вызывал развитие характерного стереотипного поведения, тогда как низкие дозы данного анализатора (100 мг/кг) не приводили к существенным изменениям поведенческой активности животных. Предварительное введение соединения РУ-1205 в дозах 1, 10 и 30 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на выраженность стереотипии в опытных группах по сравнению с негативным контролем (таблица 5.5).

Отсутствие статистически значимых признаков изменения поведения животных (в соответствии с оценочной шкалой по Т.А. Ворониной) в группах, получавших меньшие подпороговые для стереотипной реакции дозы L-ДОФА, позволяет с большой степенью вероятности исключить фармакологически значимую МАО-ингибирующую активность у изучаемого вещества.

Таблица 5.5

Влияние вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на выраженность стереотипии, вызванной L-ДОФА (баллы $M \pm SD$).

Группа/комбинация веществ	Время после введения L-ДОФА, мин	Выраженность стереотипии, баллы
Позитивный контроль L-ДОФА (500 мг/кг, и.п.)	35	3,00±0,00
	70	2,25±0,46
	105	1,50±0,54
	140	1,38±0,52
Негативный контроль L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.)	35	0,00±0,00*
	70	0,25±0,46*
	105	0,13±0,35*
	140	0,00±0,00*
Соединение РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.) + L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.)	35	0,25±0,46*
	70	0,00±0,00*
	105	0,00±0,00*
	140	0,00±0,00*
Соединение РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) + L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.)	35	0,13±0,35*
	70	0,25±0,46*
	105	0,13±0,35*
	140	0,13±0,35*
Соединение РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.) + L-ДОФА (100 мг/кг, и.п.)	35	0,13±0,35*
	70	0,00±0,00*
	105	0,00±0,00*
	140	0,00±0,00*

Примечание: * - $p < 0,05$ – статистически значимо по отношению к позитивному контролю (критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

5.4.3 Влияние соединения РУ-1205 на каталептогенный эффект галоперидола

Каталепсия, свойственная для «типичных» нейролептиков, обусловлена блокированием D₂-рецепторов на уровне nigrostriарной системы [Sanberg P. R. et al., 1988].

В результате проведенного эксперимента установлено, что тестируемое соединение РУ-1205 при интраперитонеальном введении в дозах 1, 10 и 30 мг/кг не вызывало статистически значимого изменения каталептогенных свойств галоперидола у мышей опытной группы в сравнении контрольными животными, получавшими галоперидол (таблица 5.6).

Таблица 5.6

Влияние вещества РУ-1205 на каталепсию, вызванную галоперидолом (1 мг/кг, и.п.) у мышей ($M \pm m$).

Группы	Продолжительность каталепсии, сек
Интактный контроль (физ. р-р)	Менее 10
Контроль (галоперидол)	105,2±6,6
РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.) + галоперидол	108,0±7,7
РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) + галоперидол	118,4±7,5
РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.) + галоперидол	121,6±8,1

Таким образом, на данной модели соединение РУ-1205 не оказывало антикаталептогенного действия. Результаты проведенного теста согласуются с работами других авторов. По данным Marin С. агонисты каппа-опиоидных рецепторов не влияют на каталептогенный эффект антагонистов D₂-рецепторов [Marin С., 1996].

5.4.4 Влияние соединения РУ-1205 на гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном у мышей

5-гидрокситриптофан (5-ГТФ) является аминокислотой, предшественником серотонина и повышает его межсинаптическую концентрацию в медиальной префронтальной коре [Lambe, E.K., 2000]. У животных эффекты 5-ГТФ проявляются в виде гиперкинеза – «встряхивания» головой. Агонисты каппа-опиоидных рецепторов способны устранять данный гиперкинез [Marek, G. J., 2003; Werkheiser, J. L., 2007].

В группе интактного контроля моторных нарушений зарегистрировано не было. В группе контроля, получавшей 5-ГТФ наблюдалось развитие феномена резкого встряхивания головой со средней частотой 15,5 за период с 11 по 20 минуту с последующим снижением эффекта.

В опытных группах происходило дозозависимое снижение частоты встряхиваний головы (таблица 5.7). Статистически значимые результаты получены в группах после введения вещества РУ-1205 в дозах 10 и 30 мг/кг. Максимальные значения регистрировались с 11 по 20 минуту наблюдения и составляли 50,9% и 65,2% соответственно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$).

В условиях проведенного эксперимента установлен супрессивный эффект соединения РУ-1205 на 5-ГТФ-индуцированный гиперкинез, что может быть следствием депримирующего влияния изучаемого вещества на серотонинергические нейроны в медиальной префронтальной коре. Данная активность, вероятно, является сопутствующим проявлением каппа-опиоидного механизма действия [Marek, G. J., 2003; Werkheiser, J. L., 2007].

Таблица 5.7

Влияние вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на 5-ГТФ-индуцированный (300 мг/кг, и.п.) гиперкинез у мышей, ($M \pm m$).

Вещество/группа	Количество «встряхиваний» головы во временной промежуток		
	С 1 по 10 минуту	С 11 по 20 минуту	С 21 по 30 минуту
Интактный контроль (физ. р-р)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (5-ГТФ)	7,2±1,5	15,5±2,0	11,8±2,6
РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.) + 5-ГТФ	8,1±1,8	13,0±1,4	9,2±1,5
РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) + 5-ГТФ	6,3±1,2	7,6±2,1*	7,5±1,4
РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.) + 5-ГТФ	2,9±0,7*	5,4±1,5*	4,1±1,3*

Примечание: * – статистически значимо по отношению к контролю (5-ГТФ) ($p \leq 0,05$, критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

5.4.5 Действие соединения РУ-1205 на эффекты резерпина

Резерпин вызывает истощение гранулярных депо катехоламинов (дофамина, норадреналина и серотонина), как следствие, в этих системах наблюдается снижение нейромедиаторной передачи [Verheij, M.M., 2009]. Данный анализатор нарушает автономные нервные функции, что выражается гипотермией и блефароптозом [Воронина, Т.А., 2012]. Резерпиновая модель не является строго селективной, поскольку резерпин вызывает истощение депо сразу нескольких нейротрансмиттеров, тем не менее модель целесообразна в комплексе с другими тестами и позволяет косвенно судить о наличии моноаминергических компонентов в спектре активности изучаемого вещества [Миронов А.Н., 2012].

В группе контроля резерпин в дозе 2,5 мг/кг после интраперитонеального введения вызывал понижение ректальной температуры животных на 3°С ($p < 0,05$), блефароптоз выраженностью в $2,8 \pm 0,5$ балла ($p < 0,05$). Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 1-30 мг/кг и.п. не оказывало влияния на степень выраженности гипотермии, блефароптоза и двигательных расстройств (таблица 5.8).

Таблица 5.8.

Влияние вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на эффекты резерпина (2,5 мг/кг и.п.), ($M \pm SD$).

Комбинации вводимых веществ	Температура			Блефароптоз		
	Исход (введение резерпина)	4 час (введение РУ-1205)	4,5 час	Исход (введение резерпина)	4 час (введение РУ-1205)	4,5 час
Контроль (резерпин)	38,4±0,3	35,3±0,3*	35,3±0,3*	0,0±0,0	2,8±0,5*	2,8±0,5*
РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.) + резерпин	38,5±0,3	35,4±0,4*	35,4±0,4*	0,0±0,0	2,6±0,5*	2,8±0,5*
РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) + резерпин	38,6±0,2	35,5±0,2*	35,4±0,4*	0,0±0,0	2,6±0,7*	2,8±0,5*
РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.) + резерпин	38,5±0,3	35,4±0,3*	35,2±0,5*	0,0±0,0	2,8±0,5*	2,8±0,5*

Примечание: * - $p < 0,05$ – статистически значимо по отношению к исходным данным (влияние резерпина, критерий Краскела-Уолиса с *post-hoc* тестом Данна).

Оценивая полученные результаты, можно заключить, что соединение РУ-1205, вероятно, не оказывает достаточно выраженного влияния на моноаминергические системы мозга, ассоциированные с эффектами резерпина.

5.4.6 Эффект соединения РУ-1205 на ареколиновый тремор

М-холиномиметик ареколин индуцирует у мышей паркинсоноподобный гиперкинез в виде тремора [Lukomskaaya, N. Ya., 2008]. Изменение выраженности данного эффекта ареколина на фоне введения других веществ может происходить при наличии у этих веществ М-холиноблокирующего или М-холиномиметического действия [Андреева, Н.И., 2005].

Ареколин при подкожном введении в дозе 25 мг/кг вызывал развитие генерализованного тремора у мышей. Соединение РУ-1205 в дозах 1, 10 и 30 мг/кг статистически значимо не влияло на латентный период и продолжительность ареколинового тремора (таблица 5.9).

Таблица 5.9

Влияние вещества РУ-1205 на выраженность ареколин-индуцированного (25 мг/кг, п.к.) тремора у мышей, ($M \pm m$).

Вещество/группа	Латентный период тремора, сек	Длительность тремора, сек
Интактный контроль	-	-
Контроль (ареколин)	68,0±7,0	1098,0±111,9
РУ-1205 (1 мг/кг, и.п.) + ареколин	65,6±10,1	1082,0±142,2
РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) + ареколин	69,1±8,4	1096,0±80,5
РУ-1205 (30 мг/кг, и.п.) + ареколин	64,4±5,2	1066,0±90,2

Статистически значимого эффекта соединения РУ-1205 на данной модели установлено не было, что указывает на отсутствие у вещества М-холинергической активности.

5.4.7 Эффект соединения РУ-1205 на никотиновый тремор

Никотин является Н-холиномиметиком, который вызывает у мышей тремор и судороги [Mansner, R., 1977]. Изменение выраженности эффектов никотина после

введения изучаемых веществ может расцениваться как признак холинергической активности, связанной с воздействием на Н-холинорецепторы.

После введения мышам Н-холиномиметика никотина в дозе 6 мг/кг подкожно отмечалось развитие тремора и судорог у 100% контрольных и опытных животных. Сочетанное введение соединения РУ-1205 в диапазоне доз 1-30 мг/кг и анализаторного вещества не вызывало статистически значимых изменений латентного периода и продолжительности тремора по сравнению с контрольной группой животных, получавшей никотин (таблица 5.10).

Таблица 5.10

Влияние соединения РУ-1205 в возрастающих дозах на никотиновый (6 мг/кг, п.к.) тремор и судороги у мышей ($M \pm m$).

Вещества/группы/доза веществ	Латентный период тремора, с	Латентный период судорог, с	Животные с судорогами, %
Интактный контроль (физ. р-р)	-	-	-
Контроль (никотин + физ. р-р)	63,0±4,6	101,0±8,1	100,0
РУ-1205 1 мг/кг, и.п. + никотин	62,7±5,8	98,6±8,4	100,0
РУ-1205 10 мг/кг, и.п. + никотин	66,5±5,7	106,8±7,3	100,0
РУ-1205 30 мг/кг, и.п. + никотин	72,3±6,8	108,6±9,4	100,0

Соединение РУ-1205 не оказывало статистически значимого влияния на эффект никотина, что служит свидетельством отсутствия у изучаемого вещества Н-холинергической активности.

5.5 Заключение

Результаты проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о взаимодействии соединения РУ-1205 с каппа-опиоидными рецепторами, при этом эффекты вещества устраняются после введения высокоселективного каппа-антагониста норбиналторфимина. ЭК₅₀ подавления электроиндуцированных сокращений семявыносящего протока кролика составила 2 нМ. Non-BNI обратимая противосудорожная активность в тесте с бикукуллином (5,5 мг/кг и.п.) позволяет сделать вывод о том, что антиконвульсивное действие соединения РУ-1205 (10

мг/кг и.п.) реализуется преимущественно за счет активации каппа-опиоидных рецепторов.

Изученное соединение позволяет нивелировать искусственный дефицит ГАМК-ергического торможения в ЦНС. После провокации эпилептиформной активности пикротоксином, введение вещества РУ-1205 приводило к сокращению в 12 раз площади под кривой спектральной плотности до $0,15 \pm 0,1 \text{ mV}^2$ в диапазоне 1-13 Гц на всех каналах, при этом механизм его действия не связан с активацией бензодиазепинового сайта и ГАМК_A- ρ рецепторов.

На модели диализа и фиксации мембранного потенциала показано, что соединение РУ-1205 в диапазоне концентраций 1-1000 мкМ обладает выраженным мембранотропным действием на нейроны моллюска прудовика, обратимо подавляет натриевые ($\text{ЭК}_{50} = 93,5 \text{ мкМ}$) и кальциевые токи ($\text{ЭК}_{50} = 95,7 \text{ мкМ}$), снижает специфические токи утечки, что также может лежать в основе его антиконвульсивного действия.

В исследованиях с использованием различных анализаторных веществ, селективно влияющих на отдельные нейромедиаторные системы, было установлено, что соединение РУ-1205 реализует противосудорожный эффект с возможным вовлечением моноаминергических нейромедиаторных систем.

Выявленные нейрохимические закономерности позволяют выдвинуть предположение о ключевой роли каппа-опиоидной системы в механизме противосудорожного действия соединения РУ-1205 с вероятным сопутствующим влиянием на дофамин-, серотонин- и ГАМК-ергические структуры, а также токи Na^+ и Ca^{2+} .

ГЛАВА 6. СОПУТСТВУЮЩИЕ, НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ И ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205

Исследования новых фармакологически активных веществ включают изучение их побочных, общепармакологических и нейротоксикологических свойств. Одной из главных проблем в применении многих антиконвульсивных средств является развитие толерантности к противосудорожному эффекту, феномен «рикошета» и синдром отмены [Katzung V.G., 2018].

Большинство противосудорожных препаратов имеют узкую широту терапевтического действия и обладают выраженными токсическими свойствами, поэтому изучение токсического действия и характера патологических изменений, приводящих к гибели животных, является важным аспектом фармакологического исследования новых соединений [Арзамасцев Е.В., 2012].

Поскольку проявление различных токсических эффектов в дозах, меньших, чем среднелетальная возможно до наступления гибели животных, целесообразным представляется использование схемы многотестового наблюдения по Ирвину [Irwin S., 1964] для определения доз, с которых начинают развиваться нейротоксические и другие неблагоприятные эффекты.

6.1 Влияние соединения РУ-1205 на развитие толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и синдрома отмены

На данном этапе исследования была проведена оценка развития толерантности и синдрома «отдачи» при хроническом введении соединения РУ-1205 и препарата сравнения диазепама. Результаты эксперимента представлены в таблице 6.1.

За день до введения изучаемых веществ исходный уровень порога для миоклонических судорог был определен титрованием коразола во всех группах мышей. В последующие дни у контрольных животных отмечалось незначительное снижение уровня судорожного порога, что может быть связано с явлением киндлинга.

Таблица 6.1

Влияние соединения РУ-1205 (TID₂₀₀ 31 мг/кг и.п.) и диазепама (TID₂₀₀ 5 мг/кг и.п.) на уровень судорожного порога в эквиваленте коразола (мг/кг) за день до хронического введения изучаемых соединений, на 1, 14 и 28 день хронического введения, на 2, 4 и 7 дни после отмены хронического введения противосудорожных веществ (M±m).

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

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

В группе животных, которым инъецировалось соединение РУ-1205 (31 мг/кг, и.п.), пороговая доза коразола возросла до 87±5,0 мг/кг, что было в 3 раза выше по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$). В дальнейшем уровень судорожного порога вышел на плато и сохранялся без существенных изменений. Через сутки после отмены введения соединения РУ-1205 пороговая доза коразола статистически значимо не отличалась от уровня группы негативного контроля в тот же день.

Диазепам (5 мг/кг, и.п.) вызывал в первый день повышение судорожного порога в 3 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Однако по сравнению с 1-м днем активность препарата сравнения статистически значимо ($p < 0,05$) снизилась на 21% и 44% к 7-му и 28-му дню хронического введения соответственно. На следующие сутки после отмены диазепама уровень судорожного порога мышей уменьшился до 23,0±4,5 мг/кг коразола, что было значительно ниже ($p < 0,05$), чем в группе контроля в тот же день (28,9±4,8 мг/кг коразола).

При оценке признаков синдрома отмены на второй день после прекращения введения вещества РУ-1205 наличие прыжков, встряхиваний, тремора, стука

зубами, птоза, синдрома Штраубе, судорог, а также изменений двигательной активности (в тесте открытого поля) не отмечалось.

У животных, получавших диазепам, наблюдалось повышение двигательной активности, при этом других признаков синдрома отмены не регистрировалось.

В результате проведенного исследования было установлено, что антиконвульсивный эффект соединения РУ-1205 не снижается при хроническом назначении, и отсутствуют признаки феномена «рикошета», синдрома отмены после прекращения введения, в отличие от препарата сравнения диазепама.

6.2 Изучение вторично-подкрепляющих и аверсивных свойств соединения РУ-1205

6.2.1 Влияние соединения РУ-1205 на формирование условного рефлекса предпочтения или избегания места

Методика формирования условного рефлекса предпочтения или избегания места направлена на выявление аддиктивной или аверсивной активности веществ соответственно [Terashvili M. et al., 2008]. Отобранные по признаку отсутствия предпочтения отсеков животные до обуславливания проводили в отсеках №1 (ассоциация с физиологическим раствором) и №2 (ассоциация с тестируемым веществом) примерно равное количество времени. После 4 дней обучения, в ходе заключительного тестирования было установлено, что вещество РУ-1205 в дозе 31 мг/кг и.п. не вызывало статистически значимого предпочтения/избегания какого-либо из отсеков камеры, что соответствовало результатам контрольной группы животных (рисунок 6.1).

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

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

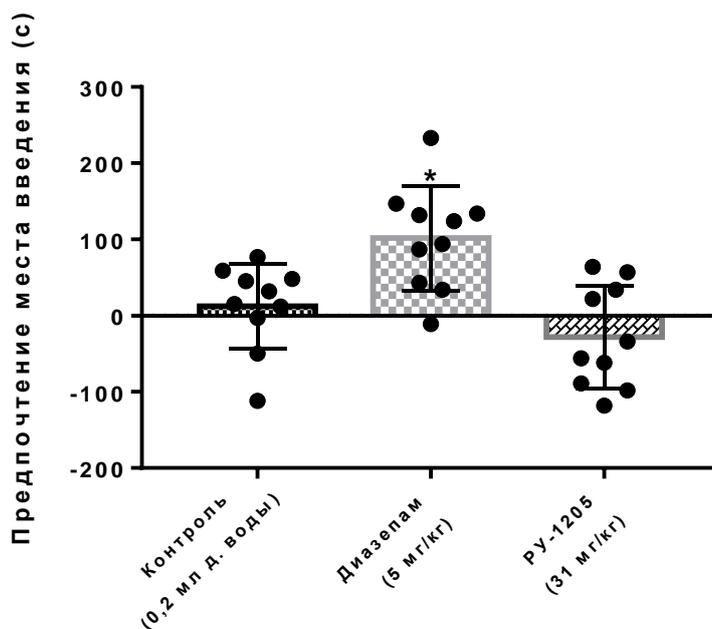


Рисунок 6.1. Влияние соединения РУ-1205 и диазепама (при и.п. введении) на время нахождения мышей в отсеках установки для исследования реакции избегания места ($M \pm SD$).

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

6.2.2 Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста неизбежного плавания

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

Диазепам в дозе 5 мг/кг и.п. вызывал выраженную седацию и статистически значимо ($p \leq 0,05$) повышал время иммобилизации до $133,1 \pm 9,6$ секунд, что согласуется с литературными данными [El Zahaf N. A., 2014]. Среднее время иммобилизации у животных, получавших соединение в дозе 31 мг/кг и.п. составило $87,9 \pm 13,9$ секунд и статистически не отличалось от группы негативного контроля (рисунок 6.2).

На основании полученных данных, можно заключить, что соединение РУ-1205 в изученной дозе не обладает депрессогенными, авersiveвыми и вторично-подкрепляющими свойствами.

