

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ГОРБУНОВА ЮЛИЯ ВАСИЛЬЕВНА

**ПСИХОТРОПНАЯ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук,

профессор

Тюренков Иван Николаевич

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

доктор химических наук, профессор

Озеров Александр Александрович

Волгоград, 2019

Оглавление

Введение.....	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Спектр биологической активности производных хиназолина.....	11
1.2. Заключение по главе 1.....	30
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....	31
2.1. Экспериментальные животные.....	31
2.2. Исследуемые соединения и препараты сравнения.....	33
2.3. Статистическая обработка результатов исследования.....	36
2.4. Дизайн исследования.....	36
2.5. Экспериментальные методы, использованные при проведении скрининга нейропсихотропной активности исследуемых соединений.....	38
2.6. Экспериментальные методы, использованные при проведении дополнительного изучения нейропсихотропной активности наиболее активных соединений.....	46
2.7. Методы изучения острой токсичности наиболее активных веществ.....	51
2.8. Экспериментальные методы, использованные при изучении нейропротекторного действия соединения VMA-10-18 при острой фокальной ишемии и при ХНМК.....	52
2.9. Экспериментальные методы, использованные при изучении возможных механизмов действия наиболее активного соединения.....	60
ГЛАВА 3. Скрининговое изучение психотропной активности новых производных хиназолина.....	64
3.1. Изучение влияния группы простых эфиров - производных хиназолин- 4(3 <i>H</i>)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность.....	64
3.2. Изучение влияния амидных производных хиназолин-4(3 <i>H</i>)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность ..	75

3.3. Изучение влияния сложнзамещенных амидных производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность..... 88

ГЛАВА 4. Дополнительное изучение психотропной активности наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она в сравнении с референтными препаратами 103

4.1. Изучение антиамнестического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она..... 103

4.2. Изучение анксиолитического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она..... 104

4.3. Изучение антидепрессивного действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она..... 106

4.4. Изучение противогипоксического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она на моделях гистотоксической гипоксии и модели острой ишемии головного мозга..... 107

4.5. Изучение острой токсичности наиболее активного производного хиназолин-4(3H)-она соединения VMA-10-18 на мышах и крысах 116

ГЛАВА 5. Изучение нейропротективной активности соединения VMA-10-18 при нарушениях мозгового кровообращения..... 118

5.1. Изучение нейропротекторного действия соединения VMA-10-18 при моделировании фокальной ишемии путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии..... 118

5.2. Изучение нейропротективного действия соединения VMA-10-18 на животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения..... 126

5.2.1. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на поведение животных с ХНМК..... 127

5.2.2. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на сенсомоторный дефицит у животных с ХНМК 129

5.2.3. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на уровень кровотока в сонных артериях и в проекции средней мозговой артерии	135
5.2.4. Изучение влияния курсового введения наиболее соединения VMA-10-18 на функциональное состояние эндотелия крыс с ХНМК.....	137
5.2.5. Изучение влияния соединения VMA-10-18 на утилизацию глюкозы мозгом при ХНМК.....	139
ГЛАВА 6. Изучение нейрофармакологического взаимодействия нового производного хиназолина	141
6.1. Изучение взаимодействия производного хиназолина с дофаминергической нейромедиаторной системой головного мозга	141
6.2. Изучение взаимодействия производного хиназолина с холинергической нейромедиаторной системой.....	142
6.3. Изучение взаимодействия производного хиназолина с серотонинергической системой	144
6.4. Изучение взаимодействия производного хиназолина с ГАМК-ергической системой	145
ГЛАВА 7. Заключение.....	149
Выводы.....	160
Практические рекомендации.....	162
Список сокращений.....	163
Список литературы	164

Введение

Актуальность темы исследования

Согласно данным ВОЗ распространенность психических и неврологических нарушений неуклонно растет и достигает по численности во всем мире более миллиарда больных [https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_391-2410-prevalence-of-mental-disorders/ (дата обращения 01.07.2019)]. В настоящее время имеющиеся лекарственные препараты не в полной мере удовлетворяют современным требованиям при лечении психических и неврологических расстройств, либо являются недостаточно эффективными, или в связи с побочными эффектами, влияющими на качество жизни [de Kinderen R.J., 2014; Alberti P., 2014; Grupke S., 2015; Creamer M., 2018; Nag N., 2019; Данилов В.И., 2014]. Частой причиной или следствием деменции, дефицитарных и психотических нарушений являются различные патологии мозгового кровообращения и перенесенный инсульт [Стаховская Л.В., 2014; Wanleenuwat P., 2019; Escher C., 2019; Zhang L., 2019; Arvanitakis Z., 2019]. Ежегодно в мире от инсульта погибают около 5 млн человек и 15 млн переносят не фатальный инсульт [Feigin V.L., 2015; Samorodskaya I.V., 2018; Pinheiro L.C., 2019]. Поэтому одним из современных направлений в поиске и создании новых препаратов для лечения цереброваскулярных заболеваний и сопутствующих им психоэмоциональных и когнитивных нарушений является разработка препаратов с поливалентным действием [Speck-Planche A., 2015; Кожина А. В., 2015; Чичёва М.М., 2017; Соснов А.В., 2017; Gontijo V.S., 2019; Bellera C.L., 2019; Wang T., 2019].

Природные и синтетические производные хиназолина, имеющие широкий спектр фармакологической активности: противовоспалительное, [Волошина А.Д., 2017; Haile P.A., 2019; Hu J., 2015; Moussa G., 2018] антихолинэстеразное [Sarfraz M., 2017; Gálvez J., 2018; Cai R., 2019], антиоксидантное [Al-Salahi R., 2018; Sivaguru P., 2017; Chaudhari P.S., 2018], антигипоксическое [Cheng W., 2014; Cheng

W., 2015], ноотропное [Геращенко А.Д., 2017], антидепрессантное [Zhang H.J., 2015], вазодилатирующее, антигипертензивное [Sen Li., 2016; Belenichev I., 2018; Pathak S.R., 2014; Mujeeb Ur Rahman, 2014], антипсихотическое и противосудорожное действие [Zhang H.J., 2015; El Kayal W.M., 2019] и являются привилегированным классом химических соединений для поиска среди новых производных этого ряда эффективных средств для лечения психоневрологических, сердечно-сосудистых и других патологий [Sadek B., 2016; Kubacka M., 2019].

В связи с вышеизложенным, поиск высокоэффективных и безопасных веществ среди природных и синтетических производных в химическом классе хиназолинов для лечения психических и неврологических нарушений и патологий нарушения мозгового кровообращения, представляется перспективным и целесообразным [Zuo S.J., 2014; Джигалюк О.В., 2019].

Степень разработанности темы

За последние годы проведено множество исследований, посвященных изучению различных видов биологической активности производных хиназолинов [Ding P.P., 2016; El-Messery S.M., 2016; Самотруева М.А., 2016; El-Gazzar Y.I., 2017; Григорян Н.П., 2017; Saravanan G., 2018; Григорян Н.П., 2017, 2018; Насруллаев А.О., 2017; Hemalatha K., 2016], но спектр психотропного и нейропротективного действия простых эфиров, амидных производных и сложнозамещенных амидных производных производных хиназолин-4(3H)-она [Григорян Н.П., 2018; Волокитина Д.С., 2018; Джигалюк О.В., 2019; Long S., 2019; Бурчинский С.Г., 2015] мало изучены. Это делает основание считать, что поиск в ряду новых производных хиназолин-4(3H)-она веществ с нейропсихотропными и церебропротективным действием является целесообразным.

Целью настоящего исследования является поиск соединений в ряду новых производных хиназолин-4(3H)-она с нейропсихотропными и нейропротективными свойствами (при нарушениях мозгового кровообращения), а также изучение некоторых аспектов их механизма действия.

Для достижения вышеуказанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести скрининг в группах простых эфиров, амидных производных и сложнозамещенных амидных производных хиназолин-4(3*H*)-она веществ с нейрорепродуктивным действием.

2. Изучить антиамнестическое, анксиолитическое и антигипоксическое действие наиболее активных производных хиназолин-4(3*H*)-она.

3. Определить острую токсичность, провести анализ зависимости фармакологического эффекта от дозы для наиболее активных производных хиназолин-4(3*H*)-она.

4. Изучить влияние соединения VMA-10-18 на неврологический дефицит, психоэмоциональное состояние, сенсорно-моторные и когнитивные функции у животных, перенесших острое и хроническое нарушение мозгового кровообращения.

5. Изучить влияние соединения VMA-10-18 на уровень локального мозгового кровотока (МК) и эндотелий-зависимую вазодилатацию при хроническом нарушении мозгового кровообращения (НМК).

6. Провести нейрорепродуктивный анализ возможного механизма действия наиболее активного соединения VMA-10-18, обладающего наиболее выраженной репродуктивной и нейрорепродуктивной активностью.

Научная новизна

Впервые получены данные о спектре репродуктивного действия 17 новых производных хиназолин-4(3*H*)-она и выявлены репродуктивные, анксиолитические, антидепрессантные, антигипоксические свойства.

Впервые изучена и выявлена высокая нейрорепродуктивная активность нового производного хиназолина 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он под лабораторным шифром VMA-10-18, его нейрорепродуктивное действие при остром и хроническом нарушении мозгового кровообращения, антигипоксическое, эндотелиопротективное действие.

Впервые проведено изучение возможного механизма репродуктивного и репродуктивного действия наиболее активного соединения VMA-10-18.

Теоретическая и практическая значимость работы

Скрининговое исследование позволило определить спектр психотропной активности 3-х новых подгрупп: простых эфиров, амидных и сложнозамещенных амидных производных хиназолина, выявить наиболее эффективное вещество и оптимальные дозы соединения VMA-10-18, в котором оно оказывало антидепрессантное, анксиолитическое, ноотропное и нейропротективное действие. Высокий терапевтический потенциал при остром и хроническом НМК (вещество активно в дозе 2,5-5-10 мг/кг), а также низкая токсичность (более 5 г/кг при приеме *per os*), свидетельствует о перспективности разработки на его основе лекарственного препарата для коррекции нарушений мозгового кровообращения и сопутствующих им нейро- и психических патологий. Это позволило в рамках Федеральной программы «Фарма 2020» получить финансовую поддержку и провести химиками и фармакологами ВолгГМУ в полном объеме доклинические исследования по государственному контракту № 14.N08.12.0142 от «02» июня 2017 г. «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения нарушений мозгового кровообращения на основе производного хиназолина» с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Получены данные цереброваскулярном, нейропротективном и психотропном и возможном нейропретективном действии исследуемого производного хиназолина 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он свидетельствует о его полимодальном и политаргетном действии. Результаты выполненного исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшего направленного химического синтеза и поиска в ряду новых производных хиназолина веществ с психотропной и нейропротекторной активностью.

Методология и методы исследования

При проведении экспериментальных работ использовался комплексный подход к оценке фармакологической активности производных хиназолина в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н. и др., 2012]. Исследования выполнены с соблюдением этических норм работы с лабораторными животными

на современном уровне, при необходимом количестве экспериментальных животных с применением валидных экспериментальных моделей на оборудовании, отвечающим поставленным задачам. Заключение и выводы о проведенных экспериментах сделаны на основании литературных данных и собственных исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Простые эфиры, но в большей степени амидные производные хиназолин-4(3*H*)-она обладают выраженными психотропными свойствами (анксиолитическим, антидепрессивным и ноотропным действием).

2. Среди эфиров амидных производных хиназолин-4(3*H*)-она выделено соединение с лабораторным шифром VMA-10-18, которое оказывает выраженное анксиолитическое, антидепрессивное, ноотропное, антигипоксическое и нейропротективное действие при острых и хронических НМК, повышая показатели выживаемости животных и уменьшая неврологический дефицит.

3. Психотропные эффекты обусловлены активацией ГАМК-ергической и М-холинергической системой мозга (ноотропное) и дофаминергическим действием (активирующее и антидепрессивное).

4. Нейропротективные свойства соединения VMA-10-18 обусловлены улучшением МК, связанным с улучшением эндотелийзависимой вазодилатации, его антигипоксическими и антиоксидантными свойствами.

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие на всех этапах планирования и выполнения экспериментальной части работы, статистической обработке и описании полученных данных, а также в подготовке и написании опубликованных по теме диссертации работ, в написании диссертации и автореферата. Проведен скрининг среди большого ряда производных хиназолина, проведен углубленный поиск среди наиболее активных соединений, что отражено в научных публикациях. Автором проведен анализ обзорных и экспериментальных работ, опубликованных за последние 5 лет, касающихся темы диссертации, на основании чего разработан дизайн исследования среди изучаемых соединений.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов проведенных экспериментов подтверждается достаточным объемом выполненных исследований с использованием современных методов и современного оборудования, и общепринятых методов статистической обработки. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на многих научно-практических конференциях: 69-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием – Волгоград, 2011 г., IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» - Казань, 2012 г., IV Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» - Волгоград, 2012 г., 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» - Волгоград, 2013 г., V-ом съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» - Ярославль, 2018 г.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 24 печатных работы, из них 8 в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

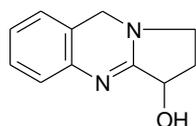
Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы и список используемой литературы, включает 170 источников, из них 63 отечественных и 107 зарубежных. Диссертация содержит 61 таблицу, 17 рисунков.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Спектр биологической активности производных хиназолина

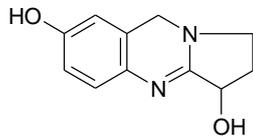
В природе производные хиназолина широко распространены, в настоящее время выделено не менее 150 алкалоидов производных хиназолинового ряда из низших грибов, бактерий и высших растений, которые обладают высокой биологической активностью и многих из них применяются в медицинской практике. Среди алкалоидов хиназолинового ряда наиболее известным является фебрифунгин (Febrifugine), выделенный из листьев и корней китайского лекарственного растения *Dichroa febrifuga*. Фебрифунгин - противомаларийный препарат, он в 100 раз более активен по сравнению с хинином, но более токсичен. Фебрифунгин также оказывает выраженное кокцидостатическое действие [Herman, J.D., 2015; McLaughlin N.P., 2014].

Известным представителем хиназолинового алкалоида, содержащегося в семенах гармалы (могильника, степной руты *Peganum harmala*) – широко распространенного в Средней Азии и на юге Казахстана, а также в ряде других растений, является пеганин (вазицин):



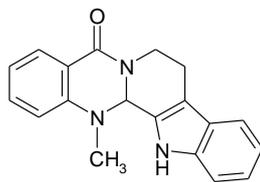
В медицинской практике пеганина гидрохлорид применяется в качестве антихолинэстеразного средства при миастении и миопатии, при атонии кишечника различного происхождения и как слабительное средство при запорах. Полный химический синтез его достаточно прост и описан в доступной литературе [Herraiz T., 2017].

Новый алкалоид пирролохиназолиновой структуры - гидроксильный аналог пеганина был выделен из южно-китайского растения *Linaria vulgaris* [Hua H. A., 2002]:



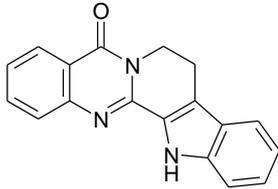
В состав разнообразных анаболических и жиросжигающих препаратов, а также БАДов, применяющихся в спортивном питании входит ряд алкалоидов хиназолиновой структуры, например, эводиамин и рутекарпин из плодов *Evodia rutaecarpa* (используется в китайской народной медицине).

Алкалоид хиназолинового производного – эводиамин был выделен из плодов *Evodia rutaecarpa*, который воздействует на ванилоидовые рецепторы, вызывая разнонаправленные эффекты. Благодаря увеличению уровня холецистокинина алкалоид, выделенный из плодов *Evodia rutaecarpa* подавляет аппетит, уменьшает количество подкожного жира вместе со снижением уровня холестерина и триглицеридов, это привело к широкому использованию в качестве разнообразных жиросжигающих и анаболических препаратов, БАДов, которые применяются в спортивном питании. Эводиамин применяется при лечении раковых заболеваний (развитие рака простаты, лейкемии, меланомы, рака шейки матки, фибросаркомы, рака груди). Эводиамин оказывает благоприятное воздействие на сердечно-сосудистую систему, уменьшает гипоксию, а также может служить средством для лечения эректильной дисфункции, что подтверждено исследованиями на животных [Gavaraskar K., 2015; Poudapally S., 2017; Zhang K., 2019]:



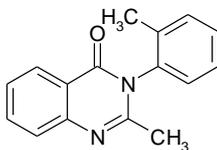
Рутекарпин является представителем индолопиридохиназолинового алкалоида и содержится в растениях семейства рутовые (*Rutaceae*) - *Evodia rutaecarpa*, *Hortia arborea*, *Zanthoxylum rhetsa*, *Spiranthera odoratissima* и другие, которые применяются в традиционной восточной медицине для лечения

желудочно-кишечных нарушений, головных болей, послеродовых осложнений и аменореи. Нейропротекторные эффекты рутекарпина в условиях ишемического поражения головного мозга в эксперименте были отмечены в ряде исследований [Wu Y., 2016]:



Также установлено, что рутекарпин обладает антитромботическим, противоопухолевым, болеутоляющим и противовоспалительным, терморегуляционным и жиросжигающим действиями, и воздействует на эндокринную и сердечно-сосудистую систему [Lee S.H., 2008; Hu J., 2015; Han X., 2019].

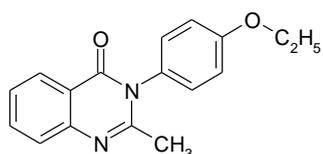
Среди синтетических производных хиназолина широким спектром фармакологической активности обладают многие соединения, которые в качестве эффективных и безопасных терапевтических и профилактических препаратов нашли широкое применение в медицинской практике. Одним из представителей наиболее известных препаратов хиназолинового ряда является метаквалон (Quaalude, Mandrax, Sopor), который был одобрен правительством США в 1966 г. как седативно-гипнотический препарат, не вызывающий привыкания [Hammer H. A., 2015]:



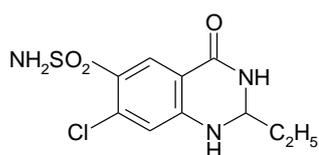
Метаквалон оказывает успокаивающее и снотворное действие, усиливает действие барбитуратов, анальгетиков и нейролептиков, а также обладает умеренной противосудорожной активностью [Машковский М.Д., 1997].

Наиболее известны позже полученные более эффективные аналоги метаквалона: этаквалон, меклоквалон, хлороквалон, нитрометаквалон и препарат лонетил (транквилизатор с седативной активностью).

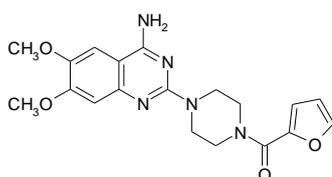
Основными показаниями при применении препарата лонетила являются расстройство сна, тревога, психовегетативные проявления, невротические расстройства. При лечении алкоголизма в клинике лонетил используют для купирования абстинентного алкогольного синдрома, и в период ремиссии. Уменьшение страха, тревоги и раздражительности, нормализации ночного сна, устранение вегетососудистых проявлений способствует лечению данным препаратом. У больных алкоголизмом в период ремиссии, препарат обуславливает снижение патологического влечения к алкоголю, что приводит к устранению психопатологической симптоматики [Магалифа А.Ю., 1999]:



Среди производных хиназолинона большое количество проявляет диуретическое действие не уступающее и даже превышающее действие хлортиазида (на основании зарегистрированных патентов ФРГ, США, Японии и Великобритании). Известен также тиазидный диуретик хинетазон, имеющий, в отличие от известных бензотиадиазинов, хиназолиновую структуру, и широко применяется при лечении артериальной гипертонии, цирроза печени, почечной недостаточности, нефротического синдрома [Carta F., 2013; РЛС, 2017]:

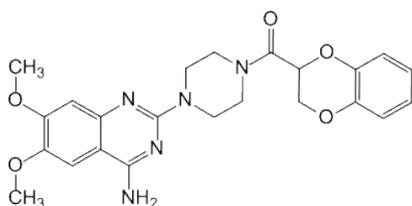


Хиназолиновый цикл лежит в основе химической структуры препарата празозина – мощного и селективного антагониста α_1 -адренорецепторов [Antonello A., 2005]:



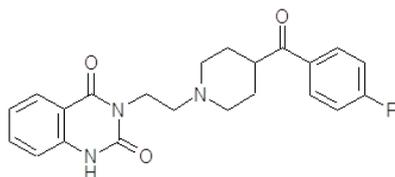
В настоящее время празозин успешно применяется в психиатрии для лечения посттравматического стресса и нарушения сна у детей и взрослых, а также в качестве антигипертензивного средства [Writer B.W., 2014; Akinsanya A., 2017].

Доксазозин – является хиназолиновым соединением, относящимся к α -адреноблокаторам. Его применяют как сосудорасширяющее, спазмолитическое, гипотензивное, гиполипидемическое средство. Он селективно блокирует постсинаптические α_1 -адренорецепторы, снижает общее периферическое сопротивление сосудов. Антигипертензивный эффект частично обусловлен экранированием α_1 -адренорецепторов в ЦНС. Адренолитическое действие в наибольшей степени проявляется в сосудах почек, кожи, в меньшей – в брюшных, церебральных и легочных сосудах [РЛС, 2017]. Во время физической активности вазодилатирующий эффект сильно выражен в почках и коже и меньше степени в мышцах. Уменьшает потребность миокарда в кислороде, снижая пред- и постнагрузку. Системное артериальное давление снижается умеренно без возникновения рефлекторной тахикардии [Wolak T., 2014]. Доксазозин снижает уровень общего холестерина, атерогенных фракций липопротеидов и повышает содержание липопротеинов высокой плотности, подавляет синтез коллагена в сосудистой стенке, ингибирует агрегацию тромбоцитов, увеличивает концентрацию тканевого активатора плазминогена, уменьшает тонус гладкомышечных клеток стромы и капсулы предстательной железы, шейки мочевого пузыря. В клинике доксазозин также используется для лечения гиперплазии простаты и посттравматического стресса [Karaman M.İ., 2014; Ruerke S., 2017; Mohamed T., 2017]:

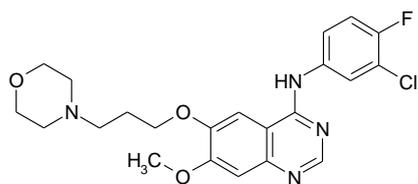


Кетансерин оказывает α -адреноблокирующее действие являясь специфическим антагонистом 5-HT₂-рецепторов. Также препарат вызывает расширение кровеносных сосудов при сочетанном влиянии на 5-HT₂ (S₂)-

серотониновые и α_1 -адренергические рецепторы [Vijaychand A., 2011]. Применяется при лечении артериальной гипертензии, для купирования гипертонических кризов, при нарушениях периферического кровообращения. Назначают кетансерин при тромбозах: периферических тромбофлебитах, геморроидальном тромбозе и др. [РЛС, 2010]:

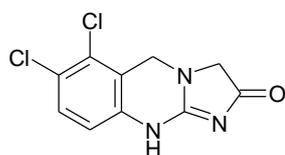


Первым представителем нового класса препаратов среди селективных ингибиторов активности (EGFR) тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста в процессах роста и развития опухолей является гетифиниб (Gefitinib, Iressa) [El-Sayed NNE., 2019]:



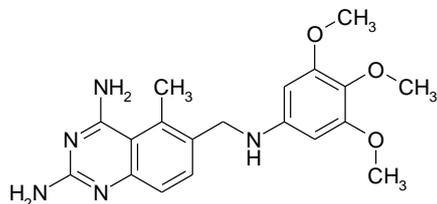
Препарат одобрен FDA в мае 2003 года как монотерапевтическое средство для лечения пациентов с локализованным или метастатическим немелкоклеточным раком легких в тех случаях, когда химиотерапия доцетакселом или другими препаратами оказалась неэффективной [Chouaid C., 2017; Берг К, 2004].

Анагрелид (Anagrelide, Agrylin, Xagrid) – производное имидазоквиназолина:

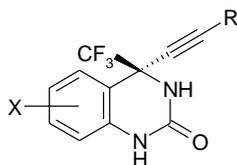


Точный механизм действия анагрелида не установлен. В отношении препарата известно, что он тормозит синтез фосфодиэстеразы. Предполагают, что при полицитемии анагрелид препятствует созреванию мегакариоцитов в тромбоциты. Препарат используют для лечения эссенциального тромбоцитоза, истинной полицитемии, также используется в лечении хронического миелоидного лейкоза [Birgegård G., 2016; Petrides P.E., 2006].

Триметриксат (Trimetrexate, Neutrexin) - ингибитор дигидрофолат редуктазы, используется вместе с лейковорином в лечении пневмоцистной пневмонии, а также лечения пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов [Huang Y.S., 2017; Smith H.O., 2002]:



Ряд производных хиначолина активен в отношении ВИЧ-1, в том числе мутантных штаммов, устойчивых к действию нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1. Например, 4-алкинил-3,4-дигидро-4-трифторметилхиначолин-2(1*H*)-оны – структурные аналоги известного ненуклеозидного анти-ВИЧ-1 препарата эфавиренца, существенно превосходят его *in vitro* и *in vivo* [Corbett J.W., 1999; Magnus N.A., 2000]:

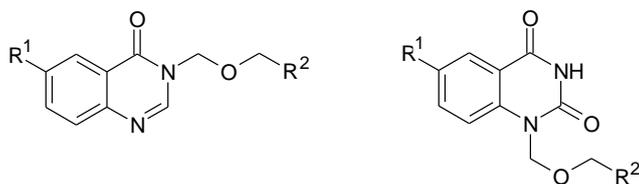


где: R = этил, изопропил, циклопропил, фенил или 2-пиридил; X = 5-хлор или 5,6-дифтор.

Известен ряд соединений нуклеозидного строения, содержащих в качестве нуклеинового основания хиначолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион или его производные. Наиболее интересные биологические свойства продемонстрировал 4-амино-1-(β-D-рибофуранозил)-хиначолин-2(1*H*)-он (хиначолиновый аналог цитидина), активный в отношении вируса герпеса простого типа 1 *in vitro*.

Однако разнообразные аналоги этого соединения, в том числе и 5'-алкольтиопроизводные, синтезированные как потенциальные ингибиторы S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы, оказались неактивными [Chien T.C., 2004; Tazarki H., 2019].

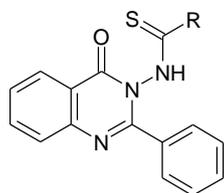
Алкилированием хиназолин-4(3*H*)-она и хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-диона α -хлорэфирами по методу Гилберта-Джонсона были получены N³- или N¹-алкил(арил)оксиметилпроизводные:



где: R¹ = H, Br/NO₂; R² = C₃H₇/C₆H₅

Полученные соединения не проявили противовирусных свойств, но обладали способностью подавлять рост клеток некоторых злокачественных опухолей [Озеров А.А., 1997].

N³-Замещенные 2-фенилхиназолин-4(3*H*)-оны, содержащие фрагменты тиомочевины, в экспериментах на крысах проявили высокую анальгетическую активность и противовоспалительное действие не уступая диклофенаку, а также подавляли рост патогенных микроорганизмов *in vitro*. Активность у диалкиламинопроизводных была выше, чем у ароматических и гетероциклических аналогов [Alagarsamy V., 2002; Moussa G., 2018]:

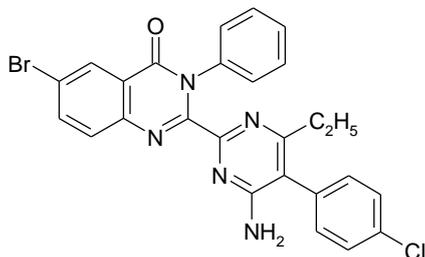


где: R = метиламино, диметиламино, диэтиламино, фениламино, дифениламино, N-пирролидино, N-морфолино или N-пиперазино.

Аналогичным действием обладали близкие по строению 3-замещенные производные 2-бензиламинохиназолин-4(3*H*)-она [Alagarsamy V., 2002].

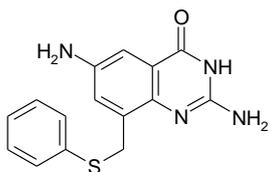
Описан синтез гибридных соединений, содержащих фрагменты хиназолин-4(3*H*)-она и известных пиримидиновых антибактериальных агентов – триметоприма и пириметамина [Dinakaran M., 2003; Jyothi Buggana S., 2019.]. Среди всех синтезированных веществ только комбинация 5-бром-3-фенилхиназолин-4(3*H*)-она и пириметамина формулы проявляла заметную

активность в отношении вируса осповакцины (минимальная ингибирующая концентрация 1,9 мкг/мл):



В отношении других вирусов полученные вещества активности не проявили.

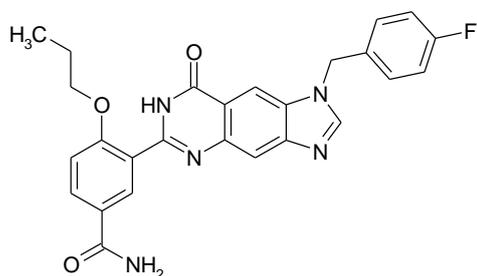
Диаминопроизводные хиназолин-4(3*H*)-она, содержащие арилтиометильный радикал в положении 8, представляют собой новый перспективный класс антибактериальных средств для лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызываемых микроорганизмами семейства *Shigella* – устойчивых к действию многих антибиотиков и вызывающих тяжелые формы дизентерии, смертность от которых в мире превышает 1 миллион случаев в год. Механизм действия этих веществ основан на их способности эффективно ингибировать специфическую т-РНК-гуанинтрансгликозилазу – ключевой фермент, регулирующий бактериальную вирулентность. Наиболее высокую активность имеет 8-фенилтиометилпроизводное (величина константы ингибирования фермента $K_i = 100$ нМ):



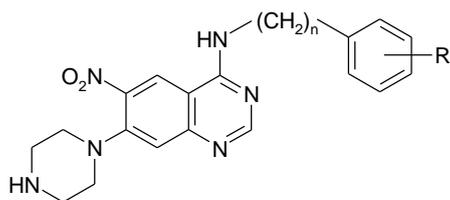
Замена атома серы на кислород или углерод в фенилтиометильной группе, а также замещение фенила на алкильные, циклоалкильные или гетероциклические радикалы приводит к значительному уменьшению ингибиторной активности [Meyer E.A., 2002; Krapf M.K., 2019]. Высокую антибактериальную активность проявляет также ряд диарильных производных хиназолин-4(3*H*)-она [Vizgunova O.L., 1987; Саттарова О.Е., 2006].

Описан синтез N³-замещенных имидазо[4,5-*g*]хиназолинонов, проявляющих выраженную способность ингибировать фосфодиэстеразу типа 5. Одно из

полученных соединений существенно превосходит виагру в экспериментах на животных и позиционируется как препарат для лечения эректильной дисфункции [Rotella D.P., 2000]:



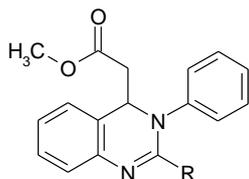
4,7-Дизамещенные 6-нитрохиназолины обладают способностью подавлять продукцию ключевого цитокина - фактора некроза опухоли типа α (TNF- α) и могут быть использованы для лечения таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит, септический шок и рассеянный склероз [Tobe M., 2002; Гражданцева Н.Н., 2011]:



где: R = H, F, Cl, CF₃, NO₂, CN, COOH, C(O)OC₂H₅, C(O)NH₂ или NHC(O)CH₃; n = 1 или 2

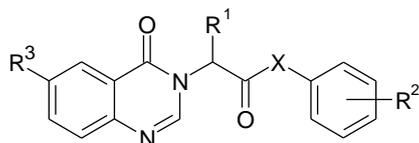
Близкие по структуре 4-анилинопроизводные дизамещенного хиначолина являются ингибиторами тирозинкиназы и проявляют противоопухолевую активность [Jones T.R., 1989; Kreutzberger A., 1993; Баркер Э.Д., 1993; Li Y., 2019].

Корейскими химиками разработан эффективный синтез 2-замещенных 3,4-дигидрохиназолинов, также представляющих интерес в качестве фармакологически активных веществ [Lee B.H., 2004]:



где: R=C₂H₅, CH₃(CH₂)₃, CH₂=CH, CH₂=CHCH₂, C₆H₅/C₆H₅CH₂

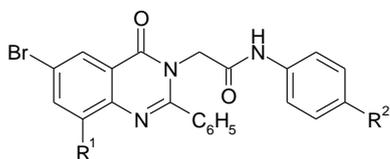
В последние годы был синтезирован и всесторонне исследован широкий ряд ацетанилидных производных хиназолина с общей формулой:



где: X = NH, 1,4-пиперазино; R¹ = H, CH₃; R² = H, o-, m-, p-CH₃, C₂H₅, F, Cl, Br, CF₃, NO₂, OCH₃, OC₂H₅, N(CH₃)₂, 2,3-фенилен, 3,4-фенилен; R³ = H, Br, NO₂

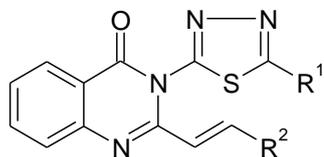
Среди соединений ряда производных хиназолина отмечена ноотропная [Петров В.И., 2014; Тюренков И.Н., 2013; 2015], антидепрессантная, анксиолитическая [Беленичев И.Ф., 2006; Павлов С.В., 2007; Шабельник К.П., 2007], антиоксидантная и противогипоксическая активность [Павлов С.В., 2006].

Некоторые природные и синтетические производные хиназолина оказывают выраженную противосудорожную активность [Mhaske S.B., 2006; Wolfe J.F., 1990]. 6-Бром- и 6,8-дибромпроизводные 2-фенилхиназолин-4(3*H*)-она, содержащие ацетанилидные фрагменты, оказались эффективными конкурентными антагонистами NMDA рецепторов глутаматергической системы мозга [Nerkar A.G., 2012, 2013]:



где: R¹ = H, Br; R² = H, Cl, NO₂

Известны тиадиазолил-производные хиназолин-4(3*H*)-она с общей формулой:



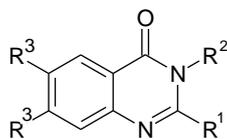
где: R¹ и R² - ароматические заместители, которые также

обладают психоугнетающими и противосудорожными свойствами.

По результатам плавательного теста Порсольты антидепрессивных свойств у этих соединений не обнаружено [Jatav V., 2008].

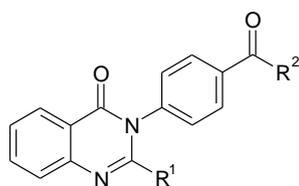
Конденсацией изатового ангидрида с разнообразными ароматическими, гетероциклическими аминами и иминокислотами был получен широкий ряд 3-

замещенных производных хиназолин-4(3*H*)-она, обладающих противовоспалительной активностью и угнетающим действием на ЦНС [Золотых Д.С., 2010; Кодониди И.П., 2012; Оганесян Э.Т., 2004, 2010, 2013]:



где: $R^1 = \text{CH}_3$, C_6H_5 ; $R^2 =$ замещенный фенил, бензил, 2-тиазолил, фрагменты глицина, глицилглицина и γ -аминомасляной кислоты; $R^3 = \text{H}$, OCH_3 .

Среди веществ хиназолинового ряда, обладающих психотропными свойствами, следует выделить производные 3-фенилхинолин-4(3*H*)-она, актопротекторная активность которых сопоставима с бемитилом [Альчук А.И., 2011; Альчук О.И., 2010; Степанюк Г.И., 2009]:



где: $R^1 = \text{H}$, CH_3 , C_2H_5 ; $R^2 = \text{OH}$, ONa , $\text{NHCH}(i\text{-C}_3\text{H}_7)\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$.

Известен ряд разнообразных по химическому строению производных хиназолина, оказывающих влияние на сердечно-сосудистую систему [Somer F., 2001; Kubacka M., 2019].

Систематические исследования 4-тиохинолинов на моделях *in vitro* и *in vivo* выявили их перспективность, как антиоксидантов и антигипоксантов. Данные вещества относятся к малотоксичным или нетоксичным соединениям [Волошина А.Д. 2017]. Установлено проявление алкоксипроизводными (2-метилхинолин-4-илтио) карбоновых кислот значительной антиоксидантной активности на моделях индуцированного свободнорадикального окисления *in vitro* (по генерации супероксид-аниона, монооксида азота и по ингибированию окислительной модификации протеинов). Введение электроноакцепторных функциональных групп в структуру меркаптокарбоновой кислоты приводит к усилению действия [Бражко Е.А., 2015].

Производные хиназолина также обладают кардио-, нейропротекторной и противоишемической активностью. Так соединение МТ-279 – натриевая соль 3-(2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-пропановой кислоты – уменьшает деструктивные изменения в кардиомиоцитах животных, подверженных действию гипокинезии и осуществляет защиту ишемизированного мозга в эксперименте, что проявлялось снижением отсрочкой гибели животных в критический период ОНМК, а также снижением активности нейронспецифической эналазы и нормализацией кислотно-щелочного равновесия и уровня Ca^{2+} в крови [Саенко А.В., 2014; Wu K.J., 2017].

В исследованиях *in vivo* было показано, что соединение DSK-38 (натриевая соль 4-(2-оксо-3-метил-2Н-[1,2,4]триазин[2,3-с]хиназолин-6-ил) бутановой кислоты оказывает противовоспалительный эффект, а также лечебное действие при остром нарушении мозгового кровотока у крыс, что проявилось уменьшением показателя летальности, а также процента животных с тяжелой симптоматикой, улучшением ориентировочно-исследовательской активности, увеличением процента обученных животных при проведении теста УРПИ по сравнению с контрольной группой. Причем оказываемый протективный эффект соединения DSK-38 был сопоставим с таковым у цитиколина. Указанное положительное действие обоих лечебных средств при проявлениях неврологического дефицита, вероятно, является одним из проявлений цитопротекторного эффекта [Гриб В.В., 2015; Семененко Н. А., 2014].

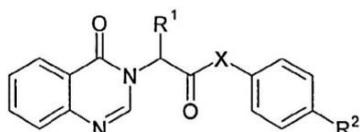
Ингибитор митохондриального деления MDIVI-1, является производным хиназолина, который ингибирует расщепление белка Drp1. По результатам проведенных исследований установлено, что в качестве селективного ингибитора Drp1, MDIVI-1 оказывает защитное действие в условиях экспериментальных ишемически-реперфузионных повреждений как сердца, так и головного мозга. При этом его нейропротекторный эффект был дозозависимым, блокировал апоптотическую гибель клеток при ишемии мозга и его реперфузионном повреждении, а также значительно снижал экспрессию Drp1 и цитохрома С [Xie N., 2013; Saver J.L., 2015].

Нейропротекторная активность была показана для хиназолиновых ингибиторов фосфодиэстеразы 7 *in vitro* (в первичных культурах нервных клеток) и *in vivo* (на экспериментальных моделях болезни Паркинсона, травме спинного мозга, в условиях перманентной окклюзии средней мозговой артерии). Эти соединения также проявляли и противовоспалительную активность [Redondo M., 2012; Long S., 2019].

Производные 3-гидрокси-7-хлорхиназолин-2,4-диона являются антагонистами ионотропных глутаматных рецепторов. В исследованиях *in vitro* продемонстрировали свою эффективность в снижении повреждения нейронов в органотипических срезах гиппокампа крысы, а также проявили противосудорожную активность при судорогах, вызванных пентилентетразолом [Colotta V., 2012].

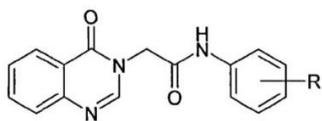
На основании проведенного анализа спектра биологической активности было целесообразно провести патентный поиск с целью поиска соединений с психотропной и нейропротективной активностью разрабатываемого средства [Nameed A., 2018].

В патенте РФ №2507199 «Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью» представлены соединения, которые на экспериментальных моделях *in vivo* обладали оригинальным спектром психотропного действия, превосходя по комплексу полезных свойств препараты различных фармакологических групп – афобазол, мелипрамин, фенотропил, диазепам и рекомендованные для дальнейшего широкого применения при лечении больных с тревожно-депрессивными расстройствами:

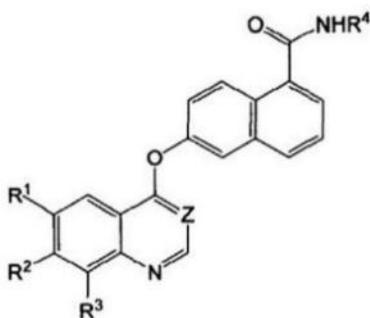


Изобретение, представленное в патенте РФ № 2507198 «Производные хиназолина, обладающие ноотропной и антигипоксической активностью», относится к области органической химии и медицины, а именно к новым

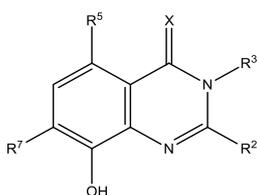
производным хиназолина, обладающим выраженной ноотропной и антигипоксической активностью, которые могут быть использованы для лечения широко распространенных заболеваний центральной нервной системы:



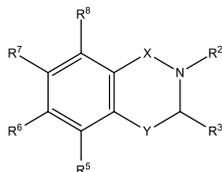
Патентуемые субстанции, патент РФ №2497809 «Производные нафталинкарбоксамиды в качестве ингибиторов протеинкиназы и гистондеацетилазы, способы их получения и применение», могут быть использованы для лечения воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, онкологических заболеваний, заболеваний нервной системы и нейродегенеративных заболеваний, аллергий, астмы, сердечно-сосудистых заболеваний и метаболических заболеваний или заболеваний, связанных с гормональными расстройствами:



Соединение относится к новым веществам, обладающим антиамилоидогенным действием, способу их получения и применению в качестве активного компонента для получения фармацевтической композиции и лекарственного средства [патент РФ №2420520 «Неврологически-активные составы»]. Соединения могут быть использованы для лечения неврологических состояний, более конкретно, для лечения нейродегенеративных состояний, таких как болезнь Альцгеймера:

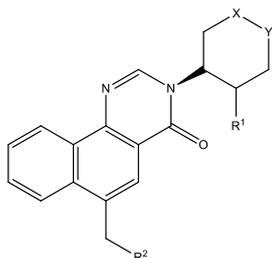


Патентуемое соединение может быть использовано для приготовления лекарства для лечения расстройств человека, причем это расстройство или заболевание реагирует на модуляцию АМРА-рецепторного комплекса ЦНС [патент РФ № 2214405 «Новые соединения и их применение в качестве положительных модуляторов АМРА-рецепторов»]. Может применяться в случаях, где эти расстройства или заболевания вызваны из-за нарушения памяти и нарушения способности к обучению, психотического расстройства, сексуальной дисфункции, ухудшения умственных способностей, шизофрении, депрессии, аутизма, болезни Альцгеймера, дефицита способности к обучению, дефицита внимания, потери памяти и старческой деменции или из расстройства или заболевания, являющегося следствием травмы, инсульта, эпилепсии, болезни Альцгеймера, воздействия нейротоксических агентов, старения, нейродегенеративного расстройства, алкогольной интоксикации, токсикомании, хирургического вмешательства с использованием аппарата искусственного кровообращения или церебральной ишемии:

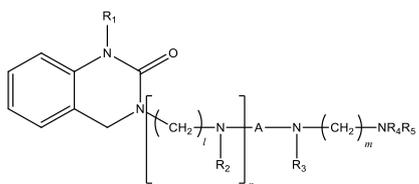


Однако данный патент прекратил свое действие.

