

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

На правах рукописи

Султанова Кира Тимуровна

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО
СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИГРЕНИ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Спасов Александр Алексеевич

Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:

Яковлев Дмитрий Сергеевич

доктор медицинских наук, доцент

Волгоград – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПОТЕНЦИАЛ 5-НТ_{2A}-АНТАГОНИСТОВ В ТЕРАПИИ МИГРЕНИ И СОПУТСВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 Нейромедиаторные аспекты патогенеза мигрени	14
1.2 Противомигренозный потенциал 5-НТ _{2A} -антагонистов	18
1.3 Анальгетическая и противовоспалительная активность 5-НТ _{2A} -антагонистов	20
1.4 Психотропный потенциал 5-НТ _{2A} -антагонистов	26
1.5 Влияние 5-НТ ₂ -антагонистов на реологию и коагуляцию	28
1.6 Фармакологический профиль 5-НТ _{2A} -антагониста соединения РУ-31	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1 Регулирующие документы	32
2.2 Реактивы и вещества	32
2.3 Оборудование и программное обеспечение.....	33
2.4 Экспериментальные животные.....	34
2.5 Методы исследования специфического фармакологического действия	34
2.5.1 Исследование влияния на цереброваскулярный кровоток	34
2.5.2 Методы исследования противовоспалительных и анальгетических свойств	35
2.6 Методы исследования психотропных свойств	36
2.6.1 Исследование анксиолитической активности.....	36
2.6.2 Исследование антидепрессивного действия	37
2.7 Методы исследования реологических и антикоагуляционных свойств	38
2.7.1 Исследование гемореологической активности <i>in vitro</i>	38
2.7.2 Исследование гемореологических эффектов <i>in vivo</i>	38
2.7.3 Исследование антикоагуляционного действия <i>in vivo</i>	39
2.8 Методы изучения влияния соединения РУ-31 на передачу внутриклеточных и внеклеточных сигналов	40

2.8.1 Исследование 5-НТ _{2А} -антагонистического действия <i>in vitro</i>	40
2.8.2 Исследование взаимодействия с нейромедиаторными системами	41
2.8.3 Исследование ингибирования циклооксигеназы.....	43
2.9 Методы изучения токсикологических свойств.....	43
2.9.1 Исследование цитотоксического действия	43
2.9.2 Исследование нейротоксикологической активности	44
2.9.3 Исследование острой токсичности	44
2.10 Методы статистической обработки	45
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, АССОЦИИРУЕМЫЕ С РАЗВИТИЕМ МИГРЕНОЗНОГО ПРИСТУПА	46
3.1 Сосудистое действие в условиях ишемии.....	46
3.2 Анальгетическая активность	48
3.2.1 Анальгетическая активность в орофациальном формалиновом тесте	49
3.2.2 Анальгетическое действие в орофациальном формалиновом тесте с нитроглицериновой нагрузкой	51
3.3 Противовоспалительное действие	53
3.4 Заключение	55
ГЛАВА 4. ПСИХОТРОПНЫЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31.....	57
4.1 Анксиолитические свойства	58
4.1.1 Исследование анксиолитической активности соединения РУ-31 и ципрогептадина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»	58
4.1.2 Исследование анксиолитического действия соединения РУ-31 в тесте «Наказуемого взятия воды» по Vogel.....	61
3.2 Антидепрессивные эффекты.....	62
4.3 Заключение	64

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КОАГУЛЯЦИЮ КРОВИ 65

5.1 Гемореологическая активность <i>in vitro</i>	65
5.1.1 Влияние соединения РУ-31 на вязкостные характеристики крови кроликов при моделировании «синдрома повышенной вязкости»	66
5.1.2 Влияние соединения РУ-31 на параметры агрегации эритроцитов кроликов в аутологичной плазме при моделировании «синдрома повышенной вязкости».....	68
5.1.3 Влияние соединения РУ-31 на деформируемость отмытых эритроцитов кроликов при моделировании «синдрома повышенной вязкости»	69
5.2 Гемореологические эффекты <i>in vivo</i>	72
5.2.1 Влияние соединения РУ-31 на вязкостные характеристики крови крыс	72
5.2.2 Влияние соединения РУ-31 на параметры агрегации эритроцитов крыс в аутологичной плазме	73
5.2.3 Влияние соединения РУ-31 на деформируемость отмытых эритроцитов крыс	74
5.3 Антикоагуляционное действие.....	74
5.4 Заключение	77