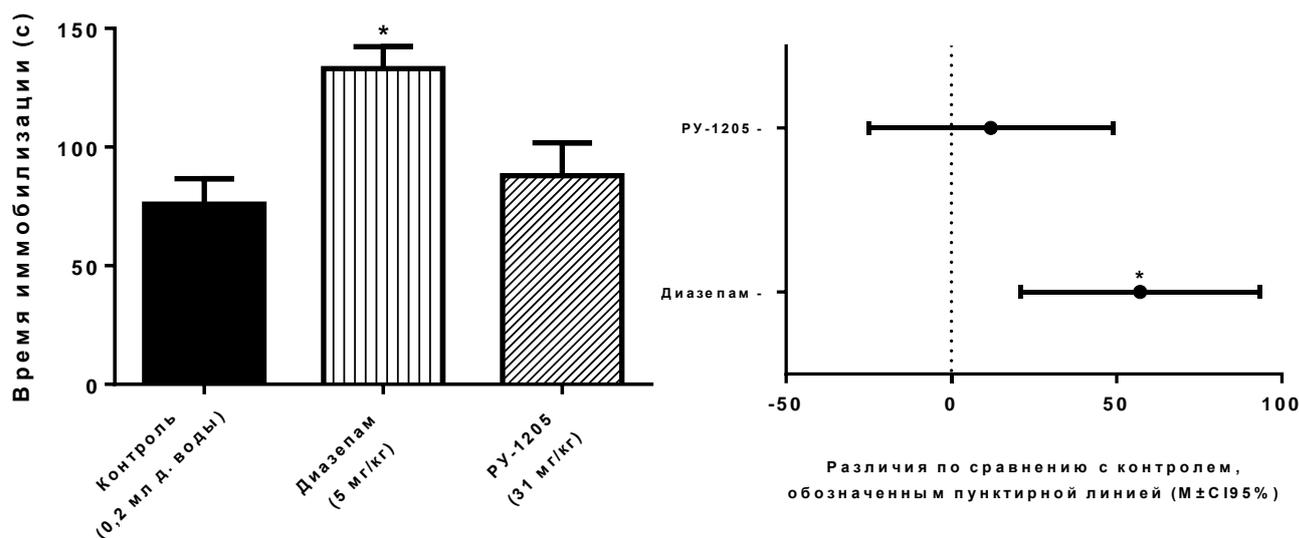


Рисунок 6.2. Влияние соединения РУ-1205 и диазепам (при и.п. введении) на длительность иммобилизации у мышей ($n=10$) в эксперименте «форсированное неизбежное плавание» ($M \pm m$).

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

6.3 Общетоксические свойства соединения РУ-1205.

6.3.1 Определение острой токсичности соединения РУ-1205

Острую токсичность соединения РУ-1205 изучали на половозрелых мышах, используя интраперитонеальный путь введения. В результате проведенных исследований были рассчитаны показатели острой токсичности для субстанции РУ-1205, а также выявлены характерные признаки интоксикации веществом.

В клинике отравления мышей преобладали симптомы нарушений со стороны ЦНС: седация, заторможенность, угнетение локомоторной активности, нарушение координации, а также угнетение болевой, тактильной и звуковой чувствительности. Гибель мышей в боковом положении происходила преимущественно через 4-6 часов после введения. Реабилитация поведенческих и вегетативных функций у выживших мышей отмечалась в течение первых суток наблюдения.

На рисунке 6.3 представлена зависимость количества погибших животных (в %) от логарифма дозы вещества РУ-1205 выраженной в мг/кг через 14 суток после интраперитонеального введения вещества.

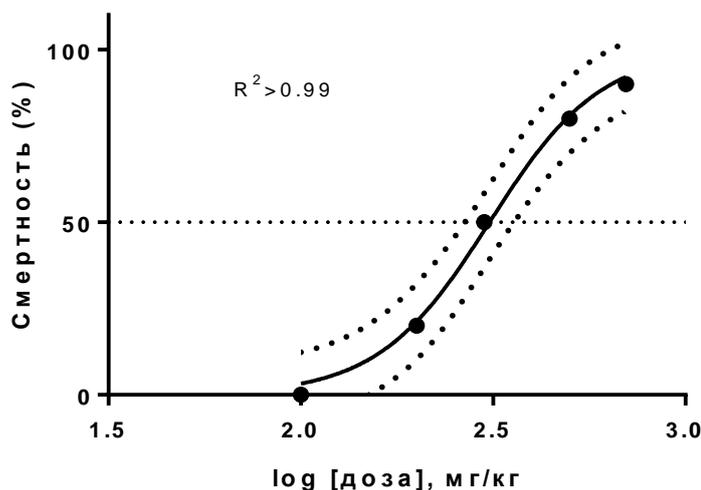


Рисунок 6.3. Гибель мышей самцов через 14 суток после однократного интраперитонеального введения вещества РУ-1205 в возрастающих дозах.

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

Результаты расчета уровней летальных доз для мышей при интраперитонеальном введении вещества РУ-1205 (ЛД₅₀, ЛД₁₆ и ЛД₈₄) представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2

Показатели острой токсичности вещества РУ-1205 через 14 суток после однократного интраперитонеального введения мышам. Результаты отражены как М (СИ95%).

Пол	ЛД ₁₆ , мг/кг	ЛД ₅₀ , мг/кг	ЛД ₈₄ , мг/кг
Самцы	178,2 (152,8 - 207,8)	309,6 (284,7 - 336,6)	537,7 (461,9 - 625,9)

Примечание: $R^2 > 0,97$ для всех указанных значений.

С учетом классификации токсичности веществ и критериев оценки опасности химических соединений по И.В. Саноцкому [Саноцкий И.В., 1975] вещество РУ-1205 может быть отнесено к классу малотоксичных.

6.3.2 Изучение нейротоксикологического профиля соединения РУ-1205 с помощью системы многотестового наблюдения по Ирвину

В результате проведенного исследования после введения соединения РУ-1205 в возрастающих дозах статистически значимые изменения бессознательных поведенческих реакций (пугливости, агрессивности, настороженности) на всем

протяжении эксперимента выявлены не были. В пределах нормы сохранялись показатели нервно-мышечной передачи и возбудимости животных. Судороги, тремор, подергивания, парезы или синдром Штраубе не регистрировались ни в одной группе мышей. Реакция на тактильные и звуковые раздражители у мышей не менялись на протяжении всего эксперимента. Нарушений походки и положения тела в пространстве не определялось. Со стороны вегетативной нервной системы такие признаки как пилоэрекция, птоз, экзофтальм, саливация, учащение дефекации и мочеиспускания выявлено не было. Сенсомоторные рефлексы мышей не изменялись в дозах до 50 мг/кг (таблица 6.3). Угнетение ипсилатерального рефлекса происходило в дозе 50 и 100 мг/кг. Снижение слухового рефлекса определялось в дозе 100 мг/кг. Нарушений роговичного рефлекса обнаружено не было.

Таблица 6.3

Влияние соединения РУ-1205 в возрастающих дозах на рефлексы мышей.

Доза, мг/кг, и.п.	Роговичный				Слухового прохода				Ипсилатеральный			
	Время после введения, мин											
	30	60	120	180	30	60	120	180	30	60	120	180
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
100	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Примечание: ↓ - если рефлекс понижен более чем у 50% животных в группе.

При изучении мышечной координации в тесте удержания на сетке статистически значимые отклонения по сравнению с группой контрольных животных отсутствовали (таблица 6.4).

При оценке влияния изучаемого соединения на частоту дыхания мышей было установлено, что при интраперитонеальном введении вещество РУ-1205 в диапазоне изучаемых доз не изменяло статистически значимо данный показатель.

Ректальная температура после введения вещества РУ-1205 в дозах до 50 мг/кг не подвергалась статистически значимым изменениям по сравнению с контрольными значениями. В более высоких дозах изучаемое соединение понижало ректальную температуру (таблица 6.5).

Таблица 6.4

Влияние соединения РУ-1205 на мышечную координацию мышей ($M \pm m$) в тесте удержания на сетке.

Время после введения, мин		Доза, мг/кг, и.п.					
		Контроль	1	10	25	50	100
30	Баллы	4,0	4,0	4,0	4,0	3,9±0,1	3,9±0,1
60		4,0	4,0	4,0	4,0	3,8±0,2	3,8±0,2
120		4,0	4,0	4,0	4,0	3,9±0,1	3,6±0,2
180		4,0	4,0	4,0	4,0	3,9±0,1	3,6±0,2

Примечание: Результаты приведены в баллах (1-4). Количество баллов соответствует количеству лап, которые задействованы в акте удержания на сетке. 1 балл также начисляется при падении животного.

Таблица 6.5

Влияние вещества РУ-1205 на ректальную температуру мышей ($M \pm m$).

Ректальная температура, С ⁰				
Вещество (и.п.)	Время после введения соединения, мин			
	30	60	120	180
Контроль	37,5±0,4	37,3±0,4	37,1±0,3	37,0±0,3
РУ-1205 (1 мг/кг)	37,5±0,2	37,8±0,1	37,5±0,3	37,5±0,1
РУ-1205 (10 мг/кг)	36,4±0,3	36,8±0,3	36,0±0,5	36,3±0,4
РУ-1205 (25 мг/кг)	36,4±0,4	36,5±0,4	35,3±0,6	35,9±0,6
РУ-1205 (50 мг/кг)	34,3±0,6*	34,3±0,6*	34,3±0,5*	34,7±0,6*
РУ-1205 (100 мг/кг)	32,3±0,3*	32,6±0,4*	32,9±0,5*	32,8±0,5*

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

В тесте «открытого поля» изучался характер двигательной активности мышей. Оценивались такие параметры, как вертикальная, горизонтальная и поисковая активности, а также число выходов в центр, количество актов дефекаций и груминга.

В группе контроля уровень горизонтальной активности животных составил $15,2 \pm 4,4$ пересечений квадратов, число вставаний на задние лапы $4,0 \pm 1,1$ и число «заглядываний» в отверстия $1,5 \pm 0,6$ (таблица 6.6). Статистически значимое угнетение двигательной активности после введения вещества РУ-1205 не наблюдалось в дозах ниже 25 мг/кг.

Таблица 6.6

Влияние вещества РУ-1205 через 60 мин. после интраперитонеального введения на поведение мышей в тесте «открытого поля» ($M \pm m$).

Вещество (и.п.)	Вертикальная активность	Горизонтальная активность	Поисковая активность	Число выходов в центр	Болюсы	Груминг
Контроль	4,0±1,1	15,2±4,4	1,5±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
РУ-1205 1 мг/кг	4,9±0,9	11,3±2,0	1,1±0,5	0,3±0,2	0,0±0,0	0,5±0,3
РУ-1205 10 мг/кг	2,8±0,6	8,8±1,3	1,0±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,2
РУ-1205 25 мг/кг	1,6±0,3*	3,8±0,7*	0,3±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,4±0,3
РУ-1205 50 мг/кг	1,6±0,3*	3,1±0,8*	0,3±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
РУ-1205 100 мг/кг	1,5±0,3*	2,1±0,6*	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

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

6.4 Заключение

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

РУ-1205 не проявляет фармакологических свойств, способствующих формированию депрессии, аверсивно-дисфорических явлений и патологического пристрастия.

По показателю острой токсичности соединение РУ-1205 можно отнести к классу малотоксичных соединений.

При изучении нейротоксикологических свойств соединения РУ-1205 по Ирвину было выявлено, что тестируемое вещество в дозах до 50 мг/кг при однократном интраперитонеальном введении не вызывает существенных изменений функционального состояния вегетативной нервной системы и эмоционального статуса у экспериментальных животных, за исключением снижения вертикальной и горизонтальной активностей в «открытом поле». В дозах 50 и 100 мг/кг наблюдалось угнетение ипсилатерального и слухового рефлекса, понижение ректальной температуры, сокращение длительности удержания на вращающемся стержне, снижение горизонтальной и вертикальной двигательных активностей.

ГЛАВА 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпилепсия и судорожные заболевания являются второй по частоте неврологической патологией после инсультов, при этом в 30% случаев судорожные состояния не поддаются терапевтическому контролю даже на фоне лечения современными препаратами и соблюдении принципов рациональной политерапии [Воронина Т.А., 2012]. Альтернативные методы лечения не всегда оказываются эффективными, а также не существует профилактических мер по предотвращению развития эпилепсии.

Наиболее часто применяемые противоэпилептические средства, определяемые ВОЗ как необходимые (вальпроат натрия, карбамазепин, фенobarбитал, этосуксимид, диазепам) вызывают различные неврологические побочные реакции (гиперсомния, нарушение координации, развитие привыкания, снижение работоспособности, атаксия, сопор) и оказывают прямое токсическое действие на внутренние органы [Зенков Л. Р., 2000; Glauser T. et al., 2006]. Более того, препараты, применяемые в клинической практике, зачастую не влияют на зарождение эпилептического очага, и способны лишь купировать приступ во время или после его манифестации [Löscher W., 2004]. Также остается актуальной проблема фармакорезистентных форм эпилепсии, которые не поддаются лечению клинически одобренными фармакологическими средствами [Карлов В. А., 2008].

Значительная выраженность побочных эффектов противосудорожных препаратов, плохая переносимость и узкая терапевтическая широта негативно отражаются на качестве жизни пациентов, что в целом диктует необходимость в поиске новых антиконвульсивных средств [Аниол В. А. и др., 2011].

Необходимо отметить, что большая часть используемых в клинической практике противосудорожных препаратов (этосуксимид, фенитоин, примидон, бензодиазепины и др.) относятся к гетероциклическим азотосодержащим структурам, поэтому активно развиваемым направлением в создании новых противоэпилептических средств является поиск и разработка биологически

активных соединений на основе гетероциклических азотосодержащих систем [Narasimhan B., 2012; Sharma S. et al., 2011; Shaharyar M. et al., 2011; Siddiqui N., 2010]. Широкое применение в медико-биологической сфере находят представители класса конденсированных производных бензимидазола и имидазо[1,2- α]бенимидазола в частности. В исследованиях, проведенных на базе кафедры фармакологии ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ Южного федерального университета, были выявлены производные имидазо[1,2- α]бенимидазола с антиконвульсивной активностью [Гречко О.Ю., 2012; Спасов А.А. и др., 2013].

На основании обзора литературных данных, а также на основании компьютерного прогноза биологической активности 521 N₉-замещенных, 126 N₁-замещенных ИмБИ с помощью системы PASS, была показана высокая перспективность класса производных ИмБИ как источника веществ, обладающих противосудорожной активностью.

Согласно прогнозу, в системе PASS для 88% веществ предполагалось наличие какого-либо вида активности, связанного с противосудорожным действием. Необходимо отметить, что противосудорожный эффект прогнозировался для большего числа N₉-замещенных ИмБИ, чем для N₁-замещенных ИмБИ. При рассмотрении вероятных молекулярных механизмов противосудорожного действия были выявлены различия между рядами. Как N₁, так и N₉-ИмБИ могут реализовать противосудорожную активность посредством блокирования натриевых каналов, при этом у N₉-производных вероятность наличия данного механизма действия была несколько выше, чем у N₁-производных. Вторым вероятным механизмом действия для N₁ и N₉- производных ИмБИ была агонистическая активность в отношении ГАМК_A-рецепторов. Третий механизм - ингибирование обратного захвата ГАМК.

Полученные результаты согласуются с данными литературы [Drasner K., 2011; Bagal S.K. et al., 2013]. Различными авторами доказана способность производных бензимидазола блокировать натриевые токи [Rajouhesh H. et al., 2012; Zuliani V. et al., 2012]. Известно, что натриевые каналы присутствуют на мембранах

нейронов и играют ключевую роль в распространении возбуждающих импульсов в ЦНС [Oliva M., 2012]. Многие противоэпилептические препараты, такие как фенитоин, карбамазепин, ламотриджин, зонисамин, руфинамид и др., оказывают ингибирующее влияние на потенциал-зависимые натриевые каналы [Sills G.J., 2011].

Также сообщается о способности производных бензимидазола повышать чувствительность ГАМК-рецепторов [Гамма Т.В. и др., 2010]. В отношении фторфенилзамещенных бензимидазолов RWJ-46771 и RWJ-51204 было показано, что они с высокой афинностью ($K_i=0,2-2$ нМ) и селективностью связываются с ГАМК-молекулярным комплексом [Atack J. R., 2003]. С помощью методов фиксации потенциала и концентрационного скачка обнаружено, что схожее по строению с изучаемым соединением производное имидазо[1,2- α]бензимидазола РУ-357 концентрационнозависимо увеличивает амплитуду ГАМК-активируемых хлорных токов в изолированных клетках Пуркинье мозжечка крысы и является позитивными аллостерическими модулятором ГАМК_A-рецепторов [Шаронова Н.И. и др., 2005].

Принимая во внимание полученные данные, в качестве объектов исследования на модели судорог, вызванных коразолом были выбраны 15 наиболее перспективных веществ, имеющих высокие прогнозные оценки в отношении противосудорожной активности ($P_a > 20$, $P_i < 10\%$). В качестве препарата сравнения был выбран вальпроат натрия, рекомендованный для данного теста методическим руководством по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств [Воронина Т.А., 2012].

По результатам экспериментального исследования *in vivo* изученные вещества проявили различный уровень антиконвульсивной активности, среди них соединения под лабораторными шифрами РУ-285, РУ-1204 и РУ-1203 эффективно блокировали клонические судороги продолжительностью более 3 сек у 40% животных в дозе 10 мг/кг, и.п. Препарат сравнения вальпроат натрия показал аналогичный уровень противосудорожной активности в дозе 130 мг/кг, и.п.

Наиболее активное вещество РУ-1205 (10 мг/кг, и.п.) предотвращало судороги у 50% опытных животных.

С помощью математического метода Фри-Уилсона было показано, что наиболее важный вклад в противосудорожное действие вносит базовая структура ИмБИ. В ходе исследования отмечалось изменение антиконвульсивной активности соединений в зависимости от их химической структуры. Противосудорожное действие во многом определялось морфолиноэтильным и пирролидиноэтильным заместителями в положении N₉, которые увеличивали антиконвульсивную активность на 12,5% и 7,5% соответственно, а также 3-бромпропильный заместитель, повышающий активность на 14,3% у N₁ производных. Кроме того, 4-галогенфенильный заместитель у атома углерода во 2 положении вносит существенный вклад в противосудорожную активность производных ИмБИ, в том числе 4-фторфенильный радикал. Полученные результаты хорошо согласуются с работами других авторов [Kumar N. et al., 2011; Shaikh I. N. et al., 2012; Shaharyar M. et al., 2016; Partap S. et al., 2017; Siddiqui N. et al., 2016; Yadav G., 2015].

По результатам направленного поиска было выбрано соединение с наиболее высоким уровнем противосудорожного действия – РУ-1205 (9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил) имидазо[1,2-*α*]бензимидазол). Указанное соединение изучалось в широком диапазоне доз с последующим расчетом показателей ЭД₅₀, ТД₅₀ и ЛД₅₀. Вещество РУ-1205 вызывало дозозависимое противосудорожное действие на модели судорог с коразолом, превосходя препарат сравнения вальпроат натрия по активности в 12,7 раз, а также по величине протективного и терапевтического индекса в 3,2 и 8,6 раз соответственно.

Фармакотерапия судорожных состояний осложняется их полиэтиологической и гетерогенной природой [Katzung B.G., 2018]. На данный момент не существует универсальных противосудорожных средств, а медикаментозное лечение подбирается на основании эмпирической классификации судорожных припадков, поддающихся лечению определенными препаратами [Литовченко Т.А., 2011]. Необходимо отметить, что даже механизм

действия препарата не является достоверным предиктором эффективности в отношении определенного типа эпилепсии или судорожного синдрома. Поэтому для изучения противосудорожной активности новое соединение тестировалось на животных с применением различных моделей эпилептогенеза, позволяющих приблизительно детерминировать спектр клинической эффективности изучаемого вещества [Katzung B.G., 2018]. Результаты исследований приведены в таблице 7.1.