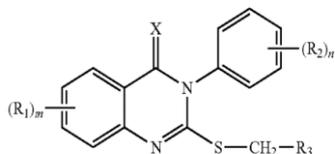
Патентуемое соединение относится к положительными аллостерическими модуляторами рецептора М1 [патент РФ № 2507204 «Положительные аллостерические модуляторы М1-рецепторов на основе пираниларилметилбензохиназолинона»] и которые применимы для лечения заболеваний, в которых задействован рецептор М1, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, болевые расстройства или нарушения сна:



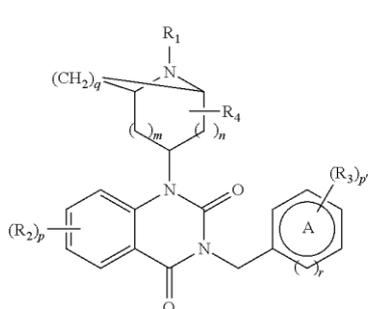
Предлагается новое производное хиназолин-2,4-диона в качестве антиоксиданта, антиконвульсанта и вазодилататора, а также для улучшения памяти, профилактики и лечения инсульта, нейродегенеративных заболеваний, болезни Альцгеймера и эпилепсии [патент US №20100311769 «Новые производные хиназолин-2,4-диона и фармацевтическая композиция для профилактики или лечения неврологических заболеваний головного мозга»]:



Применение S-замещенных хиназолинов, ингибирующих фермент фосфодиэстеразу 7 (ФДЭ7) [патент US № 20160340320 «S-замещенные хиназолины и их терапевтическое применение для лечения заболеваний, опосредуемых фосфодиэстеразой-7»], для профилактики воспалительных, нейродегенеративных, неврологических, психиатрических и аутоиммунных заболеваний:

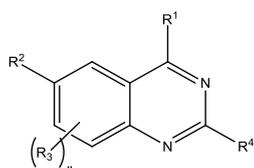


Предложено применение производного хиназолина [патент US № 20120058987 «Терапевтическое использование производных хиназолиндиона»] для лечения и/или профилактики психических или неврологических расстройств, связанных с тревогой и депрессией, расстройств, связанных с заболеваниями психосоматического происхождения: панические атаки, эпилепсия, нарушения памяти, когнитивные расстройства, а также расстройств, связанных с травмой, ишемией головного мозга:

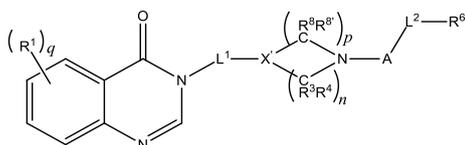


(1)

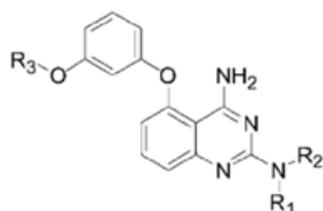
Предложен метод ингибирования активности/функции фосфатидилинозитол-3-киназы с использованием производных хиназолина [патент US № 20090018131 «Производные хиназолина в качестве ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы»], а также применение данных соединений в качестве лечения аутоиммунных, воспалительных, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, аллергии, астмы, панкреатита, мультиорганной недостаточности, заболеваний почек, нарушений агрегации тромбоцитов, рака, нарушений подвижности сперматозоидов, отторжения трансплантата и повреждения легких:



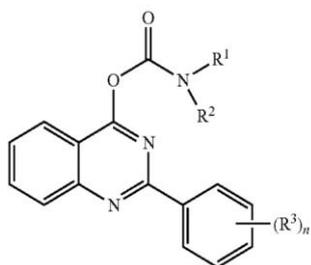
Предложены производные хиназолина, являющихся селективными и обратимыми ингибиторами убиквитин-специфической протеазы USP47 [патент US № 20140371247 «Производные хиназолина в качестве киназных ингибиторов»], предполагаемые к использованию в качестве лечения воспалительных и нейродегенеративных заболеваний:



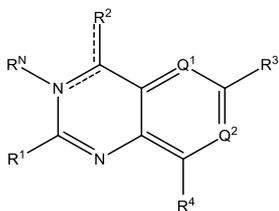
Изобретение раскрывает применение производных хиназолина в регуляции пролиферации и дифференцировки нейронных стволовых клеток [патент CN № CN106632091 A «Применение хиназолиновых соединений в регуляции пролиферации и дифференцировки нейронных стволовых клеток»], которое может применяться для восстановления повреждений нервов и лечения нейродегенеративных заболеваний и заболеваний нервной системы:



Изобретение относится к новым гетероциклическим соединениям на основе хиназолинового каркаса [патент US № 20170217907A1 «Соединения на основе хиназолиновых оснований, фармацевтические композиции и способы их использования»], которые эффективно связываются с белком транслокатора митохондрий (TSPO) и противодействуют процессам гибели клеток. Изобретение также относится к способам использования этих соединений для профилактики и лечения травматических повреждений головного мозга, нейродегенеративных заболеваний, включая основные и связанные с ними патологические и психические расстройства:



Предложены производные хиназолина, способные ингибировать активность ряда киназ (Rho, AKT, p70S6K, LIM, IKK, Fit, Aurora, Src) [патент US № 2010056758 A1 «Производные хиназолина в качестве киназных ингибиторов»]. Соединения могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии, атеросклероза, стенокардии, церебрального вазоспазма, инсульта, слабоумия, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, дегенерации нейронов, бокового амиотрофического склероза и травмы спинного мозга:



1.2. Заключение по главе 1

Из проанализированных литературных данных и патентов наиболее близкими по структуре являются соединения представленные в патентах РФ №2507199 «Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью» и №2507198 «Производные хиназолина, обладающие ноотропной и антигипоксической активностью». Однако в них нет указаний на возможность использования в качестве нейропротективных средств для профилактики и терапии нарушений мозгового кровообращения, не показана способность влиять на мозговое кровообращение и способность веществ уменьшать выраженность постишемических неврологических нарушений.

Интерес к расширению биологических эффектов, оказываемых этими соединениями, растет экспоненциально, о чем свидетельствует большое количество публикаций, сообщающих о легкой доступности этих скелетов в дополнение к разнообразному характеру синтетических и биологических применений.

Таким образом, изучение новых производных хиназолина в качестве средств с психотропной и нейропротективной активностью является актуальной и целесообразной, и в дальнейшем может позволить повысить эффективность фармакотерапии пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения и с психоневрологическими нарушениями, а учитывая возможный поливалентный спектр фармакологических эффектов, позволит минимизировать число лекарственных средств у пациентов с этими нарушениями.

Производные хиназолина имеют ряд отличительных особенностей: полимодальный механизм действия, широкий спектр биологических свойств, что свидетельствует о перспективности поиска средств с психотропным и нейропротективным действием в ряду новых производных хиназолина.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Экспериментальные животные

Экспериментальные исследования выполнены на 222 беспородных крысах-самцах массой 200-250 г, на 168 беспородных мышках-самцах весом 18-25 г. (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», д. Рапполово, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., Россия). Содержание животных и все манипуляции с ними во время проведения исследований выполнялись с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33044-2014. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартинформ, 2015. - 11 с.) со свободным доступом к воде и пище (гранулированный корм (ГОСТ Р 51849-2001, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) и в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»).

Крысы и мыши содержались в пластиковых клетках (545x395x200 мм, Тип: Т/4В, ООО «МЭСТ», г. Москва) на подстилке из древесных стружек мягких пород. Клетки оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Животные имели доступ к поилкам и кормушкам постоянно. В состав корма входили гранулированные комбикорма (ГОСТ Р 51849-2001, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия), зерно, зернопродукты и сочные корма (овощи). В составе комбикорма на 100 г продукта приходится: белков – 18%, жиров – 6%, зольных продуктов – 7%, клетчатки – 3,5%, витаминов А– 5000 МЕ, D – 500 МЕ, E– 50 МЕ. Замена воды в поилках производилась ежедневно.

Животные получали воду, соответствующую ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток вода из централизованных систем питьевого водоснабжения».

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды – температура воздуха в пределах 20-22°C и 40-60% относительной влажности. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения, в течение светового дня (совмещенный тип освещения – естественное и люминесцентное).

Бактерицидная обработка вивария производилась передвижными бактерицидными лампами перед началом размещения животных по истечению периода карантина, а затем еженедельно в период проведения эксперимента.

Данное исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [под ред. Миронова А.Н., 2012 г.] [34], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161) и согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 и Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики" [47]). В настоящей работе были использованы методические подходы, соответствующие требованиям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.).

Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

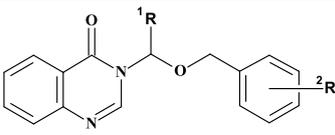
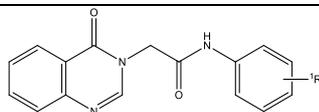
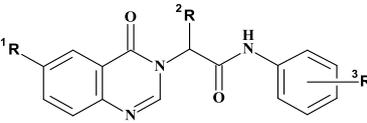
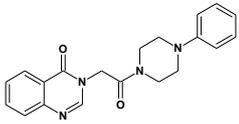
Экспериментальное исследование одобрено этическим комитетом (протокол №153-2012). При формировании экспериментальных групп животные помещались в отдельные клетки по пять животных в каждой клетке. Все экспериментальные исследования с животными во избежание влияния на результаты исследования циркадных биоритмов проводились в один и тот же интервал времени и при одинаковых климатических условиях (длительные эксперименты планировались так, чтобы сроки их выполнения укладывались в одно время года (весна), эксперименты не проводились в периоды резких изменений погоды). При проведении хронических экспериментов животные были адаптированы к человеческому фактору путем ежедневного предварительного 2-х недельного хэндлинга, и на момент проведения экспериментов все животные были здоровы (не были обнаружены изменения шерстяного покрова, слизистых, поведения, аппетита, режима сна и бодрствования).

Эвтаназия проведена с помощью декапитации у крыс, находящихся под хлоралгидратным наркозом, согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [34].

2.2. Исследуемые соединения и препараты сравнения

В работе исследовалось 17 новых производных хиназолин-4(3*H*)-она с лабораторными шифрами VMA. Все изучаемые соединения были разделены на 3 группы согласно химической структуре и дополнительным радикалам: простые эфиры производных хиназолин-4(3*H*)-она, амидные производные хиназолин-4(3*H*)-она и сложнозамещенные амидные производные хиназолин-4(3*H*)-она. Все исследуемые соединения были синтезированы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета (Волгоград, Россия). Лабораторные шифры, структурные формулы и радикалы исследуемых соединений приведены в Таблица 1.

Таблица 1 - Лабораторные шифры и структурные формулы изучаемых соединений

1 группа: простые эфиры производных хиназолин-4(3H)-она				
				
Шифр	R ¹	R ²	Солевая форма	Mm
VMA-10-06	H	H	гидрохлорид	302,76
VMA-10-03	H	3-CH ₃ , 5-CH ₃	основание	294,36
VMA-10-04	H	3-CH ₃ , 5-CH ₃	гидрохлорид	330,82
VMA-10-05	CH ₃	H	гидрохлорид	316,79
2 группа: амидные производные хиназолин-4(3H)-она				
				
Шифр	R ¹			Mm
VMA-10-11	H			279,3
VMA-10-13	2-CH ₃			293,33
VMA-10-14	4-CH ₃			293,33
VMA-10-18	4-OCH ₃			309,33
VMA-10-10	4-N(CH ₃) ₂			322,37
VMA-10-07	2-CH ₃ , 6-CH ₃			307,36
VMA-10-19	2-CH ₃ , 4-NO ₂			338,33
VMA-10-16	2,3-фенилен			329,36
3 группа: сложнозамещенные амидные производные хиназолин-4(3H)-она				
				
Шифр	R ¹	R ²	R ³	Mm
VMA-10-12	H	CH ₃	H	293,33
VMA-10-15	H	CH ₃	4-CH ₃	293,33
VMA-10-20	H	CH ₃	4-N(CH ₃) ₂	336,40
VMA-10-17	Br	H	2,3-фенилен	408,26
VMA-10-21				348,41

Все соединения исследуемого ряда вводились внутривентрикулярно в 2% крахмальном геле (который каждый раз готовился непосредственно перед началом эксперимента) с использованием специальных желудочных зондов для крыс и мышей.

Ранее проведенные исследования широкого ряда производных хиназолина позволяли выявить психотропные эффекты чаще в дозе 1/30 от молекулярной массы, т.е. в эквимолярных дозах. Вещества, на начальном этапе, вводились в дозе 1/30 от молекулярной массы (мг/кг): VMA-10-06 – 10 мг/кг, VMA-10-03 – 10 мг/кг, VMA-10-04 – 12 мг/кг, VMA-10-05 – 12 мг/кг, VMA-10-11 – 10 мг/кг, VMA-10-13 – 10 мг/кг, VMA-10-14 – 10 мг/кг, VMA-10-18 – 10 мг/кг, VMA-10-10 – 10 мг/кг, VMA-10-07 – 10 мг/кг, VMA-10-19 – 12 мг/кг, VMA-10-16 – 10 мг/кг, VMA-10-12 – 10 мг/кг, VMA-10-15 – 10 мг/кг, VMA-10-20 – 12 мг/кг, VMA-10-17 – 14 мг/кг, VMA-10-21 – 12 мг/кг, при углубленном изучении наиболее активных соединений проводились в широком диапазоне доз.

Все исследуемые соединения растворяли в 2% крахмальном геле (объем введенной жидкости на одно животное составлял из расчета 0,5 мл на 100 г массы животного), который вводился *ex tempore* за 60 мин. до проведения каждой серии экспериментов, соответственно. На начальном этапе соединения вводились перорально в дозах, составляющих 1/30 от молекулярной массы. Контрольная группа получала 2% крахмальную гелевую суспензию в эквивалентном объеме. Исследуемые соединения вводили с использованием специальных желудочных зондов для крыс и мышей.

В качестве препаратов сравнения использовались: фенотропил – 22 мг/кг (синтезирован на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия)*, мелипрамин – 15 мг/кг, (Egis Pharmaceuticals, Венгрия), диазепам – 1 мг/кг (Simplex pharma Pvt. Ltd., Индия), мексидол – 100 мг/кг («НПК Фармасофт», Россия),

* Выражаем искреннюю благодарность О.С. Васильевой и другим сотрудникам кафедры органической химии Российского педагогического университета им. А.И. Герцена (г. Санкт-Петербург) за предоставленную субстанцию фенотропила для проведения исследований.

цитиколин - в дозе 500 мг/кг (Феррер Интернасьональ С.А.), глиатилин – 100 мг/кг (Италфармако С.п.А.), кавинтон - 5 мг/кг (Гедеон Рихтер ОАО).

При проведении скрининга нейрнопсихотропной активности и при изучении зависимости доза-эффект соединения и препараты сравнения вводились однократно, при углубленном изучении фармакологических свойств использовалось системное курсовое лечебное и профилактическое введение, которое описано в соответствующих главах.

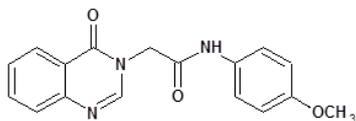
2.3. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов следующих программ: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), BioStat 2008 Professional 5.1.3.1.. При проведении скрининга исследуемых соединений для сравнения средних в случае подчинения данных нормального распределения использовался параметрический t-критерий Стьюдента, с поправкой Бонферрони, и непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При более углубленном изучении наиболее активного соединения использовали метод рангового однофакторного анализа Краскела-Уолиса, критерии Ньюмена-Кейлса и критерий Дана для множественных сравнений. Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. Различия при $p < 0,05$ расценивались как статистически значимыми [Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2006].

2.4. Дизайн исследования

На первом этапе экспериментов проведен скрининг новых производных хиназолин-4(3H)-она на наличие психотропной активности, влияние на психоэмоциональное состояние и когнитивные функции у трех групп производных. Из ряда производных хиназолин-4(3H)-она были выявлены соединения с амнезирующим, анксиолитическим, противосудорожным, противогипоксическим эффектом. Среди 3-х групп наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она с разными заместителями при углубленном

изучении наиболее активным оказалось производное хиназолина 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он под лабораторным шифром VMA-10-18:



На втором этапе экспериментов проведено изучение острой токсичности соединения VMA-10-18 при внутрижелудочном введении, изучение нейропротективного действия при нарушениях мозгового кровообращения путем моделирования необратимой окклюзии общих сонных артерий, фокальной ишемии путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии и хроническом нарушении мозгового кровообращения с оценкой психоэмоционального состояния, сенсомоторной и когнитивной функции животных.

На третьем этапе были изучены некоторые механизмы, объясняющие психотропные и нейропротективные свойства соединения VMA-10-18.

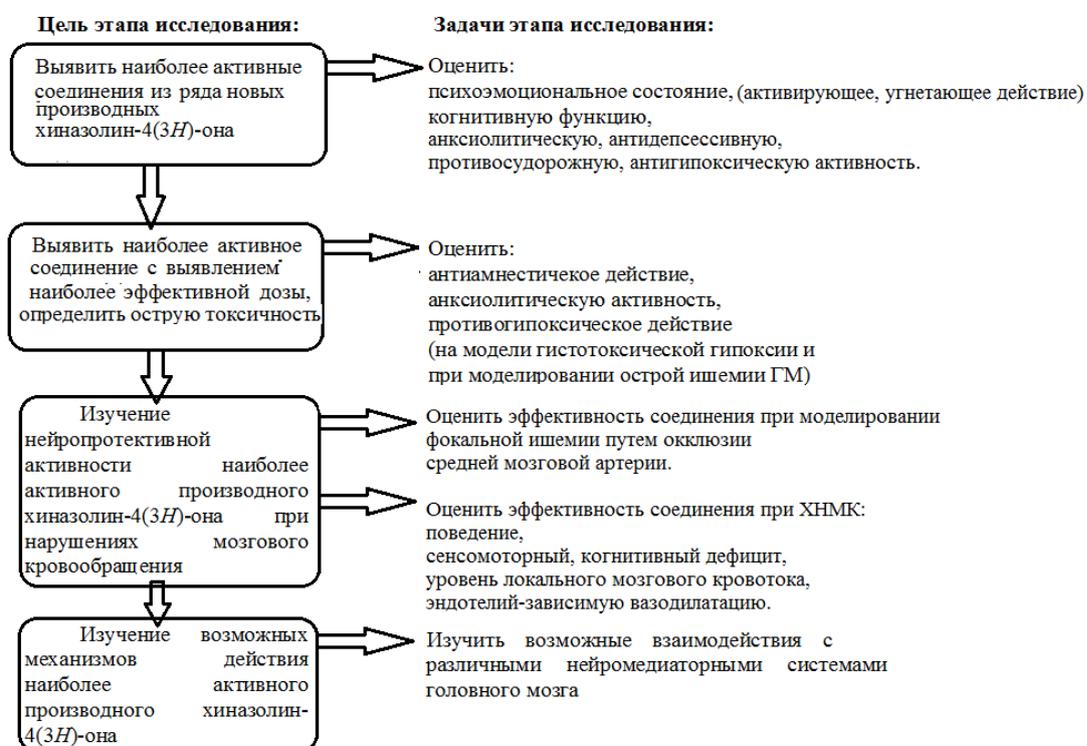


Рисунок 1. Дизайн экспериментального изучения психотропного и нейропротективного действия новых производных хиназолин-4(3*H*)-она

2.5. Экспериментальные методы, использованные при проведении скрининга нейropsychотропной активности исследуемых соединений

2.5.1. Методы изучения влияния исследуемых соединений на психоэмоциональное состояние животных

2.5.1.1. Тест «открытое поле» (ОП) [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] основан на конфликте двух мотиваций: мотива исследования новой обстановки, нового пространства и поведения в условиях недифференцированной стрессогенной среды (незнакомое ярко освещенное поле, ограниченное бортом). Для проведения теста ОП использовалась установка (Open Science, Россия), которая представляет собой круглую арену из поливинилхлорида белого цвета диаметром 97 см. с отверстиями на дне диаметром 2 см., ограниченную по периметру бортами высотой 42 см. Арена разделена разметкой на 3 ряда квадратов одинаковой площади с выделением центральной зоны поля. Освещенность площадки – 90 Лк, расположена на высоте 150 см. над центром поля. По нашему мнению, круглое ОП более предпочтительно, чем квадратное, так как создает более изоморфные условия эксперимента, чем установка, имеющая углы, которые животное может использовать в качестве точек ориентирования и мест для затаивания. Тестируемое животное помещали в центральную зону площадки хвостом к экспериментатору и наблюдали за его поведением. Продолжительность наблюдения 3 мин. Исследуемые соединения вводились за 60 мин. до проведения теста. Регистрируемые показатели: показатели двигательной активности, число пересеченных пристеночных квадратов и квадратов центральной зоны, число пристеночных и открытых стоек, заглядываний в отверстия. Количество стоек и заглядывания в отверстия расценивали как ориентировочно-исследовательскую активность. Кратковременный и продолжительный груминг (до 5 с. и более 5 с.), а также число фекальных болюсов и уринаций рассматривались как вегетативные корреляты стресса, эмоционального состояния. Уменьшение груминга можно расценивать как аналог снижения ухода за собой у людей, особенно с депрессивными и когнитивными расстройствами. Увеличение актов дефекации и

снижение ДА (особенно в центральной зоне) и ОИА, смещение продолжительности грумминга в сторону короткого связывают с повышенной тревожностью.

2.5.1.2. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] является чувствительным для изучения тревожности или анксиолитического, антифобического действия исследуемых веществ. Данная методика основана на логичном для грызунов предпочтении темных нор и естественного страха высоких открытых площадок. Установка ПКЛ (Open Science, Россия) представляет собой площадку размером 14x14 см. и четыре расходящихся от нее под прямым углом рукавов (5x14 см. каждая): два противоположных рукава открыты, которые ограничены бортом высотой 1 см. и два противоположных темных - закрыты, которые ограничены по бокам бортами высотой 30 см. Лабиринт находится на высоте 55 см. над полом. Общее время тестирования составляло 3 мин., при этом изучаемые соединения вводились за 60 мин. до теста. Животное помещалось на площадку в центр ПКЛ между рукавами. Тест ПКЛ позволяет оценить влияние изучаемых соединений и на двигательную и исследовательскую активность животных. В данном тесте регистрируется время принятия первичного решения о выходе из центральной зоны, время пребывания животного в открытых, закрытых рукавах лабиринта, количество заходов в открытые, закрытые рукава и центральную зону (пересечение зон лабиринта считалось, когда животное пересекало границы задними лапами). Также регистрировались свешивания с открытых рукавов и стойки в ОР. О возможном анксиолитическом эффекте исследуемых соединений может свидетельствовать увеличение времени нахождения в светлых рукавах и число заходов в них, а также увеличение количества стоек в открытых рукавах и свешиваний с платформы открытых рукавов. Время пребывания в центральной зоне ПКЛ может суммироваться со временем, проведенным в ОР. Общую двигательную активность можно оценить по общему количеству переходов между рукавами. По числу фекальных болюсов можно оценить эмоциональный статус животных.

2.5.1.3. Тест «Черно-белая камера» (ЧБК) [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] близок по идеологии к методике теста ПКЛ и использует

естественное стремление животных избегать освещенного пространства. Установка ЧБК (НПК Открытая наука, Россия) предназначена для изучения поведения животных в условиях переменной стрессогенности. Установка представляет собой две камеры одинакового размера 30x30 см., при этом одна из них окрашена в черный цвет, закрывается сверху крышкой, а другая - сверху открыта и окрашена в белый цвет. В отсеках высота стенок составляет 30 см., камеры сообщаются между собой четырехугольным отверстием, размер которого составляет 8x8 см. Время проведения теста 5 мин. При проведении эксперимента животным вводят исследуемые соединения за 60 мин. до проводимого теста, далее помещают в светлый освещенный отсек установки хвостом к темной камере, при этом регистрируются показатели латентного периода захода в темный отсек, количество заходов в темный отсек, время пребывания в нем, количество переходов между светным и темным отсеком, количество выглядываний из темного отсека и показатели стрессового фактора (количество уринаций и дефекаций). Увеличение латентного периода захода в темную камеру, количество выходов в светлую камеру, время пребывания в ней, количество выглядываний из темной камеры и общее количество переходов между камерами может свидетельствовать о наличии анксиолитической активности у животных, получающих исследуемые соединения. [Лапин И.П., 2000].

2.5.1.4. «Методика конфликтной ситуации» (Vogel) [Воронина Т.А., 2000, 2012; Островская, Р.У., 2012] используется как специфический тест для изучения анксиолитической активности фармакологических соединений. Установка представляет собой камеру, размер 27,5x27,5x40 см, снабженную электродным полом и поилкой на высоте 5 см, которая расположена на стенке камеры над электродным полом. До начала проведения теста (в течение 48 часов) животных подвергают водной депривации, без ограничения потребления сухого корма. Длительность проведения эксперимента 10 мин. Животное помещают в камеру, после чего вырабатывают навык взятия воды из поилки, нанося ему электроболевое раздражение (1 мА) спустя 10 с. после начала питья воды из поилки. При этом, оценка показателей времени взятия воды из поилки от момента обучения до

момента первого наказуемого взятия регистрируется как латентный период наказуемого взятия воды из поилки. Каждое взятие воды из поилки длительностью более 10 с наказуется электроболевым раздражением (1 мА) и регистрируется общее количество наказуемых попыток взятия воды из поилки. Проявление возможной анксиолитической активности исследуемых соединений расценивается как подавление чувства тревоги и страха, при этом наблюдается уменьшение латентного периода и увеличение количества наказуемых взятий воды из поилки.

2.5.1.5. Тест Порсольт [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012; Калуев А.В., 2006; Porsolt R.D., Pinchon M.Le, Jalfre M., 1977] используется для оценки степени антидепрессантной активности исследуемых соединений. Данный эксперимент проводится в два этапа: первый этап (первый день) заключается в помещении животного без введения исследуемых соединений на 15 минут в емкость с водой (температура воды 19-22°C), при этом необходимо, чтобы животные не могли опираться задними лапами о дно емкости. При проведении второго этапа (через 24 часа), с учетом пика активности исследуемых соединений, животным вводятся вещества и вновь помещают в емкость с водой при тех же условиях, что и в первый день. Наблюдение за животным ведется в течение 5 мин., при этом регистрируются следующие показатели: время иммобилизации (показатель депрессивного поведения), продолжительность пассивного и активного плавания, а также количество прыжков (количество активных попыток выбраться от аверсивной среды).

Увеличение времени активного плавания и попыток активного сопротивления воздействию аверсивных факторов, характеризующихся увеличением количества прыжков животных, по сравнению с контрольной группой животных, может расцениваться как наличие антидепрессивного эффекта у исследуемых соединений.

2.5.1.6. Тест «подвешивание мышей за хвост» (ПМХ) [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012; В.Л. Козловский, И.В. Прахье, 1996; Козловский В.Л. и др., 2008; Steru L. et al., 1985] применяется для оценки депрессивноподобного состояния. Тест основан на наблюдении за животным в

камере размером 50x50x30 см, разделенной на два отсека. Мышей подвешивают в разных отсеках за хвост на расстоянии 1,5 см. от кончика хвоста, при этом расстояние от дна камеры до носа животного составляет 10 см. Длительность проведения теста 6 мин. Основной регистрируемый показатель – это длительность иммобилизации (неподвижность, замирание). Исследуемые соединения вводили за 60 минут до начала эксперимента. Можно говорить о наличии антидепрессантного действия у исследуемых соединений при уменьшении времени иммобилизации животных по сравнению с контрольной группой животных.

2.5.2. Методы изучения влияния исследуемых соединений на когнитивные функции животных

2.5.2.1. Тест «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) [Воронина Т.А., 2000, 2012; Островская, Р.У., 2012] позволяет оценить когнитивные функции животных, получающих изучаемые вещества. Тест применяется для оценки влияния соединений на различные фазы формирования памятного следа и его сохранения в зависимости от сроков введения веществ. Введение исследуемых соединений за 60 мин. до выработки рефлекса, позволяет оценивать влияние исследуемых соединений на запоминание и обучаемость, а повторное воспроизведение УРПИ в разные периоды после его формирования на динамику угасания памятного следа. Установка УРПИ для проведения теста представляет собой смежные отсеки различного размера, один из которых большой 60x40x40 см, открытый сверху и ярко освещенный (90 Лк), другой – меньшего размера 15x15x15 см, при этом затемненный, закрытый со всех сторон, имеющий электрифицированный пол и отверстие 8x8 см. для сообщения с открытым отсеком. Данный эксперимент выполняется в несколько этапов: обучение навыку пассивного избегания и воспроизведение его сохранности через 24 часа, 7 и 14 суток. Время наблюдения за животным в тесте составляет 3 мин. Тест хорош быстротой выработки рефлекса (обучение с одной пробы) и воспроизводимостью и возможностью дифференцированно воздействовать на различные фазы памяти. Экспериментальное животное помещается на середину освещенного отсека

открытой площадки хвостом к отверстию в темный отсек. На этапе обучения навыку за животным ведется визуальное наблюдение, при этом регистрируется латентный период первого захода в темный отсек (это то время от момента помещения животного в установку до первого захода в темный отсек) и количество заходов в него. После каждого захода в темный отсек на этапе обучения навыку животному через электродный пол наносилось электроболевое раздражение, силой 40 В (3 импульса по 1 с., с интервалом 0,5 с.). Животных, не заходивших в темную камеру на этапе обучения за указанный промежуток времени, исключали из эксперимента. На этапе проверки сохранности памятного следа в нашем исследовании (через 24 час, 7 и 14 дней) тест выполнялся без электроболевой стимуляции, при этом регистрировался латентный период захода в темный отсек и количество заходов в него. В данной работе все исследуемые соединения вводились животным за 60 мин. до обучения. Ноотропный эффект под влиянием исследуемых соединений проявлялся увеличением латентного периода захода, уменьшением количества заходов и времени пребывания в темном отсеке по сравнению с контрольной группой животных и расценивался положительно на обучаемость и сохранность памятного следа животных. При повторных воспроизведениях навыка через различные периоды времени замедление угасания памятного следа ноотропный эффект наблюдался в динамике и расценивался как положительный.

2.5.2.2. *Тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ)* [Бондаренко Н.А., и др., 2003; Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] позволяет оценить ноотропную и антидепрессантную активность изучаемых соединений. Установка ТЭИ (Open Science, Россия) представляет из себя сосуд цилиндрической формы из прозрачного пластика высотой 23 см. и диаметром 9 см., нижний край которого погружаются в воду на 2,5 см., имеющей температуру 16-18 °С, и емкость из светлого пластика высотой 40 см. и диаметром 35 см., в который погружен прозрачный сосуд, удерживаемый посередине стальными креплениями. Тест заключается в решении задачи, т.е. подныривании под края прозрачного внутреннего цилиндра, погруженного на 2,5 см. в воду. Тест состоит из нескольких

этапов: обучение навыку экстраполяционного избавления и воспроизведение навыка через 12 часов, 7 и 14 дней. Эксперимент длится 3 мин., при этом ведется наблюдение за животным, уменьшение времени решения задачи (погружение животного в воду и подныривание под края внутреннего цилиндра) расценивается как показатель улучшения когнитивных функции сохранности памятного следа. Животные, не решившие задачу на этапе обучения в течение предоставленного времени, исключаются из эксперимента. Исследуемые соединения вводились однократно за 60 мин. до обучения крыс. В данном тесте (чем меньше показатель латентного периода подныривания, тем выше показатель способности к экстраполяции и скорость решения задачи).

При проведении теста ТЭИ, при помещении животного в цилиндр, кроме латентного периода подныривания, также регистрируется количество активных попыток избавиться от аверсивного воздействия водной среды (прыжки) и время депрессивного поведения (иммобилизация), что позволяет оценить выраженность поведенческой депрессии у животных при введении исследуемых соединений [Арушанян Э.Б. и др., 1990].

2.5.3. Методы изучения влияния исследуемых соединений на противосудорожную активность

2.5.3.1. Методы изучения противосудорожного действия при введении пикротоксина и коразола [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012]. Метод основан на фиксации показателей возникновения судорог при введении конвульсанта. Основными регистрируемыми показателями являются латентный период наступления судорог (время от момента введения конвульсантов до наступления клонических или тонических судорог), длительность клонико-тонических судорог, летальность в процентах от общего количества животных в группе. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 60 мин. после введения конвульсанта, также регистрировалось количество летальных исходов. Пероральное введение исследуемых соединений проводилось за 60 мин. до проведения теста, при этом контрольной группе животных вводился 2%

крахмальный гель в эквивалентном объеме. Животные помещались в плексиглазовые контейнеры размером 10x12x15 см. с крышкой и отверстиями в стенках и крышке для свободного доступа кислорода и поддержания постоянной комнатной температуры и стандартного освещения. Животным в область шейного отдела спины подкожно вводится пикротоксин в дозе, которая вызывает судороги у 97% животных контрольной группы, что составляет 2,5 мг/кг. О возможном наличии противосудорожной активности у исследуемых соединений можно судить при уменьшении латентного периода наступления судорог (предупреждение развития судорог) или уменьшении продолжительности клонических и тонических судорог.

2.5.4. Изучение противогипоксической активности исследуемых соединений

2.5.4.1. Нормобарическая гипоксия [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] используется для оценки возможного антигипоксического эффекта соединений. Эксперимент выполняется на мышах. Методика заключается в помещении животных одинакового веса (разброс не более 2-х грамм на группу) по одному в герметически закрываемые контейнеры объемом 200 см³. Испытуемые вещества вводят за 60 мин. до начала эксперимента. Регистрируется время до наступления апноэ (резервное время, время жизни в условиях гипоксии) у животного, которое фиксируется визуально. После чего животное извлекается из контейнера и реанимируется. Увеличение латентного периода наступления апноэ животных в условиях гипоксии (по сравнению с контролем) под влиянием изучаемых соединений свидетельствует о наличии у них противогипоксического эффекта.

2.5.4.2. Гемическая гипоксия, вызванная нитритной интоксикацией [Воронина Т.А. и др., 2005] также используется для оценки противогипоксического действия соединений. Тест проводится на мышах. Эксперимент заключается в однократном подкожном введении животным в шейную область спины нитрита натрия в токсической дозе 250 мг/кг с последующей регистрацией времени выживания животных. Испытуемые вещества вводят до начала эксперимента с

учетом пика их действия. Увеличение продолжительности жизни животных в условиях гипоксии на фоне метгемоглобинемии (по сравнению с контролем) под влиянием изучаемых соединений свидетельствует о наличии у них противогипоксической активности.

2.6. Экспериментальные методы, использованные при проведении дополнительного изучения нейropsychотропной активности наиболее активных соединений

2.6.1. Метод дополнительного изучения влияния наиболее активных соединений на когнитивные функции животных

Изучение антиамнестического действия наиболее активных соединений с использованием *теста хемоиндуцированной скополаминовой амнезии* [Воронина Т.А. и др., 2000,2005,2012; Островская, Р.У., 2012] используется для изучения ноотропной активности веществ. Тест обучения животных навыку проводится в установке, описанной ранее в п.2.5.2.1. Время наблюдения за животным в установке – 3 мин. Амнезию выработанного условного рефлекса вызывают введением скополамина в дозе 1,5 мг/кг внутривентриально перед воспроизведением навыка спустя 24 часа после обучения (доза подобрана экспериментально, вызывая амнезию у 100 % животных группы контроля). Исследуемые соединения вводились за 60 минут, а препараты сравнения вводились за 30 мин. до введения скополамина. При проведении теста увеличение латентного периода захода в темный отсек, где ранее животному с использованием электрического пола наносился болевой раздражитель на этапе обучения, также увеличение времени в темном отсеке и уменьшении количества зашедших животных в группе в темный отсек за отведенное время характеризуется как выраженный ноотропный эффект в устранении скополаминовой амнезии.

2.6.2. Метод дополнительного изучения влияния наиболее активных соединений на анксиолитическую активность

Метод «конфликтной ситуации» (Vogel) описан ранее в п. 2.5.1.4. в качестве препарата сравнения использовался диазепам.

2.6.3. Метод дополнительного изучения влияния наиболее активных соединений на антидепрессантную активность у животных

Тест Порсольт [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012; Калуев А.В., 2006; Porsolt R.D., Pinchon M.Le, Jalfre M., 1977] описан ранее в п. 2.5.1.5.

2.6.3. Метод дополнительного изучения влияния наиболее активных соединений на противогипоксическое действие у животных

Тканевая гипоксия [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012]. Эксперименты были выполнены на белых мышах-самцах массой 20 – 22 г. Тканевую (гистотоксическую) гипоксию вызывали путем внутрибрюшинного введения нитропрусида натрия в дозе 20 мг/кг. При воспроизведении модели тканевой гипоксии время жизни животных (мин.) начинали отсчитывать сразу после введения нитропрусида натрия. Для исследования антигипоксической активности животным вводили с помощью зонда исследуемое соединение в дозе 1/30 от молекулярной массы в 2% крахмальном геле за 60 мин. до моделирования гипоксии. Контрольной группе животных вводили 2 % крахмальным гелем в эквивалентном объеме. Объем вводимых жидкостей в контрольной и в опытных группах составлял 0,1 мл/10 г. Препарат сравнения мексидол вводился в дозе 30 мг/кг за 30 мин. до проведения теста.

2.6.4. Метод изучения влияния наиболее активного соединения на выраженность и неврологический дефицит животных при острой ишемии головного мозга

Выполнение необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий и оценка выраженности неврологического дефицита* [Стаховская Л.В., 2014] проводилось согласно дизайну, который представлен на рисунке (Рисунок 2).

* Выражаем глубокую благодарность старшему научному сотруднику лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств д.ф.н. Д.В. Куркину, старшему научному

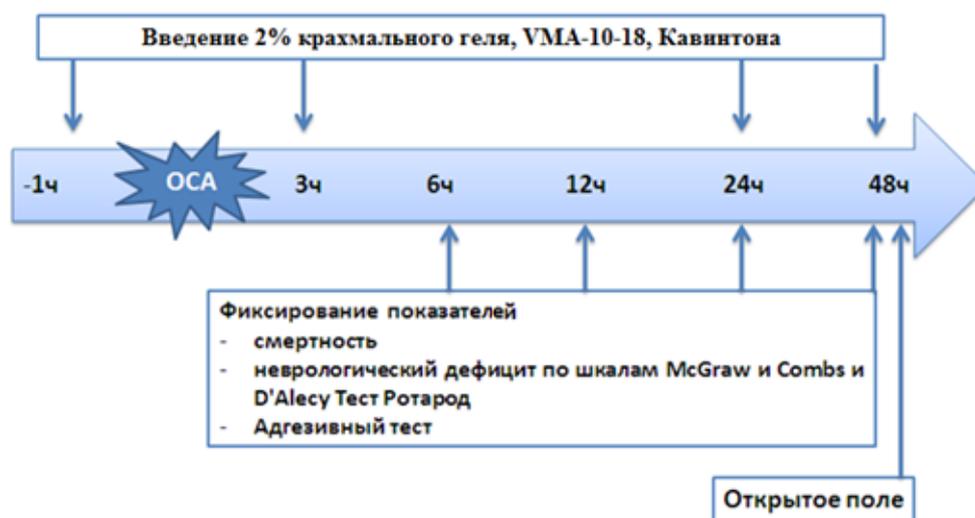


Рисунок 2. Дизайн исследования влияния на выживаемость и неврологический дефицит животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий

Обозначение: ОСА – окклюзия общих сонных артерий

Операционные процедуры (перевязка общих сонных артерий) проводились с использованием наркоза (хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг (внутрибрюшинно)) проводятся. Животное фиксируется на спине за лапы на хирургической площадке. С передней части шеи удаляется волосяной покров с помощью депиляционного крема. После поверхность кожи обрабатывается спиртом (70%). Отступив 0,5 см. от грудины продольный разрез выполняется по срединной линии шеи около 2 см. длиной. Сосудистыми ножницами разрезается подкожный жировой слой, при этом края раны, с использованием зажимов, разводятся в стороны. Под грудино-ключично-сосцевидной мышцей, ближе к грудины раствором лидокаина (2%) необходимо оросить сосудисто-нервный пучок. Без прикосновения к блуждающему нерву производится выделение общей сонной артерии. В качестве лигатуры применяется нерассасывающийся шовный материал. Не захватывая окружающие ткани затягивается и завязывается на два узла. Аналогичная манипуляция выполняется на другой общей сонной артерии. Раствором хлоргексидина 0,05% обрабатывается все операционное поле. Операционная рана

сотруднику к.м.н. Д.А. Бакулину и соискателю кафедры фармакологии и биофармации ФУВ Д.В. Верхоляку, за помощь в проведении экспериментальных работ в рамках диссертации.