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ 5-НТ_{2A}-АНТАГОНИСТА СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ПЕРЕДАЧУ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ..... 78

6.1 5-НТ _{2A} -антагонистическое действие, блокирующее пострецепторный β -аррестинный каскад	79
6.2 Влияние на активность циклооксигеназы 1 и 2	81
6.3 Взаимодействие с нейромедиаторными системами <i>in vivo</i>	84
6.3.1. Серотонинергическая система мозга	84
6.3.2. ГАМК-ергическая система мозга	85
6.3.3. М-холинергическая система мозга.....	87
6.3.4. Дофаминергическая система мозга.....	88
6.4 Заключение	91

ГЛАВА 7. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31	93
7.1 Цитотоксическое действие.....	93
7.2 Нейротоксикологические свойства	95
7.3.1 Острая токсичность при внутрижелудочном пути введения у мышей	105
7.3.2 Острая токсичность при внутрижелудочном пути введения у крыс	106
7.3.3 Острая токсичность при внутривенном пути введения у мышей.....	108
7.3.4 Острая токсичность при внутривенном пути введения у крыс.....	108
7.4 Заключение	109
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	111
ВЫВОДЫ.....	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Мигрень является сложным и распространенным заболеванием, в патогенез которого вовлечены сосудистые, тригеминальные и нейротропные механизмы, в их инициации серотониновый компонент и 5-НТ_{2A}-рецепторы играют важную роль (Садоха К.А., 2020; Шумкин М.В., 2020).

Многие антагонисты 5-НТ₂-рецепторов, такие как эрготамины, ципрогептадин, пизотифен, метисергид, способны оказывать сосудорасширяющий, антиагрегантный эффекты, уменьшать чувствительность нейронов тройничного нерва, проницаемость сосудов твердой мозговой оболочки и предупреждать нейрогенное воспаление, оказывая тем самым противомигренозный эффект как в острый период, так и на превентивном этапе (Амелин А.В., 2011).

Однако существующие препараты лечения и профилактики мигрени имеют множество нежелательных побочных реакций, что существенно ограничивает, а в некоторых случаях и исключает их использование. Кроме того, одной из главных проблем превентивной фармакотерапии является тот факт, что большинство из применяемых в настоящее время препаратов не создавалось специально для терапии данной патологии и существующие средства превентивной терапии обладают недостаточной эффективностью и не всегда удовлетворительной переносимостью (Петров В.И. и др., 2015; Табеева Г.Р., Кацарава З., 2020).

Сложные патофизиологические механизмы последовательной активации определенных стволовых, таламических, гипоталамических и кортикальных структур опосредуют инициацию и течение мигрени. При воздействии эндогенных и экзогенных мигренозных триггеров усиливается возбудимость коры, надсегментарных образований и ствола головного мозга, происходит активация ТВС, что сопровождается выбросом из тригеминоvasкулярных окончаний болевых провоспалительных молекул, в том числе и серотонина (Нурхаметова Д.Ф. и др., 2019).

Последние достижения в понимании патофизиологии мигрени позволили разработать новые фармакотерапевтические подходы, специально направленные на

различные сосудистые и нейрональные механизмы (Мирзоян Р.С. и др., 2006; Соколов А.Ю. и др., 2017; Мирзоян Р.С. и др., 2019).

В связи с этим одним из актуальных направлений современной фармакологии является разработка новых высокоэффективных антимигренозных лекарственных препаратов (Петров В.И. и др., 2012), а 5-НТ_{2A}-блокаторы, обладающие значительным противомигренозным потенциалом, перспективны в качестве новых селективных препаратов для лечения и профилактики мигрени (Филатова Е.Г. и др., 2020).