Таблица 7.1

Эффективность соединения РУ-1205 на различных моделях эпилептогенеза

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

Острые модели судорог, выполняемые на здоровых животных, позволяют оценить влияние соединений на клеточные и молекулярные процессы, которые могут быть вовлечены как в генерацию, так и в прекращение судорожного приступа. Наиболее широко применяются модели хемоиндуцированных судорог (с коразолом и другими конвульсантами) и максимального электрошока. Тест максимального электрошока более чувствителен к соединениям, которые препятствуют распространению патологической нейрональной активности, тогда

как модель коразоловых судорог лучше идентифицирует соединения, которые повышают судорожный порог [Mandhane S. N., 2007]. Максимальный электрошок является одной из самых высокопродуктивных моделей для изучения противосудорожной активности. С помощью данного теста были найдены многие противоэпилептические средства, блокирующие каналы натрия [Katzung B.G., 2018]. Модель максимального электрошока является валидной для воспроизведения тонико-клонических судорог.

Miller и соавторы выявили различия в нейронных путях, вовлеченных в эпилептогенез, вызванный максимальным электрошоком или коразолом [Miller J.W., 1987]. В развитии коразоловых судорог участвуют такие нервные структуры, как ретикулярная формация, диэнцефальная область и каудальный гипоталамус. Тогда как в МЭШ ключевую роль занимает черная субстанция [Mandhane S.N., 2007].

Коразол вызывает различные типы судорог, в зависимости от протокола введения, за счет связывания с t-бутил-бицикло-фосфоротионатным сайтом ГАМК_A-рецептора [Olsen, 1981], а также не исключается дополнительное неспецифическое проконвульсивное мембранотропное действие [Swinyard et al., 1989]. Высокую активность на моделях судорог, вызванных коразолом, проявляют такие препараты как этосуксимид, бензодиазепины и вальпроат натрия, которые эффективны для лечения генерализованных типов судорог, особенно абсансов и миоклонуса. С достаточно большой степенью вероятности тест коразоловых судорог позволяет идентифицировать соединения, которые усиливают ГАМК-ергическую нейротрансмиссию или которые действуют на каналы кальция (Ca²⁺) T-типа [Mandhane S.N., 2007].

Механизм действия бикикуллина основан на конкурентном антагонизме с ГАМК-связывающим сайтом ГАМК_A-рецептора, кроме того показано дополнительное действие – удлинение Ca²⁺-зависимых потенциалов и блокирование калиевых каналов. Классические антиконвульсивные препараты оказывают выраженный эффект против бикикуллин-индуцированных судорог, при

этом максимальную активность проявляют препараты с ГАМК_A-рецепторным фармакологическим профилем, такие как бензодиазепины [De Deyn et al., 1992; Johnston G.A.R., 2013; Velíšková et al., 1990; Velíšková et al., 1993].

Пикротоксин-индуцированные судороги также развиваются за счет блокирования в области ворот лиганд-зависимого хлорного канала ГАМК_A-рецептора и устраняются препаратами, аналогичными тем, которые эффективны на судорожной модели с бикикуллином [Miller J.W., 1987; Mandhane S.N., 2007].

Соединение РУ-1205 проявило противосудорожную активность в тесте максимального электрошока, а также на моделях судорог, вызванных антагонистами ГАМК_A-рецепторов (коразолом, бикикуллином и пикротоксином), при этом в тесте с коразолом изучаемое соединение превосходило по активности препарат сравнения вальпроат натрия в 12 раз. Следует отметить, что установленные результаты согласуются с данными ранее проведенного компьютерного прогноза биологической активности, что, в свою очередь, послужило предпосылкой для более детальной проверки гипотезы о возможной роли ГАМК- и глутаматергической систем, а также ионных каналов кальция и натрия в механизме действия соединения РУ-1205.

N-метил-D-аспартат является агонистом ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов. Данный тип рецепторов преимущественно экспрессируется в гиппокампе (CA1), зубчатой извилине и стриатуме [Swinyard et al., 1989]. Большинство классических противосудорожных препаратов, таких как фенобарбитал, диазепам, фенитоин не оказывают влияния на судороги, вызванные NMDA [Amabeoku G.J., 2008]. В проведенном нами исследовании соединение РУ-1205 статистически значимо снижало частоту вращательного поведения у мышей, что позволяет судить о вовлеченности NMDA-рецепторов в механизм противосудорожного действия изучаемого вещества. Однако нельзя исключать модулирующее влияние на глутаматергическую систему опосредованно через другие виды рецепторов.

В ходе электрофизиологических исследований было показано, что при микроапликации соединения РУ-1205 на кортикальные колонки мозга крыс наблюдается выраженное подавляющее влияние на формирование фоновой фокальной активности отдельных нейронных колонок, являющихся основными элементами структурно-функциональной организации коры мозга [Vuxhoeveden D.P., 2002]. Также регистрировалось снижение амплитудных характеристик фокальных потенциалов и подавление частот тета-ритма, характерного для состояния повышенной возбудимости нейронов. Данные наблюдения позволяют заключить, что соединение РУ-1205 обладает прямым ингибирующим влиянием на корковые структуры и, таким образом, может регулировать процессы возбуждения в ЦНС.

Кроме того, соединение РУ-1205 показало высокую противосудорожную активность на модели максимального электрошока, превосходя по индексу относительной безопасности препарат сравнения карбамазепин более чем в 3 раза. Данные настоящего исследования согласуются с работами других авторов, неоднократно сообщавших о наличии на указанной модели экспериментальных судорог антиконвульсивного действия у различных производных бензимидазола [Bhrigu V. et al., 2012; Siddiqui N., 2010]. Известно, что в тесте максимального электрошока проявляют выраженную активность многие противосудорожные препараты, которые блокируют или модулируют натриевые потенциал-зависимые каналы [Wheless J. W., 2009]. При этом выявляется устойчивая корреляция между уровнем активности вещества в тесте максимального электрошока и его эффективностью для лечения генерализованных тонико-клонических судорог у людей [Castel-Branco M.M. et al., 2009]. В ходе выполнения электрофизиологических тестов также была выявлена антиэпилептиформная активность соединения РУ-1205. Известно, что после электрической стимуляции нейронов развитие эпилептиформной активности обусловлено активацией потенциал-зависимых каналов под действием избыточной деполяризации мембраны нейронов [Сухов А. Г. и др., 2009]. При этом формирование

эпилептогенных деполяризационных сдвигов в первую очередь опосредуется токами Ca^{2+} и Na^+ [Pathak D. et al., 2009; Üre A., Altrup U., 2006].

На хронических моделях судорог экспериментально воспроизводятся определенные типы эпилепсии, схожие по патогенетическим параметрам с человеком, и проводится оценка влияния веществ на формирование эпилептического очага и персистирующие эпилептогенные процессы, которые протекают между приступами [Pitkänen A. et al., 2017].

Особенность модели киндлинга заключается в систематическом введении субконвульсивных доз коразола, вследствие чего развивается неврологическая картина сходная с эпилепсией со вторичными генерализованными припадками у людей, при этом судорожная готовность прогрессивно нарастает подобно естественному течению заболевания. Данная модель позволяет оценить препараты с точки зрения влияния на процесс эпилептогенеза и выявить потенциал для лечения фармакорезистентных форм заболевания [Dhir A., 2012]. Процесс киндлинга сопровождается нейрональной гибелью, синаптической реорганизацией и аксональным спраутингом, с образованием новых ветвей аксонов, дисрегуляцией нейрогенеза в гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа, глиозом, изменением экспрессии генов в нейронах и астроцитах [Аниол В. А. и др., 2011]. Судорожная активность и нейродегенеративные изменения локализованы преимущественно в гиппокампе, поэтому коразоловый киндлинг считается адекватной моделью височной эпилепсии у человека [Аниол В. А. и др., 2011].

Вальпроат натрия проявляет высокую эффективность на острых судорожных моделях с коразолом, однако недостаточно эффективно прерывает процесс эпилептогенеза [Ohno Y. et al., 2010]. В проведенном исследовании соединение РУ-1205 эффективно препятствовало развитию киндлинга. Наряду с этим активность соединения РУ-1205 оставалась стабильной до конца эксперимента, в отличие от вальпроата натрия, который оказался неэффективным на последних этапах киндлинга. Таким образом, это открывает возможные

перспективы применения нового соединения для лечения фармакорезистентных форм эпилепсии.

На киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя с последующей отменой соединение РУ-1205 (10 мг/кг) проявило статистически значимый уровень антиконвульсивной активности, сопоставимый с вальпроатом натрия (300 мг/кг). В основе развития симптомов отмены алкоголя лежит дисбаланс тормозных и возбуждающих медиаторных систем, в результате чего возникает нарушение межнейрональных связей и гибель нервных клеток. Одним из ключевых проявлений алкогольной абстиненции являются судорожные припадки [Мирошниченко Л. Д., 2005]. У 20-40% пациентов, поступающих в отделения неотложной помощи с судорогами, имеется связь с употреблением алкоголя, при этом в 15-24% случаев алкоголь служит причиной развития эпилептического статуса [McMicken D., 2011]. Согласно литературным данным судорожные явления алкогольного синдрома отмены развиваются по принципу киндлинга. Судорожная картина у пациентов во время детоксикации принимает более тяжелый характер, а также увеличивается риск осложнений и смертельного исхода, если в анамнезе имеются предшествующие эпизоды отмены алкоголя [Breese G. R., 2011]. Учитывая, что каппа-опиоидная система является значимой мишенью в коррекции абстинентных состояний [Shippenberg T. S., 2007], полученные результаты могут представлять собой повышенную терапевтическую ценность. Изученное вещество имеет перспективу применения для лечения синдрома отмены алкоголя и его наиболее тяжелой составляющей – судорожного синдрома.

Изучение механизма противосудорожного действия фармакологических веществ затруднено ввиду сложного морфофункционального устройства центральной нервной системы. Несмотря на точные количественные данные о степени сродства соединений и рецепторных комплексов, получаемые при помощи биохимических, радиолигандных и иммуногистохимических методов, существенным их недостатком является применение в качестве объекта

исследования фрагментов лиганд-связывающих рецепторных структур, а не целостные системы функционально активных рецепторов. С этой точки зрения существенными преимуществами обладают холистические модели, основанные на изучении свойств функционально активных рецепторных комплексов в нативных условиях. В рамках данной работы для поиска мишеней противосудорожного действия соединения РУ-1205 применялся комплексный подход, включающий серию экспериментов *in vitro* и *in vivo* с использованием специфических блокаторов рецепторов. В электрофизиологических тестах оценивалось действие на эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс, а также проводилась изучение влияния на трансмембранные ионные токи.

В ранее проведенных исследованиях было определено, что соединение РУ-1205 взаимодействует с каппа-рецепторами [Спасов А. А. и др., 2014]. Также каппа-рецепторным профилем обладают схожие по структуре производные имидазо[1,2- α]бензимидазола под лабораторными шифрами РУ-1203 и РУ-1204 [Елисеева Н.В., 2010]. Данные факты послужили предпосылкой для изучения вклада каппа-рецепторного механизма действия в противосудорожную активность соединения РУ-1205.

Известно, что семявыносящий проток кролика широко применяется для изучения каппа-рецепторных лигандов [Oka et al., 1980]. Таким образом, для выявления рецепторного компонента действия вещества РУ-1205 были проведены эксперименты *in vitro* на препаратах семявыносящего протока кролика с применением высокоселективных лигандов рецепторных структур [Воронина Т.А., 2012]. В результате тестируемое вещество проявляло выраженные каппа-агонистические свойства на препаратах семявыносящего протока кроликов, эксклюзивно экспрессирующих субпопуляцию каппа-опиоидных рецепторов, статистически значимо и *non*BNI-обратимо подавляло вызванные электрическими импульсами сокращения семявыносящего протока в диапазоне наномолярных

концентраций ($ЭК_{50} 2,2 \times 10^{-9} M$) и превосходило по этим показателям референтный препарат буторфанол.

В настоящее время каппа-агонисты рассматриваются в качестве перспективных средств для коррекции судорожных состояний [Zangrandi L., 2011]. В литературе представлены убедительные доказательства в пользу участия эндогенных каппа-опиоидов в регуляции возбуждающих процессов головного мозга, при этом их концентрация значительно возрастает во время судорожного приступа [McDermott C. M., 2011]. Недостаточная экспрессия гена эндогенного лиганда каппа-рецепторов продинорфина ассоциирована с повышением судорожного порога и склонности к развитию эпилепсии как у животных, так и у человека [Zangrandi L., 2012]. Также было установлено, что активация каппа-опиоидной системы мозга может детерминировать антиконвульсивные, антиэпилептогенные и нейропротективные эффекты [Schunk E. et al., 2011]. У многих агонистов каппа-опиоидных рецепторов выявлена способность повышать судорожный порог на различных моделях [Zangrandi L. et al., 2016].

На модели судорог, вызванных бикикуллином, соединение РУ-1205 и U-50,488 существенно увеличивали латентный период клонических и тонических судорог. Данные эффекты носили обратимый характер и практически полностью устранялись введением селективного антагониста каппа-рецепторов Nor-BNI. Таким образом, можно предполагать, что в реализации антиконвульсивного действия изучаемого соединения доминирующую роль играет каппа-рецепторная система.

В работах других авторов [McDermott C. M., 2011] так же сообщается, что селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов U-50,488 проявляет противосудорожное действие на различных моделях судорог. Установлено [Yajima Y., 2000], что введение U-50,488 п.к. в диапазоне доз 0,6-80 мг/кг оказывает дозозависимое противосудорожное действие на модели судорог, вызванных бикикуллином. В дозе 4,1 мг/кг U-50,488 увеличивал порог судорожной активности почти в 2 раза. В настоящей работе показано, что эффект U-50,488 блокировался

предварительным введением селективного антагониста каппа-рецепторов por-BN1 в дозе 5 мг/кг и.п. При этом por-BN1 не вызывал судорожных явлений после введения интактным животным.

Полученные результаты в совокупности подтверждают гипотезу о преимущественном каппа-рецепторном компоненте противосудорожного действия у производного конденсированных бензимидазольных систем - соединения РУ-1205.

Изучение закономерностей взаимодействия соединения РУ-1205 с ГАМК_A-негативными анализаторами (коразолом, пикротоксином и бикикуллином) позволяет предполагать ГАМК-ергический компонент в действии изучаемого производного бензимидазола. Имеется информация о структурно схожем соединении РУ-353, которое является позитивным аллостерическим модулятором ГАМК_A-рецепторов [Сухов А.Г. и др., 2009], а также сведения о вовлечении БД-ГАМК_A-трансмиссерных систем в нейрохимический профиль селективных каппа-агонистов [Manocha A., 2003; Lemos J.C., 2011; Schwarzer C. 2011]. Также сообщается, что каппа-агонисты способны ограничивать распространение патологической импульсации на другие области мозга в результате опосредованной модуляции активности ингибиторной ГАМК-ергической нейротрансмиссерной системы [Drake C.T., 2007].

На основании этого была предпринята попытка оценить вклад бензодиазепинового сайта ГАМК-ионоформного комплекса в реализацию антиконвульсивного эффекта соединения РУ-1205 с помощью флумазенила. Необходимо отметить, что незначительное увеличение латентного периода судорог на фоне введения флумазенила может объясняться тем, что данный препарат обладает частичным агонизмом к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецепторов и в некоторых случаях может проявлять слабую противосудорожную активность [Albiero A. et al., 2012]. В проведенном исследовании флумазенил не оказывал статистически значимого влияния на продолжительность латентного периода у контрольных животных и в группе, получавшей соединение РУ-1205, тем не менее

практически полностью блокировал эффект диазепама. Полученные результаты позволяют заключить, что противосудорожная активность соединения РУ-1205 преимущественно не связана с активацией бензодиазепинового сайта.

При проведении электрофизиологических исследований соединение РУ-1205 устраняло в микромолярной концентрации эпилептиформную активность отдельных нейронных колонок соматосенсорной коры белых крыс на фоне действия блокатора ГАМК_A-рецепторов пикротоксина, однако не оказывало влияния в миллимолярной концентрации на действие блокатора ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА.

Известно, что коразол и бикикуллин являются конкурентными по отношению к γ -аминомасляной кислоте ингибиторами ГАМК_A-рецепторов, тогда как пикротоксин является высокоафинным (неконкурентным) блокатором, который связывается в области ворот лиганд-зависимого ионного канала [Huang R. Q. et al., 2001; Johnston G. A. R., 2013].

Учитывая спектр антиконвульсивного действия в проведенных тестах, можно предположить, что соединение РУ-1205 не вступает в конкурентное взаимодействие с селективным низкоафинным агонистом ГАМК_A-р рецепторов ТРМРА [Jiang E., 2012]. Также изучаемое вещество может не конкурировать за сайты связывания с бикикуллином, коразолом и пикротоксином, а реализовать свои фармакологические эффекты благодаря аллостерическому взаимодействию с ГАМК_A-рецепторным комплексом. Вместе с этим не исключается возможность, что судорожная активность, индуцированная ГАМК-антагонистами, может блокироваться за счет других механизмов действия, включая активацию каппа-рецепторов и влияние на ионные токи.

Предполагается, что постсинаптические каппа-рецепторы могут тормозить распространение патологического возбуждения, которое возникает в результате блокирования постсинаптических ГАМК_A-рецепторов бикикуллином, путем угнетения кальциевого тока [Yajima Y, 2000]. Также был изучен ряд замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов, у которых обнаружено прямое ингибирующее

влияние на потенциал-зависимые ионные каналы [Гречко О.Ю. и др., 2010]. Учитывая общие принципы строения и функционирования ионных каналов нервных клеток моллюсков и млекопитающих [Вислобоков А.И., 2004], дальнейшее изучение нового соединения проводилось с использованием метода внутриклеточного диализа и фиксации мембранного потенциала на изолированных нейронах прудовика. На данной модели соединение РУ-1205 в диапазоне концентраций 1–1000 мкМ подавляет натриевые и кальциевые трансмембранные ионные токи, что может лежать в основе угнетения электроиндуцированной эпилептиформной активности. Полученные нами результаты согласуются с данными по изучению механизма действия других противэпилептических средств [Sills G. J., 2011]. Так, потенциал-зависимые натриевые каналы являются одной из основных фармакологических мишеней антиконвульсивных препаратов, включая фенитоин, карбамазепин, ламотриджин, зонисамид и др. Низкопороговые кальциевые каналы являются мишенью для этосуксимида, вальпроата натрия и зонисамида. Многие современные противэпилептические препараты, такие как ламотриджин, габапентин, фелбамат, взаимодействуют с высокопороговыми кальциевыми каналами [Sills G. J., 2011].

Таким образом, в реализации противосудорожного действия соединения РУ-1205 могут играть роль натриевые и кальциевые ионные каналы, которые являются важными фармакологическими мишенями для лечения первично-генерализованных эпилептических состояний, что также согласуется с данными, полученными на модели максимального электрошока, в ходе электрофизиологических исследований и компьютерным прогнозом биологической активности изучаемого соединения.

В настоящее время убедительно доказана гипотеза о каппа-опосредованной модуляции функциональной активности ионных каналов. При этом триггерным звеном является K-GPCRS, затем сигнал передается на вторичные мессенджеры: $G_{i/o}$ -белки, аденилатциклазу, цАМФ, фосфорилирующие ферменты и, в конечном итоге, на потенциал-управляемые каналы [Aldrich J.V., 2009; Bruchas M.R., 2010;

Lemos J.C., 2011]. Вместе с тем рядом исследователей показаны принципиально новые возможности влияния каппа-селективных лигандов на Na^+ и Ca^{2+} ионные токи нейрональной мембраны за счет их прямого взаимодействия с канальными структурами [Joshi S.K., 2003; Wang Y., 2010], что может явиться дополнительным механизмом действия указанного класса химических соединений.