зашивается кисетным швом. Шов обрабатывается раствором йода 5%. После операции животные помещаются в клетки с чистыми опилками по 5-6 особей. На пол клетки в чашке Петри помещается увлажненный корм. Спустя 6, 12, 24, 48 и 72 часа животные находятся под наблюдением, в это время фиксируется летальность и неврологический дефицит.

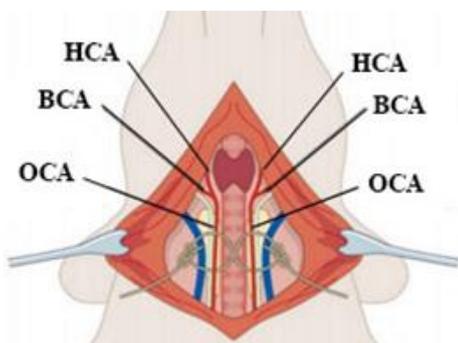


Рисунок 3. Окклюзия общих сонных артерий [Тюренков И.Н., 2013; Farkas E., 2007]

Примечание: ОСА – общая сонная артерия; HCA – наружная сонная артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия.

Методы изучения оценки степени психоневрологического дефицита

После перевязки ОСА неврологический дефицит оценивали с использованием шкалы stroke-index McGraw (Таблица 2) и шкалы Combs and D'Alecy (Таблица 3) [23,88].

Таблица 2 - Шкала оценки неврологического дефицита по McGraw

Симптомы	Соответствующие баллы
вялость	0,5
тремор	1
односторонний полуптоз	1
двухсторонний полуптоз	1,5
односторонний птоз	1,5
двухсторонний птоз	1,5
слабость конечностей	1,5
манежность движений	2
парез 1,2,3,4 конечностей	2,3,4,5
паралич 1,2,3,4 конечностей	3,4,5,6
состояние комы	7
летальный исход	10

Таблица 3 - Шкала оценки неврологического дефицита Combs and D'Alecy

Балл	Удержание себя на экране-сетке	Тест на равновесие на стержне	Удержание себя передними лапами на натянутой веревке
0	Падение 0-5 с.	Отсутствие хвата, падение со стержня	Вис 0-2 с.
1	Падение 6-10 с.	Нахождение на стержне менее 10 с.	Вис 3-4 с.
2	Падение 11-14 с.	Нахождение на стержне 11-20 с.	Вис более 5 с., третья конечность не находится на веревке
3	Вис на сетке больше 15 с.	Нахождение на стержне 21-30 с.	Вис более 5 с., третья конечность находится на веревке

Оценка выраженности неврологического дефицита по шкалам McGraw, Combs and D'Alecy проводилась через 6, 12, 24, 48 часов после необратимой окклюзии ОСА. При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались.

Метод оценки нарушений координации движений в тесте «Ротарод»

Для оценки нарушений координации животных использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия), который представляет собой горизонтальный стержень (диаметр – 70 мм), разделенный на отсеки (ширина – 70 мм) вертикальными дисками (диаметр – 370 мм) в комплексе с датчиками и программным обеспечением для автоматической регистрации времени падения животных. Использовалась постоянная скорость вращения стержня – 20 об/мин. Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

Метод оценки нарушения тактильной чувствительности и мелкой моторики в Адгезивном тесте [Bouet V., 2009]

Адгезивный тест выполнялся для определения сохранности мелкой моторики и чувствительности передних лап животных. Для выполнения теста использовалась липкая лента (изготовленная из матерчатого пластыря) размерами 5*5 мм, которую помещали на ладонную поверхность передних лап животных. После чего животное помещалось в пустую клетку с опилками, и за ним устанавливалось наблюдение в

течение 3-х минут. Засекали время, которое необходимо животному для обнаружения инородного тела на лапе и время, за которое оно избежит от него [Bouet V., 2009].

Метод оценки двигательной и ориентировочно-исследовательской активности и психоэмоционального состояния животных проводилась в тесте «Открытое поле» [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012] описан ранее п.2.5.1.1. позволяет оценить поведение животных после перевязки ОСА.

2.7. Методы изучения острой токсичности наиболее активных веществ

Острая токсичность изучена в соответствии с общепринятыми рекомендациями [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под ред. Хабриева, 2005; Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012].

Исследование проводилось на белых мышах самцах массой 18-20 г и беспородных крысах массой 200-230гр., содержащихся в стандартных условиях вивария. При проведении исследований использовали внутрижелудочный путь введения. Ввиду низкой растворимости тестируемой субстанции использовалось двукратное ее введение (с интервалом в 2 часа) в дозах 3000,0 мг/кг; 4000,0 мг/кг и 5000,0 мг/кг, замешанных в максимально допустимых объемах растворителя для внутрижелудочного введения мышам и крысам.

Непрерывное визуальное наблюдение за животными, получившими токсическую дозу веществ, велось в течении 5 часов от момента введения препарата. Далее наблюдение проводилось через каждые 24 часа в течении 14 суток после введения соединений. Оценивали показатели общего состояния, поведения: состояние шерстного покрова – изменения окраса, гладкости, плотности, опрятности; слизистых оболочек – окраска, отечность, наличие и характер выделений; подвижность; масса тела; параметров нервно-мышечной возбудимости: рефлекторные реакции на внешние раздражители – звуковые (постукивание по клетке), тактильные (прикосновения к коже), болевые (раздражение острым стилетом различных участков кожи), изменения положения

тела (прострация, скованность), положение конечностей. наличие судорог, парезов, тремора, подергиваний; вегетотропных реакций: реакции зрачка, цвет кожи, наличие уринаций, дефекаций, саливаций. Для расчета величины токсикологического показателя – LD₅₀ использовали пробит-анализ выживаемости.

2.8. Экспериментальные методы, использованные при изучении нейропротекторного действия соединения VMA-10-18 при острой фокальной ишемии и при ХНМК

*2.8.1. Методы изучения нейропротекторного действия исследуемого соединения при моделировании фокальной ишемии мозга путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии**

Перед моделированием необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) [14, 59] проводилось обучение животных в тестах УРПИ и ТЭИ, введение соединений было за 60 мин. до проведения тестов. После моделирования фокальной ишемии через 48 часов проводили оценку неврологического дефицита, психоэмоционального состояния, оценку сенсорно-моторных функций и уровень мозгового кровотока согласно дизайну исследования (Рисунок 1).



Рис. 1. Дизайн исследования нейропротекторного действия при моделировании фокальной ишемии путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА).

* Выражаем глубокую благодарность старшему научному сотруднику лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств д.ф.н. Д.В. Куркину, старшему научному сотруднику к.м.н. Д.А. Бакулину и соискателю кафедры фармакологии и биофармации ФУВ Д.В. Верхоляку, за помощь в проведении экспериментальных работ в рамках диссертации.

Подготовка животных к эксперименту и моделирование фокальной ишемии головного мозга путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА).

Операционные процедуры проводятся с использованием наркоза (хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг (внутрибрюшинно)). Все хирургические инструменты предварительно стерилизовались в Стерилизаторе паровом ГК-10.

Подготовка операционного поля. Животное фиксируется (узким лейкопластырем) за лапы на спине на хирургическом столе. Волосяной покров с передней части шеи удаляется депиляционным кремом от нижней челюсти до грудины. Поверхность кожи обрабатывается спиртовыми салфетками.

Общий принцип операции по воспроизведению внутрисосудистой обратимой окклюзии средней мозговой артерии представлен на рисунке (Рисунок 4А.)

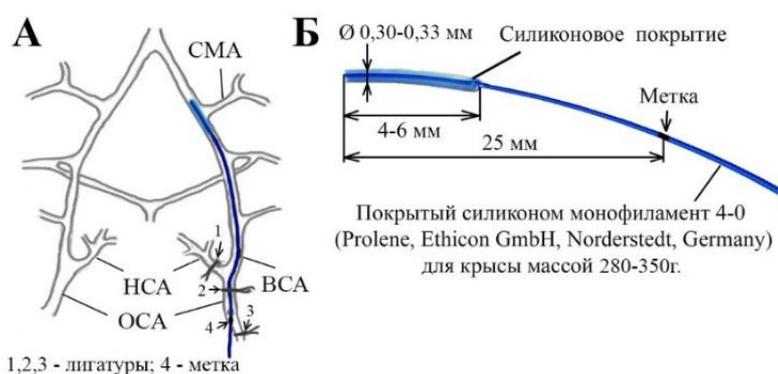


Рисунок 4. Общий принцип операции по воспроизведению окклюзии средней мозговой артерии (А). Окклюдер для интраваскулярной окклюзии средней мозговой артерии (Б) [21,22].

Примечание: ОСА – общая сонная артерия; НСА – наружная сонная артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия.

Первоначально осуществлялся оперативный доступ к левой сонной артерии. Отступив 0,5 см. от грудины выполняется продольный разрез по срединной линии шеи длиной 2 см. Подкожно жировой слой разрезается сосудистыми ножницами, края раны разводятся в стороны с использованием зажимов. Под грудино-ключично-сосцевидной мышцей, ближе к грудины находится сосудисто-нервный пучок, который орошали раствором лидокаина (2%). Выделение общей сонной артерии производится без прикосновения к блуждающему нерву. В качестве

лигатуры используется нерассасывающийся шовный материал. Далее выделяется бифуркация левой общей сонной артерии, затем перевязывается общая сонная артерия (ближе к груди) и левая наружная сонная артерия. Отступив 3-4 мм от бифуркации, в общей сонной артерии делается пункционное отверстие в которое вставляют монофиламент 4-0 (Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany) [Kuge Y., 1995], концом покрытым силиконом вперед (Рис. 1Б) таким образом, чтобы он пройдя через бифуркацию оказался во внутренней сонной артерии. Затем ориентируясь по метке на окклюдере далее его вводят в сосуд на глубину 20-23 мм (но не более), затем общая сонная затягивается, для избегания кровопотери, операционная рана орошается раствором хлоргексидина 0,05%, после чего рану ушивают кистным швом. Кровопотеря во время операции свыше 0,5 мл не допустима. Не допустима остановка дыхания и/или его отчётливое изменение (появление стонов, хрипов, снижение частоты дыхательных актов и т.д.). Животные с подобными симптомами в исследование не включались. В течение 6 часов за животными велось наблюдение.

Через 3 дня, за 4 часа до эксперимента животные отсаживались на пищевую депривацию, при сохранении доступа к воде. Далее животному *per os* вводился 2% крахмальный гель, соединение VMA-10-18, или цитиколин. Фиксировалось время введения веществ. Через 10 минут после этого проводилась наркотизация животного введением раствора хлоралгидрата внутривентриально (400 мг/кг).

Далее наркотизированной крысе, после фиксации головы в стереотаксисе, в теменной кости, бором высверливается отверстие размером 6x8 мм до поверхности твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. При этом, в процессе бурения стараются равномерно высверливать кость, по всему периметру предполагаемого отверстия, с целью избегания локального нагрева и, как следствие, повреждения мозговой оболочки. После этого, на трепонированный участок накладывается ватный диск, смоченный физ. р-ром. После этого убирается ватный диск с трепонированного участка, голова животного фиксируется в стереотаксисе и устанавливается датчик лазер-доплерографа TSD144 (полиграф

MP150, блок LDF100C, Biopac Systems, США) на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания среднемозговой артерии по направлению ее центральной ветви.

Оценка зоны некроза при моделировании фокальной ишемии

Размер зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга [Brait V.H., 2010]. С использованием матрицы BS-A-6000C (Braintree, США) (Рисунок 5А) изготавливались срезы больших полушарий толщиной 2 мм (6 срезов), которые инкубировались при 37°C в течение 15 минут в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, через 7-10 минут раствор со срезами осторожно встряхивается. Срезы после окрашивания в одной плоскости с миллиметровой линейкой фотографировались на цифровую камеру.

Измерение площади неокрашенной и окрашенной ткани осуществлялось с помощью программы ImageJ 1.37 (Rasband W.S., США). Из-за возможного завышения площади некротической ткани вследствие отека, рассчитывался скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывался в процентах относительно объема интактной гемисферы по формуле [Brait V.H., 2010]: $ЗИ = \frac{B-(A-C)}{B} \times 100\%$, а степень отека (СО) мозга рассчитывали по формуле: $СО = \frac{A-B}{B} \times 100\%$, где А – суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах ($мм^2$) ($A_1+A_2...+A_6$), В – суммарная площадь интактных гемисфер на срезах ($мм^2$) ($B_1+B_2...+B_6$), С – суммарная площадь зон инфаркта на срезах ($мм^2$) ($C_1+C_2...+C_6$) (Рисунок 5).

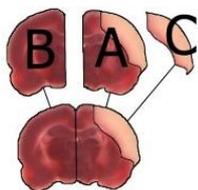


Рисунок 5. Выделение площади пораженной (А), интактной (В) гемисферы и зоны инфаркта (С) на срезе ГМ в программе ImageJ.

Оценка неврологического дефицита (по шкале Combs и D'Alecy) мелкой моторики лап (тесты Ротарод и адгезивный), психоэмоционального состояния животных (ОП) проводилась после моделирования ОСМА через 48 часов.

Шкала Garcia используется для оценки асимметрии движений и реакций животного [23].

Таблица 4 - Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia

Показатель	Начисляемые баллы			
	0	1	2	3
Спонтанная активность (в пустой клетке, в течение 5 мин.)	Движения отсутствуют	Едва двигается	Двигается, но не приближается к трем сторонам клетки	Двигается и приближается к трем сторонам клетки
Симметричность движений (4 конечности)	Одна сторона: отсутствует движение	Одна сторона: небольшое движение	Одна сторона: двигается медленно	Обе стороны: двигаются симметрично
Симметричность вытягивания предплечий (крысу держат за хвост)	Одна сторона: отсутствует вытягивание конечности	Одна сторона: слабая попытка вытянуть конечность	С одной стороны пытается вытянуть конечность меньше, чем с другой стороны	Симметричные вытягивания
Забирается по сетке	–	Не удается забраться	Одна сторона слабая	Забирается нормально
Реакция на прикосновение к стороне тела	–	Отсутствует ответ с одной стороны	Слабый ответ с одной стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение вибриссам	–	Отсутствует ответ с одной стороны	Слабый ответ с одной стороны	Симметричный ответ

Итоговый балл является суммой баллов в 6-и тестах. 18 баллов соответствует животному без нарушений.

Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ

Тесты «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ) описан п. 2.5.2.1. и п. 2.5.2.2. используются для исследования влияния фармакологических средств на формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа у животных с ОСМА.

2.8.2. Методы изучения нейропротективного действия наиболее активного соединения при моделировании хронического нарушения мозгового кровообращения

Введение исследуемого соединения, препарата сравнения и 2% крахмального геля начинали через 14 дней после моделирования ХНМК один раз в сутки течение 14 дней. При этом исследуемое соединение и препарат сравнения вводили с использованием специальных желудочных зондов для крыс. Исследуемое соединение растворяли в 2% крахмальном геле (объем введенной жидкости на одно животное составлял из расчета 0,5 мл на 100 г массы животного).

Подготовка животных к эксперименту и моделирование хронического нарушения мозгового кровообращения

Хроническую недостаточность мозгового кровообращения (ХНМК) вызывали путем частичного стенозирования общих сонных артерий (ОСА). В первой серии экспериментов (n=5) наркотизированное животное (хлоралгидрат, в/бр, 400 мг/кг) фиксировали, область шеи выбривали, обрабатывали раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%. Затем проводили разрез кожи по срединной линии шеи, рассекали подкожную фасцию, слюнную железу отодвигали, выделяли сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. Далее выделяли сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошали 2% раствором лидокаина. После выделения сонной артерии под нее подводили три лигатуры, располагаемые на расстоянии 2-3 мм друг от друга. Параллельно артерии закрепляли иглу (29G 1/2) от шприца, к которой привязывалась сонная артерия и которая затем убиралась таким образом, чтобы лигатуры оставались на заданном расстоянии. В результате описанных выше манипуляций кровотока по обоим сонным артериям ограничивался в среднем на 50-60%, а в головном мозге – на 40-45% от изначальных значений.



Рисунок 6. Дизайн исследования нейропротективного действия на животных при моделировании хронического нарушения мозгового кровообращения (ХНМК)

Тест Барнса позволяет оценить формирование референтной пространственной памяти животных. Использовалась установка – лабиринт, которая представляет круглую освещенную арену, в центр которой помещали животное. Арена представляет собой круг диаметром 120 см., размещенный на подставке высотой 115 см. и имеющий по краю 18 отверстий диаметром 9,5 см, одно из которых заканчивается темной коробкой с едой (в ней крыса комфортно себя чувствует). Если животное находит норку (после периода обучения), то оно считается решившим задачу, если животное выбирает отверстие, которое не ведет в темную норку с лакомством, считается что животное совершило ошибку. Время наблюдения в тесте составляет 5 мин.

Обучение животных проводили на 14-й и 15-й день и далее на 21-й и 28-й день воспроизведение теста. Учитывались следующие показатели - количество животных в группе, которые смогли найти норку и количество ошибок, совершенных животными.

Тест «Открытое поле» описан ранее п. 2.5.1.1. позволил оценить поведение животных на 21 день после моделирования ХНМК.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) описан в п. 2.5.1.2.

Адгезивный тест и тест «Ротарод» [Bohlen M., 2009] описан ранее п. 2.6.3.

Тесты «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ) описаны ранее п. 2.5.2.1. и п. 2.5.2.2.

Тест принудительного плавания по Порсолту описан в п. 2.5.1.4.

Оценку уровня локального кровотока (МК, у.е.)

Во время моделирования ХНМК оценку уровня локального кровотока (МК, у.е.) осуществляли до и после стенозирования сонной артерии в двух точках, в месте сразу после наложения лигатур и в проекции средней мозговой артерии. Регистрацию кровотока на сонных артериях проводили с помощью ультразвукового доплерографа (Минимакс), на средней мозговой артерии – с помощью лазерного доплерографа Biopac Systems, Inc., США. Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированному животному с использованием депиляционного крема удалялся шерстяной покров и кожный лоскут в верхней поверхности черепа, которая в последствие скальпировалась. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка брегма, определялось место установки датчика (в проекции средней мозговой артерии), голова животного и датчик фиксировались в стереотаксической установке, трепанационное отверстие производилось конической зуботехнической фрезой, твердая мозговая оболочка оставалась интактной.

Через 28 дней после проведения всех психоневрологических тестов проводили повторную оценку уровня кровотока в сонных артериях и в проекции средней мозговой артерии с анализом функционального состояния эндотелия сосудов.

Метод оценки функционального состояния эндотелия сосудов головного мозга

Для оценки вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов использовался методический подход, предложенный Тюренковым И.Н., Воронковым А.В. [Тюренков И.Н., Воронков А.В., 2008], который заключался в изучении изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (NO). Используемые нами модуляторы системы NO вводились внутривенно, в следующей

последовательности: ацетилхолин (0,01 мг/кг, Acros organics, США); нитро - L-аргинин (10 мг/кг, Acros organics, США). Каждое введение анализатора осуществлялось после возвращения МК до исходного уровня. По увеличению или уменьшению скорости МК в процентах по отношению к исходному судили соответственно о расширении или сужении просвета сосудов, а также о стимулируемой и базальной продукции оксида азота и о вазодилатирующей функции эндотелия. Регистрация изменений скорости мозгового кровотока проводилась в проекции средней мозговой артерии крыс с помощью лазерного доплерографа (Biorac Systems, Inc., США) по методу, описанному выше.

2.9. Экспериментальные методы, использованные при изучении возможных механизмов действия наиболее активного соединения

2.9.1 Методы изучения возможного взаимодействия соединения с дофаминергической нейромедиаторной системой

2.9.1.1 Изучение влияния соединения на стереотипное поведение, вызванное введением агониста постсинаптических дофаминовых рецепторов – апоморфина [Раевский К.С. и др., 2005; Епишина В.В., 2006; Меркушенкова О.В., 2009].

В ходе эксперимента проводили оценку интенсивности и регистрацию общей продолжительности стереотипного поведения мышей, вызванного подкожным введением агониста дофаминовых рецепторов апоморфина. Критерием влияния веществ на апоморфиновую стереотипию являлось изменение степени выраженности и длительности стереотипных реакций. Отобранным животным *per os* за 60 мин. до проведения эксперимента вводилось исследуемое соединение, далее подкожно вводился апоморфин в дозе 1 мг/кг. Животных помещали в прозрачные плексигласовые контейнеры, разделенные на 6 индивидуальных ячеек (10x12x15 см), закрывающихся крышкой, с отверстиями в стенках при постоянной комнатной температуре и стандартном освещении. Протоколировали интенсивность стереотипных реакций: принюхивания, грызения, лизания по принятой трехбалльной шкале оценки поведенческих феноменов, согласно которой

отдельным движением (в т.ч. непостоянному принохиванию) приписывается оценка в 1 балл, непродолжительной интенсивной стереотипии (в т.ч. лизание, грызение) – 2 балла, постоянной интенсивной стереотипии – 3 балла. Оценку проводили повторно в течении 1 минуты через каждые 30 мин. после введения апоморфина, наблюдение велось в течение 2 часов. Фиксировалась также общая продолжительность стереотипного поведения.

2.9.1.2 Изучение влияния соединения на каталептогенный эффект галоперидола

Использована методика каталепсии, вызванной галоперидолом [Воронина Т.А. и др., 2005; Епишина В.В., 2006; Меркушенкова О.В., 2009]. Галоперидол – типичный нейролептик, производное бутирофенона, блокатор дофаминовых рецепторов, обладает центральным альфа-адреноблокирующим действием, нарушает процесс обратного нейронального захвата и депонирования норадреналина. Эксперимент выполняется на крысах. Определяется способность животного сохранять искусственно приданную позу. Передние лапы животного помещали на горизонтальные проволочные перекладины (так называемая «поза лектора»), расположенные на высоте 3 см. и 10 см., и определяли время удержания данной позы. Каталепсию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг. Антагонизм с галоперидолом оценивали по способности исследуемого вещества уменьшать время каталептогенного состояния животных и интенсивности каталепсии. Продолжительность каталепсии измеряли через 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин. Интенсивность каталепсии оценивалась в баллах по методу Mogrigo: животное усаживали на задние лапки так, чтобы, опираясь передней лапкой о ступеньку, крыса держала бы другую лапу без опоры. Если крыса сохраняла такую позу в течение 10 с. при высоте ступеньки 3 см., засчитывали 1 балл; при высоте ступеньки 10 см. – 2 балла. Поочередно помещали левую и правую лапу сначала на нижнюю, затем на верхнюю ступеньки. Попытки усадить животное в нужную позу повторяли в течение 1 минуты.

2.9.2 Методы изучения возможного взаимодействия соединения с холинергической нейромедиаторной системой

2.9.2.1 Метод изучения возможного взаимодействия соединения с М-холинергической системой оценивалось по влиянию на ареколиновый тремор [Воронина Т.А. и др., 2005; Меркушенкова О.В., 2009]. Ареколин проявляет М-холиномиметическое действие. Критерием влияния вещества на холинергическую систему ЦНС являлось изменение продолжительности тремора. Животным через 60 минут после введения изучаемого соединения вводился подкожно ареколин в дозе 25 мг/кг. Далее животных помещали в прозрачные плексигласовые контейнеры, разделенные на 6 индивидуальных ячеек (10x12x15 см), закрывающихся крышкой, с отверстиями в стенках при постоянной комнатной температуре и стандартном освещении. Регистрировали показатели: латентный период от момента введения ареколина до возникновения тремора и общая его продолжительность.

2.9.2.2 Метод изучения возможного взаимодействия соединения с Н-холинергической системой изучали по влиянию соединения на никотиновый тремор [Воронина Т.А. и др., 2005; Епишина В.В., 2006; Меркушенкова О.В., 2009]. Никотин проявляет Н-холиномиметическое действие. Для проведения эксперимента используются мыши. Оценивается влияние соединения на продолжительность тремора у мышей, спровоцированного подкожным введением никотина в дозе 0,2 мг/кг. Критерием влияния веществ на холинергическую систему ЦНС является изменение латентного периода наступления тремора и общей его продолжительности. Соединения вводятся животным за 60 минут до введения никотина. Затем животных помещали в описанные выше контейнеры и регистрировали показатели, указанные в п. 2.9.2.1.

2.9.3 Метод изучения возможного взаимодействия соединения с серотонинергической нейромедиаторной системой

Взаимодействие соединения с серотонинергической системой изучается по влиянию на 5-окситриптофановый гиперкинез [Раевский К.С. и др., 2005; Епишина

В.В., 2006; Меркушенкова О.В., 2009]. Регистрируется количество специфических гиперкинетических движений у мышей (резкие встряхивания головой) в динамике, вызванных внутрибрюшинным введением предшественника серотонина 5-окситриптофана в дозе 300 мг/кг через 60 минут после введения исследуемого вещества. Критерием оценки влияния вещества на серотонинергическую нейротрансмиссию является изменение числа характерных гиперкинетических движений у мышей. Животных располагают в плексигласовые контейнеры и ведется визуальное наблюдение, в ходе которого протоколируется число встряхиваний головой за 1 минуту для каждого животного с интервалами в 10 минут в течении 60 минут, подсчет числа встряхиваний головой у мышей начинали через 10 минут после введения 5-окситриптофана.

2.9.4 Методы изучения возможного взаимодействия соединения с ГАМК-ергической системой

2.9.4.1 Метод изучения влияния соединения на судороги, вызванные введением коразола и пикротоксина. Методика описана выше (п. 2.5.4.1.)

2.9.4.2 Метод изучения влияния соединения на судороги, вызванные введением бикукулина [Воронина Т.А., Неробкова Т.Н., 2000; Епишина В.В., 2006; Меркушенкова О.В., 2009]

Бикукулин является селективным антагонистом ГАМКА-рецепторов, который при введении животным блокирует ГАМК-ергическое торможение в ЦНС, что проявляется развитием судорожного синдрома. Эксперимент выполнялся на мышах. Бикукулин вводился в дозе, вызывающей судороги у 97% животных (2,7 мг/кг) подкожно в область шейного отдела спины. Изучаемое соединение вводилось за 60 минут до введения бикукулина. Визуальное наблюдение проводили в течение 30-60 минут после инъекции бикукулина. Регистрировались латентный период судорог, интенсивность и общая продолжительность судорожных реакций, продолжительность клонической, тонической фаз судорог, а также количество летальных исходов.

ГЛАВА 3. Скрининговое изучение психотропной активности новых производных хиназолина

3.1. Изучение влияния группы простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность

3.1.1. Изучение влияния простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное поведение животных

Оценка влияния 4-х новых простых эфиров производных хиназолина на психоэмоциональное поведение животных выполнена с использованием тестов ОП, ПКЛ, теста ЧБК, «Конфликтной ситуации в варианте Вогель», теста «принудительного плавания по Порсольту» и теста ПМХ. Тесты ОП, ЧБК и ПКЛ позволяют оценить поведение животных в условиях авersive среды с оценкой поведенческих проявлений.

Результаты, отражающие поведение в тесте ОП представлены в таблице (Таблица 5). У всех животных, получавших вещества с лабораторными шифрами VMA-10-06 и VMA-10-03, VMA-10-04, в отличие от контрольной группы животных, получавших 2% крахмальный гель, статистически значимо отмечалось больше актов исследовательского поведения (заглядываний в отверстия), открытых стоек, а также, уменьшение актов кратковременного груминга и количество болюсов, и увеличение длительного груминга (VMA-10-03, VMA-10-04 и VMA-10-05). Такие изменения поведения в ОП, т.е. в незнакомой и авersive (ярко освещенной среде) свидетельствуют о том, что соединения VMA-10-03 и VMA-10-04, имеющие по 2 метильных заместителя в бензольном кольце (VMA-10-03 – основание и VMA-10-04 гидрохлорид) и соединение VMA-10-05, имеющего метильную группу в составе линкера, соединяющего гетероцикл с бензольным

кольцом, статистически значимо не влияли на горизонтальную и вертикальную двигательную активность, но увеличивали число заглядываний в отверстия, количество актов длительного груминга, и уменьшали число кратковременного груминга и актов дефекации. Такое поведение животных может свидетельствовать, что они в описанной обстановке, не чувствовали тревоги и могли делать стойки в открытом пространстве и спокойно выполнять санитарные процедуры по чистке тела, т.е. увеличивая количество длительного груминга, уменьшая при этом количество кратковременного (тревожного) груминга. Уменьшение актов дефекации-вегетативных коррелятов рассчитывались как снижение тревожных состояний.

Таблица 5 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Открытое поле»

Показатели / группы	Контроль 1	VMA-10-06	VMA-10-03	VMA-10-04	VMA-10-05
Количество пересеченных квадратов	27,3±2,69	30,2±4,18	26,0±1,83	30,0±1,53	23,5±1,45
Количество заглядываний в отверстия	4,7±0,76	8,2±1,08*	7,7±1,31*	7,0±0,73*	6,7±0,71
Стойки закрытые	6,0±1,10	3,2±0,87	5,0±1,03	4,0±0,58	1,8±0,31**
Стойки открытые	0,7±0,33	1,0±0,37	1,3±0,61	2,0±0,45*	1,0±0,37
Ориентировочно-исследовательская активность	11,3±0,71	12,3±1,41	14,0±1,88	13,0±1,26	9,5±0,96
Количество актов кратковременного груминга	2,8±0,31	0,8±0,31**	1,5±0,22*	1,7±0,21*	1,0±0,26*
Количество актов длительного груминга	0,7±0,33	0,5±0,22	1,7±0,21*	1,8±0,31*	2,0±0,26**
Количество актов дефекации	1,2±0,54	0,8±0,31	0,5±0,22	0,2±0,17*	0,2±0,17*

*Примечание: * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Результаты поведения животных в более аверсивной среде теста ПКЛ представлены в таблице (Таблица 6). Животные, получавшие соединения VMA-10-04, VMA-10-05 после посадки быстро покидали центральную зону, больше делали

выходов в ОР и дольше находились в них, делая большее количество стоек в открытых рукавах и свешиваний с них, по сравнению с показателями контрольной группы животных. Нахождение животных в открытых рукавах в тесте ПКЛ в условиях моделирования ситуативной тревожности может указывать на снижение данными соединениями уровня тревоги, и подавляя страх высоты ярко освещенного открытого пространства, что можно расценивать как анксиолитическое действие, более выраженное у соединения VMA-10-05, имеющего метильную группу в составе линкера, соединяющего гетероцикл с бензольным кольцом.

Таблица 6 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатели / группы	Контроль 1	VMA- 10-06	VMA- 10-03	VMA- 10-04	VMA- 10-05
Время в открытых рукавах	17,7±4,07	16,9±1,16	42,2±5,72**	88,3±14,87**	89,5±23,67*
Количество выходов в открытые рукава	1,7±0,21	0,7±0,29*	0,5±0,22**	2,0±0,26	2,0±0,26
Время нахождения в центральной зоне	10,8±0,54	9,7±1,51	5,0±0,68**	2,0±0,52**	4,2±0,40**
Количество заходов в темный рукав	2,0±0,26	1,4±0,32	1,2±0,17*	1,5±0,22	2,2±0,17
Количество переходов между рукавами	5,0±0,63	3,6±0,26*	2,5±0,43**	5,7±0,56	6,5±0,34
Количество стоек в открытых рукавах	0,8±0,40	5,1±0,74**	2,8±0,31**	4,2±0,48**	3,7±0,21**
Количество свешиваний с открытых рукавов	1,3±0,21	0,9±0,47	0,7±0,21	1,7±0,33	2,7±0,21**

*Примечание: * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Отмеченное в тесте ОП уменьшение актов кратковременного и увеличение длительного груминга (VMA-10-03, VMA-10-04 и VMA-10-05), а также уменьшение числа актов дефекации (VMA-10-04 и VMA-10-05) у отмеченных веществ подтверждают возможное их анксиолитическое действие.

В тесте «Черно-белая камера» менее аверсивной, чем тест ПКЛ, у животных, получавших исследуемые вещества данной группы, отмечено

увеличение количества переходов между камерами, время нахождения в светлой камере (больше VMA-10-06 и VMA-10-05), количество стоек и времени нахождения в светлой камере.

Таблица 7 - Влияние однократного введения простых эфиров производных хиназолин-4(3H)-она на показатели теста «Черно-белая камера»

Показатели / группы	Контроль 1	VMA-10-06	VMA-10-03	VMA-10-04	VMA-10-05
ЛП захода в темную камеру, с.	38,0±11,14	78,7±6,24*	59,7±15,17	58,8±7,37	56,3±18,06
Время нахождения в светлой камере, с.	81,2±18,11	150,7±13,41*	110,5±14,78	118,8±15,56	153,0±16,95*
Количество переходов между камерами	2,3±0,71	8,0±3,10	6,8±2,59	5,7±2,28	7,8±2,32*
Количество выглядываний из темной камеры	3,0±0,77	3,2±0,91	3,2±0,48	2,7±1,23	3,0±1,44
Количество свободных стоек в светлой камере	0,2±0,17	1,0±1,00	0,2±0,17	1,0±0,63	0,5±0,34
Количество пристеночных стоек в светлой камере	1,8±0,70	5,0±2,57	7,7±3,49	5,8±3,04	3,3±1,67
Количество болюсов	0,3±0,21	0,3±0,21	0,0±0,00	0,2±0,17	0,0±0,00
Количество уринаций	0,2±0,17	0,0±0,00	0,3±0,21	0,0±0,00	0,0±0,00

*Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Таким образом, сопоставляя полученные данные в проведенных тестах можно заключить, что простые эфиры 3-(бензилоксиметил)-хиназолин-4(3H)-он, имеющие метильные заместители в бензольном кольце или в составе линкера снижают тревожность в условиях аверсивной среды ОП, ПКЛ и ЧБК, о чем свидетельствует увеличение количества переходов между камерами, время нахождения в светлой камере (больше VMA-10-06 и VMA-10-05), а так же увеличение времени в ОР и количества стоек в ПКЛ (VMA-10-03, VMA-10-04, VMA-10-05 и VMA-10-06), и количество свешиваний в установке ПКЛ (VMA-10-05), но анксиолитический и антифобический в большей мере во всех аверсивных средах был более выраженным, чем у соединений с метильными заместителями в бензольном кольце.

Но для заключения о значительности и сравнительной выраженности анксиолитического действия простых эфиров, производных хиназолина желательнее оценить количество наказуемых взятий воды из поилки в тесте «Конфликтной ситуации в варианте Вогель» и сопоставить с действием референтных анксиолитиков.

При проведении исследований среди изучаемых соединений некоторые производные хиназолина данной группы проявляли в разной степени выраженные анксиолитические свойства, это проявлялось в достоверном увеличении количества выходов в центральную зону в тесте ОП, увеличении продолжительности пребывания в открытых рукавах и увеличении количества свешиваний с них в тесте ПКЛ, увеличении латентного периода захода в темный отсек и времени нахождения в светлом отсеке в тесте «Черно-белая камера». На основании предыдущих исследований представляется целесообразным дальнейшее исследование в более специфическом тесте «Конфликтной ситуации в варианте Вогеля», для подтверждения анксиолитической активности у исследуемых соединений.

При проведении теста «Конфликтной ситуации в варианте Вогель» животные (крысы - самцы), получавшие соединение VMA-10-05 статистически значимо уменьшали показатели латентного периода от первого до второго наказуемого взятия воды из поилки, а также увеличивали количество наказуемых взятий воды, по сравнению с показателями контрольной группой животных.

Таблица 8 - Влияние однократного введения простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на показатели теста «Конфликтная ситуация в варианте Вогеля»

Показатели \ группы	ЛП от 1 до 2-го наказуемого взятия воды из поилки		Количество наказуемых взятий воды из поилки	
Контроль 1	232,2±7,85	-	2,4±0,37	-
Диазепам	5,6±1,75**	(-98%)	288,0±36,51**	(11900%)
VMA-10-06	242,4±19,98	(4%)	2,6±0,55	(8%)
VMA-10-03	198,2±11,87	(-15%)	3,2±0,45	(33%)
VMA-10-04	238,4±5,25	(3%)	3,0±0,58	(25%)
VMA-10-05	192,0±13,74*	(-17%)	6,8±1,45*	(183%)

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

Животные, получавшие производные хиназолина под лабораторным шифром VMA-10-05, вследствие анксиолитического эффекта замедляли ориентировочные реакции (на основании ранее проведенных тестов ОП, ПКЛ, теста ЧБК), в данном тесте анксиолитический эффект проявлялся в увеличении латентного периода от первого до второго наказуемого взятия воды и увеличении количества наказуемых взятий воды из поилки.

В тесте принудительного плавания по Порсольту время активного плавания, количество прыжков и время иммобилизации у животных, получавших исследуемые вещества VMA-10-06, VMA-10-03, VMA-10-04, VMA-10-05 статистически значимо не отличались от показателей животных контрольной группы (Таблица 9).

Таблица 9 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте принудительного плавания по Порсольту

Показатели \ группы	Время активного плавания, с.	Количество прыжков	Время иммобилизации, с.
Контроль 1	127,3±7,63	16,8±1,68	9,3±0,71
Мелипрамин	289,7±1,43**	18,5±2,64	7,8±1,51
VMA-10-06	115,7±9,05	18,3±3,32	8,2±1,08
VMA-10-03	123,0±14,17	16,7±1,96	12,8±1,28
VMA-10-04	99,0±14,62	14,8±1,38	10,8±1,45
VMA-10-05	144,2±10,40	18,2±1,78	7,8±0,40

*Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

С целью дальнейшего изучения антидепрессивных свойств изучаемых соединений был использован тест ПМХ. (Таблица 10). Основным показателем отсутствия тревоги и депрессивного компонента в этом тесте является уменьшение параметра «Время иммобилизации».

Животные, получавшие соединения простых эфиров – производных хиназолин-4(3H)-она VMA-10-04 и VMA-10-03, уменьшали показатель времени иммобилизации (эквивалент отчаяния), что может свидетельствовать о наличии активирующей и слабой антидепрессивной активности соединений.

Таблица 10 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Подвешивание мышей за хвост»

Показатели \ группы	Время иммобилизации, с.	% по отношению к контрольной группе животных
Контроль 1	161,8±9,28	-
Мелипрамин	85,7±6,45**	-47%
VMA-10-06	124,3±15,82*	-23,17%
VMA-10-03	156,0±17,48*	-3,60%
VMA-10-04	137,7±16,66*	-27,29%
VMA-10-05	135,3±12,00	-22,55%

*Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Анализируя результаты тестов Порсольт и ПМХ, можно сделать вывод о незначительном антидепрессантном эффекте только у соединения VMA-10-05, которое незначительно увеличивало время активного плавания в тесте по Порсольту и уменьшало время иммобилизации в тесте ПМХ.

Гидрохлорид VMA-10-04 и соответствующее ему свободное основание VMA-10-03 ряда простых эфиров хиназолина существенно не меняли психоэмоциональное состояние животных.

3.1.2. Изучение влияния простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на когнитивные функции животных

Изучение влияния производных хиназолина на когнитивные функции крыс проведено с использованием тестов «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) (Таблица 11) и «Теста экстраполяционного избегания» (ТЭИ). Воспроизведение рефлекса пассивного избегания в тесте УРПИ и проверка выработки стратегии решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ проводилась через 24 часа, 7 и 14 суток после обучения. Вещества вводились однократно на этапе обучения за 60 мин. до проведения тестов, что позволяло оценивать одновременно их влияние на формирование и сохранность памятного следа.

Таблица 11 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Условная реакция пассивного избегания»

Показатели / группы	Контроль 1	VMA-10-06	VMA-10-03	VMA-10-04	VMA-10-05
ЛП захода в темный отсек при обучении	12,5± 1,02	20,1± 2,23	15,8± 1,96	16,2± 1,68	14,0± 0,93
Количество заходов в темный отсек при обучении	1,2± 0,17	1,2± 0,11	1,0± 0,00	1,0± 0,00	1,2± 0,17
n/N	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 24 часа	180,0± 0,00	179,3± 0,67	180,0± 0,00	168,7± 11,3	180,0± 0,00
Количество заходов в темный отсек воспроизведены через 24 часа	0,0± 0,00	0,2± 0,17	0,0± 0,00	0,2± 0,17	0,0± 0,00
n/N	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6
ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 7 дней	103,5± 26,28	109,0± 24,18	152,7± 27,33	139,2± 26,47	155,3± 24,67
Количество заходов в темный отсек воспроизведены через 7 дней	0,7± 0,21	0,7± 0,21	0,17± 0,17	0,3± 0,21	0,2± 0,17
n/N	4/6	4/6	1/6	2/6	1/6
ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 14 дней	67,8± 26,52	107,8± 23,18	152,8± 27,17*	122,0± 36,68	139,2± 28,06
Количество заходов в темный отсек воспроизведение через 14 дней	1,0± 0,26	0,7± 0,21	0,3± 0,33	0,50± 0,34	0,8± 0,54
n/N	5/6	4/6	1/6	2/6	2/6

*Примечание: * - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса, критерия χ^2), n/N – количество животных, зашедших в темный отсек в УРПИ; % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.*

В тесте УРПИ соединения VMA-10-03 и VMA-10-05 улучшали формирование памятного следа и сохранение его через 24 часа, 7 и 14 суток после выработки реакции пассивного избегания, что выразилось в уменьшении количества животных, зашедших в темную камеру и увеличении времени ЛП по сравнению с контрольной группой животных.