Степень разработанности

На сегодняшний день доказано вовлечение 5-НТ_{2A}-рецепторов в патогенез мигренозных атак и подтверждена эффективность использования антисеротониновых препаратов для лечения и профилактики данной патологии (Азимова Ю.Э., Осипова В.В., 2011; Соколов А.Ю., Любашина О.А., Пантелеев С.С., 2011; Yücel Y. et al., 2016). Так, алкалоиды спорыньи, пизотифен, ципрогептадин, метисергид способны оказывать сосудорасширяющее действие, проявляя тем самым противомигренозный эффект как в острый период, так и на превентивном этапе. Однако, применение данных препаратов имеет ряд ограничений. Алкалоиды спорыньи при длительном использовании вызывают снижение артериального давления, тахикардию, тошноту. Ципрогептадин и пизотифен вызывают сонливость, вялость, повышение аппетита. Метисергид способен вызывать ретроперитонеальный, плевральный, эндокардиальный фиброз (Ганьшина Т.С., 2003; Азимова Ю.Э., Рачин А.П., 2016; Полухина Е.В., Глазун Л.О., 2016).

Высокоэффективными препаратами из группы серотонинергических средств являются «триптаны», которые воздействуют на 5-НТ₂-рецепторы мозговых сосудов и предотвращают выделение субстанции P из окончаний тройничного нерва и развитие нейrogenного воспаления. Однако использование последних не допускается при лечении базилярной и гемиплегической мигрени (Шалькевич Л.В., Жевнеронок И.В., 2018). Еще одним препаратом из данной группы средств является тропоксин, устраняющий констрикцию мозговых сосудов, угнетающий нейрональные ответы на 5-гидрокситриптамиин и оказывающий антиагрегантное действие, таким образом, проявляя высокую эффективность в межприступном лечении мигрени (Мирзоян Р.С. и др., 2006; Ганьшина Т.С. и др., 2016).

В результате ряда исследований выделен класс бензимидазолов, обладающих антисеротониновыми и антимигренозными свойствами (Черников М.В., Васильев П.М., Спасов А.А., 2019; Яковлев Д.С., 2016), для которого дополнительно показано анксиолитическое (Воронина Т.А., Середенин С.Б., 2002; Яковлев Д.С., Спасов А.А., Анисимова В.А., 2010), анальгетическое (Гречко О.Ю. и др., 2016; Nguema Ongone T. et al., 2019), антидепрессивное (Albott C.S. et al., 2017), противосудорожное (Калитин К.Ю. и др., 2017; Turan N. et al., 2019) действия.

Для различных солей 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола (Патент РФ № 2465901) был показан высокий уровень 5-НТ_{2А}-антагонистической активности (Мальцев Д.В., 2014; Яковлев Д.С., 2016) и выявлено соединение РУ-476, демонстрирующее высокое 5-НТ_{2А}-блокирующее действие, однако подверженное фотодеградации. В дальнейшем были синтезированы и изучены неорганические дигидрохлоридная и дигидробромидная солевые формы 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола. В ходе данных исследований наибольший уровень антисеротониновой активности был показан для дигидрохлорида 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – соединения РУ-31 (Агацарская Я.В., 2019), а также выявлены его способность устранять сосудистые спазмы (рассчитана средняя эффективная доза – 10 мг/кг) и обезболивающее действие, что делает данное вещество перспективным в качестве кандидата в ходе создания нового средства терапии мигрени и требует расширенных изучений его фармакологических и токсикологических свойств.

Целью исследования является изучение противомигренозных свойств, углубленное изучение фармакологических механизмов действия, а также токсичности соединения РУ-31.

Для решения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать противомигренозные и анальгетические свойства соединения РУ-31 на экспериментальных моделях, отражающих мигренозную патологию.
2. Провести изучение противовоспалительной активности соединения РУ-31.
3. Определить психотропный потенциал вещества РУ-31.
4. Исследовать влияние соединения РУ-31 на реологические и коагуляционные свойства крови.

5. Провести детализацию аспектов механизма действия изучаемого вещества в широком диапазоне концентраций и доз *in vitro* и *in vivo*.
6. Определить цитотоксичность, нейротоксичность и острую токсичность соединения РУ-31.

Научная новизна

Впервые были получены данные о противомигренозной активности дигидрохлорида 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – соединения РУ-31 – в условиях, отражающих патогенез мигренозной патологии, а именно в условиях длительного нарушения мозгового кровотока. Получены данные о анальгетическом потенциале изучаемого агента в тесте орофациальной формалиновой гипералгезии. Впервые была исследована и выявлена противовоспалительная активность соединения РУ-31, соответствующая по уровню действия препаратам сравнения ципрогептадину и диклофенаку.