Прямое каналоблокирующее действие изучаемого вещества может быть обусловлено как уменьшением количества функционирующих каналов, вследствие связывания молекулы с канальными структурами, вероятно, с сегментами S5-S6 в устье канала [Bruchas M.R., 2010], так и в результате уменьшения времени открытого состояния каналов или частоты их открывания (при изменении кинетики развития ионных токов). Эффекты многих мембраноактивных веществ могут возникать в клетках не только после проникновения в открытый ионный канал поверхностных мембран, но и из липидного мембранного бислоя, воздействуя на S4-сегмент альфа-субъединицы потенциал-управляемых ионных каналов, который являясь сенсором напряжения, обеспечивает конформационные перестройки и переводит ворота ионных каналов в открытое состояние [Miller K.W., 2002]. Кроме того, было показано, что структурно схожие вещества, являющиеся производными имидазо[1,2- α]бензимидазола, РУ-1275; РУ-1117; РУ-353 в концентрации 10^4 М выражено, а в дозе 10^3 М полностью блокируют Na^+ , Ca^{2+} ионные токи. При этом авторы полагают, что молекулы указанных веществ входят в устья открытых ионных каналов, достаточно прочно связываются и блокируют их, а также обладают способностью взаимодействовать с воротными механизмами ионных каналов [Вислобоков А.И. и др., 2007].

Для расширения представления о механизмах действия соединения РУ-1205 изучали его влияние на эффекты различных нейромедиаторных анализаторов (таблица 7.2).

Участие серотонинергической нейромедиаторной системы в реализации нейротропных эффектов соединения РУ-1205 подтверждается результатами экспериментов с использованием 5-гидроокситриптофана (предшественника

серотонина). Вещество РУ-1205 статистически значимо уменьшало выраженность гиперкинеза, вызванного 5- ГТФ в течение 30 минут наблюдения. Учитывая информацию, о каппа-опосредованном снижении содержания 5-НТ в стриатуме крыс, в результате ингибирования секреции медиатора или облегчения обратного нейронального захвата серотонина [Yilmaz B. et al., 2006; Schwarzer C., 2011], можно выдвинуть предположение о вовлечении указанных механизмов в реализацию эффектов вещества в тесте 5-ГТФ гиперкинеза «встряхиваний головы».

Депрессивное действие вещества на дофаминовую систему, может быть обусловлено его влиянием на D₂-рецепторы. Так, например, Williams J.T. и соавторами изучался электрофизиологический феномен подавления селективными каппа-лигандами D₂-опосредованного медленного ТПСИ при выраженной гипервозбудимости нейронов [Ford C.P., 2006; 2007], однако в тесте с галоперидолом в группе животных, получавших соединение РУ-1205 в дозах 1, 10 и 30 мг/кг изменения продолжительности каталепсии не регистрировалось.

В тесте с фенамином выявлено статистически значимое уменьшение гиперактивности мышей по сравнению с контрольной группой, которым вводили фенамин. Полученные результаты, предположительно, могут указывать на способность изучаемого вещества подавлять дофаминовую нейротрансмиссию в мезолимбической системе головного мозга.

Полагают, что основными механизмами, задействованными в модуляции каппа-агонистами дофаминовой синаптической нейротрансмиссии, являются угнетение высвобождения медиатора и стимуляция процессов обратного нейронального захвата дофамина за счет активации работы DAT [Тао Y.M., 2008; Schwarzer C., 2011], а также имеются сведения о каппа-рецептор-опосредованном угнетении долговременной потенциации в лимбической системе мозга [Schwarzer C., 2011]. Вероятно, представленные механизмы могут лежать в основе депримирующих эффектов изучаемого соединения в тесте фенамином.

Тем не менее нельзя исключить прочие механизмы сокращения двигательной активности животных, при условии, что фенамин-индуцированная гиперактивность может быть обусловлена рилизингом различных медиаторов (серотонина, дофамина и норадреналина) из нервных окончаний [Robertson S. D., 2009; Kleijn J., 2012].

Отсутствие потенцирования эффектов малых доз L-ДОФА при взаимодействии веществ, косвенно опровергает наличие у соединения РУ-1205 MAO-ингибирующей активности.

Способность оказывать влияние на межнейронную моноаминергическую передачу в тесте с резерпином у тестируемого вещества РУ-1205 установлена не была.

При оценке влияния изучаемого вещества на холинергическую нейротрансмиссию были выполнены тесты с ареколином и никотином. В результате было выявлено, что соединение РУ-1205 не влияет на продолжительность тремора, вызванного никотином и ареколином. Это свидетельствует об отсутствии центрального действия вещества РУ-1205 на М- и Н-холинергическую нейротрансмиссию.

Таблица 7.2

Влияние вещества РУ-1205 на основные нейротрансмиссионные системы мозга.

Нейромедиаторные системы мозга	Влияние РУ-1205
Дофаминергическая	↓
Холинергическая	-
Адренергическая	-
Серотонинергическая	↓
ГАМК-ергическая	↑

Примечание: ↓ - снижение активности нейромедиаторной системы; ↑ - повышение активности нейромедиаторной системы; «-» - отсутствие влияния на нейромедиаторную систему.

В рамках этапа работы по изучению побочных эффектов было проведено исследование острой токсичности, нежелательных явлений в виде развития синдрома отмены и нейротоксикологических свойств соединения РУ-1205.

Несмотря на высокую эффективность, на начальных этапах лечения нередко наблюдается развитие толерантности к действию некоторых классов противоэпилептических препаратов, особенно с ГАМК-ергическим механизмом действия, что в значительной мере ограничивает их клиническое применение [Haigh J. R. M., 1988; Reddy D. S., 2000]. Данные факты послужили предпосылкой для оценки развития толерантности к противосудорожному эффекту и феномена «отдачи» при хроническом введении соединения РУ-1205 или диазепама.

В проведенном исследовании было показано, что при хроническом введении диазепама на протяжении 28 дней в дозе 5 мг/кг и.п. наблюдается развитие толерантности к противосудорожному эффекту и синдром «отдачи», проявляющийся снижением судорожного порога по сравнению с контрольными животными. Хроническое введение соединения РУ-1205 в дозе 31 мг/кг и.п. (TI_{D200}) не вызывало развитие толерантности и феномена «отдачи» на данной экспериментальной модели. Признаки синдрома отмены на второй день после прекращения введения вещества РУ-1205 зафиксированы не были. У животных, получавших диазепам, наблюдалось повышение двигательной активности, что можно рассматривать как признак синдрома отмены.

Известно, что быстрое развитие толерантности, феномен «отдачи» (синдром «рикошета») и синдром отмены присущи большинству представителей бензодиазепинового ряда [Vinkers C. H., 2012]. В основе данных явлений лежат различные нейроадаптивные механизмы, включая явление аллостерического разобщения и активацию глутаматергической передачи [Mandhane S. N., 2007]. Аллостерическое разобщение на фоне действия бензодиазепинов может развиваться в результате рекомпозиции субъединиц, фосфорилирования ГАМК-рецептора или его вторичных мессенджеров, а также других процессов, изменяющих конформационное состояние ГАМК-комплекса [Mandhane S.N., 2007]. Немаловажным фактором в развитии толерантности и снижении судорожного порога после отмены препаратов бензодиазепинового ряда служит гиперсенситизация глутаматергической медиаторной системы [Allison C., 2003].

В отношении механизма действия соединения РУ-1205 было установлено взаимодействие с каппа-опиоидными рецепторами [Гречко О.Ю. и др., 2014]. Противосудорожная активность каппа-агонистов на модели судорог с коразолом подтверждена рядом исследований, при этом в качестве частного звена механизма действия предусматривается угнетение кальциевых токов [Yajima Y. et al., 2000]. Известно, что в отличие от бензодиазепиновых транквилизаторов, каппа-агонисты напротив оказывают тормозное действие на глутаматергическую передачу и способны устранять главный патогенетический фактор нейродегенерации, развивающейся на фоне эпилепсии – эксайтотоксичность, которая сопровождается чрезмерным поступлением ионов Ca^{2+} в клетку с последующим запуском апоптоза [Meldrum B. S., 2002; Schunk E. et al., 2011].

Таким образом, в отличие от диазепама, изучаемое вещество обладает преимуществом при хроническом введении, сохраняя высокую степень противосудорожной активности на протяжении всего эксперимента без признаков развития толерантности и синдрома отмены. В работе других авторов, направленной на изучение физической зависимости и толерантности к анальгетической активности соединения РУ-1205 было показано, что исследуемое соединение не обладает побочными явлениями, типичными для морфина и буторфанола, включающими развитие синдрома отмены при провокации налоксоном и толерантности к анальгетической активности при 14-дневном введении [Гречко О. Ю. и др., 2016].

В тесте условной реакции избегания или предпочтения места соединение РУ-1205 не проявило влияния на поведенческую активность животных, что позволяет сделать вывод об отсутствии вторично-подкрепляющих аддиктивных или аверсивных свойств у изученного соединения. Необходимо отметить, что для селективного каппа-агониста U50,488 в ряде других работ были показаны разнородные эффекты в данном тесте в зависимости от вида животного, породы, пола и дозы вещества [Laman-Maharg A. R. et al., 2017; Robles C. F. et al., 2014].

В тесте «форсированного неизбежного плавания» вещество РУ-1205 не оказывало влияния на длительность иммобилизации животных по сравнению с контролем. Результаты данного исследования позволяют допустить, что соединение РУ-1205 не провоцирует депрессию в эффективной противосудорожной дозе, в отличие от диазепама и U50,488 [Zhang L. et al., 2015].

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

В ходе изучения нейротоксикологических свойств вещества РУ-1205 с использованием системы многотестового наблюдения по Ирвину было установлено, что изучаемое соединение при однократном интраперитонеальном введении в дозах до 50 мг/кг не вызывает существенного изменения функционального состояния вегетативной нервной системы и эмоционального статуса экспериментальных животных. Угнетение слухового и ипсилатерального рефлексов, снижение ректальной температуры, длительности удержания на вращающемся стержне, а также сокращение горизонтальной и вертикальной двигательной активности наблюдалось только после введения соединения РУ-1205 в дозах, превышающих эффективные противосудорожные дозы.

Полученные в ходе данной работы результаты позволяют считать целесообразным проведение дальнейшего поиска соединений с противосудорожной активностью среди производных N1, N₉-замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола, а также рекомендовать для дальнейшего доклинического фармакологического исследования вещество под лабораторным шифром РУ-1205.

ВЫВОДЫ

1. N₁, N₉-замещенные 2-галогенофенилимидазо[1,2- α]бензимидазолы являются перспективным классом химических соединений для поиска структурно новых веществ с противосудорожной активностью.
2. Наиболее важный вклад в противосудорожное действие исследуемых веществ вносит скаффолд имидазо[1,2- α]бензимидазола, а также морфолино- и пирролидиноэтильные заместители в положении N₉ и 4-галогенфенильный фрагмент у 2 атома углерода гетероциклического ядра.
3. Соединение РУ-1205 при интраперитонеальном введении белым нелинейным мышам оказывает выраженное дозозависимое противосудорожное действие и превосходит по эффективности, показателям терапевтической широты, протективного индекса препарат сравнения вальпроат натрия в 12,7; 8,6 и 3,2 раза соответственно в тесте антагонизма с коразолом. На модели максимального электрошока исследуемое вещество равно по уровню антиконвульсивной активности карбамазепину и превосходит референтный препарат по величине терапевтического индекса в 3,4 раза.
4. Изучаемое соединение проявляет широкий спектр антиконвульсивной активности, эффективно устраняет судорожные явления на различных острых: индуцированных коразолом (TID₅₀=7,9 мг/кг внутривенно и превосходит по этому показателю референтный препарат вальпроат натрия в 15 раз), бикикуллином (в дозе 10 мг/кг интраперитонеально пролонгирует латентный период клонических и тонических судорог на 41; 60% соответственно); пикротоксином (дозозависимо уменьшает продолжительность тремора, увеличивает латентный период тремора и клонических судорог, снижает частоту судорог, максимально в дозе 20 мг/кг интраперитонеально в 3; 1,2; 1,4 и 1,6 раза соответственно); и NMDA (дозозависимо устраняет вращательное поведение животных, максимально

- на 38% по сравнению с контрольными значениями), а также хронических моделях эпилептогенеза: киндлинг прогрессии с коразолом (в дозе 10 мг/кг интраперитонеально в 1,8 раза уменьшает тяжесть судорожных явлений и сокращает гибель животных на 40%) и судороги, вызванные отменой алкоголя (в дозе 10 мг/кг при интраперитонеальном введении нивелирует судорожную активность с 4,2 баллов в контроле до 0,2 баллов по шкале НИС).
5. В электрофизиологических тестах соединение РУ-1205 при локальной внутрикорковой микроапликации (в концентрациях 3,5; 30,5 и 0,457 мкМ соответственно) оказывает депримирующее воздействие на формирование фоновой фокальной активности нейронных колонок соматосенсорной коры крыс (уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 2,3 и 3 раза в диапазоне 1-13 Гц в верхних (K_1) и нижних (K_2) корковых слоях соответственно), а также эпилептиформных спайков, вызванных пикротоксином (уменьшение площади под кривой спектральной плотности в 12 раз в диапазоне 1-13 Гц на K_1 K_2 каналах) или электрической стимуляцией (120 В, 10 Гц, 10 с) поверхности мозга крыс (полное восстановление амплитудно-частотных параметров осцилляций фокального потенциала).
 6. Противосудорожное действие соединения РУ-1205 реализуется за счет каппа-опиоидных рецепторных механизмов. Вещество концентрационно-зависимо и *non*ВNI-обратимо предотвращает электроиндуцированные сокращения изолированного семявыносящего протока кролика ($ЭК_{50} = 2$ нМ); а также *non*ВNI-обратимо ингибирует судороги, вызванные бикукуллином; модулирует активность ГАМК- и глутаматергической систем, подавляет трансмембранные ионные токи натрия ($ЭК_{50} = 93,5$ мкМ) и кальция ($ЭК_{50} = 95,7$ мкМ).
 7. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 1-31 мг/кг интраперитонеально подавляет фенаминовую гиперактивность, 5-гидрокситриптофановый гиперкинез у мышей, максимально на 57,8 и 65,2% соответственно.

Исследуемое вещество не влияет на эффекты L-ДОФА, галоперидола, резерпина, ареколина и никотина.

8. В отличие от диазепама (5 мг/кг, и.п.), в исследованиях по изучению порога коразоловых судорог, соединение РУ-1205 (TD_{200} 31 мг/кг и.п.) при хроническом введении (28 дней) не вызывает толерантности к противосудорожному действию, феномена «рикошета» и признаков абстиненции. В тестах условной реакции предпочтения/избегания места, а также избегаемого форсированного плавания не проявляет вторично-подкрепляющих или аверсивных свойств.
9. В соответствии с классификацией по И.В. Саноцкому (1975) соединение РУ-1205 относится к разряду малотоксичных соединений ($LD_{50}=309,6$ мг/кг интраперитонеально). При оценке нейротоксикологического профиля установлено, вещество РУ-1205 в дозах 1-50 мг/кг и.п. не обладает значимым нейротоксикологическим влиянием (за исключением снижения вертикальной и горизонтальной активности в «открытом поле»), в более высоких дозах отмечается неспецифическое угнетение ЦНС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С учетом низкой токсичности и выраженности противосудорожного действия соединения РУ-1205 - гидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола, целесообразно дальнейшее расширенное доклиническое изучение потенциального антиконвульсанта.
2. Рекомендуется продолжить поиск новых соединений с противосудорожными свойствами в ряду галогенфенил замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола.

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 5-НТ – 5-гидрокситриптамин, серотонин
- 5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан
- БИ – бензимидазол
- ВАХ – вольт-амперная характеристика
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ГАМК – γ -аминомасляная кислота
- ИмБИ – имидазо[1,2- α] бензимидазол
- и.п. – интраперитонеально
- КОР – каппа-опиоидный рецептор
- ЛД – летальная доза
- МАО – моноаминооксидаза
- НИР – научно-исследовательская работа
- ПИ – протективный индекс
- ПЭП – противоэпилептические препараты
- СПК – семявыносящий проток кролика
- ТД – токсическая доза
- ТИ – терапевтический индекс
- ЭД – эффективная доза
- ЭЭГ – электроэнцефалография
- АМРА – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
- DAT – дофаминовый транспортер
- НИС (handling-induced convulsions) – судороги, вызванные «хендлингом»
- L-ДОФА – L-3,4-диоксифенилаланин
- NMDA – N-метил-D-аспартат
- Nor-BNI – норбиналторфимин
- TID (threshold increasing dose) – доза, повышающая порог
- ТРМРА – 1,2,5,6-тетрагидропирид-4-илметилфосфиновая кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аванцини, Д. Клинические формы и классификация эпилепсии / Д. Аванцини // Неврология и психиатрия. – 2005. – №. 8. – С. 59-62.
2. Авдеева, Е.В. Тез. 1-й съезд Российского научного общества фармакологов. - 9-13 октября 1995 г.- Волгоград. Москва. - с.7.
3. Андреева, Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ/ Н.И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб и доп. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.
4. Аниол, В. А. Оценка противозепилептических эффектов кортексина на модели судорожной активности / В.А. Аниол, Ю. Новицкая, Т.Н. Бородина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2011. – Т. 111. – №. 12. – С. 68-73.
5. Анисимова, В. А. Синтез и фармакологическая активность 2-(гетарил)имидазо [1, 2-а] бензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – №. 10. – С. 12-17.
6. Анисимова, В.А. 2-арил-1-диалкиламиноалмикилимидазо[1,2-а]бензимидазолы и их антагонизм к ионам кальция / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, М.В. Левченко [и др.] // Хим.-фарм. ж. - 1995. - №10. - с.18.
7. Анисимова, В.А. Фармакологическая активность 2-метоксифенилзамещенных 9-диалкиламиноэтилимидазо [1, 2-а] бензимидазолов / В.А Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39. – №. 9. – С. 26-32
8. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В.

- Березовская, О.Л. Верстакова [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 2012. – С. 13-24.
9. Белоусов, Д.Ю. Побочные эффекты противоэпилептических препаратов второго поколения / Ю.Б. Белоусов // Качественная клиническая практика. – 2008. – №. 2.
10. Бугаева, Л.И. Исследование острой токсичности бемитила и бромитила / Л.И. Бугаева, А.А. Спасов, В.Е. Веровский, И.Н. Иежица // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63. – №. 6. – С. 53-57.
11. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон. // М: «Высшая школа» - 1991. – 400 с.
12. Вальдман, Е.А. Экспериментальная и клиническая эпилептология / Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина, Г.Н. Авакян [и др.] // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. - 2010. - Т. 2. - №4. - С. 41-54.
13. Вислобоков, А. И. Мембранные механизмы действия на нервные клетки анестетиков, анальгетиков и противоаритмических средств / А.И. Вислобоков, А.А. Зайцев, Ю.Д. Игнатов, А. Л. Савоськин // Мед. акад. журн. – 2001. – Т. 1. – №. 1. – С. 25-33.
14. Вислобоков, А. И. Влияние бупивакаина и лидокаина на ионные каналы изолированных нейронов моллюска / А. И. Вислобоков, К. Н. Мельников // Психофармакология и биологическая наркология. – 2004. – Т. 4. – №. 2-3.
15. Вислобоков, А. И. Современные представления о воздействии фармакологических средств на ионные каналы / А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов//Психофармакология и биологическая наркология.–2007.– Т7.– №3-4.
16. Вислобоков, А.И. Мембранотропное действие фармакологических средств / А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, П.Д. Шабанов // Санкт-Петербург - Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. – 528 с.

17. Воронина, Т.А. Характеристика фармакологических свойств феназепама. Методы исследования / Т.А. Воронина, Ю.И. Вихляев, Л.Н. Неробкова [и др.] // Феназепам Киев: Наукова Думка. – 1982. – С. 145-150.
18. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Т.А. Воронина, Л.С. Гузеватых; под общ. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – 197–248 с.
19. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ - 2-изд., перераб и доп. Под общ. ред. Р.У. Хабриева. - М.: Медицина - 2005. - С.277-295.
20. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва, Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Гриф и К, 2012, Гл. 14, с. 235-251.
21. Воронина, Т.А. Новые биомолекулярные мишени для создания противоэпилептических препаратов / Т.А. Воронина, Г.Г. Авакян, Л.Н. Неробкова [и др.] // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. -2015- Т.7.- №4.
22. Воронина, Т. А. Противосудорожное действие производного 4-бензоил-пиридина (гжж-298) на пароксизмальную активность в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы / Т.А. Воронина, И.О. Гайдуков, С.А. Литвинова [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – №. 2.
23. Гамма, Т. В. Поведенческие реакции крыс при действии некоторых производных бензимидазола в сверхмалых концентрациях / Т.В. Гамма // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2013. – Т. 26. – №. 1. – С. 30-36.