В тесте экстраполяционного избавления, в котором животное в условиях воздействия аверсивной среды (вода пониженной температуры и помещение в сосуд с ограниченным пространством (в прозрачном сосуде) должно активно (выбраться) найти решение задачи избавления от неблагоприятной среды.

В тесте ТЭИ (Таблица 12) у животных, получавших соединения VMA-10-03 и VMA-10-05, регистрировалось уменьшение времени решения задачи экстраполяционного избавления после погружения в цилиндр на 2, 7 и 14 день после выработки навыка избавления от аверсивной среды по сравнению с показателями животных контрольной группы.

Таблица 12 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на когнитивные функции животных в тесте «экстраполяционного избавления»

Показатели / группы	Контроль 1	VMA-10-06	VMA-10-03	VMA-10-04	VMA-10-05
ЛП двигательной активности при обучении	5,2±0,31	5,2±0,40	6,3±0,70	9,3±0,20	5,5±0,70
Время иммобилизации при обучении	7,8±1,25	0,2±0,17	8,8±1,83	13,5±3,75	1,7±0,21
Количество прыжков при обучении	0,8±0,17	2,0±0,45	1,3±0,21	0,8±0,17	2,0±0,26
ЛП подныривания при обучении	37,3±4,05	36,8±4,93	82,3±7,57	77,7±2,25	69,0±8,58
Время иммобилизации при воспроизведении через 24 часа	1,7±0,21	0,8±0,17**	3,5±0,34**	4,7±0,61**	0,5±0,34*
Количество прыжков при воспроизведении через 24 часа	0,8±0,54	2,0±0,58	2,5±0,22*	3,3±0,21**	1,2±0,17
ЛП подныривания при воспроизведении через 24 часа	31,2±5,39	28,5±4,93	22,0±6,73	64,7±6,83**	16,0±2,85*
ЛП подныривания при воспроизведении через 7 дней	24,5±3,56	18,0±3,14	15,3±3,53	42,0±4,89*	12,7±2,69*
ЛП подныривания при воспроизведении через 14 дней	21,2±3,29	14,5±1,02	11,0±1,59*	27,8±1,89	10,0±1,93*

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Статистически значимое уменьшение времени подныривания наблюдалось только среди показателей соединения VMA-10-05 на всех этапах воспроизведения. В условиях аверсивной среды животные, получавшие соединение VMA-10-04 решали задачу экстраполяционного избавления значительно дольше, а количество поведенческих актов было больше, чем у животных контрольной группы.

Таким образом, результаты, полученные в тестах УРПИ и ТЭИ, свидетельствуют об улучшении когнитивных функций (формировании и сохранении памятного следа) у животных, получавших соединения VMA-10-05, и в меньшей степени VMA-10-03.

3.1.3. Изучение влияния простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на судороги, вызванные введением коразола

Изучение противосудорожной активности новых производных хиназолина проводилось на модели коразоловых судорог при однократном подкожном введении коразола в дозе 90 мг/кг в область шейного отдела спины животным (мыши – самцы).

За животными наблюдение велось в течение 30 мин. после инъекции коразола. Регистрировали следующие показатели: продолжительность латентного периода до наступления судорог, длительность клонико-тонических судорог, летальность в процентах от общего количества животных в группе.

При проведении теста противосудорожной активности статистически значимое увеличение латентного периода наступления судорог наблюдалось у животных, получавших соединения VMA-10-05 (158%) и VMA-10-03 (98%), по сравнению с контрольной группой животных, получавших 2% крахмальный гель. Остальные вещества значимого влияния на показатели латентного периода до развития судорог и на их выраженность и продолжительность не оказывали.

Полученные данные - увеличение времени наступления клонико-тонических судорог и сокращение летальных исходов на фоне введения простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она с лабораторными шифрами VMA-10-05 и VMA-10-03, свидетельствуют о наличии у данных соединений противосудорожной активности (Таблица 13).

Таблица 13 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на показатели латентного периода и продолжительность клонико-тонических судорог у животных

Показатели / группы	Латентный период наступления судорог (M±m)	Продолжительность клонико-тонических судорог, с.	Количество погибших животных
Контроль 1	193,7±37,66	53,2±10,81	4/6
Диазепам	1047,7±59,93**	9,0±0,73**	0/6
VMA-10-06	283,0±31,79	37,2±7,45	5/6
VMA-10-03	383,0±16,51*	53,2±6,23	4/6
VMA-10-04	294,5±53,96	61,7±10,93	6/6
VMA-10-05	500,5±104,09*	56,3±9,64	3/6

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (непараметрический U-критерий Манна-Уитни, критерий Данна для множественных сравнений), $n=6$.

3.1.4. Изучение антигипоксической активности простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она на модели нормобарической и гемической гипоксии у животных

Изучение антигипоксического действия производных хиназолина группы простых эфиров выполнено на моделях нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии.

Таблица 14 - Влияние простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она время наступления апноэ на модели нормобарической и время жизни животных при воспроизведении гемической гипоксии

Показатели/ группы	Нормобарическая гипоксия		Гемическая гипоксия	
	ЛПА, с. (M±m)	%	Время жизни, с. (M±m)	%
Контроль 1	1062,7±97,15	-	1271,8±103,76	-
Мексидол	1547,5±115,54	45,62	1714,2±19,85**	34,78
VMA-10-06	1219,3±176,5	14,7	1669,8±155,34	31,3
VMA-10-03	1432,3±159,37	34,8	1538,8±50,75	21,0
VMA-10-04	1047,8±89,87	-1,4	1347,3±56,19	5,9
VMA-10-05	882,7±57,12	-16,9	1382,2±96,31	8,7

Примечание: ЛПА – латентный период апноэ – время от момента помещения животного в герметично закрываемый контейнер до наступления апноэ, с; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса), % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

Об антигипоксическом действии при проведении нормобарической гипоксии исследуемых веществ судили по увеличению времени наступления апноэ. Все исследуемые соединения группы простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она статистически значимого влияния на время наступления апноэ не оказывали.

Так же нами проведен тест острой генерализованной гемической гипоксии, вызванной введением нитрита натрия, что также подтвердило отсутствие выраженной антигипоксической активности в группе простых эфиров - производных хиназолин-4(3H)-она.

На основании проведенных исследований влияния простых эфиров производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию наибольшая активность отмечена у соединений VMA-10-03 и VMA-10-05, что является целесообразным их дальнейшее углубленное изучение.

3.2. Изучение влияния амидных производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность

3.2.1. Изучение влияния амидных производных хиназолина на психоэмоциональное состояние животных

Оценка влияния группы амидных производных хиназолина на психоэмоциональное поведение животных выполнена, как и в предыдущей серии, с использованием тестов ОП, ПКЛ, теста ЧБК, «Конфликтной ситуации в варианте Вогель», теста «принудительного плавания по Порсольту» и теста ПМХ.

В тесте ОП соединения ряда амидных производных хиназолина оказывали разнонаправленное влияние на большинство регистрируемых показателей (Таблица 15).

Соединение VMA-10-18 статистически значимо повышало показатели спонтанной двигательной и ориентировочно-исследовательской активности,

количество открытых стоек и актов длительного груминга. Соединение VMA-10-19 в тесте ОП не увеличивало спонтанную двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность, но увеличивало количество открытых стоек, актов длительного груминга, а соединения VMA-10-16, и в меньшей степени VMA-10-14, статистически значимо увеличивая двигательную активность – такое поведение свидетельствует об отсутствии тревожности в условиях новой аверсивной среды.

В тесте ПКЛ (Таблица 16), более длительно в открытых рукавах находились животные, которым вводились соединения VMA-10-19 > VMA-10-18 > VMA-10-13 > VMA-10-11. Соединения VMA-10-16 и VMA-10-11 увеличивали количество переходов между рукавами, в меньшей степени соединения VMA-10-18 > VMA-10-14 > VMA-10-19. Наибольшее количество свешиваний с ОР наблюдалось у животных, получавших VMA-10-19 и VMA-10-13. Эти данные и результаты поведения в тесте ОП, представленные в таблице (Таблица 15) свидетельствуют о выраженном анксиолитическом действии VMA-10-18 и VMA-10-19.

При проведении теста ЧБК (Таблица 17) животные, которым вводили соединения VMA-10-18 > VMA-10-13 > VMA-10-10 > VMA-10-14 > VMA-10-11 дольше, чем животные контрольной группы находились в светлой камере, животные, получавшие соединения VMA-10-18 и VMA-10-10 больше осуществляли переходов между камерами, что можно расценивать как увеличение исследовательской активности, что коррелирует с показателями проведенных ранее тестов.

На основании данных, полученных в 3-х тестах, среди амидных производных хиназолина соединение VMA-10-18 проявило активирующее действие, увеличивая количество пересеченных квадратов в тесте ОП, общее количество пересечений рукавов в тесте ПКЛ и количество переходов между камерами в тесте ЧБК и одновременно анксиолитическое, т.е. и в тесте ПКЛ и в тесте ЧБК Животные дольше находились в светлом рукаве и светлой камере, больше совершали переходов между рукавами и камерами.

Таблица 15 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Открытое поле»

Показатели/ группы	Количество пересеченных квадратов	Количество заглядываний в отверстия	Стойки пристеночные	Стойки открытые	ОИА	Количество заходов в центральную зону	Количество актов кратковременного груминга	Количество актов длительного груминга	Количество актов дефекации
Контроль 2	25,7±1,98	4,8±0,48	9,5±1,23	0,2±0,17	14,5±1,63	0,2±0,17	2,0±0,37	0,2±0,17	3,5±0,34
VMA-10-11	33,8±4,85	5,7±1,28	8,5±2,09	0,7±0,21	14,8±2,95	0,3±0,21	2,7±0,42	0,5±0,22	3,5±0,50
VMA-10-13	36,7±4,80*	6,3±0,88	9,0±2,00	0,5±0,22	15,8±2,69	0,8±0,17*	1,7±0,21	0,8±0,17*	2,2±0,31*
VMA-10-14	32,8±4,81	5,33±0,71	8,8±1,17	2,0±0,63*	16,2±0,40	0,8±0,17*	3,0±0,37	0,5±0,22	3,8±0,48
VMA-10-18	42,7±5,46*	6,7±0,80	12,5±2,16	4,5±0,99**	23,7±3,02*	0,2±0,17	3,2±0,60	3,0±0,37**	3,3±0,49
VMA-10-10	28,5±5,64	9,5±1,95	8,8±1,33	1,2±0,40	20,0±2,80	0,5±0,34	0,5±0,22*	1,00±0,37	0,7±0,21*
VMA-10-07	34,7±6,08	8,7±0,99	10,2±2,39	0,0±0,00	20,0±4,48	0,2±0,17	3,00±0,82	0,0±0,00	9,8±1,96*
VMA-10-19	32,0±4,49	4,2±1,08	10,5±0,89	2,3±0,33**	17,0±1,67	0,5±0,22	1,3±0,21	1,2±0,17**	3,3±0,42
VMA-10-16	36,2±4,73*	4,7±0,67	13,5±0,62*	1,2±0,17*	19,3±1,09*	0,2±0,17	2,3±0,21	0,3±0,21	2,3±0,21*

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса);*

% по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

Таблица 16 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатели / группы	Время нахождения в центральной зоне	Время нахождения в открытых рукавах	Время нахождения в темных рукавах	Количество стоек в открытых рукавах	Количество свешиваний с открытых рукавов	Количество переходов между рукавами
Контроль 2	5,8±0,31	11,2±3,88	163,0±3,79	0,2±0,17	0,3±0,21	3,2±0,40
VMA-10-11	3,3±0,42*	21,2±0,70*	155,5±3,04	0,5±0,22	0,5±0,22	6,2±0,48**
VMA-10-13	3,8±0,40*	42,8±5,99**	133,3±7,06	0,8±0,17*	1,8±0,40**	3,8±0,40
VMA-10-14	7,3±0,42*	13,0±0,52	159,7±2,62	0,7±0,21	0,5±0,22	5,8±0,54**
VMA-10-18	5,3±0,33	51,5±2,74**	123,2±2,76	0,3±0,21	2,0±0,26**	6,0±0,52**
VMA-10-10	6,7±0,52	21,9±10,82	150,1±2,55	2,8±0,91*	0,2±0,19	3,2±0,36
VMA-10-07	2,9±0,23*	6,1±5,29*	172,1±1,19	0,8±0,42	0,0±0,00*	1,7±0,20*
VMA-10-19	5,8±0,54	76,7±15,13**	97,5±15,36	0,5±0,22	0,3±0,21	5,3±0,56*
VMA-10-16	6,3±0,42	4,0±0,26	169,7±0,56	0,3±0,21	0,5±0,22	7,0±0,45**

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); %, по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

Таблица 17 - Влияние однократного введения амидных производных хиназолин-4(3H)-она на показатели теста «Черно-белая камера»

Показатели/ группы	Время нахождения в светлой камере, с.	Количество переходов между камерами	Количество выглядываний из темной камеры	Количество свободных стоек в светлой камере	Количество пристеночных стоек в светлой камере	Количество болюсов	Количество уриаций
Контроль 2	88,2±7,44	2,3±0,71	2,8±0,60	0,2±0,17	1,8±0,70	0,7±0,21	0,3±0,21
VMA-10-11	131,0±12,35*	9,2±2,10*	3,0±0,93	0,2±0,17	2,2±2,17	0,8±0,48	0,0±0,00
VMA-10-13	167,2±18,24**	5,5±2,68	1,8±0,60	1,8±1,05	7,5±3,23	0,5±0,50	0,0±0,00
VMA-10-14	142,0±17,55*	2,2±0,87	4,5±0,76	1,7±1,17	4,2±1,80	0,3±0,21	0,0±0,00
VMA-10-18	177,7±11,16**	9,5±2,95*	2,7±1,58	0,0±0,00	0,7±0,42	0,7±0,33	0,0±0,00
VMA-10-10	152,3±20,34*	9,2±4,08*	3,0±1,46	0,3±0,33	7,2±3,90	0,0±0,00	0,0±0,00
VMA-10-07	90,5±19,35	3,7±0,95	2,3±0,56	0,3±0,33	5,5±2,85	1,2±0,98	0,0±0,00
VMA-10-19	100,0±22,09	6,7±2,28	2,8±0,87	1,2±0,98	5,7±3,55	0,2±0,17	0,2±0,17
VMA-10-16	42,5±14,83	6,5±2,22	2,5±1,06	2,5±2,31	4,5±1,95	0,7±0,21	0,0±0,00

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

Наличие анксиолитической активности оценивалось в тесте «конфликтной ситуации в варианте Вогель». Животные, получавшие соединения VMA-10-18 и VMA-10-13 статистически значимо уменьшали показатели латентного периода от первого до второго наказуемого взятия воды из поилки, а также увеличивали показатели количества наказуемых взятий воды из поилки на 367% и 133%, соответственно, по сравнению с показателями контрольной группой животных, получавших 2% крахмальный гель.

Таблица 18 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на показатели теста «Конфликтная ситуация» в варианте Вогеля

Показатели / группы	ЛП от 1 до 2-го наказуемого взятия воды из поилки		Количество наказуемых взятий воды из поилки	
Контроль 2	219,2±17,3	-	3,0±0,45	-
Диазепам	3,3±0,42**	-98,48%	18,5±0,22**	516,67%
VMA-10-11	218,0±9,98	-0,5%	3,5±0,43	17%
VMA-10-13	37,7±2,40*	-83%	7,0±0,68*	133%
VMA-10-14	154,2±26,12	-30%	5,7±1,56	89%
VMA-10-18	9,5±2,78*	-96%	14,0±0,68*	367%
VMA-10-10	176,7±9,25	-20%	5,0±0,67	80%
VMA-10-07	236,4±13,21	8%	2,8±0,18	-8%
VMA-10-19	117,0±44,13	-47%	3,7±0,42	22%
VMA-10-16	137,5±35,48	-37%	2,8±0,40	-6%

*Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

По результатам проведенного теста «конфликтной ситуации по Вогель», можно говорить о выраженном анксиолитическом эффекте у соединений VMA-10-18, и, в меньшей степени, VMA-10-13, что коррелирует с предыдущими исследованиями психоэмоционального состояния животных, получавших эти соединения.

Для выявления антидепрессивной активности амидных производных хиназолин-4(3H)-она были выполнены два теста: тест «Принудительного плавания по Порсолту» на крысах и тест «Подвешивания мышей за хвост».

В тесте принудительного плавания по Порсолту (Таблица 19) у животных, получавших соединения VMA-10-19, VMA-10-18 и VMA-10-11 отмечалось большее время активного плавания, большее количество прыжков и меньшее время иммобилизации, что может свидетельствовать о наличии у этих веществ антидепрессивного действия.

Таблица 19 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте принудительного плавания по Порсолту

Показатели/ группы	Время активного плавания, с.	Количество прыжков	Время иммобилизации, с
Контроль 2	178,00±20,76	3,83±0,54	25,5±4,45
Мелипрамин	295,0±6,30**	14,5±2,01	9,0±1,51**
VMA-10-11	213,3±32,88	11,8±1,45*	9,8±1,54*
VMA-10-13	171,8±25,05	5,5±1,06	12,7±3,14*
VMA-10-14	182,3±32,34	6,5±1,41	6,5±1,38**
VMA-10-18	214,5±20,23	11,0±1,37*	1,8±0,40**
VMA-10-10	164,8±20,19	3,0±0,45	38,3±4,90*
VMA-10-07	164,8±26,98	5,3±0,56	28,2±6,38
VMA-10-19	217,5±18,66	13,0±1,67*	2,0±0,82**
VMA-10-16	184,3±15,27	5,0±0,77	15,8±1,85

Примечание: * - $p < 0,05$ различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

В тесте «Подвешивание мышей за хвост» (Таблица 20) регистрировалось «Время иммобилизации», укорочение которого расценивалось как депрессивное поведение животных.

В этом тесте достоверное уменьшение времени иммобилизации наблюдалось у животных, получавших соединения VMA-10-18 > VMA-10-19 > VMA-10-11. Остальные соединения статистически значимо на время иммобилизации не влияли.

Таблица 20 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на депрессивное поведение животных в тесте «Подвешивание мышей за хвост»

Показатели / группы	Время иммобилизации, с.	% по отношению к контрольной группе животных
Контроль 2	162,5±22,73	-
Мелипрамин	92,7±9,76*	-43%
VMA-10-11	91,2±8,44*	-44%
VMA-10-13	126,5±15,30	-22%
VMA-10-14	138,8±10,35	-15%
VMA-10-18	89,2±10,82*	-45%
VMA-10-10	144,7±17,88	-11%
VMA-10-07	126,0±14,79	-22%
VMA-10-19	130,7±22,48	-20%
VMA-10-16	143,8±17,00	-11%

*Примечание: * - $p < 0,05$ различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Таким образом, на основании теста «подвешивания мышей за хвост» и теста «принудительного плавания по Порсольту», наиболее выраженное антидепрессивное поведение наблюдалось у животных, получавших соединения VMA-10-11 и VMA-10-18, которые статистически значимо в тесте ПМХ уменьшали показатели времени иммобилизации, а в тесте Порсольт сокращали время иммобилизации и достоверно увеличивали количество прыжков и время активного плавания, что свидетельствует о наличии антидепрессантного компонента у исследуемых соединений.

Наиболее активными по влиянию на основные показатели антидепрессивного эффекта оказались соединения VMA-10-18 и VMA-10-11. У соединений VMA-10-13, VMA-10-14 и VMA-10-19 отмечалась тенденция к уменьшению депрессивного поведения в условиях аверсивного воздействия.

3.2.2. Изучение влияния амидных производных хиназолин-4(3H)-она хиназолина на когнитивные функции животных

Влияние указанных соединений на когнитивные функции животных оценивалось в тесте «Условная реакция пассивного избегания» и в тесте «Экстраполяционного избавления».

В тесте УРПИ (Таблица 21) животные, получавшие вещества VMA-10-13, VMA-10-14, VMA-10-18, VMA-10-16 и животные контрольной группы оказались обученными и в темный отсек не заходили. Однако, лучшее сохранение памятного следа на 7 и 14 сутки наблюдалось только у животных, которым вводилось соединение VMA-10-18, у которых латентный период захода в темный отсек был больше, чем у животных других групп, а количество зашедших в темную камеру соответственно меньше.

Таким образом, при воспроизведении в тесте УРПИ (через 24 часа, 7 и 14 дней) меньшее количество животных, получавших соединение VMA-10-18, и в меньшей мере VMA-10-16, заходили в темный отсек, а зашедшие через большее время, что может свидетельствовать о хорошей обучаемости и закреплении рефлекса пассивного избегания после его выработки.

Во время обучения экстраполяционному избавлению от аверсивной среды **в тесте ТЭИ** (Таблица 22) поведение животных, получавших различные амидные производные, существенно не отличалось, кроме животных, получавших соединение VMA-10-07, которые наибольшее время «замирали» в воде, затем делали больше прыжков и дольше решали задачу избавления от аверсивной среды при обучении и при воспроизведении теста через 24 часа, 7 и 14 суток. После обучения навыку быстрее других решали эту задачу животные, получавшие соединение VMA-10-18, меньше эффект был выражен у животных, которым вводились соединения VMA-10-16 и VMA-10-13.

Таким образом, соединения VMA-10-18, и в меньшей мере соединения VMA-10-16 в тестах УРПИ и ТЭИ улучшали формирование и сохранение памятного следа. Такие результаты свидетельствуют об улучшении когнитивной функции.

Таблица 21 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Условная реакция пассивного избегания»

Показатели \ группы	ЛП захода в темный отсек при обучении	Количество заходов в темный отсек при обучении	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 24 часа	Количество заходов в темный отсек воспроизведение через 24 часа	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 7 дней	Количество заходов в темный отсек воспроизведение через 7 дней	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 14 дней	Количество заходов в темный отсек воспроизведение через 14 дней	n/N
Контроль 2	15,8±2,65	1,7±0,33	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	128,0±21,79	0,3±0,21	4/6	111,7±17,04	0,8±0,17	5/6
VMA-10-11	15,7±2,23	1,5±0,22	6/6	177,5±2,50	0,2±0,17	1/6	96,8±37,20	0,5±0,22	3/6	99,7±35,98	0,5±0,22	3/6
VMA-10-13	24,3±8,14	1,5±0,22	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	114,3±31,80	0,7±0,33	3/6	100,7±28,36	0,7±0,21	4/6
VMA-10-14	17,0±4,84	1,2±0,17	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	126,0±34,20	0,3±0,21	2/6	116,2±30,63	0,5±0,22	3/6
VMA-10-18	24,0±2,07*	1,0±0,00	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	164,5±15,50	0,2±0,17	1/6	148,2±21,35	0,3±0,21	2/6
VMA-10-10	25,5±7,65	1,0±0,00	6/6	177,2±2,83	0,2±0,17	1/6	108,5±32,71	0,5±0,22	3/6	116,7±21,43	0,8±0,31	4/6
VMA-10-07	14,3±3,16	1,0±0,00	6/6	148,3±14,76	0,5±0,22	3/6	81,5±31,65	0,7±0,21	4/6	62,2±27,49	1,2±0,17	6/6
VMA-10-19	10,2±1,94	1,8±0,31	6/6	166,0±13,60	0,3±0,21	2/6	105,7±30,56	0,7±0,21	4/6	73,5±28,21	0,8±0,17	5/6
VMA-10-16	13,7±2,96	1,2±0,17	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	136,0±29,42	0,3±0,21	2/6	125,3±34,60	0,3±0,21	2/6

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса, критерия χ^2), n/N – количество животных, зашедших в темный отсек в УРПИ; % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.

Таблица 22 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на когнитивные функции животных в тесте «экстраполяционного извлечения»

Показатели \ группы	ЛП двигательной активности при обучении	Время иммобилизации при обучении	Количество прыжков при обучении	ЛП подныривания при обучении	Время иммобилизации при воспроизведении через 24 часа	Количество прыжков при воспроизведении через 24 часа	ЛП подныривания при воспроизведении через 24 часа	ЛП подныривания при воспроизведении через 7 дней	ЛП подныривания при воспроизведении через 14 дней
Контроль 2	1,7±0,42	6,2±1,70	0,2±0,17	19,5±8,46	4,0±1,44	0,3±0,33	16,0±4,75	20,7±2,81	14,5±2,69
VMA-10-11	1,8±0,31	5,0±1,86	0,5±0,34	17,5±5,05	1,8±0,17	0,7±0,33	33,3±8,58	13,2±3,28	10,0±2,10
VMA-10-13	2,2±0,40	8,7±2,76	1,2±0,79	27,3±4,96	2,3±0,61	1,0±0,52	9,8±1,68	11,3±0,95*	9,5±0,99
VMA-10-14	2,8±0,87	5,8±1,85	0,3±0,33	21,0±4,96	3,3±0,42	0,3±0,33	15,7±6,29	10,7±2,35*	8,2±0,95
VMA-10-18	1,5±0,22	6,2±2,06	0,8±0,54	32,0±14,02	1,8±0,17	1,3±0,71	7,3±0,56*	6,7±0,61**	6,0±0,26*
VMA-10-10	1,7±0,33	2,8±1,01	1,3±0,21*	18,7±2,86	1,3±0,21	0,8±0,31	15,8±2,32	52,5±13,86	11,3±1,23
VMA-10-07	1,5±0,34	16,3±3,43*	1,3±0,33	58,0±10,86*	2,0±0,45	2,8±0,60**	46,3±10,70*	38,2±2,09	29,0±3,44**
VMA-10-19	2,2±0,48	6,8±3,64	0,0±0,00	33,5±23,18	3,7±0,33	1,7±0,84	57,5±30,11	19,8±2,12	13,3±3,71
VMA-10-16	1,7±0,33	4,8±1,85	0,0±0,00	20,5±6,71	3,3±0,42	2,2±1,11	13,2±4,67	11,0±2,45*	7,5±1,06*

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

3.2.3. Изучение влияния амидных производных хиназолин-4(3H)-она на судороги, вызванные введением коразола

У всех животных после введения коразола, наблюдалось статистически значимое увеличение показателей латентного периода наступления судорог. При этом статистически значимое уменьшение длительности клонико-тонических судорог и уменьшение количества летальных исходов наблюдалось у животных, получавших VMA-10-18 и VMA-10-13, по сравнению с контрольной группой животных, получавших 2% крахмальный гель. Остальные соединения группы амидных производных хиназолин-4(3H)-она значимого влияния на показатели продолжительности судорог и количество летальных исходов не оказывали.

Таблица 23 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на показатели противосудорожной активности у животных

Показатели \ группы	Латентный период наступления судорог (M±m)	Продолжительность клонико-тонических судорог, с.	Количество погибших животных
Контроль 2	193,7±37,66	53,2±10,81	5/6
Диазепам	1048,7±58,83**	9,1±0,63**	0/6
VMA-10-11	383,5±52,37*	37,5±7,69	4/6
VMA-10-13	616,5±44,98*	19,5±3,83*	0/0
VMA-10-14	568,8±43,58*	52,0±10,42	3/6
VMA-10-18	622,5±35,44*	16,3±1,58*	0/0
VMA-10-10	321,8±29,17*	45,8±6,13	5/6
VMA-10-07	415,2±32,59*	49,2±4,11	5/6
VMA-10-19	602,5±74,24*	30,0±8,64	4/6
VMA-10-16	365,8±47,13*	35,5±6,76	5/6

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (непараметрический U-критерий Манна-Уитни, критерий Данна для множественных сравнений), $n=6$.

Соединения VMA-10-18, VMA-10-13 и препарат сравнения диазепам предупреждали гибель животных при введении коразола, по сравнению с

контрольной группой животных, что может свидетельствовать о наличии противосудорожной активности у названных производных хиназолина.

3.2.4. Изучение антигипоксической активности амидных производных хиназолин-4(3H)-она на модели нормобарической и гемической гипоксии у животных

В тесте (Таблица 24) при моделировании нормобарической гиперкапнической гипоксии животные, получавшие соединения VMA-10-18 (59,5%), VMA-10-11 (39,1%), VMA-10-16 (32,2%), VMA-10-14 (31,6%), VMA-10-13 (31,0%), статистически значимо увеличивали ЛПА наступления апноэ, по сравнению с группой контроля, получавшей 2% крахмальный гель в эквивалентном объеме.

Таблица 24 - Влияние амидных производных хиназолин-4(3H)-она на время наступления апноэ на модели нормобарической и время жизни животных при воспроизведении гемической гипоксии

Показатели \ группы	Нормобарическая гипоксия		Гемическая гипоксия	
	ЛПА, с. (M±m)	%	Время жизни, с. (M±m)	%
Контроль 2	572,0±18,55	-	1268,3±63,63	-
Мексидол	800,1±63,40	39,9	1446,8±49,87	78,7
VMA-10-11	795,8±43,82*	39,1	1697,5±98,30*	28,4
VMA-10-13	749,1±57,94*	31,0	1573,8±53,86*	24,1
VMA-10-14	752,8±45,72*	31,6	1653,5±83,63*	30,4
VMA-10-18	912,4±40,67*	59,5	2266,3±47,71*	78,7
VMA-10-10	847,9±53,27	48,2	1697,7±203,05	33,9
VMA-10-07	765,8±39,38	33,9	1680,7±199,77	32,5
VMA-10-19	611,3±51,04	15,6	1209,7±35,45	-4,6
VMA-10-16	755,9±58,18*	32,2	1628,8±84,85*	31,3

*Примечание: ЛПА – латентный период апноэ – время от момента помещения животного в герметично закрываемый контейнер до наступления апноэ, с; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса), % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

В тесте острой генерализованной гемической гипоксии, вызванной введением нитрита натрия соединения VMA-10-18 (78,7%), и в меньшей степени соединения VMA-10-16 (31,3%), VMA-10-11 (28,4%), VMA-10-14 (30,4%), VMA-10-13 (24,1%) статистически значимо по отношению к контролю увеличивали продолжительность жизни животных.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о наиболее выраженной антигипоксической активности у соединения VMA-10-18 из группы амидных производных хиназолин-4(3H)-она.

При изучении влияния амидных производных хиназолина на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию животных в группе у соединения VMA-10-18 выявлена выраженная анксиолитическая активность, умеренное антидепрессивное действие. Вместе с этим соединение VMA-10-18 улучшало когнитивную функцию и оказывало выраженное антигипоксическое действие, что позволяет считать, что данное соединение перспективно для дальнейшего углубленного изучения.

3.3. Изучение влияния сложнозамещенных амидных производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние (анксиолитическое и антидепрессивное), когнитивные функции, противосудорожную и антигипоксическую активность

3.3.1. Изучение влияния сложнозамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на психоэмоциональное состояние животных

При оценки психоэмоционального состояния животных использовались стандартные тесты ОП, ПКЛ, ЧБК, в варианте Вогель, «принудительного плавания по Порсольту» и тест ПМХ.

В тесте ОП соединения ряда производных хиназолина значимо не влияли на большинство регистрируемых показателей поведения (Таблица 25).

Таблица 25 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Открытое поле»

Показатели \ группы	Двигательная активность	Количество заглядываний в отверстия	ОИА	Стойки закрытые	Стойки открытые	Количество заходов в центральную зону	Количество актов кратковременного груминга	Количество актов длительного груминга	Количество актов дефекации
Контроль 3	29,0±2,73	5,7±0,56	16,5±1,59	10,5±1,59	0,3±0,21	0,2±0,17	2,3±0,49	0,5±0,34	3,3±0,42
VMA-10-12	31,2±1,68	5,8±0,60	15,0±0,82	9,0±0,45	0,2±0,17	0,2±0,17	1,3±0,21	0,3±0,21	3,8±0,17
VMA-10-15	31,8±3,18	5,8±0,79	14,5±0,81	7,2±0,31**	1,5±0,22**	0,5±0,22	0,7±0,21	0,2±0,17	3,0±0,37
VMA-10-20	29,8±3,18	2,5±0,22**	9,3±0,56**	6,2±0,40	0,7±0,21	0,2±0,17	1,3±0,21	0,3±0,21	2,8±0,17
VMA-10-17	27,2±1,78	4,7±0,33	13,5±0,56	8,7±0,42	0,2±0,17	0,0±0,00	1,5±0,22	0,2±0,17	2,0±0,37*
VMA-10-21	42,8±4,56*	6,5±0,67	20,8±0,87*	13,5±0,43*	0,8±0,17	0,5±0,22	1,2±0,17	0,8±0,17	4,3±0,61

Примечание: * - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.

Среди сложнорамещенных производных хиразолин-4(3H)-она только вещество VMA-10-21 с фенилпиперазиновым фрагментом выражено повышало горизонтальную двигательную активность, а также и исследовательское поведение в тесте ОП. Соединение VMA-10-20 увеличивало количество заглядываний в отверстия и повышало ориентировочно-исследовательскую активность. Животные, получавшие соединение VMA-10-15, статистически значимо увеличивали количество открытых стоек, уменьшая количество закрытых, на остальные показатели статистически значимо не влияя. Поведение животных, которым вводились другие вещества VMA-10-12 и VMA-10-17 этой группы практически не отличалось от таковых контрольных животных.

В тесте ПКЛ (Таблица 26), у животных, которым вводились соединения VMA-10-20, VMA-10-21, и в меньшей степени соединение VMA-10-17, регистрировалось больше количество переходов между рукавами, количество заходов в открытые рукава и время пребывания в открытых рукавах и в центральной зоне, а также отмечалось большее количество свешиваний с открытых рукавов.

У животных, получавших перед тестированием вещества VMA-10-12 и VMA-10-15 большинство показателей поведения в ПКЛ мало или не отличались от таковых показателей у животных контрольной группы.

Таблица 26 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатели \ группы	Время в открытых рукавах	Количество выходов в открытые рукава	Время нахождения в центральной зоне	Количество заходов в темный рукав	Количество переходов между рукавами	Количество стоек в открытых рукавах	Количество свешиваний с открытых рукавов
Контроль 3	8,2±3,98	0,5±0,22	6,2±0,48	1,5±0,22	3,2±0,48	0,3±0,21	0,2±0,17
VMA-10-12	13,3±1,50	1,3±0,21*	3,8±0,91*	1,3±0,21	4,3±0,56	0,2±0,17	0,3±0,21
VMA-10-15	8,7±2,56	1,0±0,26	10,5±0,56**	2,5±0,22**	5,8±0,60*	0,5±0,22	0,5±0,22
VMA-10-20	29,7±5,85**	2,3±0,21**	10,0±1,21*	1,8±0,31	7,2±0,48**	0,2±0,17	1,0±0,26*
VMA-10-17	21,7±2,58**	1,7±0,33*	9,0±0,52**	1,5±0,22	5,3±0,92	0,5±0,22	2,3±0,21**
VMA-10-21	29,8±4,57**	2,2±0,31**	8,3±0,61*	3,5±0,72*	9,0±1,00**	0,7±0,21	1,8±0,31**

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); %, по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Тест ЧБК (Таблица 27) показал, что животные, которым вводились соединения VMA-10-17 и, в меньшей мере, VMA-10-21 при их посадке в светлый отсек камеры долго находились в нем, не заходя в темный отсек, но животные, получавшие вещество VMA-10-21 в светлой камере делали больше свободных и пристеночных стоек, а соединение VMA-10-17 больше переходов между камерами. Оба вещества уменьшали число болюсов и уринаций за время нахождения в ЧБК, которые являются коррелятами тревожного состояния. Среди других – только соединения VMA-10-12 и VMA-10-20 увеличивали время пребывания животных в светлой камере, количество переходов между камерами. Соединение VMA-10-15 этой химической группы незначительно влияло на поведение животных в этом тесте.

Таким образом, сопоставляя результаты исследования поведения животных в тестах ОП, ПКЛ и ЧБК можно заключить, что во всех тестах вещество VMA-10-21 повышало двигательную и исследовательскую активность в ОП, количество переходов между рукавами и выходов в ОР и время пребывания в них, а также количество стоек и свешиваний с ОР в тесте ПКЛ. В тесте ЧБК вещество увеличивало время пребывания в светлой камере, количество переходов между светлым и темным отсеком. Все эти показатели позволяют считать, что соединение VMA-10-21 оказывает активирующее, анксиолитическое и антифобическое действие. Аналогичное, но менее выраженное действие оказывают соединения VMA-10-20 и VMA-10-17. Остальные соединения выраженной активности не проявляют.

Таблица 27 - Влияние однократного введения сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Черно-белая камера»

Показатели \ группы	ЛП захода в темную камеру, с.	Время нахождения в светлой камере, с	Количество переходов между камерами	Количество выглядываний из темной камеры	Количество свободных стоек в светлой камере	Количество пристеночных стоек в светлой камере	Количество болюсов	Количество уринаций
Контроль 3	36,2±10,14	94,5±25,91	2,5±0,43	3,0±0,73	0,3±0,33	1,8±0,48	0,7±0,21	0,2±0,21
VMA-10-12	107,7±20,05**	152,2±17,05	7,2±2,18*	2,5±1,20	0,2±0,17	4,5±1,65	0,3±0,21	0,3±0,21
VMA-10-15	67,2±9,70*	125,0±22,13	0,3±0,21	2,7±0,84	1,0±0,45	6,7±3,14	0,7±0,42	0,2±0,17
VMA-10-20	81,3±15,95*	149,7±10,36	6,7±0,84**	3,3±1,26	0,3±0,33	2,8±2,14	0,0±0,00	0,0±0,00
VMA-10-17	243,2±28,39**	247,0±9,58**	6,8±1,45*	0,2±0,17	0,0±0,00	0,7±0,49	0,5±0,22	0,0±0,00
VMA-10-21	152,7±15,05**	201,3±21,64**	5,8±2,75	2,0±0,77	0,8±0,65	4,3±2,14	0,0±0,00	0,0±0,00

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

На основании ранее проведенных тестов среди данной группы исследуемых соединений некоторые производные хиназолина проявляли в разной степени выраженные анксиолитические свойства. Представляется целесообразным дальнейшее проведение теста «Конфликтной ситуации в варианте Вогель», для подтверждения анксиолитической активности у исследуемых соединений данной группы.

При проведении теста «конфликтной ситуации в варианте Вогель» статистически значимое уменьшение показателя латентного периода от первого наказуемого взятия воды из поилки до второго наблюдалось у всех животных, получавших исследуемые соединения. При этом животные, получавшие соединения VMA-10-21, VMA-10-20, VMA-10-17, VMA-10-15 и VMA-10-12, достоверно увеличивали показатели количества наказуемых взятий воды из поилки на 518%, 289%, 225%, 111% и 98%, соответственно, по сравнению с показателями контрольной группой животных, получавших 2% крахмальный гель.

Таблица 28 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на показатели теста «Конфликтной ситуации в варианте Вогель»

Показатели \ группы	ЛП от 1 до 2-го наказуемого взятия воды из поилки		Количество наказуемых взятий воды из поилки	
	ЛП	Изменение	Взятий	Изменение
Контроль 3	177,8±33,76	-	2,7±0,33	-
Диазепам	3,8±0,65**	-98%	17,3±1,09**	550%
VMA-10-12	27,3±6,05**	-85%	5,3±0,49**	98%
VMA-10-15	65,5±6,02*	-70%	6,3±0,80**	111%
VMA-10-20	5,7±0,42*	-97%	11,7±1,17**	289%
VMA-10-17	73,3±11,38*	-59%	8,7±1,43**	225%
VMA-10-21	73,0±11,38*	-59%	16,5±0,92**	518%

*Примечание: * - $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

На основании ранее проведенных тестов (ОП, ПКЛ, ЧБК) наибольшее анксиолитическое действие выявлено у соединения с лабораторным шифром VMA-10-21 и, в меньшей мере, у соединения VMA-10-20. У остальных соединений группы сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она анксиолитические свойства мало выражены.

С целью выявления антидепрессивного поведения у животных, получавших исследуемые соединения был проведен тест «Принудительного плавания по Порсольту». В этом тесте основными показателями поведенческой депрессии является увеличение времени иммобилизации при попадании животного в авersiveную среду, а также уменьшение количества прыжков и времени активного плавания.

В тесте принудительного плавания по Порсольту (Таблица 29) животные, получавшие соединения VMA-10-21, в меньшей степени VMA-10-20 и VMA-10-17 в течение большего времени активно плавали, больше совершали прыжков и статистически значимо меньше находились в состоянии иммобилизации по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 29 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «принудительного плавания по Порсольту»

Показатели \ группы	Время активного плавания, с.	Количество прыжков	Время иммобилизации, с
Контроль 3	161,3±20,54	5,5±1,36	20,5±3,71
Мелипрамин	295,0±6,30**	16,2±2,73**	10,8±1,54*
VMA-10-12	171,2±27,61	8,3±0,95	14,3±2,25
VMA-10-15	175,5±17,49	3,8±0,48	18,0±1,24
VMA-10-20	183,8±21,05	15,5±1,34**	6,7±3,33*
VMA-10-17	184,2±10,70	12,7±1,98**	6,8±1,56**
VMA-10-21	205,8±22,86	16,0±1,06**	0,3±0,21**

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

В тесте ПМХ (Таблица 30), основным показателем антидепрессивного поведения которого является уменьшение параметра времени иммобилизации (замирание) было отмечено у животных, которым вводилось производное хиназолина с фенилпиперазиновым фрагментом - лабораторный шифр VMA-10-21, время иммобилизации было наименьшим. Другие соединения этого ряда незначительно, статистически не значимо уменьшали время иммобилизации. Наименее выраженный эффект наблюдался у животных, получавших соединение VMA-10-12, имеющего метильную группу в составе линкера.