Получены данные об анксиолитической и антидепрессивной активности соединения РУ-31 в диапазоне доз 2 – 50 мг/кг, превосходящие действие ципрогептадина и не уступающие диазепаму и имипрамину.

Впервые было изучено влияние на вязкость крови и агрегацию эритроцитов, и отсутствие влияния соединения РУ-31 на основные параметры коагуляционного звена гемостаза.

Показано наличие для вещества РУ-31 дозозависимого 5-НТ_{2A}-антагонистического действия, опосредующего блокаду внутриклеточного пострецепторного β -аррестинного каскада, по уровню эффективности сопоставимого с препаратом сравнения ципрогептадином. Была проведена детализация аспектов выявленного противовоспалительного действия соединения РУ-31. Установлена умеренная ингибирующая активность в отношении ЦОГ-1.

Впервые для соединения РУ-31 *in vivo* была исследована зависимость серотонинергической, ГАМК-миметической, М-холинергической активностей от дозировки.

Получены данные о цитотоксичности соединения РУ-31 на первичных клетках человека и показан существенно более низкий уровень токсичности данного соединения по сравнению с референсным цитостатиком доксорубицином.

Установлено, что для изучаемого соединения в средней эффективной дозе и дозах, превышающих среднюю эффективную в 2 и 5 раз, не характерно влияние на функциональное состояние вегетативной нервной системы, нервно-мышечное возбуждение и поведение животных. Впервые получены данные об острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном путях введения на мышах и крысах обоего пола. Соединение РУ-31 по величине LD₅₀ отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенного исследования были получены новые данные о специфическом фармакологическом действии, механизме его возникновения, а также токсикологических характеристиках нового лекарственного вещества 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – соединения РУ-31. Полученные результаты включены в проект отчета о доклиническом исследовании противомигренозного средства, а также проекты нормативных документов по его разработке в рамках реализации государственного контракта № 14.N08.11.0159 от «02» июня 2017 года по теме «Доклинические исследования противомигренозного лекарственного средства, улучшающего мозговой кровоток с 5-HT₂-антагонистическим действием, производного 2-метоксифенил-имидазобензимидазола».

Методология и методы исследования

Принимая во внимание задачи, поставленные в ходе исследования, выбор методических подходов производился из высокоинформативных и инновационных методов, представленных в ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также на базе ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» и Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ.

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н. и др., 2012), с использованием нелинейных половозрелых мышей, крыс и кроликов породы Шиншилла.

Методология исследования включала использование валидированных методов тестирования активности соединений *in vivo* и *in vitro*. Используются рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов (Сергиенко В.И., Бондарева И.Б., Маевский Е.И., 2012). Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол №2032-2017 от 26 июня 2017 года.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для соединения РУ-31 характерны следующие эффекты: способность устранять серотонинопосредованные спазмы сосудов в условиях длительного нарушения мозгового кровотока; анальгетический в условиях орофациальной формалиновой гипералгезии; способность подавлять серотонининдуцированный отёк; анксиолитический в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Наказуемое взятие воды по Vogel»; антидепрессивный в тесте «Принудительное плавание по Porsolt»; способность снижать вязкость крови и агрегацию эритроцитов.
2. Для соединения РУ-31 показано наличие 5-НТ_{2А}-антагонистического действия в широком диапазоне концентраций и доз *in vitro* и *in vivo*, ГАМК-миметического, М-холиноблокирующего эффектов в широком диапазоне доз, а также способность ингибировать активность ЦОГ-1.
3. Соединение РУ-31 оказывает умеренное цитотоксическое действие, по уровню эффекта сопоставимое с препаратом сравнения ципрогептадином. Для соединения РУ-31 характерно отсутствие влияния на функциональное состояние вегетативной нервной системы, нервно-мышечное возбуждение и поведение животных в средней эффективной дозе 10 мг/кг. Соединение РУ-31 по величине LD₅₀ относится к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методология углублённого изучения потенциальных противомигренозных препаратов включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ; фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ; фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ; кафедре кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ ВолгГМУ; использованы в научно-практической деятельности лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ЮФУ; лаборатории медицинской химии ГБУ ВМНЦ.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2017; 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2018; 70-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных, Республика Беларусь, Витебск, 2018; V Съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств», Ярославль, 2018; VII Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск, 2018; XV Международном Междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии», Москва, 2019; XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2019; 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2019», Екатеринбург, 2019; XXIV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2019; 78-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и

студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2020; I Дальневосточном международном медицинском конгрессе, Хабаровск, 2020; IV Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2020), Екатеринбург 2020; XXV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2020; IX Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск, 2020.