24. Гамма, Т.В. Функциональное состояние нейронов ППа1 под влиянием дибазола и бемитила / Т.В. Гамма, И.И. Коренюк, М.Ю. Бабаевский // Ученые записки ТНУ, серия «Биология, Химия» - 2003. – Т. 16 (55). - №4. – С. 20-27
25. Гамма, Т.В. Действие бензимидазола и некоторых его производных на электрическую активность моллюска и поведенческие реакции крыс / Т.В. Гамма, И.И. Коренюк // Физиологический журнал. – 2006. – Т 5. - №2. – С. 29.
26. Гамма, Т. В. Нейро- и психотропные эффекты бензимидазола и его производных / Т.В. Гамма, И.И. Коренюк, Д. Р. Хусаинов. – 2012. – С. 46-80
27. Гамма, Т. В. Анальгетические свойства бензимидазола / Т.В. Гамма, И.И. Коренюк, Д. Р. Хусаинов [и др.] // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2010. – Т. 23. – №. 2. – С. 66-71.
28. Гречко, О.Ю. Конденсированные бензимидазолы – новый класс каппа-опиоидных агонистов: дисс. ... докт. мед. наук: 14.03.06 / Гречко О.Ю. – Волгоград. - 2012.
29. Гречко, О. Ю. Изменения ионных токов нейронов прудовика под влиянием буторфанола и производных имидазобензимидазола соединений РУ-1203, РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, В.А. Анисимова, А.А. Спасов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2010. – Т. 8. – №. 4.
30. Гречко, О. Ю. Изменения ионных токов нейронов прудовика под влиянием буторфанола и производных имидазобензимидазола соединений ру-1203 и ру-1205 / О.Ю. Гречко, А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, В.А. Анисимова, А.А. Спасов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2011. – Т. 9. – №. 4.
31. Гречко, О. Ю. Изучение рецепторного механизма анальгетического действия соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, Д. М. Штарёва [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №. 1 - С. 49.

32. Гречко, О. Ю. 2-п-Фторфенилимидазо [1, 2-а] бензимидазол-перспективный скаффолд для создания селективных каппа-опиоидных агонистов / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова [и др.] // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – 2016. – С. 482-482.
33. Гречко, О. Ю. Изучение физической зависимости и толерантности к антиноцицептивному действию соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, Д. М. Штарёва, А.А. Спасов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79. – №. 4. – С. 8-11.
34. Гусев, Е.И. Неврология и нейрохирургия / Е.И. Гусев, А.Н. Коновалов, Г.С. Бурд. — 2004. — С. 450.
35. Елисеева, Н.В. Поиск и изучение фармакологических свойств новых агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных бензимидазола: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Елисеева Наталья Владимировна – Волгоград, 2010. – 182 с.
36. Елисеева, Н.В. Изучение рецепторного механизма действия нового производного бензимидазола / Н.В. Елисеева, О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова [и др.] // Тез. Докладов XVII Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва. - 2010. - С. 613.
37. Звартау, М.В. Опиоидные анальгетики: пути совершенствования терапии болевых синдромов / М.В. Звартау, Э.Э. Пчелинцев, А.Н. Кубынин // Анестезиология. 2007.- Т.5. — С. 417-425.
38. Зенков, Л.Р. Фармакологическое лечение эпилепсии / Л.Р. Зенков // Русский медицинский журнал. – 2000. – Т. 8. – №. 10. – С. 411-417.
39. Зефирова, О.Н. Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефиров // Вестник Московского Университета. – 2002. – Т. 43. – №. 4. – С. 251-256.
40. Ивановская, С. В. Фармакологическая характеристика новых производных имидазо-(1,2-а)-бензимидазола: дисс. канд. мед. наук: 14.03.06 / С. В. Ивановская. Волгоград, 1969. - 234 с.

41. Карлов, В. А. Фармакорезистентность и толерантность при эпилепсии / В. А. Карлов // Журнал неврологии и психиатрии. – 2008. – Т. 10. – С. 75.
42. Карлов, В. А. Учение об эпилептической системе. заслуга отечественной научной школы / В. А. Карлов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2017. – Т. 9. – №. 4.
43. Киричек, Л. Т. Действие бемитила на состояние систем саморегуляции при кратковременной иммобилизации / Л. Т. Киричек, Ю. Г. Бобков // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54. – №. 6. – С. 42-44.
44. Козловский, В. Л. О физиологических основах и некоторых перспективах дальнейшего развития противоэпилептических средств / В.Л. Козловский // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. -2011. - №11. -С.101-105.
45. Коренюк, И. И. Влияние бензимидазола на нейроны моллюска / И. И. Коренюк, Т. В. Гамма // Ученые записки ТНУ, серия «Биология». – 2004. – Т. 17 (56), № 1. – С. 42–47.
46. Коренюк, И.И. Влияние новых производных бензимидазола и 1,5-бензодиазепинона-2 на электрическую активность нейронов *Helix albescens* Rossm. / И.И. Коренюк., Т.В. Гамма., О.В. Катюшина [и др.] // Научные труды II съезда физиологов СНГ, Кишинэу (Кишинев). –Молдова. – 2008 – С. 73.
47. Крыжановский, Г.Н. Киндлинг как модель формирования эпилептической активности. / Г.Н. Крыжановский, А.А. Шандра, Л.С. Годлевский [и др.] // Успехи физиологических наук. — 1988. — Т. 19. — № 4. — С. 12–31.
48. Литвинов, Р.А. Фармакотоксикологические свойства нового каппа-опиоидного агониста – производного бензимидазолов: дисс. ... канл. мед. наук: 14.03.06 / Литвинов Р.А. – Волгоград. - 2016. – 196 с.
49. Литовченко, Т.А. Резистентные эпилепсии: причины и методы лечения / Т.А. Литовченко // НейроNews. - 2010. - № 6. - С. 21-26.
50. Литовченко, Т. А. Некоторые дискуссионные вопросы лечения эпилепсии / Т.А. Литовченко // Здоров'я України. – 2011. – №. 1. – С. 32-33.

51. Луцкий, И. С. Болезнь Паркинсона (клиника, диагностика, принципы терапии) / И.С. Луцкий, С.К. Евтушенко, В. А. Симонян // Международный неврологический журнал. – 2011. – №. 5.
52. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев. – 2012.
53. Мирошниченко, Л. Д. Алкоголизм / Л.Д. Мирошниченко - Т. 1, Большая Российская энциклопедия, Москва. - 2005.
54. Михайлов, И. Б. Изменение активности эпилептогенного очага в гиппокампе крыс под влиянием бемитила / И.Б. Михайлов, М.Я. Шарф, В.И. Гузева // Экспериментальная и клиническая фармакология, 1995. - Т. 58. -№. 4. С.12-13.
55. Михайлов, И. Б. Влияние бемитила на экспериментальные судороги / И.Б. Михайлов, В.И. Гузева, М.Я. Шарф // Биоантиоксидант: междунар. симп. в рамках междунар. выставки «Мед. и охрана здоровья. Медтехн. и аптека. – 1997. – С. 174-175.
56. Насырова, Р.Ф. Биологические маркеры эффективности и безопасности противоэпилептических препаратов: фармакогенетика и фармакокинетика [и др.] / Р.Ф. Насырова, Д.В. Иващенко, К.К. Яхин//Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – №. 1 (103).
57. Оводенко, Л.А. Бензимидазолы - потенциальные седативные, снотворные и противосудорожные средства / Л.А. Оводенко, Г.В. Голдобина, М.Л. Суслина // Синтез, фармакология и клинические аспекты психотропных и сердечно-сосудистых веществ. – 1989 г. - С. 156-157.
58. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств / Р.У. Островская, К.С. Раевский, Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под общей редакцией А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 251-263.
59. Петров, В. И. Персонализированная медицина: эволюция методологии и проблемы практического внедрения / В.И. Петров, И.Н. Шишиморов, О.В.

- Магницкая [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 1 – С. 57.
60. Покровский, М. В. и др. Фармакологическая коррекция ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней при преэклампсии / Покровский М. В., Покровская Т. Г., Гуреев В. В., Барсук А. А., Проскурякова Е. В., Корокин М. В., Белоус А. С., Левашова О. В., Мальцева Н. В., Полянская О. С. // Акушерство и гинекология. – 2011. – №.2. – С. 16-20.
61. Поройков, В.В. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика / В.В. Поройков, Д.А. Филимонов, Т.А. Глориозова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2009. – Т. 13. – №. 1. – С. 137-143.
62. Рамш, С. М. История создания отечественного лекарственного препарата дибазол / С.М. Рамш // Историко-биологические исследования. -2011.-Т.3.-№4.
63. Розин, М. А. Фармакология патологических процессов / М.А. Розин. – 1951.
64. Розин, М. А. Синтез белка и резистентность клеток / М.А. Розин. – Наука. Ленингр. отд-ние, 1971.
65. Саноцкий, И. В. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений / И.В. Саноцкий, И.П. Уланова // М.: Медицина. – 1975. – Т. 1. – №. 975. – С. 329.
66. Середенин, С.Б. Феназепам. 25 лет в медицинской практике / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Г.Г. Незнамов, В.П. Жердев. — М.: Наука, 2007. — 381 с.
67. Середенин, С.Б. Сигма-1 рецепторы—новая мишень фармакологической регуляции / С.Б. Середенин, М.В. Воронин, Е.В. Абрамова // Экспериментальная и клиническая фармакология.– 2017.– Т.80.– №9. – С.9-19.
68. Смирнов, А.В. Бемитил: механизм действия и связанные с ним эффекты / А.В. Смирнов // Физиологически активные вещества. 1993.-вып.25. - С.5-8.
69. Спасов, А.А. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола (обзор) / А.А. Спасов, И.Н. Иежица,

- Л.И. Бугаева, В.А. Анисимова // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33. – №. 5. – С. 6-17.
70. Спасов, А.А. Фармакокинетика некоторых производных бензимидазола / А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, И.Н. Иёжица [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48. – №. 3. – С. 233-258.
71. Спасов, А.А. Изучение взаимодействия соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарёва [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №. 2 (50).
72. Спасов, А.А. Противоэпилептическая активность нового производного бензимидазола РУ-1205 / А.А. Спасов, К.Ю. Калитин, О.Ю. Гречко [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины–2015–Т160–№9– С.320.
73. Сухов, А.Г. Потенциал-зависимые механизмы эпилептиформной активности / А.Г. Сухов, Л.В. Лысенко, А.К. Логвинов // Валеология – 2009. – № 4– С. 54.
74. Толмачев, П.А. Сравнительная характеристика заболеваемости эпилепсии в Российской Федерации на примере Кировского, Пензенского и Ульяновского центров Приволжского Федерального Округа / П.А. Толмачев, Н.В. Наймушина [и др.] // Евразийское Научное Объединение. – 2017. – Т. 1. – №. 5. – С. 64-66.
75. Шабанов, П. Д. Динамика реакции самостимуляции мозга у крыс после форсированного введения психоактивных веществ [Текст] / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, А. В. Любимов, В. А. Корнилов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 9. - №. 1–2. – С. 2524-2529.
76. Шаймарданова, Г. С. Имидазол и его производные как биологически активные вещества / Г.С. Шаймарданова, Р.А. Камбург, Р.П. Евстигнеева [и др.] // Химико-фармацевтич. журнал. – 1992. – №. 3. – С. 31-38.
77. Шаронова, Н.И. Потенциация ГАМК-активируемых токов производным имидазобензимидазола РУ-353 в изолированных клетках Пуркинье мозжечка

- / Н.И. Шаронова, В.С. Воробьев, В.Г. Скребицкий [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2005. – Т.140. – №9. – С. 311-314.
- 78.Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – №. 2. – С. 66-75.
- 79.Фомин, Ю.К. Фармакологическое изучение некоторых новых производных производных имидазо(1,2-а)бензимидазола и имидазола / Ю.К. Фомин. - Волгоград. – 1975.
- 80.Юрьев, К.Л. Медикаментозное лечение эпилепсии у взрослых пациентов: обзор доказательных клинических рекомендаций / К.Л. Юрьев // Укр. мед. часопис. – 2004. – Т. 4. – №. 42. – С. 5-27.
- 81.Albiero, A. Focal nonconvulsive seizures during detoxification for benzodiazepine abuse / A Albiero, F Brigo, M Faccini [et al] // Epilepsy & Behavior. – 2012. – Т. 23. – №. 2. – С. 168-170.
- 82.Aldrich, J.V. Peptide Kappa Opioid Receptor Ligands: Potential for Drug Development / J.V. Aldrich, P.J. McLaughlin // J. AAPS.- 2009. – 1(2). - P.312-322.
- 83.Allison, C. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence / C. Allison, J.A. Pratt // Pharmacology & therapeutics. – 2003. – Т. 98. – №. 2. – С. 171-195.
- 84.Amabeoku, G. J. Anticonvulsant activity of Nylandtia spinosa L. Dumont (Polygalaceae) aqueous and methanol leaf extracts in mice / G.J. Amabeoku // Human & experimental toxicology. – 2008. – Т. 27. – №. 11. – С. 811-818.
- 85.Antipova, T. A. Selective anxiolytic afobazole increases the content of BDNF and NGF in cultured hippocampal HT-22 line neurons / T.A. Antipova, D.S. Sapozhnikova, L.I. Bakhtina, S.B. Seredenin // Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija. – 2009. – Т. 72. – №. 1. – С. 12-14.
- 86.Atask, J. R. Anxiolytic compounds acting at the GABAA receptor benzodiazepine binding site / J. R. Atack // Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders. – 2003. – Т. 2. – №. 4. – С. 213-232.

87. Bagal, S. K. Benzimidazole and imidazopyridine derivatives as sodium channel modulators / S.K. Bagal, A.D. Brown, M.I. Kemp [et al] // WO114250. – 2013.
88. Bansal, Y. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review / Y. Bansal, O. Silakari // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2012 – T. 20. – №21. – C. 6208-6236.
89. Barnes, G.N. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease / G.N. Barnes, J.T. Slevin // Current medicinal chemistry. – 2003. – T. 10. – №. 20. – C. 2059-2072.
90. Barrese, V. Neuronal potassium channel openers in the management of epilepsy: role and potential of retigabine / V. Barrese, F. Miceli, M.V. Soldovieri [et al] // Clinical pharmacology: advances and applications. – 2010. – T. 2. – C. 225.
91. Basta-Kaim, A. Effects of new antiepileptic drugs and progabide on the mitogen-induced proliferative activity of mouse splenocytes / A. Basta-Kaim, B. Budziszewska [et al] // Pharmacological Reports. – 2008. – T. 60. – №. 6. – C. 925.
92. Baudy, R.B. Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of highly potent benzimidazole-spaced phosphono- α -amino acid competitive NMDA antagonists of the AP-6 type / R.B. Baudy, H. Fletcher III, J.P. Yardley [et al] // Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 10. – C. 1516-1529.
93. Bernasconi, R. The specific protective effect of diazepam and valproate against isoniazid-induced seizures is not correlated with increased GABA levels / R. Bernasconi, M. Klein, P. Martin [et al] // Journal of neural transmission. – 1985. – T. 63. – №. 2. – C. 169-189.
94. Bernasconi, R. γ -Vinyl GABA: comparison of neurochemical and anticonvulsant effects in mice / R. Bernasconi, M. Klein, P. Martin [et al] // Journal of neural transmission. – 1988. – T. 72. – №. 3. – C. 213-233.
95. Besag, F. M. C. Clinical efficacy of perampanel for partial-onset and primary generalized tonic-clonic seizures / F.M.C. Besag, P.N. Patsalos // Neuropsychiatric disease and treatment. – 2016. – T. 12. – C. 1215.
96. Beyreuther, B.K. Lacosamide: a review of preclinical properties / B.K. Beyreuther, J. Freitag, C. Heers [et al] // CNS drug reviews. – 2007. – T. 13. – №. 1. – C. 21-42.

97. Bhrigu, B. Anticonvulsant evaluation of some newer benzimidazole derivatives: design and synthesis / B. Bhrigu, N. Siddiqui, D. Pathak [et al] // *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* – 2012. – T. 69. – №. 1. – C. 53-62.
98. Bialer, M. New antiepileptic drugs that are second generation to existing antiepileptic drugs / M. Bialer // *Expert opinion on investigational drugs.* – 2006. – T. 15. – №. 6. – C. 637-647.
99. Bialer, M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs) / M. Bialer // *Advanced drug delivery reviews.* – 2012. – T. 64. – №. 10. – C. 887-895.
100. Bialer, M. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII) / M. Bialer, S.I. Johannessen, H.J. Kupferberg [et al] // *Epilepsy research.* – 2007. – T. 73. – №. 1. – C. 1-52.
101. Boehlen, A. The new KCNQ2 activator 4-Chlor-N-(6-chlor-pyridin-3-yl)-benzamid displays anticonvulsant potential / A. Boehlen, M. Schwake, R. Dost [et al] // *British journal of pharmacology.* – 2013. – T. 168. – №. 5. – C. 1182-1200.
102. Boiani, M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents / M. Boiani, M. González // *Mini reviews in medicinal chemistry.* – 2005. – T. 5. – №. 4. – C. 409-424.
103. Borowicz, K.K. Is there any future for felbamate treatment? / K.K. Borowicz, B. Piskorska, Z. Kimber-Trojnar [et al]. - *Pol J Pharmacol* 2004;56:289-94
104. 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. – C. 4638-4640.
105. Borza, I. Selective NR1/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonists among indole-2-carboxamides and benzimidazole-2-carboxamides / I. Borza, E. Bozo [et al] // *Journal of medicinal chemistry.* – 2007. – T. 50. – №. 5. – C. 901-914.
106. Botros, S. Synthesis and anticonvulsant activity of new phenytoin derivatives / S. Botros, N.A. Khalil, B.H. Naguib [et al] // *European journal of medicinal chemistry.* – 2013. – T. 60. – C. 57-63.

107. Boulos, M.N.K. Semantic Wikis: A comprehensible introduction with examples from the health sciences / M.N.K. Boulos // *Journal of Emerging Technologies in Web Intelligence*. – 2009. – T. 1. – №. 1. – C. 94-96.
108. Breese, G. R. Chronic alcohol neuroadaptation and stress contribute to susceptibility for alcohol craving and relapse / G.R. Breese, R. Sinha, M. Heilig // *Pharmacology & therapeutics*. – 2011. – T. 129. – №. 2. – C. 149-171.
109. Brink, N. G. Vitamin B12. VI. 5, 6-Dimethylbenzimidazole, a degradation product of vitamin B12 / N. G. Brink, K. Folkers // *Journal of the American Chemical Society*. – 1949. – T. 71. – №. 8. – C. 2951-2951.
110. Brodie, M. J. EPILEPSY: Felbamate: a new antiepileptic drug / M.J. Brodie, M. Potts, W. Carswell [et al] // *The Lancet*. – 1993. – T. 341. – №8858. – C. 1445-1446.
111. Broicher, T. T-current related effects of antiepileptic drugs and a Ca²⁺ channel antagonist on thalamic relay and local circuit interneurons in a rat model of absence epilepsy / T. Broicher, T. Seidenbecher, P. Meuth [et al] // *Neuropharmacology*. – 2007. – T. 53. – №. 3. – C. 431-446.
112. Bruchas, M. R. Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates κ -opioid-dependent dysphoria / M.R. Bruchas, B.B. Land, M. Aita [et al] // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – T. 27. – №. 43. – C. 11614-11623.
113. Bruchas, M.R. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor / M.R. Bruchas, C. Chavkin // *J. Psychopharm.* - 2010. – 210(2). - P.137-147.
114. Byrnes, K. R. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders / K.R. Byrnes, D.J. Loane, A. I. Faden // *Neurotherapeutics*. – 2009. – T. 6. – №. 1. – C. 94-107.
115. Bundschuh, M. Extraction of semantic biomedical relations from text using conditional random fields / M. Bundschuh, M. Dejori, M. Stetter [et al] // *BMC bioinformatics*. – 2008. – T. 9. – №. 1. – C. 207.
116. Bum, E. N. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae) / E.N. Bum, M. Schmutz, C. Meyer [et al] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2001. – T. 76. – №. 2. – C. 145-150.