Таблица 30 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на время иммобилизации животных в тесте «подвешивания мышей за хвост»

Показатели \ группы	Время иммобилизации, с.	% по отношению к контрольной группе животных
Контроль 3	162,3±13,90	-
Мелипрамин	94,5±4,98	-42%
VMA-10-12	146,2±11,45	-10%
VMA-10-15	123,7±13,92	-24%
VMA-10-20	122,7±14,48	-24%
VMA-10-17	124,0±11,95	-24%
VMA-10-21	96,0±3,68**	-41%

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

Таким образом, представленные данные, полученные в двух тестах, свидетельствуют о выраженном антидепрессивном действии соединения VMA-10-21, что отмечалось и в тесте «Порсолт» - наибольшее время активного плавания, число прыжков и меньшее время иммобилизации, в том числе и в тесте ПМХ. Вместе с этим данное вещество оказывало анксиолитическое и антифобическое действие.

3.3.2. Изучение влияния сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на когнитивные функции животных

В тесте УРПИ на этапе обучения (Таблица 31) латентный период захода в темный отсек у животных, получавших исследуемые соединения не отличался от показателей контрольной группы. На этапе воспроизведения через 24 часа обучаемость 100% животных наблюдалось у контрольной группы и у группы, получавших соединение VMA-10-17, сформировался памятный след, но через 7 и 14 дней латентный период захода в темный отсек укорачивался и росло количество зашедших животных в темный отсек. Показатели латентного периода и количество зашедших животных, которым вводились другие соединения производных хиназолин-4(3H)-она практически не отличались от контрольной группы.

В тесте ТЭИ (Таблица 32) на этапе обучения латентный период двигательной активности, время иммобилизации и количество прыжков у всех животных было сопоставимо с показателями контрольной группы. На этапе воспроизведения через 24 часа все животные решили поставленную задачу, при этом наиболее быстро решили ее животные, получавшие соединения VMA-10-17, и в меньшей степени VMA-10-15. При этом статистически значимо уменьшалось время иммобилизации у животных, получавших соединения VMA-10-21, менее у животных VMA-10-20, что может свидетельствовать об отсутствии тревожного компонента. У остальных животных количество прыжков и время иммобилизации сопоставимо с группой контрольных животных.

На этапе воспроизведения через 7 и 14 дней животные, получавшие соединения VMA-10-17, VMA-10-12, VMA-10-20, VMA-10-21, уменьшали время решения задачи, уменьшая латентный период подныривания статистически значимо показатели теста экстраполяционного избавления отличались незначительно у всех животных, получавших исследуемые соединения.

Таким образом, в тестах УРПИ и ТЭИ у соединения VMA-10-17 из группы сложнзамещенных амидных производных хиназолин-4(3H)-она было выявлено улучшение показателей когнитивной функции, по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 31 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на поведение животных в тесте «Условная реакция пассивного избегания»

Показатели \ группы	ЛП захода в темный отсек при обучении	Количество заходов в темный отсек при обучении	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 24 часа	Количество заходов в темный отсек воспроизведе через 24 часа	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 7 дней	Количество заходов в темный отсек воспроизведе через 7 дней	n/N	ЛП захода в темный отсек воспроизведение через 14 дней	Количество заходов в темный отсек воспроизведение через 14 дней	n/N
Контроль 3	15,8±2,65	1,2±0,17	6/6	180,0±0,00	0,0±0,00	0/6	114,7±30,62	0,5±0,22	3/6	56,7±30,44	0,8±0,17	5/6
VMA-10-12	46,5±19,18	1,3±0,21	6/6	137,3±25,33	0,8±0,48	3/6	94,5±38,25	0,7±0,33	3/6	61,5±28,05	0,8±0,17	5/6
VMA-10-15	12,5±3,13	1,3±0,21	6/6	146,3±26,03	0,3±0,21	2/6	69,7±35,05	0,7±0,21	4/6	45,5±27,63	0,8±0,17	5/6
VMA-10-20	31,7±12,44	1,0±0,00	6/6	130,2±31,77	0,3±0,21	2/6	83,8±32,72	0,8±0,31	4/6	65,8±36,18	0,8±0,17	4/6
VMA-10-17	20,0±3,36	1,5±0,34	6/6	180,0±0,00	0,3±0,21	2/6	115,8±30,56	0,7±0,33	3/6	83,7±31,11	0,7±0,21	4/6
VMA-10-21	32,7±16,79	1,8±0,40	6/6	99,3±36,25	0,5±0,22	3/6	74,0±33,88	0,7±0,21	4/6	59,0±29,77	0,8±0,17	5/6

Примечание: n/N – количество животных, зашедших в темный отсек в УРПИ; % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.

Таблица 32 - Влияние сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она на когнитивные функции животных в тесте «экстраполяционного избавления»

Показатели \ группы	ЛП двигательной активности при обучении	Время иммобилизации при обучении	Количество прыжков при обучении	ЛП подныривания при обучении	Время иммобилизации при воспроизведении через 24 часа	Количество прыжков при воспроизведении через 24 часа	ЛП подныривания при воспроизведении через 24 часа	ЛП подныривания при воспроизведении через 7 дней	ЛП подныривания при воспроизведении через 14 дней
Контроль 3	2,0±0,37	4,0±2,25	0,5±0,22	19,5±8,46	5,0±1,51	0,7±0,33	13,3±2,84	17,3±2,26	13,7±1,86
VMA-10-12	2,2±0,40	3,7±1,69	2,0±0,68	23,3±5,14	6,5±0,22	0,3±0,21	34,7±23,15	10,2±0,70*	8,2±0,79*
VMA-10-15	2,2±0,31	7,5±2,47	2,8±1,01	69,3±21,63	6,3±1,17	0,2±0,17	6,7±1,17	10,8±3,13	9,2±1,78
VMA-10-20	2,2±0,60	2,8±0,87	0,5±0,50	21,3±5,90	0,5±0,22*	1,0±0,45	37,2±22,68	12,2±2,82	8,0±1,46*
VMA-10-17	2,3±0,42	5,8±3,50	1,0±0,82	37,8±20,20	5,2±0,40	1,2±0,65	7,7±2,03	7,0±0,89**	6,5±0,56**
VMA-10-21	2,7±0,56	3,5±2,25	1,0±0,68	34,8±23,41	0,3±0,21*	1,7±0,76	24,7±11,92	14,7±2,72	8,3±1,15*

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса); % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.*

3.3.3. Изучение влияния сложнотамещенных производных хиринолин-4(3H)-она на судороги, вызванные введением коразола

При выявлении противосудорожной активности у исследуемой группы сложнотамещенных производных хиринолин-4(3H)-она с использованием коразола, достоверное увеличение латентного периода наступления судорог наблюдалось у животных, получавших соединения VMA-10-17 (303%), VMA-10-21 (188%) и VMA-10-12 (113%). Статистически значимое уменьшение времени клонико-тонических судорог и уменьшение гибели животных наблюдалось после введения соединений VMA-10-21 и VMA-10-17, по сравнению с контрольной группой животных, получавших 2% крахмальный гель. У животных, получавших остальные вещества, все показатели этого теста (латентный период до развития судорог, их выраженность и продолжительность клонико-тонических судорог, количество погибших) значимо не отличались от контрольной группы животных.

Таблица 33 - Влияние сложнотамещенных производных хиринолин-4(3H)-она на показатели противосудорожной активности у животных

Показатели \ группы	Латентный период наступления судорог (M±m)	Продолжительность клонико-тонических судорог, с.	Количество погибших животных
Контроль 3	193,7±37,66	53,2±10,81	5/6
Диазепам	1046,7±60,54**	9,2±0,58**	0/6
VMA-10-12	412,2±48,66*	87,0±19,99	4/6
VMA-10-15	379,5±76,48	30,0±5,96	6/6
VMA-10-20	294,5±31,27	37,0±4,97	5/6
VMA-10-17	780,0±130,60*	26,0±3,92*	3/6
VMA-10-21	558,2±114,13*	17,3±4,06*	2/6

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (непараметрический U-критерий Манна-Уитни, критерий Данна для множественных сравнений), $n=6$.

Эти данные свидетельствуют о наличии противосудорожной активности у соединения VMA-10-21, лишь незначительно уступая диазепаму.

3.3.4. Изучение антигипоксической активности сложнотамещенных производных хиазолин-4(3H)-она на модели нормобарической и гемической гипоксии

Среди группы сложнотамещенных производных хиазолин-4(3H)-она наибольшая противогипоксическая активность в тесте нормобарической гипоксии выявлена у соединений VMA-10-21 и VMA-10-17, которые статистически значимо увеличивало ЛП наступления апноэ, соответственно, на 47,5% и 43,5%, по сравнению с контрольной группой животных. Остальные производные значимо не изменяли данный показатель.

В тесте гемической гипоксии, вызванной введением нитрита натрия соединения VMA-10-21 и VMA-10-17 также статистически значимо по отношению к контролю увеличивали продолжительность жизни животных на 38,0% и 33,0%, соответственно. Остальные соединения не оказывали противогипоксического действия.

Таблица 34 - Влияние сложнотамещенных производных хиазолин-4(3H)-она на время наступления апноэ на модели нормобарической и время жизни животных при воспроизведении гемической гипоксии

Показатели \ группы	Нормобарическая гипоксия		Гемическая гипоксия	
	ЛПА, с. (M±m)	%	Время жизни, с. (M±m)	%
Контроль 3	577,0±16,51	-	1251,7±55,58	-
Мексидол	775,0±63,55**	34,3	1459,3±42,99*	16,6
VMA-10-12	685,3±77,52	18,8	12395,0±75,15	3,5
VMA-10-15	712,8±81,00	23,5	1415,8±86,88	13,1
VMA-10-20	669,1±48,53	16,0	1255,8±99,24	0,3
VMA-10-17	827,8±48,87**	43,5	1664,8±94,62*	33,0
VMA-10-21	850,9±80,63**	47,5	1726,8±122,30*	38,0

*Примечание: ЛПА – латентный период апноэ – время от момента помещения животного в герметично закрываемый контейнер до наступления апноэ, с; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса), % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.*

На основании проведенных тестов на наличие противогипоксической активности среди группы сложнотамещенных производных хиазолин-4(3H)-она

можно сделать заключение о наличии данного эффекта у соединений VMA-10-21 и VMA-10-17, остальные соединения не показали статистически значимых результатов.

На основании полученных данных по проведенным тестам ОП, ПКЛ, ЧБК, «Конфликтной ситуации в варианте Вогель», Порсолт, ПМХ, УРПИ, ТЭИ, нормобарической и гемической гипоксии наибольшую активность среди группы сложнзамещенных производных хиназолин-4(3H)-она оказали соединения с лабораторными шифрами VMA-10-21 и VMA-10-17.

При изучении психоэмоционального поведения и когнитивной функции животных, получавших соединения - производные хиназолин-4(3H)-она, разделенные на три группы, согласно химической структуре, среди группы простых эфиров наибольшая активность отмечена у соединений VMA-10-03 и VMA-10-05. Среди амидных производных хиназолина наибольшее влияние на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию животных проявляло соединение VMA-10-18 с умеренным антидепрессивным, выраженным анксиолитическим и антигипоксическим действием, с улучшением когнитивной функции. Среди группы сложнзамещенных амидных производных наибольшую активность оказали соединения с лабораторными шифрами VMA-10-21 и VMA-10-17. Все это позволяет считать, что данные соединения из трех групп производных хиназолин-4(3H)-она являются перспективными для дальнейшего углубленного изучения. Для подтверждения активности из разных групп производных хиназолин-4(3H)-она целесообразно исследование в сравнении наиболее активных соединений и препаратов сравнения.

ГЛАВА 4. Дополнительное изучение психотропной активности наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она в сравнении с референтными препаратами

По результатам фармакологического скрининга среди 3-х групп производных хиназолин-4(3H)-она наиболее выраженным нейрпсихотропным действием обладают несколько соединений с лабораторными шифрами VMA-10-03 и VMA-10-05, VMA-10-18, VMA-10-17 и VMA-10-21. По совокупности проведенных у ряда веществ выявлена способность улучшать процессы запоминания и воспроизведения информации в тестах УРПИ и ТЭИ. В этой связи было целесообразно проанализировать эти эффекты в условиях хемоиндуцированной скополаминовой амнезии.

4.1. Изучение антиамнестического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она

При проведении хемоиндуцированной скополаминовой амнезии был использован тест УРПИ, в котором сравнивалось влияние выше названных производных хиназолина с фенотропилом, широко применяющийся в клинической практике как ноотропное средство.

На этапе обучения все животные посетили темный отсек и латентный период у всех животных исследуемых групп был сопоставим с группой контроля. При воспроизведении навыка УРПИ все животные контрольной группы и животные, получавшие соединения VMA-10-21 и VMA-10-05, зашли в темный отсек практически через тот же латентный период, как при обучении, что свидетельствует об отсутствии антеамнезирующего действия у исследуемых веществ. Количество зашедших животных, получавших соединения VMA-10-03 и VMA-10-16, а латентный период у зашедших в темную камеру соответственно больше. Соединение VMA-10-18, оказывало антиамнезирующее действие сопоставимое с препаратом сравнения фенотропилом. Исследуемое соединение VMA-10-18 и препараты сравнения достоверно по сравнению с показателями

контрольной группы животных уменьшали количество зашедших животных в темный отсек и достоверно увеличивали латентный период захода животных в темный отсек (Таблица 35).

Таблица 35 - Влияние соединений на выраженность хемоиндуцированной скополаминовой амнезии у крыс в тесте «Условная реакция пассивного избегания»

Показатели \ группы	ЛП при обучении, с. (M±m)	Количество животных, зашедших в темный отсек при обучении		ЛП при воспроизведении через 24 часа, с. (M±m)	Количество животных, зашедших в темный отсек при воспроизведении навыка через 24 часа	
		N/n	%		N/n	%
Контроль	29,8±2,27	8/8	100	30,9±4,72	8/8	100
Фенотропил	32,4±2,76	8/8	100	180,0±0,00**	0/8	0
VMA-10-03	27,8±1,98	8/8	100	90,6±26,61	5/8	62,5
VMA-10-05	27,5±2,24	8/8	100	28,6±2,08	8/8	100
VMA-10-18	28,6±2,25	8/8	100	178,4±1,63**	1/8	12,5
VMA-10-16	30,9±2,39	8/8	100	87,9±27,36	5/8	62,5
VMA-10-21	29,3±1,94	8/8	100	33,5±4,77	8/8	100

*Примечание: ЛП при обучении – латентный период первого захода в темный отсек при выработке рефлекса пассивного избегания; ЛП при воспроизведении – латентный период первого захода в темный отсек при воспроизведении рефлекса на фоне введения скополамина; (N/n) – количество животных, зашедших в темный отсек (N) из общего числа животных в группе (n) при воспроизведении рефлекса на фоне введения скополамина. ** - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса, критерия χ^2), n/N – количество животных, зашедших в темный отсек в УРПИ; % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.*

Таким образом, у производного хиназолина 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3H)-он под лабораторным шифром VMA-10-18 выявлена ноотропная активность в тестах УРПИ и ТЭИ в скрининговых тестах, и в тесте скополаминовой амнезии, что свидетельствует о перспективности углубленного изучения его влияния на когнитивную функцию, включая условия, нарушающие интегративную функцию мозга.

4.2. Изучение анксиолитического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она

При проведении исследований среди изучаемых соединений некоторые производные хиназолина проявляли в разной степени выраженные

анксиолитические свойства, это проявлялось в достоверном увеличении количества выходов в центральную зону в тесте ОП, длительного груминга, увеличении продолжительности пребывания в открытых рукавах и увеличении количества свешиваний с них в тесте ПКЛ, увеличении латентного периода захода в темный отсек и времени нахождения в светлом отсеке в тесте «Черно-белая камера» и в тесте «Конфликтной ситуации в варианте Вогель». Поэтому в дополнительной серии экспериментов сравнить между собой производные хиназолина, проявившие анксиолитические свойства и с препаратами позитивного контроля, для подтверждения анксиолитической активности и ее выраженности у исследуемых соединений.

При проведении теста «Конфликтной ситуации в варианте Вогель», животные, которые получали соединение VMA-10-18, VMA-10-21 и препараты сравнения достоверно уменьшали латентный период от первого до второго взятия воды из поилки и достоверно увеличивали количество наказуемых взятий воды из поилки, по сравнению с контрольной группой животных. Эти данные подтверждают наличие анксиолитических свойств у соединений VMA-10-21 и VMA-10-18, их эффект сопоставим с диазепамом.

Таблица 36 - Влияние наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она на анксиолитическую активность в тесте «Конфликтная ситуация в варианте Вогель»

Показатели \ группы	ЛП от 1 до 2 взятия воды из поилки	Количество наказуемых взятий воды из поилки
Контроль	232,20±7,85	2,80±0,84
Диазепам	5,60±1,75* (-98%)	25,00±1,35* (793%)
VMA-10-05	84,20±5,70* (-64%)	14,80±2,91* (429%)
VMA-10-18	6,40±1,37* (-97%)	23,40±2,09* (736%)
VMA-10-20	11,60±4,14* (-95%)	12,20±1,69* (336%)
VMA-10-21	8,40±2,44* (-96%)	16,00±1,32* (471%)

*Примечание: * - $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений, непараметрический U- критерий Манна-Уитни); % по сравнению с контрольной группой животных, n=6.*

Соединения VMA-10-20 и VMA-10-05 по регистрируемым показателям латентного периода взятия воды из поилки и количества их взятий уступали

соединениям VMA-10-18 и VMA-10-21. На основании полученных данных можно сделать вывод о выраженных анксиолитических свойствах у соединения VMA-10-18 с метоксигруппой в *para*-положении бензольного кольца и фенилпиперазинового производного хиназолина VMA-10-21, по эффективности они сопоставимы с препаратом сравнения диазепамом (Таблица 36).

На основании комплекса исследования влияния соединения VMA-10-18 на психоэмоциональную и когнитивные функции следует отметить, что соединение VMA-10-18 оказывая выраженное анксиолитическое действие при этом не нарушает когнитивные функции, улучшая формирование и сохранение памятного следа, в том числе и при действии амнезирующего действия скополамина.

Для расширения представлений о психонейротропных свойствах производных хиназолина были изучены их противосудорожные и притовогипоксические свойства. Для выявления терапевтического потенциала была изучена острая токсичность наиболее активного вещества под лаботароним шифром VMA-10-18 среди изучаемых новых производных хиназолина.

4.3. Изучение антидепрессивного действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она

Проведение исследований по изучению антидепрессивных свойств из 3-х групп в ранее проведенных тестах «Подвешивания мышей за хвост» и теста «Принудительного плавания по Порсольту», позволило выявить наиболее выраженный эффект у соединений VMA-10-03, VMA-10-04, VMA-10-11, VMA-10-18 и VMA-10-21.

При проведении теста «Принудительного плавания по Порсольт» на фоне введения наиболее активных исследуемых соединений наиболее выраженный эффект по времени активного плавания наблюдался у животных, получающих соединения VMA-10-18, VMA-10-11, VMA-10-21, и был сопоставим с препаратом сравнения мелипрамином. При этом достоверное увеличение прыжков и уменьшение времени иммобилизации наблюдалось только у животных, получавших VMA-10-18 и VMA-10-21.

Таблица 37 - Влияние наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она на антидепрессивную активность в тесте «Принудительного плавания по Порсольту»

Показатели/ группы	Время активного плавания, с.	Количество прыжков	Время иммобилизации, с
Контроль	122,7±16,08	9,0±2,02	11,2±1,33
Мелипрамин	236,3±17,42**	19,8±1,08*	6,8±1,35*
VMA-10-03	123,0±14,17	10,0±2,59	11,0±1,37
VMA-10-04	115,7±14,99	10,0±2,74	11,3±1,54
VMA-10-11	181,7±18,46*	14,3±1,08	10,8±2,12
VMA-10-18	209,7±16,24**	20,0±2,29**	3,2±1,94*
VMA-10-21	172,5±7,17*	15,2±1,85*	9,8±1,54

*Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений, непараметрический U- критерий Манна-Уитни); % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.*

При изучении антидепрессантных свойств производных хиназолина наиболее выраженный эффект наблюдался у соединения под лабораторным шифром VMA-10-18, и в меньшей степени VMA-10-21, среди изучаемых новых производных хиназолин-4(3H)-она.

4.4. Изучение противогипоксического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она на моделях гистотоксической гипоксии и модели острой ишемии головного мозга

Важной составной частью фармакологического анализа исследуемых соединений, проявляющих ноотропные свойства, является изучение их противогипоксического действия. На этапе скрининга в ряду амидных и сложнозамещенных производных хиназолин-4(3H)-она были выявлены вещества с лабораторными шифрами VMA-10-11, VMA-10-13, VMA-10-14, VMA-10-16, VMA-10-17 и VMA-10-18 с выраженной противогипоксической активностью. Для сравнительной оценки данного эффекта было выполнено дополнительное исследование на модели гистотоксической (тканевой) гипоксии и при ишемии

головного мозга, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий у крыс, для выявления зависимости доза-эффект.

4.3.1. Изучение антигипоксического действия наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она на модели гистотоксической гипоксии

Гистотоксическую гипоксию (тканевую) вызывали путем внутрибрюшинного введения нитропрусида натрия в дозе 20 мг/кг. Все исследуемые соединения вводились за 30 мин. до введения нитропрусида натрия в 2% крахмальном геле.

В условиях тканевой гипоксии все исследуемые соединения достоверно увеличивали показатель продолжительности жизни животных, по сравнению с контрольной группой животных, но наиболее выражен антигипоксический эффект был отмечен у соединения VMA-10-18, который на 15,2% был выше, чем у препарата сравнения - мексидола (Таблица 38).

Таблица 38 - Влияние однократного введения производных хиназолина на продолжительность жизни в условиях тканевой гипоксии, вызванной введением нитропрусида натрия

Показатели \ группы	Продолжительность жизни, с.	% по отношению к контрольной группе животных
Контроль	1212,5±82,42	-
Мексидол	2415,7±52,43*	99,2%
VMA-10-11	2163,2±46,04*	78,4%
VMA-10-13	2079,3±210,82*	71,5%
VMA-10-14	2042,5±35,57*	68,5%
VMA-10-18	2599,3±162,53**	114,4%
VMA-10-16	1907,67±161,87*	57,3%
VMA-10-17	2238,2±25,28*	84,6%
VMA-10-21	1934,30±151,65*	59,5%

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контрольных животных (ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса), % по сравнению с контрольной группой животных, $n=6$.

4.3.2. Изучение влияния наиболее активного производного хиназолин-4(3H)-она (VMA-10-18) на выживаемость и неврологический дефицит животных при острой ишемии головного мозга

Учитывая ноотропный и выраженные противогипоксические свойства соединения VMA-10-18 нам представлялось важным для оценки его терапевтического потенциала выполнить дополнительные исследования на модели частичной ишемии в полушариях - передних отделах коры головного мозга у крыс, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий (ОСА) [Буреш Я., 1991]. О нейропротекторном действии активного соединения VMA-10-18 судили по нескольким параметрам: 1) летальности животных после перевязки ОСА; 2) по выраженности неврологического дефицита животных.

Соединение VMA-10-18 вводилось перорально, за 60 минут до моделирования перевязки ОСА и через 3, 24 и 48 часов после воспроизведения ишемии головного мозга в трех дозах (2,5; 5 и 10 мг/кг). Фиксирование показателей выживаемости, неврологического дефицита, проведение адгезивного теста и теста «Ротарод» проводили через 6, 12, 24 и 48 ч. после двусторонней перевязки общих сонных артерий. Поведенческий тест проводили через 48 часов после патологии.

Моделирование церебральной ишемии у крыс путем билатеральной окклюзии сонных артерий приводило к частичной гибели животных (Таблица 39).

Таблица 39 - Выживаемость животных после моделирования перевязки ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Выживаемость, %			
		6 часов	12 часов	24 часа	48 часов
ЛО + 2% крахмальный гель	-	100	100	100*	100*
Перевязка ОСА + 2% крахмальный гель	-	100	80	60	47
Перевязка ОСА + VMA-10-18	2,5	100	100	93*	93*
	5	100	100	93*	93*
	10	100	87	87	87
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	100	100	93*	93*

*Примечание: * - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий хи-квадрат), ОСА – общие сонные артерии, n=15.*

Максимальная летальность наблюдалась у животных контрольной группы. Смертельные исходы наблюдались уже через 12 часов погибло 20%, через 24 часа еще 20%, а через двое суток выживаемость составила только 46,7%, тогда как в

группах животных, получавших соединение VMA-10-18 в дозах 2,5 и 5 мг/кг и референтный препарат – кавинтон выживаемость составила 93%.

Оценка тяжести течения неврологических нарушений у животных с различными патологиями мозгового кровообращения является достаточно информативной и дает возможность судить о динамике неврологических нарушений и нейропротекторном действии исследуемых веществ [19, 22].

После билатеральной окклюзии общих сонных артерий у животных контрольной группы отмечался стойкий нарастающий неврологический дефицит. Неврологическая симптоматика проявлялась в виде одно- и двусторонних птозов, параличей и парезов конечностей, тремора, появления судорог, впадения в коматозное состояние и гибель. У выживших наблюдалась вялость, замедленность движений, манежных движений животных и снижение реакции на внешние стимулы (Таблица 40).

Таблица 40 - Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw у животных после моделирования окклюзии ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Балл по шкале McGraw			
		6 часов	12 часов	24 часа	48 часов
ЛО+ 2% крахмальный гель	-	0,6±0,20	0,5±0,20	0,3±0,20	0,3±0,20
Перевязка ОСА + 2% крахмальный гель	-	5,6±0,60	5,4±0,60	6,8±0,90	6,9±0,90
Перевязка ОСА+ VMA-10-18	2,5	4,0±0,70	4,4±0,20	3,8±0,50*	4,1±0,50*
	5	4,4±0,60	4,6±0,60	4,1±0,70*	4,3±0,70*
	10	4,7±0,50	4,4±0,70	4,4±0,80	5,3±0,60
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	5,0±0,40	3,8±0,40*	3,7±0,60*	3,9±0,60*

*Примечание: *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСА – общие сонные артерии.*

Так в контрольной группе, в которой вместо соединения VMA-10-18, крысам вводили 2% крахмальный гель, у животных наблюдалось тяжелое или среднетяжелое течение экспериментальной ишемии мозга, при этом неврологический дефицит постепенно прогрессировал, начиная с 6-го часа после перевязки ОСА, и постепенно к 2-м суткам достигал максимума. Соединение

VMA-10-18 при пероральном введении различных доз уменьшало выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw.

При анализе неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy (Таблица 41) у животных после окклюзии ОСА, регистрировались моторные дисфункции и нарушение способности сохранять равновесие, которое проявлялось уже через 6 часов и далее через 12 часов после операции у всех экспериментальных животных, которые получали соединение VMA-10-18 неврологические нарушения были выражены в меньшей степени, чем у крыс контрольной группы. На этой модели ишемии головного мозга у животных, которым вводился препарат сравнения – кавинтон, неврологический дефицит был выражен меньше, чем у животных, получавших исследуемое вещество VMA-10-18.

Таблица 41 - Выраженность неврологического дефицита в баллах по шкале Combs и D'Alecy у животных после моделирования перевязки ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Балл по шкале Combs и D'Alecy			
		6 часов	12 часов	24 часа	48 часов
ЛО+ 2% крахмальный гель	-	3,7±0,40	6,2±0,60	7,5±0,40	8,2±0,30
Перевязка ОСА + 2% крахмальный гель	-	2,6±0,40	2,5±0,50	2,2±0,50	2,1±1,00
Перевязка ОСА+ VMA-10-18	2,5	2,9±0,30	3,5±0,20	4,9±0,40*	5,9±0,40*
	5	3,0±0,40	3,8±0,40	5,2±0,60*	5,7±0,50*
	10	2,1±0,30	3,2±0,30	3,4±0,30	4,5±0,80
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	3,1±0,30	4,5±0,40*	5,8±0,60*	6,4±0,60*

*Примечание: *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСА – общие сонные артерии.*

Через 6, 12, 24 и 48 часов после моделирования окклюзии ОСА у животных оценивалась выраженность нарушений координации в тесте «Ротарод». Регистрировались латентный период (ЛП) первого падения животного с вращающегося стержня установки и суммарное время его удержания на нем за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

Выраженность постишемических нарушений силы и координации движений у животных после окклюзии ОСА менялась с течением времени. Так в первые 6 часов животные практически всех групп (за исключением ЛО и ОСА+ VMA-10-18 - 5 мг/кг) с трудом могли удержаться на вращающемся стержне, о чем

свидетельствовало уменьшение латентного периода первого падения (4,7-8,4с.) и суммарное время удержания на стержне за 3 попытки (13,5-27,3с.). У животных, которым перорально вводили вещество в дозе 5 мг/кг, общее время удержания животных на вращающемся стержне установки достоверно превосходило зафиксированное у животных остальных групп с перевязанными ОСА. При тестировании экспериментальных животных через 48 часов после операции у тех, которые получали соединение VMA-10-18 во всех исследуемых дозах, общее время удержания в установке было значительно выше, чем у получавших 2% крахмальный гель, а время первого падения только у тех, которым соединение VMA-10-18 вводили в дозах 5 и 10 мг/кг и кавинтон (Таблица 42).

Таблица 42 - Время первого падения и общее время (в секундах) удержания животных, за 3 попытки в тесте «Ротарод» после двусторонней перевязки ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Время после окклюзии ОСА							
		6 часов		12 часов		24 часа		48 часов	
		ЛП	Тобщ	ЛП	Тобщ	ЛП	Тобщ	ЛП	Тобщ
ЛО	-	21,1± 0,70*	87,1± 2,30*	37,2± 5,00*	80,3± 2,20*	31,9± 4,60*	88,8± 5,20*	46,9± 3,40*	83,2± 4,10*
Перевязка ОСА + 2% крахмальн ый гель	-	8,5± 1,20	26,9± 1,50	5,3± 1,50	34,2± 3,70	3,7± 1,10	30,2± 4,10	6,7± 2,20	13,1± 2,10
Перевязка ОСА+ VMA-10-18	2,5	5,1± 1,20	25,5± 1,50	7,7± 1,50	23,5± 4,60	8,6± 1,50	39,5± 4,10	7,6± 2,00	63,4± 4,80*
	5	4,7± 1,50	47,8± 14,2*	5,5± 1,20	35,3± 3,60	5,8± 1,30	42,5± 5,20	16,5± 3,10*	66,0± 5,40*
	10	5,8± 1,30	27,3± 1,90	10,5± 1,60*	31,0± 2,20	4,7± 1,70	37,8± 3,40	12,9± 1,80*	58,5± 5,40*
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	5,5± 1,60	23,5± 3,20	9,9± 1,60*	55,3± 3,40*	17,3± 2,30*	49,5± 3,40*	25,5± 3,90*	46,4± 3,60*

*Примечание: ЛП – время первого падения; Тобщ. – общее время удержания за 3 попытки (с); *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСА – общие сонные артерии.*

Неотъемлемой частью патологического симптомокомплекса ишемических поражений ЦНС и маркером её повреждения является снижение тактильной чувствительности и мелкой моторики. Выраженность этой группы нарушений возможно в той или иной степени оценить при проведении адгезивного теста,

закрывающегося в регистрации времени обнаружения (сенсорная чувствительность) и удаления постороннего предмета (удаление лейкопластыря, наклеенного на тыльную поверхность передних лап животного). У животных с вызванной ишемией головного мозга значительно снижалась чувствительность к факторам, раздражающим поверхность кожи, что выражалось в увеличении времени обнаружения ими инородного предмета, закрепленного на их лапках (Таблица 43).

При проведении теста через 6 часов после операции, у животных, которым перорально вводили соединение VMA-10-18 в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг, время обнаружения инородного предмета было меньше, чем у тех, которым после моделирования ишемии вводили 2% крахмальный гель. Через 48 часов после моделирования ишемии головного мозга, животные которым вводили производное хиназолина и препарат сравнения кавинтон, значительно быстрее чем те, которым вводили 2% крахмальный гель, обнаруживали и удаляли инородный предмет с лапки, что свидетельствует о более полном восстановлении у них тактильной чувствительности и мелкой моторики.

Комплексное изучение неврологической картины заболеваний ЦНС различной этиологии предполагает оценку поведенческих отклонений и позволяет судить о масштабах поражения отделов нервной системы с возможностью в той или иной мере экстраполяции в клиническую практику. Исследование поведенческих и когнитивных нарушений животных проводилось через 48 часов после операции по окклюзии ОСА.

Таблица 43 - Время обнаружения и удаления с лап инородного предмета животными после перевязки ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Время после окклюзии ОСА											
		6 часов			12 часов			24 часа			48 часов		
		ЛП	T1	T2	ЛП	T1	T2	ЛП	T1	T2	ЛП	T1	T2
ЛО	-	20,7± 3,90	21,2± 4,20	27,7± 6,90	36,0± 16,70	42,8± 16,10	40,3± 16,20	35,1± 16,50	40,6± 16,30	40,6± 16,20	20,0± 3,50	24,5± 3,30	26,9± 3,10
Перевязка ОСА + 2% крахмальный гель	-	153,2± 12,30	157,4± 12,30	159,2± 11,90	146,4± 15,10	147,7± 14,80	153± 12,30	130,7± 20,90	144± 19,50	140,1± 19,20	98,0± 16,60	126,7± 14,00	130± 15,00
Перевязка ОСА+ VMA-10-18	2,5	112,5± 17,80	126± 15,70	120,6± 15,10	131,7± 16,00	137,7± 15,00	137,9± 15,00	117,2± 16,60	126,2± 14,80	131,4± 14,00	51,3± 12,30*	60,1± 11,80	63,1± 11,70
	5	104,8± 18,40*	112,5± 16,80*	127,4± 15,30	127,2± 17,30	142,8± 14,10	138,8± 13,80	103,6± 16,20	122,3± 14,60	128,9± 14,30	43,1± 1,30*	55,5± 10,50*	54,6± 10,90*
	10	113,0± 16,60	123,3± 15,30	122,7± 15,50	143,5± 14,30	148,8± 12,30	137,4± 14,70	102,3± 20,40	109,3± 18,50	111,6± 18,00	69,5± 16,00	78,9± 14,90	81,1± 15,00
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	132,1± 16,90	135,1± 15,20	146,1± 14,20	124,4± 16,60	126,9± 15,90	131,6± 14,90	108,5± 17,80	120,4± 16,30	121,1± 15,40	47,5± 11,30*	54,3± 10,90*	53,8± 10,90*

Примечание: ЛП – латентный период обнаружения инородного тела; T1 – время снятие инородного тела с левой лапы, T2 – время снятие инородного тела с правой лапы; *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСА – обцие сонные артерии.

Ориентировочно-исследовательская активность при нарушении адекватного кровоснабжения головного мозга и функционирования ЦНС достоверно снижалась при моделировании неполной ишемии головного мозга у животных всех экспериментальных групп, кроме группы ЛО.

У животных, получавших соединение VMA-10-18 в дозе 2,5 мг/кг, и в меньшей мере, в дозах 5 и 10 мг/кг, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность достоверно превосходила аналогичную в группе негативного контроля по числу пересеченных животными секторов и заглядываний в отверстия, имитирующих норки (Таблица 44).

Таблица 44 - Показатели поведения животных в тесте «открытое поле» через 48 часов после перевязки ОСА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Показатели в ОП			
		ДА	Количество заглядываний в норки	Количество стоек	Количество актов груминга
ЛО	-	37,9±1,40*	31,9±3,50*	20,7±2,00*	1,9±0,40*
Перевязка ОСА + 2% крахмальный гель	-	15,4±1,50	11,6±1,70	8,9±1,90	0,6±0,40
Перевязка ОСА+ VMA-10-18	2,5	32,6±2,30*	21,8±1,40*	13,5±1,30	0,8±0,30
	5	19,6±1,70	23,2±1,60*	16,0±1,50*	1,0±0,40
	10	15,7±2,50	18,3±3,80	10,9±1,60	0,9±0,40
Перевязка ОСА + Кавинтон	5	31,4±2,00*	23,7±2,30*	12,0±1,30	1,1±0,40

*Примечание: ДА-двигательная активность; *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСА – общие сонные артерии.*

Таким образом, при моделировании частичной ишемии головного мозга в полушариях - передних отделах коры головного мозга установлено, что комбинированное (лечебно-профилактическое) введение соединения VMA-10-18 оказывает нейропротекторное действие во всех исследуемых дозах, но более выраженное в дозах 2,5 и 5 мг/кг, повышая выживаемость животных и

уменьшая выраженность неврологических нарушений (улучшая показатели мелкой моторики, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности).

4.5. Изучение острой токсичности наиболее активного производного хиназолин-4(3H)-она соединения VMA-10-18 на мышях и крысах

В проведенных 14-ти дневных исследованиях на мышях и крысах, которым производное хиназолина VMA-10-18 вводилось в дозах 3000; 4000 и 5000 мг/кг (плохо растворимые дозы в максимально допустимых объемах растворителя – 2% крахмальном геле) двукратно, внутрижелудочно, в общем состоянии и поведении существенных различий с результатами, полученными на мышях, получавших 2% крахмальным гелем внутрижелудочно, не прослеживалось. Проявление слабой седации, снижение подвижности, угнетение реакций на тактильные раздражители и болевая чувствительность регистрировалась лишь у мышей в первые сутки наблюдения, получавших соединение в дозах 4000 и 5000 мг/кг, и отсутствовали у мышей и крыс, получавших соединение VMA-10-18 в дозе 3000. На второй и последующие дни наблюдений состояние и поведение животных, состояние слизистой и шерстного покрова не различалось с таковым в контрольной группе. По окончании первых суток наблюдений общее состояние животных, их двигательное поведение и нервно-мышечные реакции соответствовали контролю. Не выявлено, каких-либо различий у этих животных с контролем и в последующие дни 2-х недельных наблюдений.

В наблюдении за приростом массы тела мышей и крыс достоверно значимых различий в динамике изменений контрольных и опытных групп не обнаружено.

В связи с отсутствием гибели мышей, которым исследуемое соединение вводилось внутривенно в максимальной дозе 5000 мг/кг величина ЛД₅₀ соединения VMA-10-18 была принята условно и составила более 5000 мг/кг.

Таким образом, исследуемое соединение VMA-10-18 при внутривенном введении является малотоксичным для крыс и мышей. В клинике отравления отмечены элементы слабо угнетающего влияния на ЦНС, седация, снижение двигательной активности и нервно-мышечных реакций на тактильные и болевые раздражители. Данные эффекты были непродолжительными и восстанавливались до уровня контрольных значений в течение первых 4-6-ти часов при введении 3000 мг/кг, а в дозах 4000-5000 мг/кг в течение 24-х часов после введения. В связи с отсутствием ранней и отдаленной гибели у животных в опытных группах уровни границ ЛД₅₀ для внутривенного введения производного хиназолина VMA-10-18 были приняты ориентировочно и составили более 5000 мг/кг.

ГЛАВА 5. Изучение нейропротективной активности соединения VMA-10-18 при нарушениях мозгового кровообращения

В предыдущей главе представлены данные, о выраженном антигипоксическом действии на трех моделях гипоксии, а также при ишемии головного мозга. В дополнении к этому соединение VMA-10-18 проявляло анксиолитическое, противосудорожное и ноотропное действие, что в целом его выгодно отличает от других исследуемых нами производных хиназолин-4(3H)-она. Для расширения оценки терапевтического потенциала соединения VMA-10-18 были выполнены дополнительные исследования по оценке нейропротективного потенциала при фокальной ишемии головного мозга и при хронических нарушениях МК.

5.1. Изучение нейропротекторного действия соединения VMA-10-18 при моделировании фокальной ишемии путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии

Метод фокальной церебральной ишемии является одной из моделей неполной ишемии, получивший широкое распространение, так как перевязка левой средней мозговой артерии приводит к формированию относительно однородного очага некроза и отека головного мозга. Данная модель считается экспериментальным эквивалентом ишемического инсульта, наиболее частой причиной которого является окклюзия средней мозговой артерии, вызванная тромбоэмболией и атеросклерозом. Поэтому нами для оценки нейропротективного действия соединения VMA-10-18 была выполнена серия экспериментов на модели фокальной ишемии головного мозга, вызванной окклюзией левой средней мозговой артерии. О влиянии исследуемого вещества на течение фокальной церебральной ишемии судили по динамике

неврологического дефицита и некоторых показателей метаболизма мозговой ткани, а также уровню мозгового кровотока.

Фиксирование показателей поведения, сенсорно-моторных функций, оценка неврологического дефицита и мозгового кровотока проводился через 48 ч. после фокальной церебральной ишемии. Согласно дизайну исследования, обучение в тестах УРПИ и ТЭИ проводили за 48 ч. до моделирования фокальной ишемии, воспроизведение через 48 ч.

Психоэмоциональное состояние животных после окклюзии средней мозговой артерии оценивалось по поведению животных в открытом поле через 48 часов по показателям: количество пересеченных квадратов (показатель двигательной активности), числу выполненных стоек и обследованных отверстий-норок (показатель ориентировочно-исследовательской активности) и актов груминга. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных контрольной группы ОСМА была меньше по сравнению с группой ЛО животных. Животные контрольной группы ОСМА в основном двигались на небольшом участке, не покидали центральную зону поля, с редкими заглядываниями в норки и вставаниями на задние лапки (Таблица 45).