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работы, из них 4 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и токсикологических свойств соединения РУ-31. Автору принадлежит ведущая роль в проведении исследования на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, восьми глав, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 36 таблицами. Библиографический указатель включает 235 источника, из них 51 отечественных, 184 иностранных.

ГЛАВА 1. ПОТЕНЦИАЛ 5-НТ_{2A}-АНТАГОНИСТОВ В ТЕРАПИИ МИГРЕНИ И СОПУТСВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Нейромедиаторные аспекты патогенеза мигрени

Мигрень — это первичная форма головной боли, характеризующаяся повторяющимися приступами интенсивной односторонней цефалгии, а также различным сочетанием неврологических и вегетативных проявлений, её анатомо-физиологическим субстратом является тригемино-васкулярная система, состоящая из экстра- и интракраниальных сосудов, а также периферических и центральных образований тройничного нерва (Haanes K.A., Edvinsson L., 2019; Iyengar S. et al., 2019; Frederiksen S.D. et al., 2019; Sahithi A.S.T., Muthu T., Saraswathy R., 2020; Scelzo E. et al., 2020).

Мигренозная атака возникает на фоне тригемино-васкулярной активации, приводящей к развитию асептического нейрогенного воспаления сосудов мозговых оболочек из-за высвобождения из периферических окончаний тройничных афферентов активных агентов, в том числе серотонина (Messlinger K., Balcziak L.K., Russo A.F., 2020; Avona A. et al., 2020; Clemow D.V. et al. 2020). В патогенезе наблюдается выраженная парасимпатическая активация, что опосредует дилатацию интракраниальных сосудов и повышение их проницаемости с последующим развитием отёка сосудистой стенки (Martinelli D. et al., 2020).

Известно, что у кошек и грызунов нейроны тройничного ганглия проецируются в мозговые оболочки. При этом, аксональные проекции нейронов тройнично-сосудистой системы второго порядка передают болевые сигналы множеству ядер ствола мозга, гипоталамуса, базальных ганглиев и таламуса. Эти проекции способны опосредовать вегетативные (тошнота, рвота, зевота, слезотечение, мочеиспускание), аффективные (беспокойство, раздражительность) и регулируемые гипоталамусом функции, связанные с поддержанием гомеостаза (потеря аппетита, утомляемость). Релейные таламические нейроны, широко выступающие (например, в соматосенсорную, островную, слуховую, зрительную и обонятельную корку), вносят свой вклад в специфический характер мигренозной боли и многие корковые симптомы мигрени. К ним относятся преходящие симптомы аллодинии, фонофобии, фотофобии и осмофобии (Ashina M. et al., 2019).

Кроме того, в патофизиологию мигрени вовлечены различные нейромедиаторные системы (Nosedá R., Vorsook D., Burstein R., 2017). Наиболее значимыми медиаторами в патогенезе мигренозных атак являются серотонин, норадреналин, ацетилхолин, дофамин, гамма-аминомасляная кислота, монооксид азота (Haanes K.A., Edvinsson L., 2019; Chan C., Wei D.Y., Goadsby P.J., 2019).

Серотонинергическая медиаторная система

Серотонин обнаружен в тромбоцитах, телах нейронов, энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта, а также в головном мозге (Smith C. et al., 2020; Jones L.A. et al., 2020). 5-НТ является одним из самых важных нейротрансмиттеров в центральной нервной системе, ассоциированным с патофизиологией многих заболеваний, включая рвоту, синдром раздраженного кишечника, беспокойство, шизофрению, депрессию, гипертонию, мигрень, обсессивно-компульсивные панические расстройства, расстройства пищевого поведения и карциноидную диарею (DeKa S. et al., 2020).