117. Buxhoeveden, D. P. The minicolumn hypothesis in neuroscience / D. P. Buxhoeveden, M. F. Casanova // *Brain*. – 2002. – T. 125. – №. 5. – С. 935-951.
118. Cahill, C. M. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? / C. M. Cahill, A. M. W. Taylor, C. Cook [et al.] // *Front Pharmacol*. – 2014. – V. 5. – № 253. – P.1-15.
119. Cahill, C. M. Migraine and reward system-or is it aversive? / C. M. Cahill, C. Cook, S. Pickens // *Curr. Pain Headache Rep*. - 2014. - V. 18. - № 410. - 9 pp.
120. Carta, M. Isoniazid-induced reduction in GABAergic neurotransmission alters the function of the cerebellar cortical circuit / M. Carta, L. Murru, E. Barabino [et al.] // *Neuroscience*. – 2008. – T. 154. – №. 2. – С. 710-719.
121. Castel-Branco, M. M. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. M.M. Castel-Branco, G.L. Alves, I.V. Figueiredo [et al.] – 2009.
122. Caudle, K. E. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and HLA-B Genotypes and Phenytoin Dosing / K.E. Caudle, A.E. Rettie, M. Whirl-Carrillo [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2014. – T. 96. – №. 5. – С. 542-548.
123. Chang-Mu, C. Characterization of neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice / C. Chang-Mu, L. Jen-Kun, L. Shing-Hwa [et al.] // *Behavioral neuroscience*. – 2010. – T. 124. – №. 4. – С. 541.
124. Chen, B. Semantic Breakthrough in Drug Discovery / B. Chen, H. Wang, Y. Ding [et al.] // *Synthesis Lectures on the Semantic Web: Theory and Technology*. – 2014. – T. 4. – №. 2. – С. 1-142.
125. Clinckers, R. Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D2 and 5-HT1A receptors / R. Clinckers, I. Smolders, A. Meurs [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 2004. – T. 89. – №. 4. – С. 834-843.
126. Crowder, K. M. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A) / K.M. Crowder, J.M. Gunther, T.A. Jones [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – T. 96. – №. 26. – С. 15268-15273.

127. Custer, K. L. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses / K.L. Custer, N.S. Austin, J.M. Sullivan [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – T. 26. – №. 4. – C. 1303-1313.
128. Czapinski, P. Mechanisms of action of antiepileptic drugs / P. Czapinski, B. Blaszczyk, S. J. Czuczwar // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2005. – T. 5. – №. 1. – C. 3-14.
129. Czuczwar, S. J. The new generation of GABA enhancers / S.J. Czuczwar, P.N. Patsalos // *CNS drugs*. – 2001. – T. 15. – №. 5. – C. 339-350.
130. Czuczwar, S.J. LY 300164, a novel antagonist of AMPA/kainate receptors, potentiates the anticonvulsive activity of antiepileptic drugs / S.J. Czuczwar, M. Świąder, H. Kuźniar [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 1998. – T. 359. – №. 2-3. – C. 103-109.
131. Dannhardt, G. Benzimidazoles as NMDA Glycine-Site Antagonists: Study on the Structural Requirements in 2-Position of the Ligand / G. Dannhardt, B. K. Kohl // *Archiv der Pharmazie*. – 2000. – T. 333. – №. 5. – C. 123-129.
132. Davies, D.J. A novel series of benzimidazole NR2B-selective NMDA receptor antagonists / D.J. Davies, M. Crowe, N. Lucas [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – T. 22. – №. 7. – C. 2620-2623.
133. De Deyn, P. P. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants / P.P. De Deyn, R. D'Hooge, B. Marescau [et al.] // *Epilepsy research*. – 1992. – T. 12. – №. 2. – C. 87-110.
134. De Simone, G. Carbonic anhydrase inhibitors. Zonisamide is an effective inhibitor of the cytosolic isozyme II and mitochondrial isozyme V: solution and X-ray crystallographic studies / G. De Simone, A. Di Fiore, V. Menchise [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2005. – T. 15. – №. 9. – C. 2315-2320.
135. Dhir, A. Pentylentetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy / A. Dhir // *Current Protocols in Neuroscience*. – 2012. – C. 9.37. 1-9.37. 12.

- 136.Dhir, A. Role of neurosteroids in the anticonvulsant activity of midazolam / A. Dhir, M.A. Rogawski // *British journal of pharmacology*. – 2012. – T. 165. – №. 8. – C. 2684-2691.
- 137.Dodgson, S. J. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes / S. J. Dodgson, R.P. Shank, B. E. Maryanoff//*Epilepsia*. – 2000.– T.41. – №1. – C.35-39.
- 138.Dooley, D.J. Ca²⁺ channel $\alpha 2\delta$ ligands: novel modulators of neurotransmission / D.J. Dooley, C.P. Taylor, S. Donevan [et al.] // *Trends in pharmacological sciences*. – 2007. – T. 28. – №. 2. – C. 75-82.
- 139.Doty, P. Lacosamide / P. Doty, G.D. Rudd, T. Stoehr [et al.] // *Neurotherapeutics*. – 2007. – T. 4. – №. 1. – C. 145-148.
- 140.Drake, C.T. Kappa opioid receptors in the rostral ventromedial medulla of male and female rats / C.T. Drake, A.X. De Oliveira, J.A. Harris [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2007. – T. 500. – №. 3. – C. 465-476.
- 141.Drasner, K., Weber, K. T. blocking voltage-sensitive sodium channels of neurons in a mammal comprising administering 1-benzyl-2-imino-3-(2-hydroxy-3-phenoxypropyl) benzimidazole; analgesics; neuroprotectants; anticonvulsants: пат. 7868028 CIIA. – 2011.
- 142.El Zahaf, N. A. The effect of GABA mimetics on the duration of immobility in the forced swim test in albino mice / N.A. El Zahaf, A.S. Elhwuegi // *Libyan Journal of Medicine*. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. 23480.
- 143.Emerson, G. Vitamin B12. VIII. Vitamin B12-like activity of 5, 6-dimethylbenzimidazole and tests on related compounds / G. Emerson, N.G. Brink, F.W. Holly [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1950. – T. 72. – №. 7. – C. 3084-3085.
- 144.Enna, S. J. Challenges in the search for drugs to treat central nervous system disorders / S. J. Enna, M. Williams // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2009. – T. 329. – №. 2. – C. 404-411.
- 145.Enz, R. Molecular composition of GABAC receptors / R. Enz, G. R. Cutting // *Vision research*. – 1998. – T. 38. – №. 10. – C. 1431-1441.

146. Errington, A. C. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels / A.C. Errington, T. Stöhr, C. Heers [et al.] // *Molecular pharmacology*. – 2008. – T. 73. – №1. – C. 157-169.
147. Falcó, J. L. Synthesis, pharmacology and molecular modeling of *N*-substituted 2-phenyl-indoles and benzimidazoles as potent GABA-A agonists / J.L. Falcó, M. Piqué, M. González [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2006. – T. 41. – №. 8. – C. 985-990.
148. Farber, N.B. Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity / N.B. Farber, X.P. Jiang, C. Heinkel [et al.] // *Molecular psychiatry*. – 2002. – T. 7. – №. 7. – C. 726.
149. Fatemi, S. H. Downregulation of GABAA Receptor Protein Subunits $\alpha 6$, $\beta 2$, δ , ϵ , $\gamma 2$, θ , and $\rho 2$ in Superior Frontal Cortex of Subjects with Autism / S.H. Fatemi, T.J. Reutiman, T.D. Folsom [et al.] // *Journal of autism and developmental disorders*. – 2014. – T. 44. – №. 8. – C. 1833-1845.
150. Faure, A. Mesolimbic Dopamine in Desire and Dread: Enabling Motivation to Be Generated by Localized Glutamate Disruptions in Nucleus Accumbens / A. Faure, S. M. Reynolds, J. M. Richard, K. C. Berridge // *J Neurosci*. – 2008. – V. 28. - № 28. - P. 7184-7192.
151. Feld, G.B. Sleep-Dependent Declarative Memory Consolidation—Unaffected after Blocking NMDA or AMPA Receptors but Enhanced by NMDA Coagonist D-Cycloserine / G.B. Feld, T. Lange, S. Gais [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2013. – T. 38. – №. 13. – C. 2688-2697.
152. Ford, C. P. Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location / C. P. Ford, G.P. Mark, J.T. Williams // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – T. 26. – №. 10. – C. 2788-2797.
153. Ford, C. P. Kappa opioid inhibition of somatodendritic dopamine inhibitory postsynaptic currents / C.P. Ford, M.J. Beckstead, J. T. Williams // *Journal of neurophysiology*. – 2007. – T. 97. – №. 1. – C. 883-891.

154. Freidel, M. Oxcarbazepin in der Epilepsietherapie / M. Freidel, E. Krause, K. Kuhn [et al.] // Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie. – 2007. – T. 75. – № 2. – C. 100-106.
155. Fuchigami, T. Synthesis and biological evaluation of radio-iodinated benzimidazoles as SPECT imaging agents for NR2B subtype of NMDA receptor / T. Fuchigami, H. Yamaguchi, M. Ogawa [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2010. – T. 18. – № 21. – C. 7497-7506.
156. Gambardella, A. Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy / A. Gambardella, I. Manna, A. Labate [et al.] // Epilepsia. – 2003. – T. 44. – № 9. – C. 1255-1256.
157. Gamma, T. V. Effects of biologically active compounds on the parameters of electrical activity of identified neurons of a mollusc *Helix albescens*. / T.V. Gamma, M.Y. Ravaeva [et al.] // Uch. Zap. Tavrichesk. Nats. Univ., Ser. Biol. – 2001. – T. 14. – № 2. – C. 21-26.
158. Gamma, T.V. Effects of some benzimidazole derivatives on electrical activity in molluscan neurons / T.V. Gamma, I.I. Korenyuk, M.Y. Baevsky [et al.] // Neurophysiology. – 2002. – T. 34. – № 2-3. – C. 130-132.
159. Gamma, T.V. Effect of benzimidazole and its derivatives on electrical neuronal activity of *Helix albescens* Rossm. and rat behavior / T.V. Gamma, I.I. Korenyuk // 5th International Symposium On Cell / Tissue Injury and Cytoprotection / Organoprotection Focus on GI Tract, – September 17-19, – 2008. – C. 81.
160. Gee, N. S. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the subunit of a calcium channel / N.S. Gee, J.P. Brown, V.U.K. Dissanayake [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271. – № 10. – C. 5768-5776.
161. Gil-Nagel, A.: Does mode of action predict spectrum of efficacy and side-effect profile? In: Antiepileptic Drug Therapy: Does Mechanism of Action Matter? Radisson Edwardian Heathrow Hotel, London, UK, Monday 7 June 2010.
162. Gillard, M. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein

- / M. Gillard, P. Chatelain, B. Fuks // *European journal of pharmacology*. – 2006. – T. 536. – №. 1-2. – C. 102-108.
163. Glauser, T. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes / T. Glauser, E. Ben-Menachem, B. Bourgeois [et al.] // *Epilepsia*. – 2006. – T. 47. – №. 7. – C. 1094-1120.
164. Göker, H. Synthesis of some new 2-substituted-phenyl-1H-benzimidazole-5-carbonitriles and their potent activity against *Candida* species / H. Göker, C. Kuş, D.W. Boykin [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2002. – T. 10. – №. 8. – C. 2589-2596.
165. Granger, P. Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin / P. Granger, B. Biton, C. Faure // *Molecular Pharmacology*. — 1995. — T. 47, № 6. — P. 1189—1196.
166. Gurvinder, S. Benzimidazoles: the latest information on biological activities/ S. Gurvinder, K. Maninderjit, C. Mohan//*Int Res J Pharm.*–2013.–T.4.–№.1.– C.82-87.
167. Haigh, J.R.M. Tolerance to the anticonvulsant effect of benzodiazepines / J.R.M. Haigh, M. Feely // *Trends in pharmacological sciences*. – 1988. – T. 9. – №. 10. – C. 361-366.
168. Harika, M. S. Docking studies of benzimidazole derivatives using hex 8.0 / M.S. Harika, T.R. Kuma [et al.] // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2017. – T. 8. – №. 4. – C. 1677.
169. Harris, J. A. Lacosamide and epilepsy / J.A. Harris, J.A. Murphy // *CNS neuroscience & therapeutics*. – 2011. – T. 17. – №. 6. – C. 678-682.
170. Henriksen, S. J. Opioid peptides in the hippocampus: anatomical and physiological considerations / S.J. Henriksen, G. Chouvet, J. McGinty [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1982. – T. 398. – №. 1. – C. 207-220.
171. Herrero, A. I. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA-mediated responses and activation of a potassium conductance / A.I. Herrero, N. Del

- Olmo, J.R. González-Escalada [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2002. – T. 42. – №. 2. – C. 210-220.
- 172.Hjelmstad, G.O. Kappa opioid receptor activation in the nucleus accumbens inhibits glutamate and GABA release through different mechanisms / G.O. Hjelmstad, H.L. Fields // *Journal of neurophysiology*. – 2003. – T. 89. – №. 5. – C. 2389-2395.
- 173.Horton, R. W. Convulsant and anticonvulsant actions in DBA/2 mice of compounds blocking the reuptake of GABA / R.W. Horton, J.F. Collins, G.M. Anlezark [et al.]//*European journal of pharmacology*– 1979– T.59– №1-2– C.75-83.
- 174.Hosseinzadeh, H. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice / H. Hosseinzadeh, S. Parvardeh // *Phytomedicine*. – 2004. – T. 11. – №. 1. – C. 56-64.
- 175.Howes, J. F. Talampanel / J. F. Howes, C. Bell // *Neurotherapeutics*. – 2007. – T. 4. – №. 1. – C. 126-129.
- 176.Huang, C. W. The synergistic inhibitory actions of oxcarbazepine on voltage-gated sodium and potassium currents in differentiated NG108-15 neuronal cells and model neurons / C.W. Huang, C.C. Huang, M.W. Lin [et al.] // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2008. – T. 11. – №. 5. – C. 597-610.
- 177.Huang, R.Q. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action / R.Q. Huang, C.L. Bell-Horner, M.I. Dibas [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2001. – T. 298. – №. 3. – C. 986-995.
- 178.Irwin, S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics*. – 1964. – 5. – P.174-179.
- 179.Isaac M. Serotonergic 5-HT_{2C} receptors as a potential therapeutic target for the design antiepileptic drugs / M. Isaac // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2005. – T. 5. – №. 1. – C. 59-67.

180. Iwamoto, F. M. Phase 2 trial of talampanel, a glutamate receptor inhibitor, for adults with recurrent malignant gliomas / F.M. Iwamoto, T.N. Kreisl, L. Kim [et al.] // *Cancer*. – 2010. – T. 116. – №. 7. – C. 1776-1782.
181. Jain, P. Design, synthesis and biological evaluation of some novel benzimidazole derivatives for their potential anticonvulsant activity / P. Jain, P.K. Sharma, H. Rajak [et al.] // *Archives of pharmacal research*. – 2010. – T. 33. – №. 7. – C. 971-980.
182. Jakus, R. Effect of two noncompetitive AMPA receptor antagonists GYKI 52466 and GYKI 53405 on vigilance, behavior and spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy / R. Jakus, M. Graf, R.D. Ando [et al.] // *Brain research*. – 2004. – T. 1008. – №. 2. – C. 236-244.
183. Jiang, E. Glial glutamate transporter and glutamine synthetase regulate GABAergic synaptic strength in the spinal dorsal horn / E. Jiang, X. Yan, H.R. Weng // *Journal of neurochemistry*. – 2012. – T. 121. – №. 4. – C. 526-536.
184. Johannessen, S. I. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs / S.I. Johannessen, D. Battino, D.J. Berry [et al.] // *Therapeutic drug monitoring*. – 2003. – T. 25. – №. 3. – C. 347-363.
185. Johnston G.A.R. Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists / G.A.R. Johnston // *British journal of pharmacology*. – 2013. – T. 169. – №. 2. – C. 328-336.
186. Joshi, S. K. Arylacetamide κ -opioid receptor agonists produce a tonic-and use-dependent block of tetrodotoxin-sensitive and-resistant sodium currents in colon sensory neurons / S.K. Joshi, K. Lamb, K. Bielefeldt [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – T.307. – №1. – C.367-372.
187. Jung, M.J. γ -vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice / M.J. Jung, B. Lippert, B.W. Metcalf [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 1977. – T. 29. – №. 5. – C. 797-802.

- 188.Kalia, L.V. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead / L.V. Kalia, S.K. Kalia, M.W. Salter // *The Lancet Neurology*. – 2008. – T. 7. – №. 8. – C. 742-755.
- 189.Kalyankar, T. M. Review on benzimidazole derivative / T. M. Kalyankar, S.S. Pekamwar, S.J. Wadher [et al.] // *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – T. 3. – №. 4. – C. 1-8.
- 190.Kamal, A. Synthesis of new benzimidazole linked pyrrolo [2, 1-c][1, 4] benzodiazepine conjugates with efficient DNA-binding affinity and potent cytotoxicity / A. Kamal, P.P. Kumar, K. Sreekanth [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2008. – T. 18. – №. 8. – C. 2594-2598.
- 191.Kaminski, R. M. Pharmacological and genetic manipulation of kappa opioid receptors: Effects on cocaine-and pentylenetetrazol-induced convulsions and seizure kindling / R.M. Kaminski, J.M. Witkin, T.S. Shippenberg // *Neuropharmacology*. – 2007. – T. 52. – №. 3. – C. 895-903.
- 192.Kasthuri, S. A review: animal models used in the screening of antiepileptic drugs / S. Kasthuri, K. Karthigadevi, P. Manjulakshmi [et al.] // *Int. Res J Pharm. App Sci*. – 2013. – T. 3. – №. 3. – C. 18-23.
- 193.Katzung, B.G. Basic & clinical pharmacology, 14th Edition / B.G. Katzung, S.B. Masters, A.J. Trevor (Eds.). - McGraw-Hill Education, pp. 409–438 - 2018.
- 194.Kauffman, M.A. Transcriptionally less active prodynorphin promoter alleles are associated with temporal lobe epilepsy: a case-control study and meta-analysis / M.A. Kauffman, D. Consalvo, M.D. Gonzalez [et al.] // *Disease markers*. – 2008. – T. 24. – №. 3. – C. 135-140.
- 195.Kay, H.Y. M-current preservation contributes to anticonvulsant effects of valproic acid / H.Y. Kay, D.L. Greene, S. Kang [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2015. – T. 125. – №. 10. – C. 3904-3914.