Таблица 45 – Влияние соединения VMA-10-18 на показатели психоэмоционального поведения животных, зафиксированные в тесте «Открытое поле» через 48 часов после ОСМА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Показатели в ОП			
		ДА	Количество заглядываний в норки	Количество стоек	Количество актов груминга
ЛО	-	25,7±5,70*	14,0±2,30*	10,0±1,70*	1,3±0,60
ОСМА+2% крахмальный гель	-	10,0±1,90	3,0±1,50	1,2±0,30	0,2±0,20
ОСМА+ VMA-10-18	2,5	24,7±3,80*	7,0±1,50	2,0±0,60	0,8±0,30
	5	20,0±2,10*	9,5±2,20*	3,7±1,10	1,2±0,70
	10	11,8±2,20	4,7±1,60	1,3±0,40	0,5±0,30
ОСМА+ Цитиколин	500	15,5±1,40*	8,8±2,10*	4,3±1,50	0,8±0,70

*Примечание: ДА-двигательная активность; *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

В группе животных, которой вводили соединение VMA-10-18 в дозе 2,5 и 5 мг/кг, число совершаемых ими поведенческих актов было значительно больше, чем в контрольной группе ОСМА животных, и группе, которой вводили препарат сравнения цитиколин. Однако, животные, получавшие соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг, в отличие от всех других групп, более полно исследовали внутреннее пространство установки, передвигаясь равномерно по всей её площади, что свидетельствует о более полной сохранности двигательной функции и поисковой мотивации. Поведение животных этой группы в максимальной степени было приближено к поведению, отмеченному у ЛО. Животные, получавшие соединение VMA-10-18 в дозе 10 мг/кг и цитиколина в открытом поле были менее эффективными.

Динамику неврологических нарушений оценивали по шкалам Combs and D'Alecy и Garcia, в адгезивном тесте и на установке «Ротарод». Шкала Combs and D'Alecy предназначена для оценки мышечной силы, цепкости и способности сохранять равновесие. При оценке неврологического дефицита по шкале Combs and D'Alecy также присваивались баллы по нескольким критериям с последующим их суммированием (максимальный балл, соответствующий здоровому животному равен 9) (Таблица 46).

Таблица 46 - Выраженность неврологического дефицита по шкалам Combs and D'Alecy и Garcia у животных через 48 часов после моделирования ОСМА

Показатели / группы	Дозы, мг/кг	Combs и D'Alecy	Garcia
ЛО	-	8,8±0,20*	17,8±0,20*
ОСМА+2% крахмальный гель	-	5,2±0,60	6,8±0,80
ОСМА+VMA-10-18	2,5	6,0±0,50	8,2±0,90
	5	7,3±0,60*	9,7±0,90*
	10	5,8±0,60	7,2±0,80
ОСМА+Цитиколин	500	7,8±0,70*	11,8±1,50*

*Примечание: *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

У животных контрольной группы ОСМА+2% крахмальный гель отмечались следующие симптомы: неспособность сохранить равновесие на неподвижном стержне более 10 с., а также неспособность удержать свой вес передними лапами на натянутой веревке (более 5 с.) и вертикальной

металлической сетке (более 5 с.). Уровень неврологического дефицита по шкале Combs and D'Alecy через 48 часов после операции равнялся 5,2 баллам соответственно. В группах, получавших соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и цитиколин, неврологический дефицит был менее выражен.

Шкала Garcia предназначена для оценки выраженности одностороннего повреждения головного мозга. Она учитывает одностороннюю слабость конечностей и нарушение чувствительности частей тела, а также нарушение спонтанной двигательной активности. При оценке уровня неврологического дефицита по шкале Garcia животному по нескольким критериям присваивались баллы с последующим их суммированием (максимальный балл, соответствующий здоровому животному равен 18).

Моделирование ОСМА вызывало значительный неврологический дефицит у животных, который выражался снижением спонтанной двигательной активности и ответа на прикосновение к вибриссам, появлением манежности и асимметрии движений. Итоговый балл в группе животных, которым произведена ОСМА и затем вводили 2% крахмальный гель, через 48 часов после операции был равен 6,8. В группах, получавших соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и цитиколин неврологические нарушения были выражены в меньшей степени.

Состояние сенсорно-моторных функций оценивали в адгезивном тесте, который выполнялся у животных через 24 и 48 часов после ОСМА. У животных с ОСМА, которым вводили 2% крахмальный гель, тактильная чувствительность (ЛП обнаружения инородного предмета) и мелкая моторика (скорость удаления инородного предмета) были в значительной степени нарушены (Таблица 47).

Пероральное введение соединения VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и препарата цитиколин животным с ОСМА оказало наиболее выраженный статистически значимый церебропротективный эффект, поскольку животные этих групп значительно быстрее контрольных с ОСМА обнаруживали и удаляли инородный предмет с волярной поверхности лап, при тестировании в

обоих промежутках времени (на 24 и 48 часов). Пероральное введение исследуемого вещества в дозе 2,5 и 10 мг/кг, в меньшей степени, чем в дозе 5 мг/кг влияло на скорость обнаружения и удаления инородного предмета с тыльной поверхности передних лап экспериментальных животных.

Таблица 47 - Время обнаружения и удаления с лап инородного предмета животными через 24 и 48 часов после ОСМА

Показатели группы	Доза, мг/кг	Время после ОСМА					
		24 часа			48 часов		
		ЛП	T1	T2	ЛП	T1	T2
ЛО	-	19,7± 3,30	26,8± 2,90	27,2± 4,20	18,8± 2,50	26,7± 2,40	25,0± 2,90
ОСМА+2% крахмальный гель	-	138,2± 26,60	139,2± 25,80	153,5± 17,10	114,5± 29,60	120,3± 26,80	138,0± 19,30
ОСМА+ VMA-10-18	2,5	116,7± 28,40	120,7± 26,90	128,7± 23,30	90,6± 28,50	98,0± 26,40	118,7± 27,50
	5	57,7± 24,70*	61,0± 24,00	67,5± 22,90	32,2± 6,20*	36,0± 6,20*	59,0± 24,40
	10	111,5± 30,70	122,7± 25,90	140,2± 18,60	108,3± 27,70	113,3± 25,60	128,7± 20,00
ОСМА+ Цитиколин	500	85,3± 20,50	94,3± 19,50	125± 18,70	38,0± 6,30*	49,2± 6,80	69,0± 7,40

*Примечание: ЛП – латентный период обнаружения инородного предмета в с; T1 – время снятие инородного тела с левой лапы, T2 – время снятие инородного тела с правой лапы; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

Тестирование животных на установке «Ротарод» через 24 и 48 часа после моделирования ОСМА показало, что животные, которым после операции вводили 2% крахмальный гель, при первой посадке удерживались на вращающемся стержне (ЛП первого падения) в среднем 10 с. При этом суммарное время их удержания на вращающемся стержне было значительно меньше, чем у ЛО животных. При тестировании животных контрольной группы через 48 часов после проведения ОСМА, нарушения в координации прогрессировали уменьшалась и мышечная сила, что подтверждалось уменьшением времени падения при первой попытке и общего времени удержания за 3 попытки. Таким образом, у животных с ОСМА отмечались признаки выраженных моторных нарушений, выявленные при проведении

адгезивного теста, и снижении мышечной силы и координации в тесте «Ротарод» [Bohlen M., 2009].

Животные, которым после ОСМА перорально вводили соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и цитиколин, практически в одинаковой степени, и значительно дольше, чем крысы контрольной группы ОСМА, держались на вращающемся стержне в установке «Ротарод» при первой и последующих попытках. Данные результаты могут свидетельствовать о меньшей выраженности нарушений мышечной силы и координации движений (Таблица 48).

Таблица 48 - Время первого падения и общее время удержания (в секундах) животных в тесте «Ротарод» через 24 и 48 часов после ОСМА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Время после ОСМА			
		24 часа		48 часов	
		ЛП	Тобщ	ЛП	Тобщ
ЛО		81,7±11,4*	140,7±15,2*	71,7±7,4*	132,5±14,4*
ОСМА+2% крахмальный гель	-	10,0±2,3	69,8±15,8	7,2±2,3	47,6±11,7
ОСМА+ VMA-10-18	2,5	14,3±3,6	77,2±17,7	21,5±3,2	76,2±3,2
	5	30,0±5,2*	105,0±15,7*	29,3±5,7*	92,7±8,6*
	10	13,0±1,9	75,3±10,5	13,8±2,9	65,5±5,9
ОСМА+ Цитиколин	500	25,7±4,6*	112,2±9,4*	32,2±6,7	100,3±8,7*

*Примечание: ЛП – время первого падения (с); Тобщ. – общее время удержания за 3 попытки (с); *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

Для оценки мнестической функции у животных с фокальной ишемией были выполнены тесты УРПИ и ТЭИ через 48 часов после моделирования патологии. Обучение происходило за 24 ч до моделирования ОСМА.

Тестирование животных с фокальной ишемией, получавшие 2% крахмальный гель, значительно чаще и быстрее, после помещения в установку заходили в темный отсек УРПИ, а также значимо больше времени затрачивали на решение экстраполяционной задачи в ТЭИ, совершая в процессе решения больше нерезультативных поведенческих актов (прыжков).

Животные, получавшие соединение VMA-10-18 в дозах от 2,5 и 10 мг/кг, а также препарат цитиколин, значительно реже, чем в контрольной группе ОСМА, заходили в темный отсек установки УРПИ (Таблица 49).

Таблица 49 – Влияние соединения VMA-10-18 на когнитивную функцию у животных в тесте УРПИ через 48 часов после ОСМА

Показатели / группы	Количество животных в группе	Доза, мг/кг	Показатель	
			ЛП захода, с	число заходов
ЛО	6	-	180,0±0,00	0,0±0,00
ОСМА+2% крахмальный гель	6	-	51,4±5,80	0,8±0,40
ОСМА+ VMA-10-18	6	2,5	116,5±35,10	0,5±0,20
	6	5	127,7±33,30	0,3±0,20
	6	10	106,2±34,60	0,5±0,20
ОСМА+Цитиколин	6	500	124,8±34,90	0,3±0,20

Примечание: ЛП захода – латентный период захода животного в темный отсек в тесте УРПИ, ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.

В группах, получавших соединение VMA-10-18 в дозах от 2,5 и 10 мг/кг, а также препарат цитиколин, животные значительно быстрее, чем в контрольной группе ОСМА, решали экстраполяционную задачу и меньше совершали безрезультативных поведенческих актов (прыжков) (Таблица 50), что свидетельствует о более полном сохранении у них памяти и соответственно меньшем повреждении головного мозга (более полном восстановлении) после ОСМА.

Таблица 50 – Влияние соединения VMA-10-18 на поведенческие акты, совершенные животными в ТЭИ через 48 часов после ОСМА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Показатель	
		ЛП подныривания, с	Число прыжков
ЛО	-	11,8±2,10*	2,8±0,60*
ОСМА+2% крахмальный гель	-	133,6±29,80	23,7±5,10
ОСМА+ VMA-10-18	2,5	66,3±36,00	6,3±1,40*
	5	36,2±12,20*	4,2±0,40*
	10	46,0±5,30*	4,0±1,10*
ОСМА+Цитиколин	500	38,4±9,10	4,6±1,20

*Примечание: ЛП – латентный период; *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

На завершающем этапе под наркозом у всех животных в теменной области черепа животного, в проекции средней мозговой артерии, со стороны окклюзии, игольчатым датчиком лазерного доплерографа измеряли локальный МК. У крыс, которым после моделирования ОСМА перорально вводили 2% крахмальный гель, МК был ниже, что очевидно является причиной большей зоны некроза мозговой ткани и высокой тяжести психоневрологических нарушений. Пероральное введение соединения VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и препарата цитиколин, в некоторой степени, очевидно, ограничивало развитие фокальной ишемии головного мозга и ускоряло его репарацию, поскольку кровотоков в поражённой области был ниже, чем у интактных животных, но несколько выше, чем у животных, не получавших «лечение» (Таблица 51).

Таблица 51 - Уровень мозгового кровотока и размер зоны некроза мозговой ткани у животных через 48 часов после моделирования ОСМА

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Мозговой кровотоков	Размер некроза (%)
ЛО	-	54,2±3,00*	0,0±0,00*
ОСМА+ 2% крахмальный гель	-	18,5±1,70	26,3±3,20
ОСМА+ VMA-10-18	2,5	23,3±1,60	18,8±2,80
	5	31,4±3,30*	16,7±1,50*
	10	25,0±2,40	21,5±2,40
ОСМА+ Цитиколин	500	30,7±4,10*	17,7±0,80*

*Примечание: *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана), ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.*

Для сопоставления размеров зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку по данным цифровых фотографий окрашенных срезов мозга. Установлено, что зона некроза была у животных, получавших соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг и цитиколин была статистически значимо меньше, чем у животных контрольной группы ОСМА. Эти данные соглашаются с меньшей у них негативной неврологической симптоматикой и большими показателями МК.

Таким образом, соединение VMA-10-18 в условиях фокальной ишемии оказывает более выраженное нейропротективное действие в дозе 5 мг/кг, сопоставимый с таковым у цитиколина.

5.2. Изучение нейропротективного действия соединения VMA-10-18 на животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения

Хроническая недостаточность мозгового кровообращения (ХНМК), наряду с болезнями Паркинсона и Альцгеймера, является ведущей причиной снижения когнитивных способностей человека [20, 22]. Нарушения памяти и адаптивных возможностей, возникающие при ХНМК, приводят к утрате способности к самообслуживанию, что сопровождается снижением эффективности терапии основных и сопутствующих заболеваний, повышает риск смерти, инвалидизации, и снижает качество жизни не только самого пациента, но и его родственников. Таким образом, разработка эффективных методов профилактики и лечения хронической недостаточности мозгового кровообращения и сопутствующих дементных нарушений представляется важной задачей современной медицины.

Целью данного исследования являлось изучение влияния курсового (14-ти дневного) введения соединения VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг на течение хронической ишемии у крыс, моделируемой путем частичного стенозирования ОСА и развитие неврологических и когнитивных нарушений.

Исследование выполнено на крысах, которым была воспроизведена двусторонняя окклюзия. Введение исследуемого соединения проводилась в течение 14-ти дней. Оценка психоэмоционального состояния, сенсорно-моторной и когнитивной функции осуществлена в период лечения соединением VMA-10-18 и глиатилином на 21 день после ХНМК.

5.2.1. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на поведение животных с ХНМК

Поведение крыс в постишемическом периоде исследовали в тестах ОП и ПКЛ, показатели регистрировались через 7 и 14 дней на фоне введения соединения VMA-10-18.

Тестирование животных с ишемией в тесте ОП на 7 и 14 день показало, что у животных, не получавших лечения, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность по сравнению с ЛО группой была ниже на 45% и 58% (на 7 день) и на 64% и 72% (на 14 день) соответственно; движение в тестовой установке носило хаотичный характер с редкими заглядываниями в норки и стойками, при этом животные не обследовали все пространство тестовой установки, предпочитая определенную, выбранную ими зону. Снижение двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения сочеталось с увеличением количества болюсов и уменьшением актов груминга, что можно квалифицировать как тревожное поведение.

В группе, получавшей соединение VMA-10-18, по сравнению с животными группы контроль-ишемия, двигательная активность была выше на 7 день и 14 день, и значительно выше были показатели ориентировочно-исследовательской активности также на 7 и 14 день «терапии».

На фоне применения соединения VMA-10-18 и препарата сравнения у крыс с хроническим НМК количество актов дефекации через 7 суток после начала введения веществ было достоверно меньше, а актов короткого груминга больше, чем в контроле. Однако, на 14 день после введения исследуемых веществ различий между всеми группами выявлено не было, что согласно литературным данным, может быть объяснено тем, что при повторных тестированиях в ОП наблюдается некоторое уменьшение тревожности и снижение основных составляющих исследовательской активности (наблюдалась активность в центре поля), связанное с привыканием животного к предлагаемым условиям и потерей новизны (Таблица 52).

Таблица 52 – Влияние соединения VMA-10-18 на поведение животных с хроническим НМК в тесте «Открытое поле»

Показатели / группы		Время после начала введения веществ							
		на 7 день «лечения»				14 день «лечения»			
		ДА	ОИА	кол-во актов дефекации	кол-во актов короткого грумिंगа	ДА	ОИА	кол-во актов дефекации	кол-во актов короткого грумिंगа
ЛО	-	25,5± 3,80	11,3± 1,30	0,6± 0,31	1,9± 0,31	26,4± 3,80	11,6± 1,80	1,1± 0,18	0,7± 0,31
Контроль-ишемия	-	14,0± 1,80*	4,7± 0,70*	2,4± 0,30*	0,5± 0,20*	9,5± 1,50*	3,3± 0,60*	0,9± 0,26	0,6± 0,31
VMA-10-18	5 мг/кг	21,0± 2,50#	10,9± 2,00#	1,4± 0,26#	1,3± 0,19#	18,0± 2,80#	7,9± 1,50	1,2± 0,21	1,0± 0,43
Глиатилин	100 мг/кг	21,4± 2,90#	9,2± 2,30	1,5± 0,44#	1,6± 0,42#	12,9± 2,30	5,3± 1,30	1,1± 0,36	0,8± 0,41

*Примечание: ДА – двигательная активность, определяемая как сумма пересеченных секторов, ОИА – ориентировочно-исследовательская активность (сумма заглядываний в норки и количество стоек); * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).*

У животных с ХНМК, получавших соединение VMA-10-18 отмечалось увеличение времени нахождения в открытых рукавах и центральной зоне в тесте ПКЛ (Таблица 53).

Таблица 53 - Влияние соединения VMA-10-18 на поведение животных с хроническим НМК в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатели / группы	Значение показателей $M \pm m$							
	В _{ОР}		КЗ _{ОР}		В _Ц		ΣКП	
	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней	7 дней	14 дней
ЛО	50,1± 13,30	59,7± 12,40	1,9± 0,40	1,5± 0,30	14,3± 2,10	57,0± 15,40	2,6± 0,40	3,0± 0,50
Контроль-ишемия	9,5± 4,20*	27,9± 7,80*	0,7± 0,20*	1,4± 0,40	6,9± 1,60	8,5± 2,90*	3,0± 0,60	2,9± 0,50
VMA-10-18 5 мг/кг	42,4± 8,90	39,9± 12,90	1,2± 0,20	1,6± 0,30	11,9± 2,30	13,0± 5,80	2,9± 0,40	2,9± 0,50
Глиатилин	36,5± 9,20	37,3± 12,90	1,4± 0,30	1,1± 0,30	17,5± 5,20	5,2± 1,40	3,8± 0,70	2,3± 0,40

Примечание: В_{ОР} - время в открытых рукавах (с); КЗ_{ОР} – количество заходов в открытые рукава; В_Ц - время в центральной зоне (с); ΣКП – количество переходов между рукавами (суммарная двигательная активность); # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).

Полученные данные указывают на то, что курсовое 14-ти дневное введение соединения VMA-10-18 животным с хроническим НМК способствует сохранению у них двигательной и ориентировочно-исследовательской активности на более высоком уровне, чем у животных, не получавших «лечения» или получавших глиатилин, снижая у данных крыс уровень тревожности.

5.2.2. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на сенсомоторный дефицит у животных с ХНМК

ХНМК в зависимости от тяжести течения вызывают нарушения координации и моторики движений различной степени выраженности. Поэтому в данном блоке исследований при моделировании хронического НМК оценивали функциональное состояние нервной системы у животных, тестируя координацию движений и мышечный тонус в тесте Ротарод, мелкую моторику – в адгезивном тесте.

При исследовании координации движений и мышечного тонуса в тесте Ротарод установлено прогрессивное уменьшение латентного периода первого падения животного и суммарного времени удержания на вращающемся стержне у животных с хроническим НМК, что говорит о значительном нарушении координации движений и снижении мышечного тонуса у животных с НМК (Таблица 54).

Таблица 54 - Влияние соединения VMA-10-18 на координацию движений и мышечный тонус в тесте «Ротарод» животных с хроническим НМК

Показатели / группы		Время после начала «лечения»			
		на 7 день «лечения»		14 день «лечения»	
		ЛП, с	Тобщ, с	ЛП, с	Тобщ, с
ЛО	-	39,4±5,70*	107±13,70*	84,1±16,22*	147,4±15,20*
Контроль-ишемия	-	19,5±3,70	63,3±8,70	17,8±2,50	44,8±5,50
VMA-10-18	5 мг/кг	24,9±3,40	71,2±10,10	33,3±5,50*	83,8±11,20*
Глиатилин	100 мг/кг	42,5±8,20*	92,2±10,60*	40,3±8,80*	97,3±15,90*

*Примечание: ЛП – латентный период первого падения; Тобщ. – суммарное время удержания на вращающемся стержне; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы ложнооперированных животных (критерий Дана).*

При 14-ти дневном введении исследуемого соединения VMA-10-18 и препарата сравнения глиатилина животным наблюдалось статистически значимое увеличение показателей ЛП первого падения и суммарное время удержания животных на вращающемся стержне по сравнению с показателями животных группы контроль-ишемия, получавших 2% крахмальный гель.

Оценку тактильной чувствительности и мелкой моторики проводили с помощью адгезивного теста на 21 день после моделирования ХНМК, учитывая латентный период определения инородного тела на каждой лапе, суммарное время, потребовавшееся животному для снятия с лапы инородного тела, процент животных, снявших лейкопластырь с лапы.

Большее время для снятия инородного тела с лап было необходимо животным группы контроль-ишемия (от 131,8 до 149,1 с.) а наименьшее – животным, которым вводили соединение VMA-10-18. При этом 33-50% животных группы контроль-ишемия смогли избавиться от клейкой ленты с одной из лап, тогда как животные, получавшие соединение VMA-10-18, справились с задачей на 83-100%. Животные, которым вводили глиатилин по сравнению с животными группы, получавшими соединение VMA-10-18, затрачивали несколько больше времени для снятия инородного тела с лап.

Животные с ХНМК, получавшие раствор 2% крахмальной слизи, значительно позже, чем животные группы ЛО, обнаруживали инородное тело и лишь 33 и 50% могли удалить инородный предмет с обеих лап (Таблица 55).

Таблица 55 – Влияние соединения VMA-10-18 на показатели адгезивного теста, выполненного животными с ХНМК

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Показатель					
		ЛП1	ЛП2	T1	T2	% 1	% 2
ЛО	-	8,8±0,80	9,8±1,20	13,8±0,90	16,0±1,30	100	100
Контроль-ишемия	-	82,5±14,20*	122,4±14,20*	131,8±15,20*	149,1±13,90*	50	33
VMA-10-18	5	22,2±3,60#	16,0±2,00#	53,8±17,30#	38,8±10,50#	83	100
Глиатилин	100	22,5±5,80#	24,2±5,50#	57,5±15,00#	96,9±20,70#	100	67

*Примечание: ЛП1, ЛП2 – латентный период определения инородного тела на левой и правой лапе, соответственно (с); T1, T2 – суммарное время снятия инородного тела с левой и правой лапы, соответственно; % 1, %2- количество животных (в %) снявших инородное тело с левой и правой лапы; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).*

Таким образом, курсовое 14-ти дневное введение соединения VMA-10-18 животным, с хроническим НМК, приводило к улучшению координации движений, мышечной силы, мелкой моторики и сенсорной чувствительности, по сравнению с показателями группы контроль-ишемия и сопоставимы с показателями животных, получавших глиатилин.

Влияние курсового введения соединения VMA-10-18 на поведение животных с ХНМК в тесте «Принудительного плавания по Порсольту».

Возникновение депрессии у больных с цереброваскулярными заболеваниями считается неврологической проблемой и встречается более, чем у 20% пациентов, перенесших острые или хронические НМК. Современные принципы лечения тревожно-депрессивных расстройств при хронической ишемии головного мозга включают в себя большой спектр медикаментозных препаратов, таких, как нейрометаболические и нейпропротективные средства, антидепрессанты и транквилизаторы. Но, несмотря на многообразие используемых препаратов в лечении аффективных расстройств при ХНМК ни один из этих препаратов полностью не удовлетворяет требованиям врачей и пациентов. Поэтому разработка соединения для лечения и профилактики ХНМК, чьим дополнительным (плеойтропным) эффектом будет уменьшение тревожно-депрессивных расстройств, актуальна и перспективна. При изучении нейропсихотропных эффектов соединения VMA-10-18 было установлено, что оно обладает антидепрессивными свойствами, поэтому мы посчитали целесообразным изучить антидепрессивное действие у животных с ХНМК, для чего и было оценено поведение животных в тесте «Принудительного плавания по Порсольту».

У животных с ХНМК, получавших 2% крахмальный гель, на 7 и 14 дни «лечения» в тесте «Порсольт» были отмечены признаки тревожно-депрессивного поведения (Таблица 56), о чем свидетельствовало увеличение

времени иммобилизации, снижение времени активного плавания и количества совершенных животными прыжков. Курсовое введение соединения VMA-10-18 способствовало уменьшению времени иммобилизации, при этом животные данной группы выполняли большее количество прыжков, что свидетельствует об антидепрессивном действии у соединения VMA-10-18. Препарат сравнения глиатилин не влиял на показатели животных в тесте «Принудительного плавания по Порсольту».

Таблица 56 - Влияние соединения VMA-10-18 на поведение животных в тесте «Принудительного плавания по Порсольту» у животных с ХНМК

Группы / показатели		ЛО	Контроль-ишемия	VMA-10-18 5 мг/кг	Глиатилин
ЛП двигательной активности, с.	7 дней	8,5±1,70	1,8±0,30*	3,0±0,60	1,4±0,30
	14 дней	2,2±0,40	2,7±0,50	1,4±0,40	2,3±0,70
Время иммобилизации, с.	7 дней	9,8±2,30	18,8±3,30*	9,6±1,50#	21,8±4,30
	14 дней	13,5±1,50	22,8±2,50*	12,0±1,78#	24,8±6,10
Количество прыжков	7 дней	4,7±0,60	2,2±0,40*	10,4±1,60#	3,4±0,90
	14 дней	6,7±1,20	2,8±0,60*	6,4±1,20	3,8±0,50
Время активного плавания	7 дней	245,0±6,90	188,3±16,3	188,8±21,50	218,2±14,50
	14 дней	203,6±19,40	187,4±19,5	153,7±10,10	182,9±12,60

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).

Таким образом, при моделировании ХНМК у животных наблюдались признаки депрессивных наслоений (сокращение латентного периода двигательной активности, увеличение времени иммобилизации, уменьшение времени активного плавания и количества совершенных прыжков). При курсовом применении соединения VMA-10-18 оказывало антидепрессивное действие, вызывая статистически значимые изменения специфических показателей: уменьшение продолжительности иммобилизации, повышение количества прыжков. Препарат сравнения глиатилин не оказывал значимого влияния на животных в тесте принудительного плавания по Порсольту. Выявленный антидепрессивный эффект у соединения VMA-10-18 в условиях ишемии и расширяет терапевтический потенциал его применения у больных с НМК, имеющих тревожно-депрессивные расстройства.

Оценка когнитивной функции в тестах УРПИ и ТЭИ у животных с ХНМК, получавших VMA-10-18 и глиатилин

НМК сопряжены с ухудшением когнитивных функций, в частности затруднениями формирования памятного следа и его воспроизведения. Для изучения сохранности памятного следа были использованы тесты УРПИ и ТЭИ, в которых обучение (формирование памятного следа) осуществляли на 7 и 14 дни после формирования ХНМК до введения исследуемых веществ.

В результате обучения и первого тестирования установлено, что животные с ХНМК чаще и быстрее, после помещения в установку заходили в темный отсек (УРПИ), а также значимо дольше по времени решали задачу экстраполяционного избавления (ТЭИ), что свидетельствует о снижении когнитивных функций у стрессированных животных.

Через 21 и 28 дней после моделирования ХНМК (на 7 и 14 день после введения соединения VMA-10-18 или препарат сравнения) животные, получавшие соединение VMA-10-18, в тесте УРПИ – совершали меньшее количество заходов в темный отсек, при этом у животных зашедших в темный отсек латентный период захода был значительно больше, чем у животных группы негативного контроля (Таблица 57).

Таблица 57 - Влияние соединения VMA-10-18 на поведение в тесте «Условная реакция пассивного избегания» животных с ХНМК

Показатели / группы	Количество животных	Доза, мг/кг	Время после начала введения веществ			
			на 7 день «лечения»		14 день «лечения»	
			ЛП захода, с	% не зашедших	ЛП захода, с	% не зашедших
ЛО	12	-	180,0±0,00	100	180,0±0,00	100
Контроль-ишемия	12	-	122,5±20,60*	58	95,7±22,60*	42
ОСМА+ VMA-10-18	12	5	173,3±4,50#	83	153,3±17,90#	83
Глиатилин	12	100	165,8±14,20#	92	154,9±16,30	75

Примечание: ЛП захода – латентный период захода животного в темный отсек в тесте УРПИ (с); *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).

В тесте ТЭИ животные, получавшие соединение VMA-10-18, быстрее решали задачу экстраполяционного избавления, что свидетельствует о сохранении памятного следа у животных с экспериментальным НМК, получавших соединение VMA-10-18 (Таблица 58). Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что соединение VMA-10-18 у животных с ХНМК улучшало когнитивные функции. Для уточнения и расширения данных о влиянии его на обучение и память было проведено исследование в тесте «Барнс».

Таблица 58 – Влияние соединения VMA-10-18 на поведение в «тесте экстраполяционного избавления» животных с ХНМК

Показатели / группы	Доза, мг/кг	Время после начала введения веществ	
		на 7 день «лечения»	14 день «лечения»
		ЛП подныривания, с	ЛП подныривания, с
ЛО	-	6,3±1,00	4,6±0,50
Контроль-ишемия	-	20,0±3,10	14,1±0,90
ОСМА+ VMA-10-18	5	9,7±2,30#	5,2±0,80#
Глиатилин	100	9,6±1,30#	4,5±0,60#

Примечание: ЛП - латентный период подныривания; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).

Влияние курсового введения соединения VMA-10-18 на формирование референтной пространственной памяти животных с хроническим НМК в тесте Барнс

Референтную пространственную память животных с ХНМК исследовали в лабиринте Барнс на 14 день после моделирования ишемии. Животные группы контроль-ишемия и группы ЛО получали за 60 мин. до теста 2% крахмальный гель, опытные группы – соединение VMA-10-18 или препарат сравнения. На 14-й и 15-й день проводили обучение в тесте и далее на 21-й и 28-й день (на 7 и 14 день лечения) воспроизведение теста.

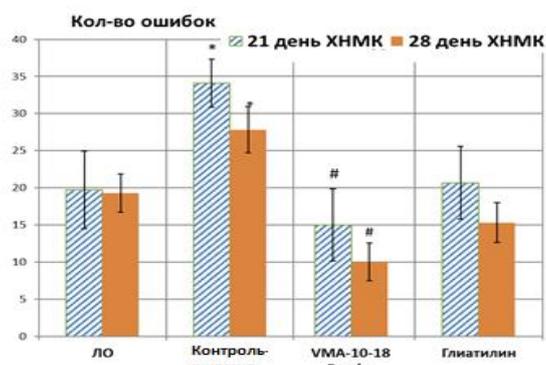


Рисунок 7. Количество ошибок, совершенных животными с ХНМК в тесте Барнс (через 21 и 28 дней после моделирования ХНМК), получавших с 15 по 28 день соединение VMA-10-18

*Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).*

При тестировании (Рисунок 7) через 7 и 14 дней после введения веществ (что соответствует 21-му и 28-му дню течения ХНМК), животные группы контроль-ишемия совершали большее число ошибок референтной (долговременной) памяти по сравнению с ЛО, что может свидетельствовать о большем ишемическом повреждении головного мозга, что проявлялось в ослаблении у них внимания, зрительно-пространственной ориентации. Напротив, при курсовом применении соединения VMA-10-18 у крыс с НМК уменьшало выраженность когнитивных нарушений, что подтверждалось в меньшем количестве ошибок и лучшей пространственной ориентации животных в лабиринте по сравнению с показателями крыс, получавших 2% крахмальный гель.

5.2.3. Изучение влияния курсового введения соединения VMA-10-18 на уровень кровотока в сонных артериях и в проекции средней мозговой артерии

Степень тяжести неврологических нарушений в условиях церебральной ишемии в значительной степени зависит от кровообращения мозга. Поэтому мозговой кровоток (МК) можно расценивать как интегральный показатель,

снижение уровня которого коррелирует с выраженностью психоневрологических отклонений.

Для нормальной работы головного мозга требуется большое количество энергии. Питательные вещества и кислород доставляются в клетки нервной ткани с кровотоком, который поступает через четыре мощные магистральные артерии: две сонные и две позвоночные. У основания мозга ветви этих сосудов образуют замкнутый круг, названный виллизиевым. Значительный стеноз сонных артерий снижает объем поступающей крови к головному мозгу, и, вследствие этого, доставку кислорода и питательных веществ.

На первом этапе была проведена оценка сохранности кровотока в сонных артериях у крыс с ХНМК. Исходные показатели кровотока по ОСА у крыс были сопоставимы, во время проведения операции по моделированию ХНМК мы добивались снижения уровня кровотока по ОСА в среднем на 50-60%, а в головном мозге (в проекции средней мозговой артерии) – на 40-45% от изначальных значений (Рисунок 8).



Рисунок 8. Уровень кровотока в общих сонных артериях у животных с ХНМК

*Примечание: *- $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы (критерий Дана).*

Через 28 дней после моделирования ХНМК было отмечено, что уровень кровотока в ОСА у крыс группы контроль-ишемия в среднем оставался ниже на 33-36%, чем у ЛО животных. У животных, получавших в течение 14 дней

соединение VMA-10-18, кровотоков в ОСА был выше, чем у животных группы контроль-ишемия, но эти различия не достигали статистической значимости.

При оценке уровня МК установлено, что у животных с хроническим НМК он был на 34% ниже, чем у ЛО животных (Рисунок 9). Курсовое 14-ти дневное введение соединения VMA-10-18 улучшало мозговое кровообращение у крыс, повышая его уровень на 20-25% по сравнению с животными с ХНМК, получавшими 2% крахмальный гель.

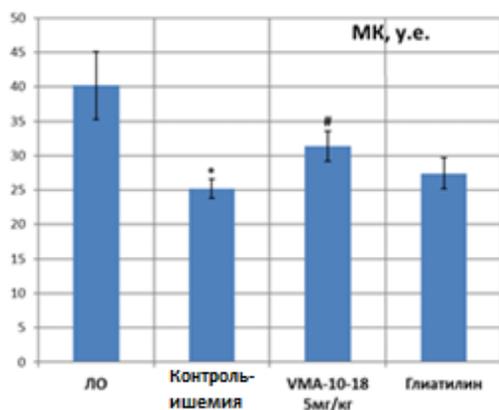


Рисунок 9. Уровень МК в проекции средней мозговой артерий у животных с ХНМК

*Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).*

Введение соединения VMA-10-18, а также препарата сравнения глиатилина не оказывало значимого влияния на уровень МК в проекции средней мозговой артерии крыс с ХНМК.

5.2.4. Изучение влияния курсового введения наиболее соединения VMA-10-18 на функциональное состояние эндотелия крыс с ХНМК

Литературные данные последних лет, со всей очевидностью, свидетельствуют о том, что эндотелиальная дисфункция (ЭД) лежит в основе цереброваскулярной патологии [Рябченко А.Ю., 2014]. Эндотелий играет ключевую роль в регулировании сосудистого тонуса за счет продукции вазоактивных веществ, наиболее важным из которых является оксид азота – «маэстро», управляющий продукцией всех эндотелиальных факторов. ЭД

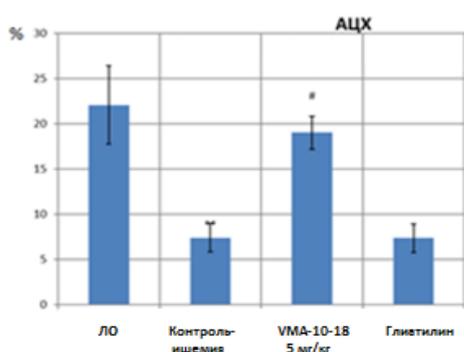
проявляется в первую очередь нарушением эндотелиозависимой вазодилатации, которую в условиях эксперимента, возможно оценить по степени изменения показателей мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза эндогенного оксида азота.

Поэтому изучение функционального состояния эндотелиальной системы мозговых сосудов в постишемический период у животных, курсом принимавших соединение VMA-10-18, позволит оценить один из возможных аспектов его церебропротекторного действия.

Вазодилатирующая функция эндотелия была оценена в условиях модификации синтеза эндогенного NO при введении ацетилхолина (активатора eNOS) и нитро-L-аргинина (ингибитора eNOS).

В ходе исследования было установлено, что у животных с ХНМК наблюдалась статистически менее значимая реакция на введение ацетилхолина (Рисунок 10А) и нитро-L-аргинина (Рисунок 10Б), чем у ЛО животных, тогда как реакция эндотелий независимая на нитроглицерин во всех экспериментальных группах практически не отличалась.

А



Б

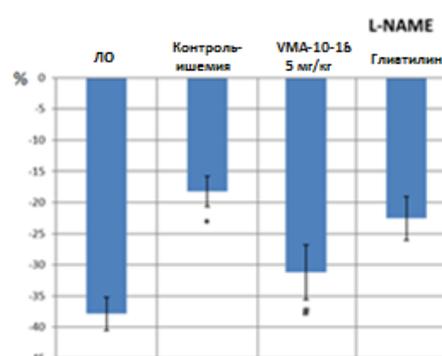


Рисунок 10. Изменение мозгового кровотока (%) в проекции средней мозговой артерии при введении ацетилхолина (А), нитро-L-аргинина (Б) у животных с ХНМК

*Примечание: * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю ЛО группы; # - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроль-ишемия (критерий Дана).*

Введение ацетилхолина животным с ХНМК, получавших соединение VMA-10-18, вызывало увеличение кровотока на 157%, чем у группы контроль-ишемия. (Рисунок 10А). У животных группы препарата сравнения – глицилглицин на 7,4%.

Блокада синтеза оксида азота введением нитро-L-аргинина данным животным способствовала более выраженному снижению церебрального кровотока по сравнению с животными с ХНМК без лечения (Рисунок 10Б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что под действием соединения VMA-10-18 у животных с ХНМК увеличивается стимулируемая и базальная продукция оксида азота.

Таким образом, по влиянию на функциональное состояние эндотелия мозговых сосудов более выраженным действием обладает соединение VMA-10-18.

5.2.5. Изучение влияния соединения VMA-10-18 на утилизацию глюкозы мозгом при ХНМК

Ишемизированная ткань мозга испытывает энергодефицит, более того, в результате снижения аэробного окисления глюкозы в ней развивается лактат-ацидоз, что приводит к дальнейшему каскаду нарушений клеточного метаболизма. Вещества, увеличивающие потребление глюкозы мозгом, уменьшают повреждение ишемизированной нервной ткани. В связи с чем было изучено влияния соединения VMA-10-18 и препарата сравнения глиатилина на метаболизм глюкозы в ткани ишемизированного мозга у животных с ХНМК.

Было установлено, что соединение VMA-10-18 статистически значимо увеличивает утилизацию глюкозы мозгом у животных с ХНМК (Рисунок 11).

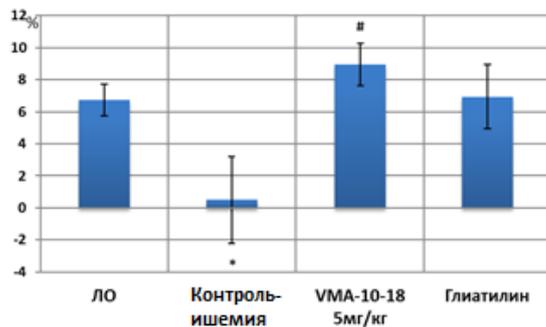


Рисунок 11. Влияние соединения VMA-10-18 и глиатилина на утилизацию глюкозы мозгом у животных с хронической ишемией головного мозга

*Примечание: * - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе -ЛО животных; # - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе животных контроль-ишемия (критерий Дана).*

Среди различных форм НМК по распространенности одно из первых мест занимает хроническая цереброваскулярная недостаточность. Хроническая ишемия мозга – особая разновидность сосудистой церебральной патологии, обусловленная медленно прогрессирующим диффузным нарушением кровоснабжения головного мозга с постепенно нарастающими разнообразными дефектами его функционирования. За последние 10 лет, по данным Министерства здравоохранения РФ, число больных с хроническими формами нарушения МК выросло. Развитие и прогрессирование ХНМК в клинической практике зачастую сопровождаются эмоциональными нарушениями у больных с преобладанием тревожных и депрессивных компонентов. Их наличие снижает приверженность пациентов к терапии, негативно влияет на эффективность проводимых лечебных и профилактических мероприятий. Вместе с тем коррекция указанных нарушений нередко осложнена тем, что пациенты с ХНМК вынуждены одновременно принимать несколько лекарственных препаратов с риском развития нежелательного лекарственного взаимодействия. Поэтому наличие у нейропротекторного средства (анксиолитических и антидепрессивных свойств) позволит снизить риск полипрагмазии и повысит эффективность проводимой терапии. Проведенное исследование позволило установить, что соединение VMA-10-18 способно снижать выраженность эндотелиальной дисфункции и улучшать мозговое кровообращение, очевидно это обуславливает снижение выраженности когнитивного нарушения. Соединение VMA-10-18 в условиях ХНМК оказывало анксиолитическое действие, что будет несомненно полезным при его применении у лиц с НМК, имеющих тревожно-депрессивные наслоения.

ГЛАВА 6. Изучение нейрофармакологического взаимодействия нового производного хиназолина

Выполненное исследование показало, что соединение VMA-10-18 обладает выраженными нейропсихотропными и нейропротекторными свойствами, которые в значительной мере могут быть обусловлены взаимодействием с нейротрансмиттерными системами ЦНС. Поэтому мы попытались оценить возможное взаимодействие вещества с некоторыми медиаторными системами головного мозга.

Исследуемое соединение вводилось однократно *per os* в дозе 5 мг\кг, контрольной группе вводился 2% крахмальный гель в эквивалентном объеме, при выполнении экспериментов, направленных на изучение механизма действия.