- 196.Keri, R. S. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry / R.S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi //Chemical biology & drug design. – 2015. – T. 86. – №. 1. – C. 19-65.
- 197.Kersanté, F. A functional role for both γ -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus / F. Kersanté, S. Rowley, I. Pavlov [et al.] // The Journal of physiology. – 2013. – T. 591. – №. 10. – C. 2429-2441.
- 198.Khatoon, H. Evaluation of anticonvulsant and neuroprotective effects of camel milk in strychnine-induced seizure model / H. Khatoon, R. Najam, T. Mirza [et al.] // Asian Pacific Journal of Tropical Disease. – 2015. – T. 5. – №. 10. – C. 817-820.
- 199.Kleijn, J. Effects of amphetamine on dopamine release in the rat nucleus accumbens shell region depend on cannabinoid CB1 receptor activation / J. Kleijn, J. Wiskerke, T.I. Cremers [et al.] // Neurochem. Int. – 2012. - 60(8). – P.791-798.
- 200.Kłodzińska, A. Roles of group II metabotropic glutamate receptors in modulation of seizure activity / A. Kłodzińska, M. Bijak, E. Chojnacka-Wojcik [et al.] //Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.– 2000. – T.361. – №3. – C.283-288.
- 201.Kubinyi, H. Free Wilson analysis. Theory, applications and its relationship to Hansch analysis / H. Kubinyi // Quantitative Structure-Activity Relationships. – 1988. – T. 7. – №. 3. – C. 121-133.
- 202.Kumar, N. Synthesis and anticonvulsant activity of novel substituted phenyl indoloimidazole derivatives / N. Kumar, P.K. Sharma, V.K. Garg [et al.] // Current Research in Chemistry. – 2011. – T. 3. – №. 2. – C. 114-120.
- 203.Laman-Maharg, A. R. The long-term effects of stress and kappa opioid receptor activation on conditioned place aversion in male and female California mice / A.R. Laman-Maharg, T. Copeland, E.O. Sanchez [et al.] // Behavioural brain research. – 2017. – T. 332. – C. 299-307.
- 204.Lambe, E.K. Serotonin Induces EPSCs Preferentially in Layer V Pyramidal Neurons of the Frontal Cortex in the Rat / E.K. Lambe, P.S. GoldmanRakic, G.K. Aghajanian // Cerebral Cortex. – 2000. – V. 10. - № 10. – P. 974-980.

- 205.Lasoń, W. Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update / W. Lasoń, M. Dudra-Jastrzębska [et al.] // *Pharmacological Reports*. – 2011. – T. 63. – №2. – C. 271-292.
- 206.Le Duigou, C. Group I mGluR agonist-evoked long-term potentiation in hippocampal oriens interneurons / C. Le Duigou, D.M. Kullmann // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – T. 31. – №. 15. – C. 5777-5781.
- 207.Lehmann, J. CGS 19755, a selective and competitive N-methyl-D-aspartate-type excitatory amino acid receptor antagonist / J. Lehmann, A.J. Hutchison, S.E. McPherson [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1988. – T. 246. – №. 1. – C. 65-75.
- 208.Lemos, J.C. Kappa-opioid receptor function / J.C. Lemos, C. Chavkin // *Opiate receptors* edited by Pasternak G.W. - 2011. - P. 226-305.
- 209.Lerman-Sagie, T. Phenobarbital still has a role in epilepsy treatment / T. Lerman-Sagie, P. Lerman // *Journal of child neurology*. – 1999. – T. 14. – №12. – C.820-821.
- 210.Leśkiewicz, M. The neurochemical mechanisms of temporal lobe epilepsy: an update / M. Leśkiewicz, W. Lasoń // *Przegląd lekarski*. – 2007. – T. 64. – №. 11. – C. 960-964.
- 211.Levy, M. Activation of a metabotropic glutamate receptor and protein kinase C reduce the extent of inactivation of the K⁺ channel Kv1. 1/Kvβ1. 1 via dephosphorylation of Kv1. 1 / M. Levy, J. Jing, D. Chikvashvili [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273. – №. 11. – C. 6495-6502.
- 212.Li, C. Activation of GABAB Receptors Ameliorates Cognitive Impairment via Restoring the Balance of HCN1/HCN2 Surface Expression in the Hippocampal CA1 Area in Rats With Chronic Cerebral Hypoperfusion / C. Li, Y. Lu, M. Zhou [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2014. – C. 1-17.
- 213.Li, G. Cytokines and epilepsy / G. Li, S. Bauer, M. Nowak [et al.] // *Seizure-European Journal of Epilepsy*. – 2011. – T. 20. – №. 3. – C. 249-256.

- 214.Li, M. Anticonvulsant activity of B2, an adenosine analog, on chemical convulsant-induced seizures / M. Li, R. Kang, J. Shi [et al.] // PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 6. – C. e67060.
- 215.Loacker, S. Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors / S. Loacker, M. Sayyah, W. Wittmann [et al.] // Brain. – 2007. – T. 130. – №. 4. – C. 1017-1028.
- 216.Lodge, D. J. Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: A mechanism of behavioral sensitization/ D. J. Lodge, A. A. Grace // J Neurosci. – 2008. – V. 28. - № 31. – P.7876–7882.
- 217.Löscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs / W. Löscher // Seizure-European Journal of Epilepsy. – 2011. – T. 20. – №. 5. – C. 359-368.
- 218.Löscher, W. Long-term studies on anticonvulsant tolerance and withdrawal characteristics of benzodiazepine receptor ligands in different seizure models in mice. I. Comparison of diazepam, clonazepam, clobazam and abecarnil / W. Löscher, C. Rundfeldt, D. Hönack [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1996. – T. 279. – №. 2. – C. 561-572.
- 219.Löscher, W. Functional, metabolic, and synaptic changes after seizures as potential targets for antiepileptic therapy / W. Löscher, R. Köhling // Epilepsy & Behavior. – 2010. – T. 19. – №. 2. – C. 105-113.
- 220.Löscher, W. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations / W. Löscher, D. Schmidt // Epilepsy research. – 1988. – T. 2. – №. 3. – C. 145-181.
- 221.Löscher, W. New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets / W. Löscher, D. Schmidt // Epilepsy research. – 2004. – T. 60. – №. 2-3. – C. 77-159.
- 222.Löscher, W. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma / W. Löscher, D. Schmidt // Epilepsia. – 2011. – T. 52. – №. 4. – C. 657-678.

223. Louvet, P. Novel benzimidazoles as ligands for the strychnine-insensitive α -methyl-D-aspartate-linked glycine receptor / P. Louvet, G. Lallement, I. Pernot-Marino [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 1993. – T. 28. – №. 1. – C. 71-75.
224. Lukomskaya, N. Ya. Involvement of Iontropic Glutamate Receptors in the Appearance of Arecoline Tremor in Mice / N. Ya. Lukomskaya, V. V. Lavrent'eva, L. A. Starshinova [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2008. - V. 38. - No. 4. - P. 421-426.
225. Luszczki, J. J. Isobolographic analysis of interaction between oxcarbazepine and valproate in pentylenetetrazole-induced seizures in mice / J. J. Luszczki // *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. – 2008. – T. 2. – №. 1.
226. Luszczki, J. J. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions / J. J. Luszczki // *Pharmacological reports*. – 2009. – T. 61. – №. 2. – C. 197-216.
227. Madeja, M. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? / M. Madeja, D.G. Margineanu, A. Gorji [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2003. – T. 45. – №. 5. – C. 661-671.
228. Maljevic, S. KV7 channelopathies / S. Maljevic, T.V. Wuttke, G. Seebohm [et al.] // *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. – 2010. – T. 460. – №. 2. – C. 277-288.
229. Mandhane, S. N. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with sc PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice / S.N. Mandhane, K. Aavula, T. Rajamannar // *Seizure*. – 2007. – T. 16. – №. 7. – C. 636-644.
230. Manocha, A. Studies on the anticonvulsant effect of U50488H on maximal electroshock seizure in mice / A. Manocha, P.K. Mediratta, K.K. Sharma // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2003. – T. 76. – №. 1. – C. 111-117.
231. Manocha, A. Possible mechanism involved in the anticonvulsant action of butorphanol in mice / A. Manocha, K.K. Sharma, P.K. Mediratta // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2003. – T. 74. – №. 2. – C. 343-350.

232. Mansner, R. Pharmacokinetics of nicotine in adult and infant mice/ R. Mansner, M.J. Mattila // *Med Biol.* – 1977. – V. 55. - № 6. – P. 317-324.
233. Marek, G. J. Behavioral evidence for A-opioid and 5-HT_{2A} receptor interactions/ Gerard J. Marek // *European Journal of Pharmacology.* – 2003. – V. 474. – P. 77-83.
234. Marin, C. Effects of kappa receptor agonists on D1 and D2 dopamine agonist and antagonist-induced behaviors/ C. Marin, T. M. Engber, P. Chaudhuri [et al] // *Psychopharmacology (Berl).* – 1996. – V. 123. - № 2. P. 215-221.
235. Martinez, D. Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II: amphetamine-induced dopamine release in the functional subdivisions of the striatum/ D. Martinez, M. Slifstein, A. Broft [et al] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2003. – V. 23. – № 3. – P. 285-300.
236. Maryanoff, B.E. Potential anxiolytic agents. Pyrido [1, 2-a] benzimidazoles: A new structural class of ligands for the benzodiazepine binding site on GABA-A receptors / B.E. Maryanoff, W. Ho, D.F. McComsey [et al.] // *Journal of medicinal chemistry.* – 1995. – T. 38. – №. 1. – C. 16-20.
237. Mathews, G.C. The dual roles of GABA in seizures and epilepsy generate more excitement / G.C. Mathews // *Epilepsy currents.* – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 28.
238. Matute, C. Therapeutic potential of kainate receptors / C. Matute // *CNS neuroscience & therapeutics.* – 2011. – T. 17. – №. 6. – C. 661-669.
239. McCauley, J.A. NR2B-selective N-methyl-D-aspartate antagonists: synthesis and evaluation of 5-substituted benzimidazoles / J.A. McCauley, C.R. Theberge, J.J. Romano [et al.] // *Journal of medicinal chemistry.* – 2004. – T. 47. – № 8. – C. 2089-2096.
240. McDermott, C. M. Activation of κ opioid receptors increases intrinsic excitability of dentate gyrus granule cells / C.M. McDermott, L.A. Schrader // *The Journal of physiology.* – 2011. – T. 589. – №. 14. – C. 3517-3532.
241. McLaughlin, J.P. Phosphorylation of a carboxyl-terminal serine within the κ -opioid receptor produces desensitization and internalization / J.P. McLaughlin, M. Xu, K.

- Mackie [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – №. 36. – C. 34631-34640.
- 242.McMicken, D. Alcohol-related seizures / D. McMicken, J. L. Liss // *Emergency Medicine Clinics*. – 2011. – T. 29. – №. 1. – C. 117-124.
- 243.Mehdi, T. Benzodiazepines revisited / T. Mehdi // *British Journal of Medical Practitioners*. – 2012. – T. 5. – №. 1. – C. 501.
- 244.Meldrum, B. S. Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives / B. S. Meldrum // *Progress in brain research*. – Elsevier, 2002. – T. 135. – C. 3-11.
- 245.Meldrum, B. S. Molecular targets for antiepileptic drug development / B.S. Meldrum, M.A. Rogawski // *Neurotherapeutics*. – 2007. – T. 4. – №. 1. – C. 18-61.
- 246.Merritt, H.H. Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders / H.H. Merritt, T.J. Putnam // *Journal of the American Medical Association*. – 1938. – T. 111. – №. 12. – C. 1068-1073.
- 247.Meunier, H. Proprietes pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacetique ler memoire: proprietes antiepleptiques /H. Meunier // *Therapie*. – 1963. – T. 18. – C. 435-438.
- 248.Miller, A.A. Pharmacological Studies on Lamotrigine, A Novel Potential Antiepileptic Drug / A.A. Miller, P. Wheatley, D.A. Sawyer // *Epilepsia*. – 1986. – T. 27. – №. 5. – C. 483-489.
- 249.Miller, J.W. Functional anatomy of pentylenetetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem / J.W. Miller, A.C. McKeon, J.A. Ferrendelli // *Annals of neurology*. – 1987. – T. 22. – №. 5. – C. 615-621.
- 250.Miller, K.W. The nature of sites of general anaesthetic action / K.W. Miller // *British journal of anaesthesia*. – 2002. – T. 89. – №. 1. – C. 17-31.
- 251.Moldrich, R.X. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy / R.X. Moldrich, A.G. Chapman, G. De Sarro [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2003. – T. 476. – №. 1-2. – C. 3-16.

252. Narasimhan, B. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety / B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar // *Medicinal Chemistry Research*. – 2012. – T. 21. – №. 3. – C. 269-283.
253. Nusrat, B. Some heterocyclics with anticonvulsant properties / B. Nusrat, R. Ali, N. Siddiqui, A. Habib [et al.] // *Bulletin of Pharmaceutical Research*. – 2014. – T. 4. – №. 1. – C. 21-36.
254. Ochoa J. G. et al. Antiepileptic Drugs. Retrieved March 28, 2012. – 2012.
255. Ohno, Y. Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model / Y. Ohno, S. Ishihara, R. Terada [et al.] // *Epilepsy research*. – 2010. – T. 89. – №. 2. – C. 360-364.
256. Oka, T. Rabbit vas deferens: a specific bioassay for opioid κ -receptor agonists / T. Oka, K. Negishi, M. Suda [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 1981. – T. 73. – №. 2-3. – C. 235-236.
257. Okuma, T. A history of investigation on the mood stabilizing effect of carbamazepine in Japan / T. Okuma, A. Kishimoto // *Psychiatry and clinical neurosciences*. – 1998. – T. 52. – №. 1. – C. 3-12.
258. Oliva, M. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy / M. Oliva, S.F. Berkovic, S. Petrou // *Epilepsia*. – 2012. – T. 53. – №. 11. – C. 1849-1859.
259. Olsen, R. W. The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex / R.W. Olsen // *The Biological Effects of Glutamic Acid and Its Derivatives*. – Springer, Dordrecht, 1981. – C. 261-279.
260. Pajouhesh, H. Benzimidazole inhibitors of the sodium channel: заяв. пат. US14002943 / H. Pajouhesh, J. Lamontagne, B. Whelan [et al.]. – 2012.
261. Partap, S. Design, Synthesis, and Pharmacological Screening of Pyridazinone Hybrids as Anticonvulsant Agents / S. Partap, M.S. Yar, M. Hassan [et al.] // *Archiv der Pharmazie*. – 2017. – T. 350. – №. 10.
262. Pathak, D. Ethanol and magnesium suppress nickel-induced bursting activity in leech Retzius nerve cells / D. Pathak, S. Lopacic, M. Stanojevic [et al.] // *Gen Physiol Biophys*. – 2009. – T. 28. – C. 9-17.

263. Pathak, D. Benzimidazoles: a new profile of biological activities / D. Pathak, N. Siddiqui // *Der Pharmacia Lettre*. – 2010. – T. 2. – №. 2. – C. 27-34.
264. Perrine, K.R. Absence Seizure / K.R. Perrine // *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. – 2017. – C. 1-2.
265. Pesquita, C. Semantic similarity in biomedical ontologies / C. Pesquita, D. Faria, A.O. Falcao [et al.] // *PLoS computational biology*. – 2009. – T. 5. – №. 7. – C. e1000443.
266. Pinheiro, P.S. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action / P.S. Pinheiro, C. Mulle // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2008. – T. 9. – №. 6. – C. 423-436.
267. Pitkänen, A. Models of seizures and epilepsy / A. Pitkänen, P. Buckmaster, A.S. Galanopoulou. – Academic Press, 2017.
268. Philibin, S.D. Ethanol withdrawal-induced motor impairment in mice / S.D. Philibin, A.J. Cameron, J.P. Schlumbohm [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2012. – T. 220. – №. 2. – C. 367-378.
269. Poolos, N.P. The h-channel: a potential channelopathy in epilepsy? / N.P. Poolos // *Epilepsy & Behavior*. – 2005. – T. 7. – №. 1. – C. 51-56.
270. Poolos, N.P. Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites / N.P. Poolos, M. Migliore, D. Johnston // *Nature neuroscience*. – 2002. – T. 5. – №. 8. – C. 767.
271. Porsolt, R.D. Animal model of depression / R.D. Porsolt // *Biomedicine* / [publiee pour l'AAICIG]. – 1979. – T. 30. – №. 3. – C. 139-140.
272. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M.L. Jalfre // *Nature*. – 1977. – T. 266. – №. 5604. – C. 730.
273. Prasad, P.M.K. Design and synthesis of novel 2-(5-(4-aryl)-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-1-(substituted aminomethyl)-1H-benzimidazole as potent anticonvulsants / P.M.K. Prasad, R. Sundararajan // *Medicinal Chemistry Research*. – 2017. – T. 26. – №. 12. – C. 3158-3172.

274. Putnam, T.B. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives / T.B. Putnam, H.H. Merritt // *Science*. – 1937.
275. Qu, X.A. et al. Semantic Web-based data representation and reasoning applied to disease mechanism and pharmacology / X.A. Qu, R.C. Gudivada, A.G. Jegga [et al.] // *Bioinformatics and Biomedicine Workshops. BIBMW. IEEE International Conference on*. – IEEE, 2007. – C. 131-143.
276. Ragsdale, D.S. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs / D.S. Ragsdale, M. Avoli // *Brain research reviews*. – 1998. – T. 26. – №. 1. – C. 16-28.
277. Reddy, D.S. Chronic treatment with the neuroactive steroid ganaxolone in the rat induces anticonvulsant tolerance to diazepam but not to itself / D.S. Reddy, M.A. Rogawski // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2000. – T. 295. – №. 3. – C. 1241-1248.
278. Rho, J. *Epilepsy: mechanisms, models, and translational perspectives* / J. Rho, R. Sankar, C.E. Stafstrom. – CRC Press, 2010. – C. 127.
279. Robertson, S.D. A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters / S.D. Robertson, H.J. Matthies, A. Galli // *Mol. Neurobiol.* – 2009. - 39(2). – P.73-80.
280. Robles, C. F. Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females / C.F. Robles, M.Z. McMackin, K.L. Campi [et al.] // *Behavioural brain research*. – 2014. – T. 262. – C. 84-93.
281. Rogawski, M.A. Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline / M.A. Rogawski // *Epilepsy research*. – 2006. – T. 69. – №3. – C. 273-294.
282. Rogawski, M. A. Brivaracetam: a rational drug discovery success story / M.A. Rogawski // *British journal of pharmacology*. – 2008. – T.154. – №8. – C.1555-1557.
283. Rogawski, M. A. New molecular targets for antiepileptic drugs: $\alpha 2\delta$, SV2A, and Kv7/KCNQ/M potassium channels / M.A. Rogawski, C.W. Bazil // *Current neurology and neuroscience reports*. – 2008. – T. 8. – №. 4. – C. 345-352.

284. Rogawski, M. A. Mechanisms of action of antiepileptic drugs / M.A. Rogawski, J.E. Cavazos // *Wyllie's Treatment of Epilepsy: Principles and Practice: Wolters Kluwer Health*, – 2015.
285. Rogawski, M. A. The neurobiology of antiepileptic drugs / M.A. Rogawski, W. Löscher // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2004. – T. 5. – №. 7. – C. 553.
286. Rogawski, M.A. Mechanisms of action of antiseizure drugs and the ketogenic diet / M.A. Rogawski, W. Löscher. J.M. Rho // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2016. – T. 6. – №. 5. – C. a022780.
287. Rogawski, M.A. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds / M.A. Rogawski, R.J. Porter // *Pharmacological reviews*. – 1990. – T. 42. – №3. – C. 223-286.
288. Rostock, A. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures / A. Rostock, C. Tober, C. Rundfeldt [et al.] // *Epilepsy research*. – 1996. – T. 23. – №. 3. – C. 211-223.
289. Rowley, N. M. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control / N.M. Rowley, K.K. Madsen, A. Schousboe [et al.] // *Neurochemistry international*. – 2012. – T. 61. – №. 4. – C. 546-558.
290. Rudolph, U. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions / U. Rudolph, H. Möhler // *Current opinion in pharmacology*. – 2006. – T. 6. – №. 1. – C. 18-23.
291. Sabers, A. Newer anticonvulsants: Comparative review of drug interactions adverse effects. / A. Sabers, L. Gram // *Drugs*. – 2000. – T. 60. – №. 1. – C. 23-33.
292. Sanberg, P. R. The catalepsy test: its ups and downs / P.R. Sanberg, M.D. Bunsey, M. Giordano [et al.] // *Behavioral neuroscience*. – 1988. – T. 102. – №. 5. – C. 748.
293. Sarro, G.D. AMPA receptor antagonists as potential anticonvulsant drugs / G.D. Sarro, R. Gitto, E. Russo [et al.] // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2005. – T. 5. – №. 1. – C. 31-42.
294. Schindler, W. Über derivate des iminodibenzyls / W. Schindler, F. Häfliger // *Helvetica Chimica Acta*. – 1954. – T. 37. – №. 2. – C. 472-483.

- 295.Schmidt, D. What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs? / D. Schmidt, C.E. Elger // *Epilepsy & behavior*. – 2004. – T. 5. – №. 5. – C. 627-635.
- 296.Schmutz, M. The competitive NMDA receptor antagonists CGP 37849 and CGP 39551 are potent, orally-active anticonvulsants in rodents / M. Schmutz, C. Portet, A. Jeker [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. – 1990. – T. 342. – №. 1. – C. 61-66.
- 297.Schousboe, A. GABA: homeostatic and pharmacological aspects / A. Schousboe, H.S. Waagepetersen // *Progress in brain research*. – 2007. – T. 160. – C. 9-19.
- 298.Schousboe, A. The GABA synapse as a target for antiepileptic drugs: a historical overview focused on GABA transporters / A. Schousboe, K.K. Madsen, M.L. Barker-Haliski [et al.] // *Neurochemical research*. – 2014. – C. 1-8.
- 299.Schunk, E. Kappa opioid receptor activation blocks progressive neurodegeneration after kainic acid injection / E. Schunk, C. Aigner, N. Stefanova [et al.] // *Hippocampus*. – 2011. – T. 21. – №. 9. – C. 1010-1020.
- 300.Schwarzer, C. 30 years of dynorphins—new insights on their functions in neuropsychiatric diseases / C. Schwarzer // *Pharmacology & therapeutics*. – 2009. – T. 123. – №. 3. – C. 353-370.
- 301.Seredin, S.B. Effects of afobazole on the BDNF content in brain structures of inbred mice with different phenotypes of emotional stress reaction / S.B. Seredin, D.S. Melkumian, E.A. Val'dman [et al.] // *Eksperimental'naiia i klinicheskaia farmakologija*. – 2006. – T. 69. – №. 3. – C. 3-6.
302. Seredenin, S.B. Interaction of Afobazole with σ 1-Receptors / S.B. Seredenin, T.A. Antipova, M.V. Voronin [et al.] // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2009. – T. 148. – №. 1. – C. 42-44.
- 303.Shabanov, P. D. Participation of GABA- and dopaminergic mechanisms of the bed nucleus of stria terminalis in reinforcing effects of psychotropic drugs mediated via the lateral hypothalamus / P. D. Shabanov, A. A. Lebedev // *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. – 2011. – V. 97. – № 8. – P. 804-813.

304. Shaharyar, M. Synthesis, characterization and pharmacological screening of novel benzimidazole derivatives / M. Shaharyar, A. Mazumder, R. Garg [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2011.
305. Shaharyar, M. Synthesis, characterization and pharmacological screening of novel benzimidazole derivatives / M. Shaharyar, A. Mazumder, R. Garg [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2016. – T. 9. – C. S342-S347.
306. Shaikh, I.N. Synthesis and In-vivo Evaluation of Carbonyl-amide Linkage Based New Benzimidazole Derivatives / I.N. Shaikh, K.M. Hosamani [et al.] // *Archiv der Pharmazie*. – 2012. – T. 345. – №. 1. – C. 65-72.
307. Shank, R.P. Carbonic anhydrase inhibition. Insight into the characteristics of zonisamide, topiramate, and the sulfamide cognate of topiramate / R.P. Shank, V.L. Smith-Swintosky, B.E. Maryanoff // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2008. – T. 23. – №. 2. – C. 271-276.
308. Sharma, S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Some New Benzimidazole Derivatives For their Anticonvulsant and Anti-inflammatory activity // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2011. – T. 4. – №. 8. – C. 1311-1319.
309. Shingalapur, R.V. Derivatives of benzimidazole pharmacophore: synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies / R.V. Shingalapur, K.M. Hosamani, R.S. Keri [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2010. – T. 45. – №. 5. – C. 1753-1759.
310. Shippenberg, T.S. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction / T.S. Shippenberg, A. Zapata, V.I. Chefer // *Pharmacology & therapeutics*. – 2007. – T. 116. – №. 2. – C. 306-321.
311. Shorvon, S.D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009 / S.D. Shorvon // *Epilepsia*. – 2009. – T. 50. – №3. – C. 93-130.
312. Siddiqui, N. Anticonvulsant and toxicity evaluation of newer 1-((1-(2-substituted benzyl)-1H-benzo [d] imidazol-2-yl) methyl)-3-arylthioureas / N. Siddiqui, M.S. Alam // *Der Pharma Chemica*. – 2010. – T. 2. – №. 2. – C. 163-171.

313. Siddiqui, N. Synthesis of new benzimidazole and phenylhydrazinecarbothiomide hybrids and their anticonvulsant activity / N. Siddiqui, M.S. Alam, R. Ali [et al.] // *Medicinal Chemistry Research*. – 2016. – T. 25. – №. 7. – C. 1390-1402.
314. Siggins, G.R. Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system: cellular mechanisms / G.R. Siggins, S.J. Henriksen, C. Chavkin [et al.] // *Advances in neurology*. – 1986. – T. 44. – C. 501-512.
315. Silkina, I.V. Gabaergic mechanism of cerebrovascular and neuroprotective effects of afobazole and picamilon / I.V. Silkina, T.C. Gan'shina, S.B. Seredin [et al.] // *Ekspperimental'naiia i klinicheskaia farmakologija*. – 2005. – T. 68. – №1. – C. 20-24.
316. Sills, G.J.: Combining mechanisms: how can experimental studies inform clinical practice? The Conference Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter? Radisson Edwardian Heathrow Hotel, London, UK, Monday 7 June 2010.
317. Sills, G. J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs / G. J. Sills // *Epilepsy 2011: From Science to Society. A Practical Guide to Epilepsy*. – 2011.
318. Singh, J.M. Possible anticonvulsant thiazolo [3, 2-a]benzimidazole Mannich bases. XI / J.M. Singh // *Journal of medicinal chemistry*. – 1969. – T. 12. – №5. – C. 962-962.
319. Singh, J. M. Chemistry of azole derivatives. XII. Possible anticonvulsant thiazolo [3, 2-a] benzimidazoles / J.M. Singh // *Journal of medicinal chemistry*. – 1970. – T. 13. – №. 5. – C. 1018-1018.
320. Singh, S.P. Synthesis of 2-substituted benzyldene-6-b-nitrothiazolo [3, 2- α] benzimidazol-3 (2H) ones as possible anticonvulsants / S.P. Singh, S.S. Parmar, B.R. Pandey // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1977. – T. 14. – №6. – C. 1093-1095.
321. Spasov, A.A. Benzimidazole derivatives: Spectrum of pharmacological activity and toxicological properties (a review) / A.A. Spasov, I.N. Yozhitsa, L.I. Bugaeva [et al.] // *pharmaceutical chemistry Journal*. – 1999. – T. 33. – №. 5. – C. 232-243.
322. Spasov, A.A., Anisimova, V. A., Vasil'ev, P. M., et al., "Kappa-opioid agonist," RU Pat. 2,413,512, Mar. 10, 2011; *Byull. Izobret.*, No. 7 (2011).

- 323.Spasov, A.A. Antiepileptic Activity of a New Derivative of Benzimidazole RU-1205 / A.A. Spasov, K.Y. Kalitin, O.Y. Grechko, V.A. Anisimova [et al.] // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2016. – T. 160. – №. 3. – C. 336-339.
- 324.Splendiani, A. Biomedical semantics in the Semantic Web / A. Splendiani // Journal of biomedical semantics. – 2011. – T. 2. – №. 1. – C. 1-9.
- 325.Stępień, K.M. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs / K.M. Stępień, M. Tomaszewski, J. Tomaszewska [et al.] // Pharmacological Reports. – 2012. – T. 64. – №. 5. – C. 1011-1019.
- 326.Stögmann, E. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promotor is associated with temporal lobe epilepsy / E. Stögmann, A. Zimprich, C. Baumgartner [et al.] // Annals of neurology. – 2002. – T. 51. – №. 2. – C. 260-263.
- 327.Stöhr, T. Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy / T. Stöhr, H.J. Kupferberg, J.P. Stables [et al.] // Epilepsy research. – 2007. – T. 74. – №. 2-3. – C. 147-154.
- 328.Su, X. The effect of κ -opioid receptor agonists on tetrodotoxin-resistant sodium channels in primary sensory neurons / X. Su, N.A. Castle, B. Antonio [et al.] // Anesthesia & Analgesia. – 2009. – T. 109. – №. 2. – C. 632-640.
- 329.Surges, R. Input resistance is voltage dependent due to activation of I_h channels in rat CA1 pyramidal cells / R. Surges, T.M. Freiman, T.J. Feuerstein // Journal of neuroscience research. – 2004. – T. 76. – №. 4. – C. 475-480.
- 330.Swinyard, E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs / E. A. Swinyard // Epilepsia. – 1969. – T. 10. – №. 2. – C. 107-119.
- 331.Swinyard, E.A. General principles. Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants/ E.A. Swinyard//Antiepileptic drugs–1989.–C.85-102.
- 332.Tao, Y.M. LPK-26, a novel κ -opioid receptor agonist with potent antinociceptive effects and low dependence potential / Y.M. Tao, Q.L. Li, C.F. Zhang [et al.] // European journal of pharmacology. – 2008. – T. 584. – №. 2-3. – C. 306-311.

333. Taylor, C.P. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel $\alpha 2-\delta$ (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery/ C.P. Taylor, T. Angelotti, E. Fauman//Epilepsy research– 2007– T73. –№2. – C.137-150.
334. Terashvili, M. (+)-Morphine attenuates the (-)-morphine-produced conditioned place preference and the μ -opioid receptor-mediated dopamine increase in the posterior nucleus accumbens of the rat / M. Terashvili, H.E. Wu, E.T. Schwasinger [et al.]//European journal of pharmacology. – 2008. – T. 587. – №1-3. – C. 147-154.
335. Toman, J.E.P. Properties of maximal seizures, and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents / J.E.P. Toman, E.A. Swinyard, L.S. Goodman // Journal of neurophysiology. – 1946. – T. 9. – №. 3. – C. 231-239.
336. Trapani, G. Synthesis and benzodiazepine receptor binding of some imidazo-, pyrimido [2, 1-b] benzoxazoles and pyrimido [1, 2-a] benzimidazoles / G. Trapani, M. Franco, A. Latrofa [et al.] //European journal of medicinal chemistry. – 1997. – T. 32. – №. 1. – C. 83-89.
337. Trifilieff, P. Kappa-Opioid Receptor Signaling in the Striatum as a Potential Modulator of Dopamine Transmission in Cocaine Dependence/ P. Trifilieff, D. Martinez // Front Psychiatry. – 2013. – V. 4. - №44. – P. 1-12.
338. Trojnar, M. K. New generation of valproic acid / M.K. Trojnar, E. Wierzchowska-Cioch [et al.]//Polish journal of pharmacology. – 2004. – T. 56. – №3. – C. 283-288.
339. Upadhyaya, C. Evaluation of Anticonvulsant Activity of Hydroalcoholic Extract of Sauropus androgynus Leaves / C. Upadhyaya, D. Raveendran, K. Hegde // International Journal of Advances in Science Engineering and Technology. – 2017. – V.5, Iss-1.
340. Urbanska, E.M. Excitatory amino acids in epilepsy / E.M. Urbanska, S.J. Czuczwar [et al.]//Restorative neurology and neuroscience. – 1998. – T.13. – №1,2. – C.25-39.
341. Üre, A. Block of spontaneous termination of paroxysmal depolarizations by forskolin (buccal ganglia, Helix pomatia) / A. Üre, U. Altrup // Neuroscience letters. – 2006. – T. 392. – №. 1-2. – C. 10-15.

- 342.ur Rehman, M. Mannich Base derivatives of Benzimidazole: Synthesis & Antimicrobial properties—A Short Review / M. ur Rehman, M. Imran, M. Arif [et al.] // W. Appl. Program. – 2013. – T. 3. – №. 12. – C. 558-564.
- 343.Velíšková, J. Ketamine suppresses both bicuculline-and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis / J. Velíšková, L. Velíšek, P. Mareš [et al.] // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1990. – T. 37. – №. 4. – C. 667-674.
- 344.Velíšková, J. Ethosuximide suppresses seizures and lethality induced by picrotoxin in developing rats / J. Velíšková, L. Velíšek, P. Mareš [et al.] // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1993. – T. 44. – №. 4. – C. 975-979.
- 345.Verheij, M.M.M. Mesolimbic alpha-, but not beta-adrenoceptors control the accumbal release of dopamine that is derived from reserpine-sensitive storage vesicles/ M.M.M. Verheij, A.R. Cools // Neuroscience. – 2009. – V. 162. - № 4. – P. 1163-1173.
- 346.Vinkers, C.H. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective G A B A A Receptor Modulators? / C.H. Vinkers, B. Olivier // Advances in pharmacological sciences. – 2012. – T. 2012.
- 347.Vogel, H. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays / H. Vogel. – Springer Science & Business Media, 2007. – T. 1. – C. 615.
- 348.Wagner, J.J. Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus / J.J. Wagner, G.W. Terman, C. Chavkin // Nature. – 1993. – T. 363. – №. 6428. – C. 451.
- 349.Walker, M.C. New anti-epileptic drugs / M.C. Walker, J.W. Sander // Expert opinion on investigational drugs. – 1999. – T. 8. – №. 10. – C. 1497-1510.
- 350.Wang, Y.H. The role of kappa-opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction / Y.H. Wang, J.F. Sun, Y.M. Tao [et al.] // Acta. Pharmacol. Sin. – 2010. - 31. № 9. – P.1065-1070.

351. Wee, X.K. Mapping the high-affinity binding domain of 5-substituted benzimidazoles to the proximal N-terminus of the GluN2B subunit of the NMDA receptor / X.K. Wee, K.S. Ng, H.W. Leung [et al.] // *British journal of pharmacology*. – 2010. – T. 159. – №. 2. – C. 449-461.
352. Weisskopf, M.G. The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation / M.G. Weisskopf, R.A. Zalutsky, R.A. Nicoll // *Nature*. – 1993. – T. 362. – №. 6419. – C. 423.
353. Werhahn, K.J. Decreased Dopamine D2/D3-Receptor Binding in Temporal Lobe Epilepsy: An [18F] Fallypride PET Study / K.J. Werhahn, C. Landvogt, S. Klimpe [et al.] // *Epilepsia*. – 2006. – T. 47. – №. 8. – C. 1392-1396.
354. Werkheiser J. L. Nalfurafine, the kappa opioid agonist, inhibits icilin-induced wet-dog shakes in rats and antagonizes glutamate release in the dorsal striatum / J. L. Werkheiser, S. M. Rawls, A. Cowan // *Neuropharmacology*. – 2007. – V. 52. – № 3. – P. 925–930.
355. Wheless, J.W. Advanced therapy in epilepsy / J.W. Wheless, J. Willmore, R.A. Brumback. – PMPH-USA, 2009.
356. White, H.S. Anticonvulsant profile of MDL 27,266: an orally active, broad spectrum anticonvulsant agent / H.S. White, S. Patel, B.S. Meldrum // *Epilepsy research* — 1992. — T. 12. – №. 3. – C. 217-226.
357. White, H. S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs / H.S. White, M.D. Smith, K.S. Wilcox // *International review of neurobiology*. – 2007. – T. 81. – C. 85-110.
358. Wickenden, A.D. Potassium channels as anti-epileptic drug targets / A.D. Wickenden // *Neuropharmacology*. – 2002. – T. 43. – №. 7. – C. 1055-1060.
359. Williams-Karnesky, R.L. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis / R.L. Williams-Karnesky, U.S. Sandau [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – T. 123. – №. 8. – C. 3552-3563.
360. Willmore, L.J. Clinical pharmacology of new antiepileptic drugs / L.J. Willmore // *Neurology*. – 2000. – T. 55. – №. 11 Suppl 3. – C. S17-24.

361. Woolley, D.W. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines / D.W. Woolley // *J Biol Chem.* – 1944. – T. 152. – C. 225-232.
362. Wulff, H. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets / H. Wulff, N.A. Castle, L.A. Pardo // *Nature reviews Drug discovery.* – 2009. – T. 8. – №12. – C. 982.
363. Wuttke, T.V. Novel anticonvulsant drugs targeting voltage-dependent ion channels / T.V. Wuttke, H. Lerche // *Expert opinion on investigational drugs.* – 2006. – T. 15. – №. 10. – C. 1167-1177.
364. Xu, X. H. GABA transporter-1 inhibitor NO-711 alters the EEG power spectra and enhances non-rapid eye movement sleep during the active phase in mice / X.H. Xu, M.H. Qiu, H. Dong [et al.] // *European Neuropsychopharmacology.* – 2014. – T. 24. – №. 4. – C. 585-594.
365. Yadav, G. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review / G. Yadav, S. Ganguly // *European journal of medicinal chemistry.* – 2015. – T. 97. – C. 419-443.
366. Yajima, Y. Effects of differential modulation of μ -, δ -and κ -opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse / Y. Yajima, M. Narita, Y. Takahashi-Nakano [et al.] // *Brain research.* – 2000. – T. 862. – №. 1-2. – C. 120-126.
367. Yamaguchi, S. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice / S. Yamaguchi, M.A. Rogawski // *Epilepsy research.* – 1992. – T. 11. – №. 1. – C. 9-16.
368. Yerragunta, V. Benzimidazole Derivatives and its Biological Importance: A Review / V. Yerragunta, P. Patil, S. Srujana [et al.] // *PharmaTutor.* – 2014. – T. 2. – №. 3. – C. 109-113.
369. Yilmaz, B. Kappa opioid modulation of serotonergic neurotransmission in the hypothalamus, hippocampus and striatum in the male rat / B. Yilmaz, S. Sandal, S. Canpolat [et al.] // *Firat Tıp Dergisi.* – 2006. – T. 11. – C. 12-15.
370. Ying, S.W. Dendritic HCN2 channels constrain glutamate-driven excitability in reticular thalamic neurons / S.W. Ying, F. Jia, S.Y. Abbas [et al.] // *Journal of Neuroscience.* – 2007. – T. 27. – №. 32. – C. 8719-8732.

371. Zaccara, G. AMPA receptor inhibitors for the treatment of epilepsy: the role of perampanel / G. Zaccara, F. Giovannelli, M. Cincotta [et al.] // *Expert review of neurotherapeutics*. – 2013. – T. 13. – №. 6. – C. 647-655.
372. Zangrandi, L. Activation of kappa opioid receptors reduces EEG seizure activity in a mouse model of temporal lobe epilepsy / L. Zangrandi, C. Schwarzer // *BMC Pharmacology*. – 2011. – T. 11. – №. Suppl 2. – C. A10
373. Zangrandi, L. Activation of kappa opioid receptors reduces seizure activity in a dose-dependent way / L. Zangrandi, C. Schwarzer // *BMC pharmacology & toxicology*. – 2012. – T. 13. – №. Suppl 1. – C. A91.
374. Zangrandi, L. The G-protein biased partial κ opioid receptor agonist 6'-GNTI blocks hippocampal paroxysmal discharges without inducing aversion / L. Zangrandi, J. Burtscher, J.P. MacKay [et al.] // *British journal of pharmacology*. – 2016. – T. 173. – №. 11. – C. 1756-1767.
375. Zhang, L. Novel κ -opioid receptor agonist MB-1C-OH produces potent analgesia with less depression and sedation / L. Zhang, J. Wang, J. Chen [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2015. – T. 36. – №. 5. – C. 565.
376. Zimmerman, G. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats / G. Zimmerman, M. Njunting, S. Ivens [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2008. – T. 27. – №. 4. – C. 965-975.
377. Zuliani, V. Sodium channel blockers: a patent review (2010-2014) / V. Zuliani, A. Rapalli, M.K. Patel [et al.] // *Expert opinion on therapeutic patents*. – 2015. – T. 25. – №. 3. – C. 279-290.