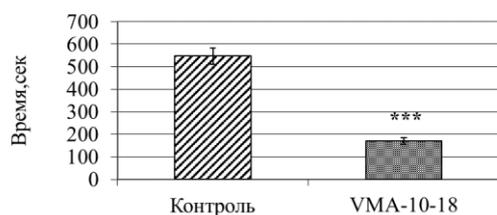
6.1. Изучение взаимодействия производного хиназолина с дофаминергической нейромедиаторной системой головного мозга

Изучение влияния производного хиназолина на стереотипное поведение, вызванное введением агониста постсинаптических дофаминовых рецепторов – апоморфина.

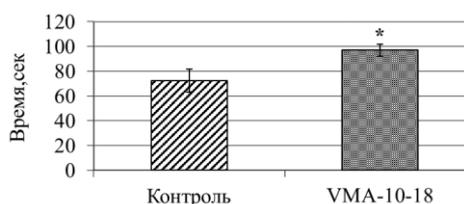
Критерием влияния изучаемого соединения в данном эксперименте на апоморфиновую стереотипию являлось время наступления стереотипии и ее выраженность, а также длительность стереотипных реакций.

После введения апоморфина у животных, получавших исследуемое соединение, по сравнению с контрольной группой животных статистически значимо уменьшился латентный период наступления стереотипного поведения на 68,7% и увеличилась ее выраженность на 34%, и незначительно сократилось общее время стереотипного поведения. Результаты эксперимента представлены на рисунке (Рисунок 12).

А



Б



В

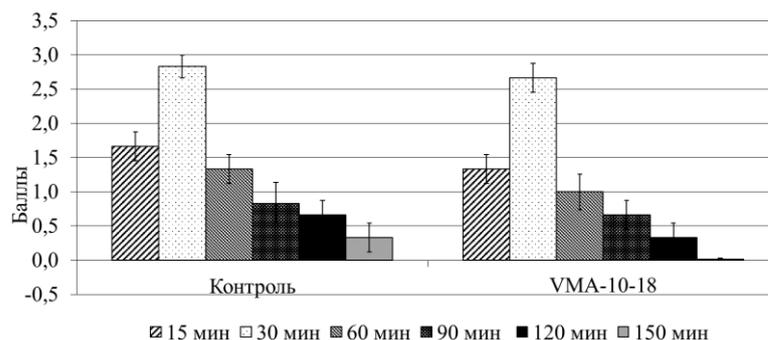


Рисунок 12. Влияние на ЛП наступления стереотипии (А), выраженность (Б) и продолжительность стереотипии (В), вызванной введением апоморфина

*Примечание: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,005$ – * - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных (непараметрический U- критерий Манна-Уитни).*

Представленные данные позволяют предполагать, что психотропные эффекты соединения VMA-10-18 обусловлены активацией дофаминовых рецепторов.

6.2. Изучение взаимодействия производного хиназолина с холинергической нейромедиаторной системой

6.2.1. Изучение возможного взаимодействия производного хиназолина с М-холинергической системой

Непосредственное взаимодействие с М-холинергической системой оценивалось по влиянию на латентный период наступления тремора, общую продолжительность тремора и его интенсивность, вызванного введением М-холиномиметика ареколина (Рисунок 13).

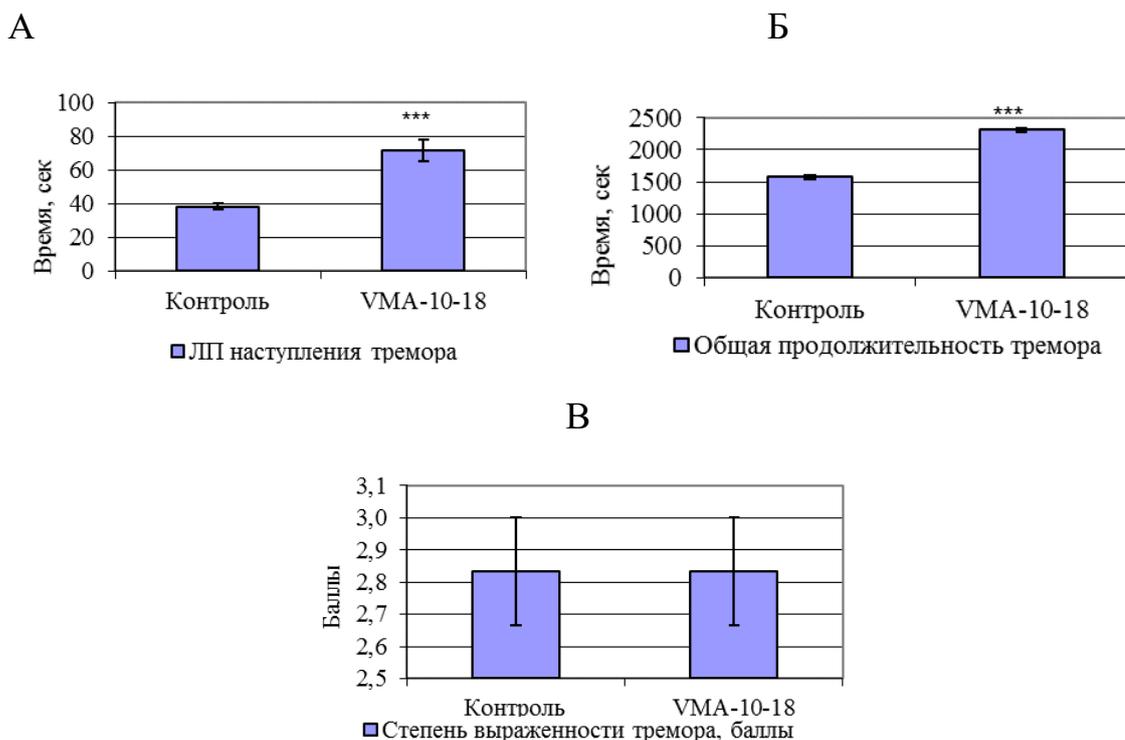


Рисунок 13. Влияние на ЛП возникновения (А), продолжительность (Б) и выраженность (В) тремора, вызванного введением ареколина

*Примечание: *** - $p < 0,005$ – различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных (непараметрический U- критерий Манна-Уитни).*

Соединение VMA-10-18 при его предварительном введении увеличивало ЛП наступления и продолжительность тремора, вызванного ареколином, но не влияло на выраженность тремора. Выше (Глава 3) мы представили данные о том, что исследуемое вещество уменьшало скополаминовую амнезию. Это может свидетельствовать о возможном взаимодействии соединения с М-холинергическими структурами головного мозга.

6.2.2. Изучение возможного взаимодействия производного хиназолина с Н-холинергической системой

Взаимодействие с Н-холинергической системой оценивалось по влиянию соединения на возникновение, продолжительность и интенсивность тремора, вызванного введением никотина (Рисунок 14).

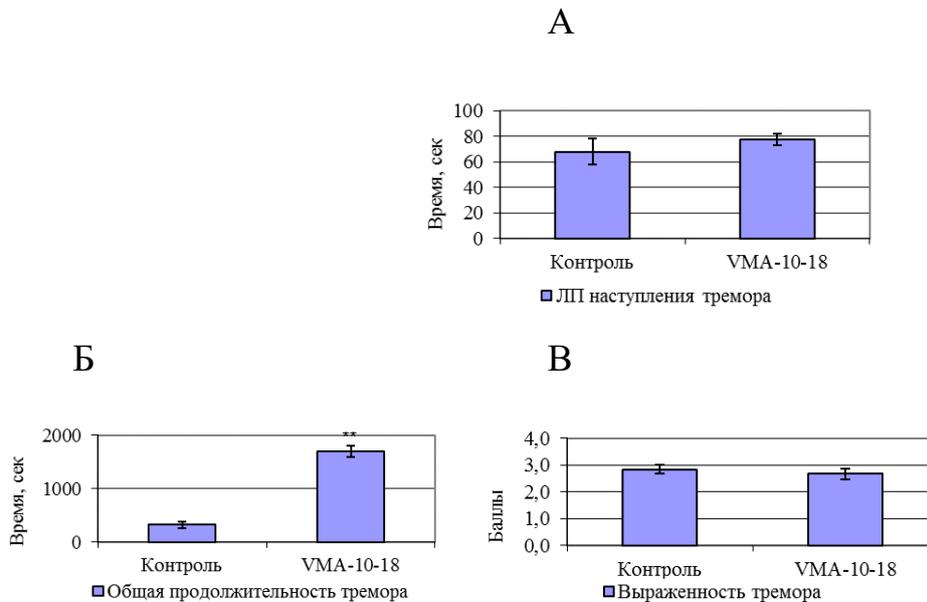


Рисунок 14. Влияние на ЛП возникновения (А), общую продолжительность (Б) и интенсивность тремора (В), вызванного введением никотина

*Примечание: ЛП – латентный период; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных (непараметрический U- критерий Манна-Уитни).*

Исследуемое соединение не вызывало статистически значимого изменения латентного периода развития тремора и его выраженности по отношению к контрольной группе животных. При этом, достоверно увеличивало общую продолжительность тремора на 420% по сравнению с контрольной группой животных.

Такое изменение регистрируемых показателей под влиянием исследуемого соединения может свидетельствовать о пролонгировании им действия никотина на ЦНС.

6.3. Изучение взаимодействия производного хиназолина с серотонинергической системой

Взаимодействие соединения с серотонинергической системой исследовалось по изменению наступления латентного периода гиперкинеза, вызванного введением 5-окситриптофана (предшественника серотонина) (Рисунок 15). У контрольной группы животных, получавших эквивалентный объем 2% крахмального геля, после введения 5-окситриптофана отмечалось развитие

гиперкинеза, который был наиболее выражен на 40 мин. эксперимента, на 50-60 мин. количество кивательных движений у контрольных животных значительно уменьшалось.

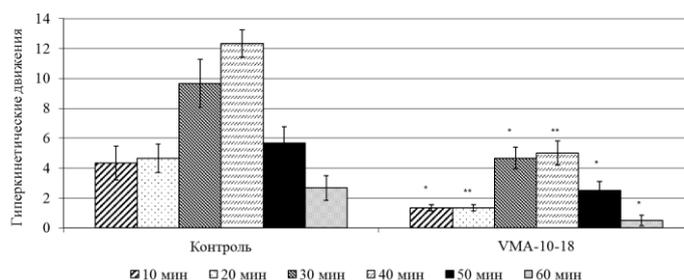


Рисунок 15. Влияние на интенсивность гиперкинеза, вызванного введением 5-окситриптофана

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,005$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных (непараметрический U- критерий Манна-Уитни).

Выраженность гиперкинеза (количество кивательных движений) исследуемое соединение достоверно снижало вплоть до 60 минуты регистрации показателей. Полученные данные могут свидетельствовать о стимуляции данным соединением серотонинергической нейротрансмиссии. Такой эффект изучаемого вещества может быть связан как с модулирующим влиянием соединения на конформацию рецептора, так и с агонизмом или частичным агонистическим взаимодействием с серотониновыми рецепторами.

6.4. Изучение взаимодействия производного хиназолина с ГАМК-ергической системой

Возможное взаимодействие производного хиназолина VMA-10-18 с ГАМК-ергической системой было изучено с использованием нескольких веществ различным образом блокирующих ГАМК-ергическую систему и, вследствие этого ослабляющие ее тормозную функцию, что приводит к развитию судорог.

6.4.1. Изучение влияния производного хиназолина на судороги, вызванные введением пикротоксина

Взаимодействие исследуемого соединения с ГАМК-А рецепторами изучалось при введении пикротоксина. Пикротоксин является неконкурентным антагонистом пресинаптических и постсинаптических ГАМК-А рецепторов. ГАМК-А-литический эффект пикротоксина осуществляется путем блокады хлорного канала ГАМК-А рецепторного комплекса. При введении пикротоксина животным данный эффект проявляется возникновением судорог.

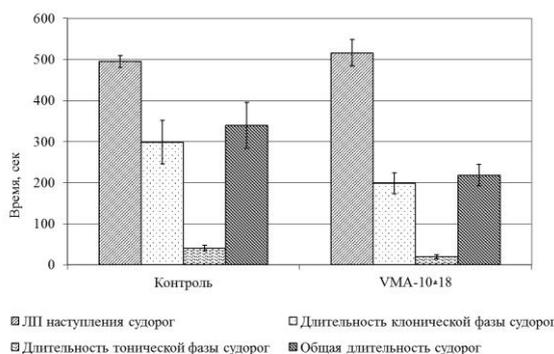


Рисунок 16. Влияние на показатели судорог, вызванные введением пикротоксина

Примечание: ЛП – латентный период.

Введение пикротоксина животным, получавших исследуемое вещество вызывало менее выраженные проявления судорог в сравнении с контрольной группой. Это проявлялось в большем латентном периоде наступления и в меньшем проявлении клонических и тонических судорог, и соответственно общая длительность и интенсивность судорожных проявлений были достоверно меньше, чем у животных контрольной группы. Это свидетельствует о том, что соединение усиливает ГАМК-ергическую передачу, усиливая ее тормозную функцию.

6.4.2. Изучение влияния производного хиназолина на судороги, вызванные введением коразола

Коразол представляет собой блокатор хлорного канала ГАМК-А рецепторного комплекса, при введении животным угнетает ГАМК-ергическое торможение в центральной нервной системе.

На основании проведенных исследований соединение проявляло выраженный антагонизм с коразолом: достоверно относительно контрольной группы вдвое увеличивался латентный период конвульсий и на 29,5% уменьшалась

длительность клонико-тонической фазы судорог и число летальных исходов, относительно группы контроля.

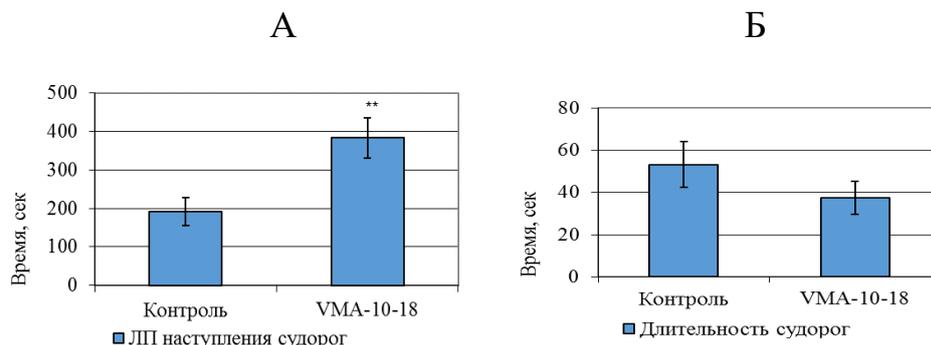


Рисунок 17. Влияние на ЛП наступления (А) и длительность судорог (Б), индуцированных коразолом

*Примечание: ЛП – латентный период; ** - $p < 0,01$ – различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных (непараметрический U- критерий Манна-Уитни).*

Исходя из полученных данных соединение проявляет выраженный антиконвульсантный эффект на модели коразоловых судорог, что свидетельствует о наличии противосудорожного действия, очевидно обусловленного ГАМК-миметическим действием.

Суммированные данные изучения нейрофармакологического взаимодействия наиболее активного производного хиназолин-4(3H)-она под лабораторным шифром VMA-10-18 представлены в таблице (Таблица 59) и отражают взаимодействие соединения с различными нейромедиаторными системами.

Неоднородное влияние исследуемого соединения на различные нейротрансмиттерные системы мозга и объясняет широкий спектр его психотропного действия.

На основании полученных данных, проведенных с помощью ряда тестов, установлено, что производное хиназолина VMA-10-18 стимулирует ГАМК-ергическую нейротрансдукцию, что, в определенной мере, может указывать на наличие у него выраженных ноотропных и нейропротекторных свойств, поскольку участие данных систем в процессах памяти, адаптации и нейропротекции является доказанным фактом. Выявлено также стимулирующее влияние соединения на

дофаминергическую нейротрансдукцию, очевидно этим можно объяснить его антидепрессивное и частично активирующее действие.

Таблица 59 - Результаты взаимодействия производного хиназолина по данным нейрофармакологического анализа с некоторыми нейромедиаторными системами ЦНС.

Нейромедиаторная система	Фармакологические зонды	Наличие и характер взаимодействия	Влияние на нейромедиаторную систему
Дофаминергическая система	Апоморфин	- достоверное снижение ЛП стереотипного поведения - достоверное увеличение продолжительности стереотипного поведения - уменьшение интенсивности стереотипного поведения	Активация
М-холинергическая система	Ареколин	- достоверное увеличение ЛП наступления тремора - достоверное увеличение общей продолжительности тремора - степень выраженности тремора не изменилась	Стимуляция
Н-холинергическая система	Никотин	- достоверное увеличение общей продолжительности тремора - ЛП достоверно не изменяется - интенсивность тремора достоверно не изменяется	Слабо выраженное
ГАМК-ергическая система	Коразол	- достоверное увеличение ЛП	Стимуляция
	Пикротоксин	- уменьшение длительности и выраженности судорог	
	Бикукуллин	- достоверное снижение тонических судорожных эффектов - снижение летальности	
Серотонинергическая система	5-окситриптофан	- достоверное уменьшение наступления гиперкинеза - достоверное уменьшение интенсивности гиперкинеза	Слабо выраженное

Холиномиметическое действие соединения VMA-10-18 может лежать в основе когнитивных эффектов, особенно в условиях ишемического повреждения головного мозга.

ГЛАВА 7. Заключение

Распространенность психических заболеваний во всем мире по данным ВОЗ занимает одно из лидирующих мест и продолжает расти. Психические расстройства включают депрессию, которая затрагивает около 300 миллионов человек, тревоги и биполярное расстройство (около 60 миллионов человек), деменцию (около 50 миллионов человек), и шизофрению, и другие психозы, что составляет 23 миллиона человек во всем мире (https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_391-2410-prevalence-of-mental-disorders/ (дата обращения 01.07.2019)). Психические и неврологические нарушения часто осложняют сердечно-сосудистые заболевания и, в частности нарушения кровоснабжения головного мозга [Кожанова Е.Г., 2015]. В России регистрируется ежегодно более чем 450000 случаев инсультов (<https://www.gks.ru/search/relevance.pdf>), которые в 25-30% заканчиваются летальным исходом. При этом лица, перенесшие инсульт, к прежней жизни, работе могут вернуться не более 15%, остальные остаются инвалидами разной степени тяжести и нуждаются в непосредственном лечении и реабилитации [Кулеш С.Д., 2011; Румянцева С.А., 2013; Савина М.А., 2019]. На фоне перенесенной сосудистой патологии головного мозга тяжесть и исход, восстановление трудоспособности в значительной мере и напрямую зависят от психоневрологического состояния больного. Сопутствующие психоэмоциональные и когнитивные нарушения относят к неблагоприятным факторам течения сердечно-сосудистых, цереброваскулярных заболеваний и требует дополнительного применения лекарственных средств, корригирующих психоэмоциональные и когнитивные нарушения.

Нарушение мозгового кровообращения и сопутствующие психоневрологические нарушения требуют комплексного подхода к фармакотерапии этих патологий и применения одновременно нескольких

препаратов. В этой связи могут заслуживать особого внимания лекарственные препараты, действие которых может быть направлено на основное заболевание и способные благоприятно влиять на настроение, память и соматическую сферу (сенсорно-моторные и др. функции).

Очевидно, одним из таких подходов является поиск препаратов с поливалентным действием. Поэтому поиск соединений с анксиолитической, антидепрессивной, ноотропной, нейропротективной, антигипоксической, противовоспалительной, антиоксидантной активностью при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения является актуальной задачей современной фармакологии.

Природные и синтетические производные хиназолина могут быть отнесены к привилегированному классу химических соединений, так как обладают широким спектром биологической активности. Среди природных соединений, содержащих хиназолиновое ядро в структуре, наиболее известным является алкалоид пеганин. Гидрохлорид этого алкалоида применяется как антихолинэстеразное средство при миопатии и миастении [Herraiz T., 2017]. Рутекарпин является представителем хиназолинового ряда, для которого установлены нейропротективные свойства при ишемических поражениях головного мозга [Hua H. A., 2002]. Также среди хиназолиновых алкалоидов выделяют фебрифунгин, который оказывает противомаларийное действие, во много раз сильнее чем у хинина [Herman, J.D., 2015; McLaughlin N.P., 2014].

Среди синтетических производных хиназолина в клинической практике применяют: метаквалон, который обладает высокой психотропной активностью [Hammer H. A., 2015], празозин и доксазозин – альфаадреноблокаторы, которые широко применяются для лечения артериальной гипертензии, гиперплазии простаты, посттравматического стресса [Antonello A., 2005, Karaman M.İ., 2014; Roerke S., 2017], препарат лонетил, применяющийся при расстройстве сна, тревоге и невротических расстройствах [Магалифа А.Ю., 1999], хинетазон – как диуретическое средство [Carta F., 2013; РЛС, 2017] и хиназолиновое производное эфавиренца, обладающие противовирусной активностью [Corbett J.W., 1999;

Magnus N.A., 2000]. В дополнении к этому, как отмечалось в литературном обзоре разнообразные аналоги производных хиназолина проявляют и противоопухолевую [Jones T.R., 1989; Kreutzberger A., 1993; Баркер Э.Д., 1993; Wei D., 2019] , антидепрессивную [Jatav V., 2008]., анксиолитическую [Патент №2507199], ноотропную [Петров В.И., 2014; Тюренков И.Н., 2013], противосудорожную [Mhaske S.B., 2006; Wolfe J.F., 1990] [Jatav V., 2008; Colotta V., 2012]., противовоспалительную [Золотых Д.С., 2010; Кодониди И.П., 2012; Оганесян Э.Т., 2004, 2010, 2013], противогипоксическую [Павлов С.В., 2006] и вазодилатирующую [Wolak T., 2014] активность.

Поэтому, можно считать, этот класс привилегированным для скрининга веществ с биологической активностью, и волгоградские химики и фармакологи в течение многих лет совместно ведут целенаправленный поиск в ряду производных хиназолина соединений с психотропной активностью, сердечно-сосудистым, антигипертензивным, церебровазодилатирующим, противоишемическим, противовирусным, антитромбическим и др. видами действия.

Нами для целенаправленного поиска лекарственных средств с нейропсихотропным и нейропротективным действием были выбраны 17 новых производных хиназолина. В данном исследовании анализировалась нейро- и психотропные свойства, а также, нейропротективные свойства, полученные при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения (Таблица 60).

Таблица 60. Изучение фармакологической активности новых производных хиназолин-4(3H)-она

Фармакологическая активность	Производные хиназолин-4(3H)-она		
	группа простых эфиров	группа амидных производных	группа сложнозамещенных амидных производных
Анксиолитическая	1/4 (VMA-10-05)	1/8 (VMA-10-18)	2/5 (VMA-10-21, VMA-10-20)
Антидепрессантная	2/4 (VMA-10-04, VMA-10-03)	2/8 (VMA-10-18, VMA-10-11)	1/5 (VMA-10-21)
Ноотропная	2/4 (VMA-10-03, VMA-10-05)	2/8 (VMA-10-18, VMA-10-16)	0/5
Противосудорожная	1/4 (VMA-10-05, VMA-10-03)	2/8 (VMA-10-18, VMA-10-13)	1/5 (VMA-10-21)
Противогипоксическая	0/4	5/8 (VMA-10-11, VMA-10-18, VMA-10-13, VMA-10-14, VMA-10-16)	2/5 (VMA-10-21, VMA-10-17)

При скрининговом исследовании ноотропной активности наибольший эффект оказали соединения из группы простых эфиров VMA-10-03, VMA-10-05 и амидных производных хиназолин-4(3H)-она – вещества VMA-10-18 и VMA-10-16. При более углубленном изучении ноотропного действия и в сравнении с референтным препаратом – фенотропилом на модели скополаминовой амнезии наибольшую активность оказывало соединение VMA-10-18. Это проявлялось в том, что из 8-ми животных, получавших соединение VMA-10-18, при воспроизведении рефлекса пассивного избегания, зашло в темную камеру установки УРПИ только одно животное из группы, тогда как в контрольной группе зашло 8 из 8 животных. Антиамнезирующий эффект данного вещества был сопоставим с фенотропилом. В механизме ноотропного действия большое значение придается наличию и выраженности у них антигипоксических свойств. Установив у ряда веществ способность улучшать формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа, мы изучили их антигипоксические свойства. Среди 17 новых производных хиназолин-4(3H)-она 5 веществ из 8 амидных производных хиназолина и у 2 веществ из 5-ти группы сложнозамещенных амидных производных выявлены антигипоксические свойства. Противогипоксическая активность на модели нормобарической и гемической гипоксии в наибольшей степени выражена у соединений VMA-10-18, VMA-10-11 и в меньшей степени VMA-10-13, VMA-10-14, VMA-10-16, VMA-10-21 и VMA-10-17. Высокая антигипоксическая активность соединения VMA-10-18 была подтверждена на модели тканевой гипоксии, а также при ишемии головного мозга. Данное вещество повышало выживаемость животных после двусторонней перевязки общих сонных артерий в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг вдвое по сравнению с контролем, а у выживших наблюдалась меньшая выраженность психоневрологических нарушений и более быстрое, чем у животных контрольной группы их купирование.

На модели ишемии мозга, вызванной двусторонней перевязкой сонных артерий соединение VMA-10-18 оказалось высокоэффективной, обеспечивая

выживаемость животных в 93%, тогда как в контрольной группе выжило только 47%.

Таким образом, на основании предварительных исследований психотропных и противогипоксических свойств было установлено, что исследуемое соединение обладает ноотропным и нейропротективным действием с дополнительными антигипоксическими, анксиолитическими и антидепрессивными свойствами (Таблица 61).

Проведенное скрининговое исследование, позволило нам по совокупности свойств выделить соединение VMA-10-18, которое оказывало выраженное анксиолитическое, ноотропное, антигипоксическое и нейропротективное (в условиях двусторонней окклюзии сонных артерий) действие и позволило считать целесообразным дальнейшее изучение его нейропротективных свойств при остром и хроническом нарушении мозгового кровообращения.

Таблица 61. Изучение фармакологической активности наиболее активных производных хиназолин-4(3H)-она

Фармакологическая активность	Производные хиназолин-4(3H)-она		
	группа простых эфиров	группа амидных производных	группа сложнозамещенных амидных производных
Ноотропная (на модели скополаминовой амнезии)	0/2	1/2 (VMA-10-18)	0/5
Анксиолитическая в варианте Vogel	1/1 (VMA-10-05)	1/1 (VMA-10-18)	2/2 (VMA-10-21, VMA-10-20)
Противогипоксическая (на модели тканевой гипоксии)	0/4	1/5 VMA-10-18	0/2
Антидепрессивная (на модели плавания по Порсольт)	0/2	1/2 (VMA-10-18)	1/1 (VMA-10-21)

В ходе углубленного изучения специфических свойств соединения VMA-10-18 основными задачами являлись:

1. Проведение дополнительных исследований, доказывающие выраженность его нейропротективного действия в сравнении с референтными препаратами при острой фокальной ишемии головного мозга и хроническом нарушении мозгового кровообращения.

2. Изучение и анализ возможных механизмов нейропротективного и психотропного действия соединения VMA-10-18.

Для моделирования острой фокальной ишемии головного мозга нами была использована необратимая окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА), эта модель считается эквивалентом ишемического инсульта, наиболее частой причиной которого является тромбоэмболия или атеросклероз.

При выполнении этой серии были получены данные доказывающие высокий нейропротективный эффект исследуемого соединения. Так у животных с ОСМА, получающих VMA-10-18, отмечается достоверно меньший неврологический дефицит по шкалам Combs and D'Alecy и Garcia, что выражалось в большем двигательном и ориентировочно-исследовательском поведении, в лучшей сенсорно-моторной функции в сравнении с животными группы контроль-ишемия.

У животных этой группы значительно быстрее восстанавливалась тактильная чувствительность и мелкая моторика, что проявлялось в уменьшении времени обнаружения и снятия инородного предмета с лап в адгезивном тесте и увеличении времени на вращающемся стержне в тесте «Ротарод».

В тестах УРПИ и ТЭИ установлены более высокие показатели ноотропной функции в формировании, сохранении и воспроизведении памятной информации, чем у животных контрольной группы.

Сохранность памятного следа оценивали в тестах УРПИ и ТЭИ после моделирования НМК. Животные, получавшие VMA-10-18, лучше сохраняли эффект, что указывает при моделировании патологии на наличие ноотропной активности.

У животных, получавших соединение VMA-10-18 в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг отмечался более высокий мозговой кровоток в проекции средней мозговой артерии, со стороны поражения на 20,7%; 41,3% и 26,0% и сопоставим с препаратом сравнения цитиколином (-32,7%), зона некроза на 28,5%; 36,5% и 18,3% была соответственно меньше, чем у группы контроль-ишемия.

ХНМК практически всегда манифестируют психоэмоциональными, тревожно-депрессивными, дементными нарушениями, что приводит к снижению качества жизни как самих больных, так и окружения. При ХНМК нейропротективный эффект исследуемого вещества также подтвердился.

Курсовое введение соединения VMA-10-18 значительно улучшает неврологический статус, сопоставимый с животными, получавшими препарат сравнения, а также более быстрый возврат тактильной чувствительности и мелкой моторики, что расценивалось как улучшение состояния животного. Показатели поведения в тестах ОП и ПКЛ регистрировались через 7 и 14 дней после проведения «лечения», и как показывают данные через 14 дней двигательная и ориентировочно-исследовательская активность приравнивалась к показателям группы ЛО и группе животных, получавших препарат сравнения глиатилин.

Так у животных опытной группы в сравнении с контрольной регистрировалась меньшая тревожность, депрессивные наслоения и меньший когнитивный дефицит.

При лечении больных с цереброваскулярными нарушениями основной проблемой считается развивающаяся депрессия на фоне перенесенного заболевания. Имеющиеся препараты не всегда удовлетворяют врачей и пациентов по причине их недостаточной эффективности или их плохой переносимости. Поэтому разработка нового соединения для лечения и профилактики ХНМК, дополнительным эффектом которого будет снижение тревожного и депрессивного компонента может быть весьма желательной.

При проведении теста Порсольт в условиях хронического НМК, у животных, получавших VMA-10-18 наблюдалось снижение признаков депрессивных наслоений, что проявлялось в увеличении ЛП двигательной активности, уменьшении времени иммобилизации, увеличении количества прыжков и увеличении времени активного плавания. Это позволило судить о выявлении антидепрессивного эффекта у соединений VMA-10-18 в условиях ишемии головного мозга.

Показатели поведения животных, получавших вещество VMA-10-18 и глиатилин в тестах ОП, ПКЛ, Порсольт, УРПИ и ТЭИ были сопоставимы.

Установив нейропротективное действие при остром и хроническом нарушении мозгового кровообращения, а также наличие у соединения анксиолитического, антидепрессантного и ноотропного действия, следовало

ответить на вопрос - с чем это связано? НМК в значительной мере обусловлено эндотелиальной дисфункцией. Функционирование эндотелия сопряжено с нарушением вазодилатирующей, антитромботической, антипролиферативной функций, связанного с нарушениями сосудистого гомеостаза.

В этой связи у животных с ХНМК был проведен анализ эндотелиотропного действия исследуемого вещества.

Оценка вазодилатирующей функции эндотелия оценена в условиях модификации синтеза эндогенного NO при введении активатора eNOS - ацетилхолина и блокатора этого фермента - нитро-L-аргинина. Было установлено, что у животных, получающих соединение VMA-10-18, было увеличение стимулируемой и базальной продукции оксида азота, т.е. увеличение вазодилатации в ответ на введение активатора eNOS и наоборот, увеличение степени падения кровотока при введении блокатора этого фермента. Такие данные в определенной мере объясняют улучшение мозгового кровообращения у животных, получавших исследуемое вещество.

Снижение мозгового кровотока и гипоксия во всех случаях приводит к повреждению ишемизированной нервной ткани. В связи с этим в тканях происходит анаэробное окисление, что приводит к нарушениям клеточного метаболизма, в том числе и изменением показателей утилизации глюкозы. Установлено, что соединение VMA-10-18 увеличивает утилизацию глюкозы мозгом у животных с ХНМК, уменьшает перекисное окисление липидов и активацию ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, глутатион пероксидазы и в меньшей степени каталазы), что было показано профессором, д.м.н. В.Н. Перфиловой при выполнении исследований в рамках по государственному контракту № 14.N08.12.0142 от «02» июня 2017 г. «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения нарушений мозгового кровообращения на основе производного хиназолина» с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Нами установлены анксиолитические, антидепрессантные и ноотропные действия вещества, которое может быть связано с нейрхимическим действием. С

этой целью для выявления нейрофармакологического действия были проведены исследования с использованием агонистов и антагонистов различных рецепторов головного мозга.

Эти данные дают нам основание считать, что соединение VMA-10-18 (3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он) является эффективным и низкотоксичным, нейропротективным веществом, что позволило ВолгГМУ участвовать в конкурсе и получить финансовую поддержку от Министерства науки и образования РФ, и в полном объеме выполнить доклинические исследования и подготовить досье для подачи в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ для получения разрешения на клинические испытания.

При моделировании ишемического повреждения головного мозга на модели перевязки ОСА среди наиболее активных исследуемых простых эфиров, амидов и сложнзамещенных амидов производных хиназолина было выбрано наиболее активное соединение VMA-10-18 в дозе 5 мг/кг. Дальнейшее исследование выживаемости и оценки неврологического дефицита показало, что соединение VMA-10-18 повышало количество выживших животных и уменьшало неврологический дефицит после перевязки ОСА. Также отмечалось уменьшение выраженности постишемического нарушения силы и координации движения животных после ОСА.

Изучение острой токсичности соединения VMA-10-18 при пероральном пути введения не выявило случаев острой (в течение 24 ч) и отсроченной (в течение 7 и 14 дней) летальности в дозах до 5000 мг\кг включительно. Дальнейшее увеличение испытываемой дозы не представлялось возможным вследствие плохой растворимости вещества и согласно существующим нормативным требованиям по ограничению объема жидкости, вводимой в желудок.

В результате этого летальное действие вещества VMA-10-18 при пероральном введении определить не представлялось возможным. На основании данных экспериментов можно сделать вывод, что соединение VMA-10-18

относится к классу малотоксичных [Саноцкий И.В., Уланова И.П., 1975]. И за ЛД₅₀ была принята доза 5 г/кг.

Учитывая полученные данные в ходе изучения острой токсичности вещества и данные, полученные при изучении специфической активности, мы можем условно рассчитать терапевтический индекс: ЛД₅₀=5 г/кг / эффективная доза 5 мг/кг и считать равным 1000, что является большой шириной терапевтического действия.

При изучении нейрофармакологического эффекта при введении агониста постсинаптических дофаминовых рецепторов - апоморфина животные, получавшие соединение VMA-10-18, уменьшали латентный период наступления стереотипного поведения на 68,7% и увеличивали его выраженность на 34%, незначительно сокращая общее время стереотипного поведения.

По результатам взаимодействия с М-холинергической системой оценивалось влияние на латентный период наступления тремора, продолжительность тремора и его интенсивность, вызванного введением М-холиномиметика ареколина. У животных наблюдалось увеличение ЛП наступления и продолжительность тремора, вызванного ареколином, но не влияло на выраженность тремора. В Главе 4 были представлены данные о влиянии соединения на выраженность амнезии, вызванной М-холиноблокатором, данные могут свидетельствовать о возможном активирующем действии М-холинергической системы головного мозга. Соединение ослабляло скополаминовую амнезию.

При изучении влияния на Н-холинергическую систему у животных, получавших соединение VMA-10-18, наблюдалось увеличение продолжительности тремора на 420%, по сравнению с контрольной группой животных. Эти данные могут свидетельствовать о пролонгировании действия никотина.

Интенсивность гиперкинеза, вызванного введением 5-окситриптофана (предшественника серотонина), у животных, получавших VMA-10-18, количество кивательных движений не отличалось от контрольной группы на всем протяжении наблюдения. Очевидно серотонинергическая нейротрансдукция не вовлечена в действие соединения VMA-10-18.

При введении неконкурентного антагониста пресинаптических и постсинаптических ГАМК-А рецепторов - пикротоксина у животных, получавших соединение VMA-10-18, наблюдалось увеличение ЛП, сокращались длительность и интенсивность судорог, что свидетельствует об усилении ГАМК-ергической передачи, усиливая ее тормозную функцию.

Увеличение латентного периода наступления судорог, уменьшением на 29,5% длительности их клонико-тонической фазы, уменьшение летальных исходов при введении блокатора хлорного канала ГАМК-А рецепторного комплекса – коразола свидетельствует об активации ГАМК-ергической системы мозга.

Таким образом, ноотропные эффекты соединения VMA-10-18 обусловлены активацией ГАМК-ергической и М-холинергической систем, а анксиолитические и антидепрессивные – активацией дофаминергической системы, что определяет его поливалентное действие.

Выводы

1. Скрининговое исследование нейрпсихотропной активности среди простых эфиров производных хиназолин-4(3*H*)-она (4 соединения), амидных производных (8 соединений) и сложнзамещенных амидных производных хиназолин-4(3*H*)-она (5 соединений) позволило выявить ряд веществ с выраженной анксиолитической (VMA-10-05, VMA-10-18, VMA-10-20, VMA-10-21) и умеренной антидепрессантной (VMA-10-05, VMA-10-18 и VMA-10-21), ноотропной (VMA-10-03, VMA-10-05, VMA-10-18, VMA-10-17 и VMA-10-21) и антигипоксической активностью (VMA-10-11, VMA-10-13, VMA-10-14, VMA-10-16, VMA-10-17 и VMA-10-18).

2. Среди наиболее активных производных хиназолина при углубленном изучении выявлено соединение 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он с лабораторным шифром VMA-10-18, которое оказывало поливалентное психоневрологическое действие: анксиолитическое, антидепрессивное, ноотропное, антигипоксическое, противосудорожное и нейропротективное.

3. Соединение VMA-10-18 при внутрижелудочном введении мышам и крысам в дозах 3; 4 и 5 г/кг не вызывает гибели животных при 14 дневном наблюдении, поэтому его можно отнести к классу малотоксичных соединений.

4. При изучении антигипоксической активности установлено, что соединение VMA-10-18 повышало продолжительность жизни при нормобарической (на 59,5%), гемической (на 78,7%) и тканевой (на 114,4%) гипоксии. При ишемии головного мозга, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий исследуемое соединение в наиболее активной дозе 5 мг/кг вдвое повышало выживаемость животных и значительно уменьшало неврологический дефицит по сравнению с группой контроль-ишемия.

5. Соединение VMA-10-18 у животных с фокальной ишемией головного мозга в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг уменьшало зону некроза соответственно на 28,5%; 36,5% и 18,3%, и сопоставимо с препаратом сравнения цитиколином (-32,7%). А мозговой кровотока в проекции средней мозговой артерии был, соответственно, на 20,7%; 41,3% и 26,0% выше, в сравнении с группой негативного контроля.

6. У животных, при моделировании хронического нарушения мозгового кровообращения, получавших соединение VMA-10-18, при оценке двигательной активности, координации движений и мышечного тонуса отмечались значительные улучшения по сравнению с группой контроль-ишемия. Уровень мозгового кровотока в проекции средней мозговой артерии был выше у животных, получавших соединение VMA-10-18, чем у группы контроль-ишемия, на 20-25%.

7. Нейропротективные эффекты у животных с острым и хроническим нарушением мозгового кровообращения, получавших соединение VMA-10-18, обусловлены его антигипоксическими свойствами, повышением стимулируемой и базальной продукции оксида азота, улучшением вазодилатирующей функции эндотелия, увеличением мозгового кровотока и утилизации глюкозы мозгом. Ноотропные свойства соединения VMA-10-18 обусловлены активацией ГАМК-ергической и М-холинергической системами. Анксиолитические и антидепрессивные – активирующей дофаминергической системой.

Практические рекомендации

1. Нейропротективное действие 3-[2-оксо-2-[(4-метоксифенил)амино]этил]хиназолин-4(3*H*)-он с лабораторным шифром VMA-10-18, выявленное при моделировании нарушений мозгового кровообращения свидетельствует о перспективности создания на его основе препарата с полимодальным действием для лечения и профилактики острых и хронических нарушений мозгового кровообращения и коррекции с ними связанных психоневрологических состояний.
2. Целесообразно продолжить дальнейший синтез новых производных хиназолин-4(3*H*)-она с различными заместителями и изучение их нейропсихотропных и нейропротективных свойств.
3. Является целесообразным включение полученных в данной работе результатов в учебные пособия по фармацевтической органической и медицинской химии в раздел «новые перспективные средства для лечения нарушений мозгового кровообращения и сопутствующих им психоэмоциональных и когнитивных нарушений».

Список сокращений

- АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ЗИ – зона инфаркта
ЛО – ложнооперированные животные
ЛП – латентный период
МК – мозговой кровоток
НМК – нарушения мозгового кровообращения
ОП – открытое поле
ОСА – общие сонные артерии
ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии
ПГД – противогипоксическое действие
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПСД – противосудорожное действие
СМА – средне мозговая артерия
СО – степень отека
Тобщ – общее время
ТЭИ – тест экстраполяционного избавления
УРПИ – условная реакция пассивного избегания
физ.р-р – физиологический раствор
ХНМК – хроническое нарушение мозгового кровообращения
ЦНС – центральная нервная система
ЧСС – частота сердечных сокращений

Список литературы

1. Альчук, А.И. Актопротекторная активность новых производных 4-оксо(амино)хиназолина / А.И.Альчук // Автореф. дисс. канд. мед. наук.-Киев, 2011.-24с.
2. Альчук, О.И. Характеристика влияния 4-[4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил]бензойной кислоты в сравнении с бемитилом на биоэнергетические процессы в организме крыс в условиях ежедневного тренировки бегом / О.И. Альчук // Вестн. морфологии. - 2010. - Т. 4, № 16. - С. 775-778.
3. Баркер, Э.Д. Производные хиназолина или их фармацевтически приемлемые соли, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе / Э.Д. Баркер: пат. России № 2127263 (1993) - Заявл. 19.01.1993, опубл. 10.03.1999.
4. Беленичев, И.Ф. Коррекция поведенческих реакций крыс, которые подвергались хроническому стрессу, производным хиназолина (ПК-66), эмоксипином и семаксом / И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, Л.И. Кучеренко [и др.] // Мед. химия - 2006. - Т. 8, № 2. - С. 91-94.
5. Берг, К. Новые противоопухолевые препараты / К. Берг, Р. Эум, П. Киркпатрик // Провизор. - 2004. - № 19. - С. 14-16.
6. Бражко, Е.А. Биологическая активность диалкоксизамещенных (хинолин-4-илсульфанил)карбоновых кислот / Е.А. Бражко // Вестник БГУ. Серия 2, химия. Биология. География. - 2015. - № 3. - С. 26-29.
7. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон // М.:Высшая школа, 1991. - 210с.
8. Бурчинский, С.Г. Возможности комплексной нейропротекции при ишемическом инсульте / С.Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал. - 2015. - №. 6 (76). - С. 98-104.
9. Волокитина, Д.С. Разработка и валидация методики определения родственных примесей в субстанции нового биологически активного соединения ноотропного действия - VMA-10-13 // Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин и др. // Евразийский Союз Ученых. – 2018. Т. 56, №11-3. – С. 39-42.

10. Волошина, А.Д. Антимикробная активность и токсичность новых производных хиназолин-2,4-диона ациклического и макроциклического строения. / А.Д. Волошина, Н.В. Кулик, А.С. Стробыкина [и др.] // Третий междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике 2017 (моби-химфарма 2017) – 2017. С. 86.
11. Воронина Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией д.м.н. А.Н. Миронова – М: Гриф и К, 2012. - С.235-250.
12. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
13. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С.153-161.
14. Ганнушкина, И.В Патофизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении / И.В Ганнушкина // Журн. невропатол. и психиатр. – 1996. – Т.96, №1. – С.14.
15. Геращенко, А.Д. Изучение ноотропной активности производного хиназолина на фоне физических нагрузок крыс / А.Д. Геращенко, В.В. Погорелова // Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству. – 2017. – С. 24-25.
16. Гражданцева, Н.Н. Иммунотропные свойства производного хиназолинона-4 и его предшественника с остатком гамма-аминомасляной кислоты / Н.Н. Гражданцева, М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков [и др.] // Астраханск. мед. журн. - 2011. - Т. 6, № 3. - С. 68-71.
17. Гриб, В.В. Сравнительная характеристика лечебного действия натриевой соли 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1, 2, 4] триазино[2, 3-с]хиназолин-6-ил) бутановой

кислоты (соединение DSK-38) и диклофенака по биохимическим показателям крови на модели адьювантного артрита / В.В. Гриб, Степанюк Г.И., Дорошенко Е.Н., Заичко Н.В. [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. - 2015. - №5(154). - С.43-46.

18. Григорян, Н.П. Синтез и превращения 2-меркапто-3-(2-метилаллил)-7,10-диметил-3Н-спиро[бензо[Н]хиназолин-5,1,-циклопентан]-4(6Н)-она и психотропная активность синтезированных соединений / Н.П. Григорян, Р.Г. Пароникян, А.С. Григорян // От синтеза полиэтилена до стереодивергентности: развитие химии за 100 лет. Материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию кафедры органической химии ПГНИУ. – 2018. Пермь. – С. 98-101.

19. Грицай, Н.Н. Система гемостаза при нарушении мозгового кровообращения / Н.Н. Грицай, В.П. Мищенко, В.А. Пинчук // Международный неврологический журнал. – 2006. – № 5. – С.53-57.

20. Гусев, Е.И. Когнитивные нарушения при цереброваскулярных заболеваниях / Е.И. Гусев, А.Н. Боголепова // М.: МЕДпресс-информ. - 2013. – 176 с.

21. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов [и др.] // Consilium Medicum. – 2014. – №12. – С.13-17.

22. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов [и др.] // Справочник поликлинического врача. - 2015. - № 1. - С. 44-45.

23. Дайнеко, А.С. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода / А.С. Дайнеко, А.А. Шмонин, А.В. Шумеева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2014. - Т.13, №1. - С.68-78.

24. Данилов, В.И. Инсульт. Современные подходы диагностики, лечения и профилактики: метод. рекомендации / под ред.: В. И. Данилова, Д. Р. Хасановой. - М.: ГЭОТАР-Медиа. - 2014. - 248 с.

25. Джигалюк, О.В. Кардиопротекторная активность и скрининг в ряду п-замещенных хиназолин-4(3Н)-онов / О.В. Джигалюк, Г.И. Степанюк, К.П. Шабельник и др. // Запорожский медицинский журнал – 2019. - №1(21). –С.112-117.

26. Золотых, Д.С. Прогноз противовоспалительной активности синтезированных производных хиназолинона-4 с остатками дипептидов и аминокислот методом молекулярного докинга / Д.С. Золотых, Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди [и др.] // Вопр. биологич. мед. и фармац. химии. - 2010. - № 9. - С. 55 - 62.
27. Кодониди, И.П. N-Производные хиназолинона-4 и их ациклические предшественники: синтез и взаимосвязь структура - психотропная активность / И.П. Кодониди // Вопр. биологич. мед. и фармац. химии. - 2012. - № 4. - С. 27-33.
28. Кожанова, Е.Г. Актуальные вопросы в лечении депрессии при остром нарушении мозгового кровообращения / Е.Г. Кожанова, В.А. Куташов // Молодой ученый. - 2015. - № 20 (100). - С. 132-135.
29. Кожинова, А. В. Фармакотерапия больных, перенесших ишемический инсульт, в период реабилитации / А. В. Кожинова, О. С. Левин // Современная терапия в психиатрии и неврологии. - 2015. - №1. – С. 4-16.
30. Кулеш, С.Д. Динамика степени ограничения жизнедеятельности и инвалидности в течение 5 лет после перенесенного инсульта / С.Д. Кулеш, Л.А. Клецкова, Н.А. Филина и др. // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. - 2011. - № 3 (11). - С. 127-135.
31. Магалифа, А.Ю. Лекарственные средства в клинике алкоголизма и наркомании: руководство для врачей / под. ред. А.Ю. Магалифа. - М.: РГМУ, 1999. - 111 с.
32. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский - Харьков: Торсинг, - 1997. - Т1 - 560 с.
33. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С.478-485.
34. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией д.м.н. А.Н. Миронова – М: Гриф и К, 2012. - С.80-93.

35. Насруллаев, А.О. Синтез и противомикробная активность трициклических хиназолинтионов / А.О. Насруллаев, Ж.И. Исламова, Б.Ж. Элмурадов и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2017. - Т. 51. - № 5. - С. 29-34.
36. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice).
37. Оганесян, Э.Т. Исследование противовоспалительной активности производных хиназолинона-4 и их ациклических предшественников / Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди, Т.А. Лысенко [и др.] // Биомедицина. - 2010. - № 5. - С. 105 -107.
38. Оганесян, Э.Т. Количественные соотношения структура - активность в ряду производных хиназолинона, проявляющих противовоспалительную, анальгетическую и жаропонижающую активность / Э.Т. Оганесян, Д.С. Золотых, И.П. Кодониди [и др.] // Вопр. биологич. мед. и фармац. химии. - 2013. - № 1. - С. 024-029.
39. Оганесян, Э.Т. Прогноз и целенаправленный синтез N-гетероциклических производных хиназолинона-4 / Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди, М.М. Магонов [и др.] // Современные наукоемк. технологии. - 2004. - № 6. - С. 113-114.
40. Озеров, А.А. Поиск новых противовирусных и противоопухолевых агентов в ряду N-замещенных производных хиназолина / Озеров, А.А. / Вестн. Волгоград. мед. акад. - 1997. - Т. 52, Вып. 3. - С. 34-36.
41. Павлов, С.В. (а) Антиоксидантная и антиамнестическая активность 3-(карбоксофенил)-4 (3Н)-хиназолинов / С.В. Павлов, И. Ф. Беленичев, К. П. Шабельник [и др.] // Запорожск. мед. журн. - 2006. - № 6. - С. 119-122.
42. Павлов, С.В. (б) Сравнительная оценка антиоксидантного действия производного хиназолина (ПК-37), тиотриазолина и эмоксипина в условиях

- моделирования иммобилизационного стресса / С.В. Павлов, И. Ф. Беленичев, К. П. Шабельник [и др.] // Эксперим. клинич. физиол. биохимия. - 2006. - № 2. - С. 25-32.
43. Павлов, С.В. Церебропротекторная активность производных (4-оксохиназолин-3-ил)алкил (арил)карбоновых кислот в условиях иммобилизационного стресса: автореф. дисс. канд. биол. наук / С.В. Павлов. - Киев, 2007. - 21 с.
44. Петров, В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А. Производные хиназолина, обладающие ноотропной и антигипоксической активностью // Пат. России № 2507198 (2014). - Оpubл. 20.02.2014, Бюлл. № 5.
45. Петров, В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А. Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью // Пат. России № 2507199 (2014). - Оpubл. 20.02.2014, Бюлл. № 5.
46. Петрова, Е.А. Цитиколин в комплексе ранней реабилитации больных ишемическим инсультом / Е.А. Петрова, Е.А. Кольцова, В.В. Гудкова [и др.] // Фарматека. - 2017. - № 9. - С. 93-98.
47. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики".
48. Регистр лекарственных средств России. РЛС. Энциклопедия лекарств: справ. // М.: РЛС-МЕДИА. - 2010. - Вып.18. - 1296 с.
49. Регистр лекарственных средств России. РЛС. Энциклопедия лекарств: справ. // М.: РЛС-МЕДИА. - 2017. - Вып.26. - 1384 с.
50. Решение Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г.
51. Румянцева, С.А. Медицинские и организационные проблемы до- и постинсультной инвалидизации / С.А. Румянцева, Е.В. Силина, С.П. Свищева и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2013. - Т. 113. - № 9-2. - С. 43-49.
52. Рябченко, А.Ю. Клинико-патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции у больных с ишемическим инсультом на фоне гипертонической

болезни: дис. ... канд. мед. наук 14.01.11 / Рябченко Александр Юрьевич - М., 2014. - 106 с.

53. Савина, М.А. Исследование факторов риска постинсультных депрессий в когорте пациентов, перенесших первый церебральный инсульт, с помощью логистического регрессионного анализа / А.Н. Симонов, Е.А. Петрова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2019. - № 10. - С. 103-107.

54. Саенко, А.В. Влияние натриевой соли 3-(2-оксо-3-фенил-2h-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)пропановой кислоты на морфологическую картину сердца крыс на фоне гипокинезии / А.В. Саенко, Г.И. Степанюк, Н.В. Заичко // Морфология. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 45-49.

55. Самотруева, М.А. Синтез и иммуотропная активность карбонильных производных хиназолин-4(3H)-она / М.А. Самотруева, А.А. Цибизова, А.А. Озеров и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2016. - Т. 50. - № 6. - С. 12-14.

56. Саттарова, О.Е. Синтез и антимикробная активность 1,2-диарил- и 2,3-диарил (2-арил-3-N-ариламино)-1,2,3,4-тетрагидрохиназолинонов / О.Е. Саттарова, О.Л. Визгунова, Э.В. Воронина // Хим.-фармац. журн. - 2006. - Т. 40, № 2. - С. 15-16.

57. Семененко, Н. А. Сравнительная оценка лечебного действия соединения DSK-38 и цитиколина в условиях хронической экспериментальной ишемии головного мозга / Н. А. Семененко, Г. И. Степанюк, А. И. Семененко // Одесский медицинский журнал. - 2014. - №1 (141). - С. 31-34.

58. Соснов, А.В. Развитие комплексной фармакотерапии сильной и средней боли. Часть I. Мультицелевое комбинирование опиоидов и ненаркотических анальгетиков центрального действия / А.В. Соснов, Ф.М. Семченко, М.И. Власов и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №2(19). – С.176-187.

59. Спасов, А.А. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте / А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, НА. Гурова [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. - 2014. - № 4. - С. 39-45.

60. Стаховская, Л.В. Инсульт. Руководство для врачей. / Под ред. Л.В. Стаховской, С.В. Котова // М.: Медицинское информационное агентство. - 2014. – 400 с.
61. Степанюк, Г.И. Динамика физической выносливости в условиях гипоксии под влиянием 4-[4-оксо- (3Н)-хиназолин]бензойной кислоты в сравнении с бемитилом / Г.И. Степанюк, О.И. Альчук // Фармакол. лекарств. токсикология. - 2010. - Т. 14/15. - № 1/2. - С. 70-74.
62. Тюренков, И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71, №1. – С.49-51.
63. Тюренков, И.Н. Ноотропная активность амидов хиназолинового ряда / Тюренков И.Н., Озеров А.А., Шматова Е.Н. и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2015. - Т. 49. - № 2. - С. 18-20.
64. Тюренков, И.Н. Сравнительная церебропротекторная активность магния оксибутирата, магния сульфата и кавинтона при их профилактическом введении на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс / И.Н. Тюренков, А.А. Литвинов, Е.В. Волотова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. - Т.79, №3. - С. 3-8.
65. Цейтлин, А.М. Ишемическое прекондиционирование мозга / А.М. Цейтлин, А.Ю. Лубнин, В.Л. Зельман, Ш.Ш. Элиава // Патология кровообращения и кардиохирургия. - 2010. - № 3. - С. 14-22.
66. Чичёва, М.М. Разработка нейропротекторных соединений с мультитаргетным механизмом действия на основе гамма-карболинов / М.М. Чичёва, Е.В. Бовина, Е.В. Брновицкий и др. // Russian Scientist // 2017. - №1. – С.31-46.
67. Шабельник, К.П. Синтез, физико-химические и биологические свойства амидов (4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)алкил (арил)карбоновых кислот. Сообщение 4 / К.П. Шабельник, С.И. Коваленко // Фармац. журн. - 2007. - № 2. - С. 64-68.

68. Akinsanya, A. Prazosin in Children and Adolescents With Posttraumatic Stress Disorder Who Have Nightmares: A Systematic Review / A. Akinsanya, R. Marwaha, R.R. Tampi // *J Clin Psychopharmacol.* – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 84-88.
69. Alagarsamy, V. Synthesis, analgesic, anti-inflammatory and antibacterial activities of some novel 2-phenyl-3-substituted quinazolin-4 (3H)-ones / V. Alagarsamy, V.R. Salomon, G. Vanikavitha, [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* - 2002. - Vol. 25, № 11. - P. 1432-1435.
70. Alberti, P Management of side effects in the personalized medicine era: chemotherapy-induced peripheral neuropathy / P. Alberti, G. Cavaletti // *Methods in Molecular Biology.* – 2014. - №117. – P.21-22.
71. Al-Salahi, R. Screening and evaluation of antioxidant activity of some 1,2,4-triazolo[1,5-a]quinazoline derivatives / R. Al-Salahi, E.H. Anouar, M. Marzouk [et. al.] // *Future Med Chem.* – 2018. - №10(4). – P.379-390.
72. Antonello, A. Design, synthesis and biological evaluation of prazosine-related derivatives as multipotent compounds / A. Antonello. P. Hrelia, A. Leonardi [et al.] // *J. Med. Chem.* - 2005. - Vol. 48, № 1. - P. 28-31.
73. Arvanitakis, Z. Diagnosis and Management of Dementia: Review / Z. Arvanitakis, R.C. Shah, D.A. Bennett // *JAMA.* – 2019. - №22. – P.1589-1599.
74. Belenichev, I. Synthesis of the new 2-(3,4-dihydro-3-oxo-2h-[1,2,4]triazino[4,3-c]quinazolin-4-yl) acetic acid derivatives and analysis of their antioxidant activity in nitrosative stress models / I. Belenichev, N. Gorchakova, A. Puzyrenko [et. al.] // *Georgian Med News.* – 2018. - №8. –P. 173-178.
75. Bellera, C.L. Quantitative structure-activity relationship models for compounds with anticonvulsant activity / C.L. Bellera, A. Talevi // *Expert Opinion on Drug Discovery.* – 2019. - №14(7). P.653-665.
76. Birgegård, G. The Use of Anagrelide in Myeloproliferative Neoplasms, with Focus on Essential Thrombocythemia / G. Birgegård // *Curr Hematol Malig Rep.* – 2016. – Vol. 11, № 5. – P. 348-355.

77. Bohlen, M. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination / M. Bohlen [et al] // *J. Neurosci. Methods.* - 2009. - Vol. 178, № 1. - P. 10-14.
78. Bouet, V. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice / V. Bouet, M. Boulouard, J. Toutain [et al.] // *Nat Protoc.* – 2009. - №4(10). – P.1560-1564.
79. Brait, V.H. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide [Text] / V.H. Brait [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2010. - Vol. 30, № 7. - P. 1306-1317.
80. Cai, R. New 4-N-phenylaminoquinoline derivatives as antioxidant, metal chelating and cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease / R. Cai, L.N. Wang, J.J. Fan // *Bioorg Chem.* - 2019. - №93. – P.103328.
81. Carta, F. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005 - 2013) / F. Carta, C.T. Supuran // *Expert Opin Ther Pat.* – 2013. – Vol. 23, № 6. – P. 681-691.
82. Chaudhari, P.S. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-(4-acetyl-3-methyl- 5-(arylamino) thiophen-2-yl)-3-arylquinazolin-4(3H)-one Derivatives as Potential Anti-inflammatory and Antioxidant Agents P.S. Chaudhari, S.S. Chitlange, R.K. Nanda // *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* – 2018. - №17(2). P.102-114.
83. Cheng, W. Design, synthesis and biological evaluation of 6-(nitroimidazole-1H-alkyloxy)-4-anilinoquinazolines as efficient EGFR inhibitors exerting cytotoxic effects both under normoxia and hypoxia / W. Cheng, S. Zhu, X. Ma [et. al.] // *Eur J Med Chem.* – 2015. - №7. – P.826-834.
84. Cheng, W. Identification of novel 4-anilinoquinazoline derivatives as potent EGFR inhibitors both under normoxia and hypoxia / W. Cheng, Y. Yuan, N. Qiu [et. al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2014. - №22(24). P. 6796-6805.
85. Chien, T.C. Nucleosides XI. Synthesis and antiviral evaluation of 5'-alkylthio-5'-deoxy quinazolinone nucleoside derivatives as S-adenosyl-L-homocysteine analogs / T.C. Chien, C.S. Chen, F.H. Yu, J.W. Chern // *Chem. Pharm. Bull.* - 2004. - Vol. 52, № 12. - P. 1422-1426.

86. Chouaid, C. Cost-Effectiveness Analysis of Afatinib versus Gefitinib for First-Line Treatment of Advanced EGFR-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancers / C. Chouaid, L. Luciani, K. LeLay [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2017. – Vol. 12, № 10. – P. 1496-1502.
87. Colotta, V. 3-Hydroxy-1H-quinazoline-2,4-dione derivatives as new antagonists at ionotropic glutamate receptors: molecular modeling and pharmacological studies / V. Colotta, O. Lenzi, D. Catarzi [et al.] // *Eur J Med Chem.* - 2012. - Vol. 54. - P. 470-482.
88. Combs, D.J. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol / D.J. Combs, L.G. D'Alecy // *Stroke.* - 1987. - Vol. 18, № 2. - P. 503-511.
89. Corbett, J.W. Expanded-spectrum nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors inhibit clinically relevant mutant variants of human immunodeficiency virus type 1 / J.W. Corbett, S.S. Ko, J.D. Rodgers [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - Vol. 43, № 12. - P. 2893-2897.
90. Creamer, M. Effect of Intrathecal Baclofen on Pain and Quality of Life in Poststroke Spasticity / M. Creamer, G. Cloud, P. Kossmehl [et. al.] // *Stroke.* – 2018. - №49(9). P.2129-2137.
91. de Kinderen, R.J. Side-effects of antiepileptic drugs: the economic burden / R.J. de Kinderen, S.M. Evers, R. Rinkens [et. al.] // *Seizure.* – 2014. - №23(3). – P.184-190.
92. Dinakaran, M. Synthesis, antiviral and cytotoxic activity of 6-bromo-2,3-disubstituted 4 (3H)-quinazolinones / M. Dinakaran, P. Selvam, E. DeClercq, S.K. Sridhar // *Biol. Pharm. Bull.* - 2003. - Vol. 26, № 9. - P. 1278-1282.
93. Ding, P.P. Synthesis and biological evaluation of quinazolin-4(3H)-one derivatives bearing dithiocarbamate side chain at C2-position as potential antitumor agents / P.P. Ding, M. Gao, B.B. Mao [et. al.] // *Eur J Med Chem.* – 2016. - №27. – P. 364-373.
94. El Kayal, W.M. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide / W.M. El Kayal, S.Y. Shtrygol, S.V. Zalevskyi [et. al.] // *Eur J Med Chem.* – 2019. - №15. – P. 134-142.

95. El-Gazzar, Y.I. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of new (1,2,4-triazole or 1,3,4-thiadiazole)-methylthio-derivatives of quinazolin-4(3H)-one as DHFR inhibitors / YI El-Gazzar, HH Georgey, SM El-Messery [et. al.] *Bioorg Chem.* – 2017. - №72. –P. 282-292.
96. El-Messery, S.M. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of some new methoxylated 2-benzylthio-quinazoline-4(3H)-ones as nonclassical antifolates / S.M. El-Messery, G.S. Hassan, M.N. Nagi [et. al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2016. - №1. – P. 4815-4823.
97. El-Sayed, N.N.E. Synthesis and evaluation of anticancer, antiphospholipases, antiproteases, and antimetabolic syndrome activities of some 3H-quinazolin-4-one derivatives. / N.N.E. El-Sayed, N.M. Almanei, A. Ben Bacha, et al. // *J Enzyme Inhib Med Chem.* - 2019. Dec, Vol. 34, №1. - P. 672-683.
98. Escher, C. Prevention of cognitive decline and dementia by treatment of risk factors / C. Escher, F. Jessen // *Nervenarzt.* – 2019. - №90(9). – P.921-925.
99. Feigin, V.L. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study / V.L. Feigin, G.A. Mensah, B. Norrving [et. al.] // *Neuroepidemiology.* – 2015. - №45(3). – P.230-236.
100. Gálvez, J. Design, facile synthesis, and evaluation of novel spiro- and pyrazolo[1,5-c]quinazolines as cholinesterase inhibitors: Molecular docking and MM/GBSA studies / J. Gálvez, S. Polo, B. Insuasty, [et. al.] // *Comput Biol Chem.*– 2018. - №74.– P.218-229.
101. Gavaraskar, K. Therapeutic and cosmetic applications of Evodiamine and its derivatives--A patent review / K. Gavaraskar, S. Dhulap, R.R. Hirwani // *Fitoterapia.* – 2015. – Vol. 106. – P.22-35.
102. Gontijo, V.S. Molecular Hybridization as a Tool in the Design of Multi-Target Directed Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases / V.S. Gontijo, FPD. Viegas, CJC. Ortiz // *Current Neuropharmacology.* – 2019. - №21.- P. 10-21.
103. Grupke, S. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: From review to preview / S. Grupke, J. Hall, M. Dobbs [et al.] // *Clinical neurology and neurosurgery.* - 2015. - N 129. - P. 1-9.

104. Haile, P.A. Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 2 (RIP2) Kinase Specific Clinical Candidate, 2-((4-(Benzo[d]thiazol-5-ylamino)-6-(tert-butylsulfonyl)quinazolin-7-yl)oxy)ethyl Dihydrogen Phosphate, for the Treatment of Inflammatory Diseases / P.A. Haile, L.N. Casillas, B.J. Votta [et. al.] // *J Med Chem.* – 2019. - №62(14). P.6482-6494.
105. Hameed, A. Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016). / A. Hameed, M. Al-Rashida, M. Uroos // *Expert Opin Ther Pat.* – 2018. Apr 28, Vol. 4. – P. 281-297.
106. Hammer, H. A Multifaceted GABAA Receptor Modulator: Functional Properties and Mechanism of Action of the Sedative-Hypnotic and Recreational Drug Methaqualone (Quaalude) / H. Hammer, B.M. Bader, C. Ehnert [et al.] // *Mol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 88, № 2. – P. 401-420.
107. Han, X. Synthesis and evaluation of chalcone analogues containing a 4-oxoquinazolin-2-yl group as potential anti-tumor agents. / X. Han, B. Peng, B.B. Xiao // *Eur J Med Chem.* – 2019. Jan 15, Vol. 162. – P. 586-601.
108. Hemalatha, K. Synthetic strategy with representation on mechanistic pathway for the therapeutic applications of dihydroquinazolinones / K. Hemalatha, G. Madhumitha // *Eur J Med Chem.* - 2016. - Vol. 123. - P. 596-630.
109. Herman, J.D. The cytoplasmic prolyl-tRNA synthetase of the malaria parasite is a dual-stage target of febrifugine and its analogs / J.D. Herman, L.R. Pepper, J.F. Cortese [et al.]// *Sci Transl Med.* – 2015. – Vol. 7, № 288. – P. 288ra77.
110. Herraiz, T. Identification, occurrence and activity of quinazoline alkaloids in *Peganum harmala*. / T. Herraiz, H. Guillén, V.J. Arán [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2017. May, Vol. 103. – P.261-269.
111. Hu, J. Synthesis, and biological evaluation of novel quinazoline derivatives as anti-inflammatory agents against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. / J. Hu, Y. Zhang, L. Dong, Z. [et al.] // *Chem Biol Drug Des.* – 2015. Jun. Vol. 85, №6. – P. 672-684.
112. Hua, H. A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris* / H. Hua, M. Cheng, X. Li, Y. Pei // *Chem. Pharm. Bull.* - 2002. - Vol. 50, № 10. - P. 1393-1394.

113. Huang, Y.S. Treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: a review / Y.S. Huang, J.J. Yang, N.Y. Lee [et al.] // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2017. – Vol. 15, № 9. – P. 873-892.
114. Jatav, V. Synthesis and CNS depressant activity of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4 (3H)-ones / V. Jatav, P. Mishra, S. Kashaw, JP. Stables. // *Eur. J. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 43. - P. 135-141.
115. Jyothi Buggana, S. Novel 2,4-disubstituted quinazolines as cytotoxic agents and JAK2 inhibitors: Synthesis, in vitro evaluation and molecular dynamics studies/ S. Jyothi Buggana, M.C. Paturi, H. Perka, et al. // *Comput Biol Chem.* – 2019. Apr, Vol. 79. – P. 110-118.
116. Karaman, M.İ. The use of primary and secondary doxazosin XL (8 mg) in the treatment of benign prostate hyperplasia: Is there a new approach in the event of alpha-blocker failure? / M.İ. Karaman, Z. Sertkaya, O. Koca [et al.] // *Turk J Urol.* – 2014. – Vol. 40, № 1. – P. 35-39.
117. Krapf, M.K. Synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives - A SAR study of novel inhibitors of ABCG2. / M.K. Krapf 1, J. Gallus, A. Spindler [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2019. Jan 1, Vol. 161. – P.506-525.
118. Kreutzberger, A. 2-Guanidino-4 (3H)-quinazolinones with chemotherapeutic activities / Kreutzberger A., Balbach S. // *Pharmazie.* - 1993. - Vol. 48, № 1. - P. 17-20.
119. Kubacka, M. Reversal of cardiac, vascular, and renal dysfunction by non-quinazoline α 1-adrenolytics in DOCA-salt hypertensive rats: a comparison with prazosin, a quinazoline-based α 1-adrenoceptor antagonist. / M. Kubacka, M. Zadrożna, B. Nowak [et al.] // *Hypertens Res.* - 2019 Mar 12.
120. Kuge, Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats / Y. Kuge [et al.] // *Stroke.* - 1995. - Vol.26, №9. - P. 1655-1657.
121. Lee, B.H. Synthesis of 2-substituted 3,4-dihydroquinazoline derivatives via regioselective addition of a carbon nucleophile to carbodiimide / B.H. Lee, B.Y. Chung, J.Y. Lee, Y.S. Lee // *Heterocycles.* - 2004. - Vol. 63, № 1. - P. 95-105.
122. Lee, S.H. Progress in the Studies on Rutaecarpine / Lee S.H., J.K. Son, B.S. Jeong [et al.] // *Molecules.* - 2008. - Vol. 13, № 2. - P. 272-300.

123. Lees, K. R. Does neuroprotection improve stroke outcome? / K.R. Lees // *The Lancet*. - 1998. - Vol. 351, № 9114. - P. 1447-1448.
124. Li, Y. The association between anti-tumor potency and structure-activity of protein-kinases inhibitors based on quinazoline molecular skeleton. / Li Y., Xiao J., Zhang Q. [et al.] // *Bioorg Med Chem*. – 2019. Feb 1, Vol. 27. – P. 568-577.
125. Long, S. Synthesis of new proteomimetic quinazolinone alkaloids and evaluation of their neuroprotective and antitumor effects. / S. Long, D.I.S.P. Resende, A. Kijjoa [et al.] // *Molecules*. – 2019. Feb 1, Vol. 24, №3. – P. E534.
126. Markosyan, A.I. Synthesis and antitumor and antibacterial activity of novel dihydronaphthaline and dihydrobenzo[h]quinazoline derivatives / A.I. Markosyan, K.K. Airapetyan, S.A. Gabrielyan [et. al.] // *Pharmaceutical chemistry journal*. – 2019. - №1. – T. 53. – C. 15-22.
127. McLaughlin, N.P. The chemistry and biology of febrifugine and halofuginone / N.P. McLaughlin, P. Evans, M. Pines // *Bioorg Med Chem*. – 2014. – Vol. 22, № 7. – P. 1993-2004.
128. Meyer, E.A. De novo design, synthesis, and in vitro evaluation of inhibitors for procariotic tRNA-guanine transglycosylase: a dramatic sulfur effect on binding affinity / E.A. Meyer, R. Brenk, R.K. Castellano, M. Furler [et al.] // *Chem. Bio. Chem.* - 2002, № 02-03. - P. 250-253.
129. Mohamed, T. 2,4-Disubstituted quinazolines as amyloid- β aggregation inhibitors with dual cholinesterase inhibition and antioxidant properties: Development and structure-activity relationship (SAR) studies. / T. Mohamed, P.P.N. Rao // *Eur J Med Chem*. – 2017. Jan 27. Vol. 126. P. 823-843.
130. Moussa, G. Novel click modifiable thioquinazolinones as anti-inflammatory agents: Design, synthesis, biological evaluation and docking study / G. Moussa, R. Alaaeddine, L.M. Alaaeddine [et al.] // *Eur J Med Chem*. – 2018. Jan 20, Vol. 144. – P. 635-650.
131. Mujeeb, Ur Rahman Synthesis and characterization of quinazoline derivatives: search for hybrid molecule as diuretic and antihypertensive agents / Ur Rahman. Mujeeb,

A. Rathore, A.A. Siddiqui [et. al.] // *J Enzyme Inhib Med Chem.* – 2014. - №29(5). – P. 733-743.

132. Nag, N. A Narrative Review of Lifestyle Factors Associated with Parkinson's Disease Risk and Progression / N. Nag, G.A. Jelinek // *Neurodegenerative Diseases.* – 2019. - №5. – P.1-9.

133. Nerkar, A.G. In silico design, synthesis and pharmacological screening of novel mono and di-bromo quazolinone derivatives as NMDA receptor antagonists for anticonvulsant activity / A.G. Nerkar, P.P. Joshi, S. Mohite [et al.] // *Int. J. Pharm. Sci.* - 2013. - Vol. 5, № 1. - P. 331-335.

134. Nerkar, A.G. In silico screening, synthesis and pharmacological evaluation of novel quinazolinones as NMDA receptor inhibitors for anticonvulsant activity / A.G. Nerkar, P.P. Joshi, S. Mohite [et al.] // *Int. J. Pharm. Sci.* - 2012. - Vol. 4, № 3. - P. 449-453.

135. Pathak, S.R. Synthesis and antihypertensive activity of novel quinazolin-4(3H)-one derivatives / S.R. Pathak, V. Malhotra, R. Nath [et. al.] // *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* – 2014. - №14(1). – P.34-38.

136. Petrides, P.E. Anagrelide: what was new in 2004 and 2005 / Petrides P.E. // *Semin. Thromb. Hemost.* - 2006. - Vol. 32. - P. 399-408.

137. Pinheiro, L.C. Using health-related quality of life to predict cardiovascular disease events / L.C. Pinheiro, E. Reshetnyak, M.R. Sterling [et. al.] // *Quality of Life Research.* – 2019. - №28(6). P.1465-1475.

138. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment / R.D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // *Nature.* - 1977.- Vol. 266, №6504.-P. 730-732.

139. Poudapally, S. Synthesis and biological evaluation of novel quinazoline-sulfonamides as anti-cancer agents. / S. Poudapally, S. Battu, L.R. Velatooru [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2017. May 1, Vol. 27, №9. – P. 1923-1928.

140. Redondo, M. Neuroprotective efficacy of quinazoline type phosphodiesterase 7 inhibitors in cellular cultures and experimental stroke model / M. Redondo, J.G. Zarruk, P. Ceballos // *Eur J Med Chem.* - 2012. - Vol. 47, № 1. - P. 175-185.

141. Roepke, S. Doxazosin, an α -1-adrenergic-receptor Antagonist, for Nightmares in Patients with Posttraumatic Stress Disorder and/or Borderline Personality Disorder: a Chart Review / S. Roepke, H. Danker-Hopfe, D. Repantis [et al.] // *Pharmacopsychiatry*. – 2017. – Vol. 50, № 1. – P. 26-31.
142. Rotella, D.P. N-3-Substituted imidazoquinazolinones: potent and selective PDE5 inhibitors as potential agents for treatment of erectile dysfunction / D.P. Rotella, Z. Sun, Y. Zhu [et al.] // *J. Med. Chem.* - 2000. - Vol. 43, № 7. - P. 1257-1263.
143. Sadek, B. The dual-acting AChE inhibitor and H3 receptor antagonist UW-MD-72 reverses amnesia induced by scopolamine or dizocilpine in passive avoidance paradigm in rats / B. Sadek, N. Khan, F.H. Darras [et. al.] // *Physiology & Behavior*. – 2016. - №15. – P.383-91.
144. Samorodskaya, I.V. Trends in stroke mortality rates in Russia and the USA over a 15-year period / I.V. Samorodskaya, O.V. Zayratyants, V.I. Perkhov [et. al.] // *Arkhiv Patologii*. - 2018. - №80(2). P.30-37.
145. Saravanan, G. Design, graph theoretical analysis, density functionality theories, Insilico modeling, synthesis, characterization and biological activities of novel thiazole fused quinazolinone derivatives / G. Saravanan, T. Panneerselvam, V. Alagarsamy [et. al.] // *Drug Dev Res*. – 2018. - №79(6). P. 260-274.
146. Sarfraz, M., Synthesis, biological evaluation and docking studies of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives as inhibitors of cholinesterases / M. Sarfraz, N. Sultana, U. Rashid [et. al.] // *Bioorg Chem*. – 2017. - №70. – P. 237-244.
147. Saver, J.L. Prehospital Use of Magnesium Sulfate as Neuroprotection in Acute Stroke / J.L. Saver, S. Starkman, M. Eckstein, [et al.] // *The New England journal of medicine*. - 2015. - Vol. 372, № 6. - P. 528-536.
148. Sen, Li. Vasodilation and hypotension of a novel 3-benzylquinazolin- 4(3H)-one derivative via the inhibition of calcium flux / Li. Sen, S.J. Zuo, L. Cao [et. al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2016. - №15. – P. 741-750.
149. Sivaguru, P. Antioxidant, anticancer and electrochemical redox properties of new bis(2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one) derivatives / P. Sivaguru, K., A. Lalitha // *Mol Divers*. – 2017. - №21(3). – P. 611-620.

150. Smith, H.O. Trimetrexate in the treatment of recurrent or advanced leiomyosarcoma of the uterus: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group / H.O. Smith, J.A. Blessing, L. Vaccarello // *Gynecol. Oncol.* - 2002. - Vol. 84, № 1. - P. 140-144.
151. Somer, F. Original 2-alkylamino-6-halogenoquinazolin-4 (3H)-ones and K (ATP) channel activity / F. Somer // *J. Med. Chem.* - 2001. - Vol. 44, № 16. - P. 2575-2585.
152. Speck-Planche, A. Multi-target drug discovery in medicinal chemistry: current status and future perspectives / A. Speck-Planche, M.N. Cordeiro // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* – 2015. - №15(8). – P. 606-607.
153. Tazarki, H. New pyrido[3,4-g]quinazoline derivatives as CLK1 and DYRK1A inhibitors: synthesis, biological evaluation and binding mode analysis. / H. Tazarki, W. Zeinyeh, Y.J. Esvan, S. Knapp, et al. // *Eur J Med Chem.* – 2019. Mar, 15. Vol. 166. – P. 304-317.
154. Tobe, M. Structure-activity relationships of 6-nitroquinazolines: dual-acting compounds with inhibitory activities toward both TNF-alpha production and T cell proliferation / M. Tobe, Y. Isobe, H. Tomizawa [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* - 2002. - Vol. 50, № 8. - P. 1073-1080.
155. Vijaychand, A. Medicinal and biological significance of quinazoline: a highly important scaffold for drug discovery: a review / Vijaychand A. // *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* - 2011. - Vol. 2, № 1. - P. 780-809.
156. Vizgunova, O.L. Study in the series of 4-quinazolinones. XVII. Synthesis and biological activity of 1,2-disubstituted 4-quinazolinones / Vizgunova O.L. // *Pharm. Chem. J.* - 1987. - Vol. 20, № 9. - P. 614-617.
157. Wang, T. Advancement of multi-target drug discoveries and promising applications in the field of Alzheimer's disease / T. Wang, X.H. Liu, J. Guan [et. al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry.* - 2019. - №1. – P. 200-223.
158. Wanleenuwat, P. Alzheimer's dementia: pathogenesis and impact of cardiovascular risk factors on cognitive decline / P. Wanleenuwat, P. Iwanowski, W. Kozubski // *Postgraduate Medicine.* – 2019. - №131(7). – P. 415-422.

159. Wei, D. Synthesis and anti-tumor activity of [1,4] dioxino [2,3-f] quinazoline derivatives as dual inhibitors of c-Met and VEGFR-2 / D. Wei, H. Fan, K. Zheng, X. Qin et al. // *Bioorg Chem.* – 2019. Vol. 88. – P. 102916.
160. Wolak, T. Doxazosin to treat hypertension: it's time to take it personally--a retrospective analysis of 19,495 patients / T. Wolak, R. Toledano, V. Novack [et al.] // *J Hypertens.* – 2014. – Vol. 32, № 5. – P. 1132-1137.
161. Wolfe, J.F. Synthesis and anticonvulsant activity of some new 2-substituted 3-aryl-4 (3H)-quinazolinones / J.F. Wolfe, T.I. Rathman, M.C. Sleevi // *J. Med. Chem.* - 1990. - Vol. 33. - P. 161-166.
162. Writer, B.W. Prazosin for military combat-related PTSD nightmares: a critical review / B.W. Writer, E.G. Meyer, J.E. Schillerstrom // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 24-33.
163. Wu, K.J. A novel CXCR4 antagonist CX549 induces neuroprotection in stroke brain. / K.J. Wu, S.J. Yu, K.S. Shia [et al.] // *Cell Transplant.* – 2017. Apr 13, Vol. 26, №4. – P. 571-583.
164. Wu, Y. Optimization of combinations of ginsenoside-Rg1, ginsenoside-Rb1, evodiamine and rutaecarpine for effective therapy of mouse migraine / Y. Wu, X. Pan, Y. Xu [et al.] // *J Nat Med.* – 2016. – Vol. 70, № 2. – P. 207-216.
165. Xie, N. A selective inhibitor of Drp1, mdivi-1, protects against cell death of hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures in rats / N. Xie, C. Wang, Y. Lian [et al.] // *Neurosci Lett.* - 2013. - Vol. 545. - P. 64-68.
166. Zhang, H.J. Synthesis and Anticonvulsant Activity Evaluation of 4-Phenyl-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinazolin-5(4H)-one and Its Derivatives / H.J. Zhang, P. Jin, S.B. Wang [et. al.] // *Arch Pharm (Weinheim).* – 2015. - №348(8). - P. 564-574.
167. Zhang, H.J. Synthesis and antidepressant activities of 4-(substituted-phenyl)tetrazolo[1,5-a]quinazolin-5(4H)-ones and their derivatives / H.J. Zhang, S.B. Wang, Z.S. Quan // *Mol Divers.* – 2015. - №19(4). – P. 817-828.
168. Zhang, K. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 4-Methyl Quinazoline Derivatives as Anticancer Agents Simultaneously Targeting Phosphoinositide 3-Kinases

and Histone Deacetylases / K. Zhang, F. Lai, S. Lin et al. // *J Med Chem.* – 2019. - Vol. 62. №15. - P. 6992-7014.

169. Zhang, L. A newly designed intensive caregiver education program reduces cognitive impairment, anxiety, and depression in patients with acute ischemic stroke / L. Zhang, T. Zhang, Y. Sun // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* – 2019. - №52(9). – P.8533.

170. Zuo, S.J. Discovery of novel 3-benzylquinazolin-4(3H)-ones as potent vasodilative agents / S.J. Zuo, S. Li, R.H. Yu [et. al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2014. - №15. – P. 5597-5601.