Тригемино-васкулярная система широко снабжена аксонами серотонинергических нейронов, локализованных, прежде всего, в ядрах шва ствола мозга (Vila-Pueyo M., 2018). Дисфункция серотонинергических нейронов, сопровождаемая изменениями уровня эндогенного серотонина в разных областях мозга, вызывает нарушение регуляции болевой чувствительности и тонуса интракраниальных сосудов, что опосредует возникновение мигрени. Стоит отметить, что эффекты действия серотонина напрямую зависят от того, с какими именно из своих рецепторов он взаимодействует (Villalón C.M., 2017). Так, его действие реализуется через различные 5-НТ-рецепторы, которые разделяют на 7 функциональных классов (Sarkar P. et al., 2020; Redelinghuys C., 2020).

Среди серотониновых рецепторов первого класса в патогенез мигрени вовлечены 1B, 1D и 1F подтипы (de Vries T., Villalón C.M., MaassenVanDenBrink A., 2020). 5-НТ_{1B}-рецепторы располагаются на гладкомышечных и эндотелиальных клетках стенки сосудов мозговых оболочек, а их активация опосредует вазоконстрикцию. Рецепторы 5-НТ_{1D} располагаются на центральных и периферических окончаниях чувствительных волокон тройничного нерва. Предполагается, что активация рецепторов 1D подтипа приводит к угнетению высвобождения из периферических окончаний тройничного

нерва медиаторов, что опосредует вазоконстрикцию и уменьшение асептического воспаления сосудов твёрдой мозговой оболочки. Рецепторы 5-HT_{1F} локализованы в спинальном ядре тройничного нерва и опосредуют угнетение проведения болевой чувствительности (Rubio-Beltrán E. et al., 2018; Vila-Pueyo M., 2018).

Активация серотониновых рецепторов второго класса, в отличие от 5-HT₁-рецепторов, инициирует возникновение болевого приступа и потенцирует проведение ноцицептивной информации (Åstrand A. et al., 2020). Рецепторы 5-HT_{2A}-подтипа, локализованные на сенсорных терминалях нервных волокон, опосредуют проноцицептивный эффект серотонина на периферии. Предполагается, что в пределах тригемино-вазкулярного комплекса активация 5-HT_{2A}-рецепторов способствует выделению провоспалительных агентов из первичных афферентов тройничного нерва, а увеличение количества или аффинности этих рецепторов в стволовых структурах и коре может быть одним из механизмов хронизации головной боли (Neugebauer V., 2020; Okumura T. et al., 2020; Costa-Pereira J.T. et al., 2020).

Рецепторы 5-HT_{2B}-подтипа локализованы на мембранах эндотелия, их активация опосредует увеличение проницаемости сосудистой стенки (Messlinger K., Balcziaik L.K., Russo A.F., 2020).

Стимуляция периферических 5-HT₃-рецепторов, экспрессированных на менингеальных ноцицепторах, сопровождается активацией и сенситизацией первичных афферентов (Kilinc E. et al., 2017). Активация 5-HT₇-рецепторов менингеальных сосудов вызывает дилатацию мозговых сосудов (Cinar I. et al., 2020).

Холинергическая медиаторная система

В патофизиологии мигрени традиционно большое внимание отводится роли иннервации тройничного нерва мозговых оболочек, которая, вероятно, представляет собой триггерные зоны для мигренозной боли (May A., Burstein R., 2019; Wang S. et al., 2020). Периферическое первичное афферентное возбуждение сопровождается активацией нейронов тригемино-цервикального комплекса. В отличие от тройничного нерва, о функциональной роли парасимпатической иннервации этих тканей известно значительно меньше. Тем не менее, известно, что менингеальные оболочки иннервируются парасимпатическими нервными волокнами, которые берут начало в клиновидно-нёбных ганглиях (Edvinsson J.C.A. et al., 2020; Koroleva K. et al. 2020).

Основным нейротрансмиттером парасимпатической системы является ацетилхолин, действующий через два типа ацетилхолиновых рецепторов - никотиновые и мускариновые. Терминалы периферического тройничного нерва и его первичные нейроны экспрессируют М-холинорецепторы. Ацетилхолин способен привлекать тучные клетки в генерацию ноцицепции менингеальных сосудов, вероятно, за счёт высвобождения активных веществ, таких как серотонин, и что это действие опосредовано М-холинорецепторами (Mikhailov N. et al., 2017; Koroleva et al., 2020). Данный нейромедиатор, высвобождаемый парасимпатическими волокнами, может активировать ноцицепторы тройничного нерва либо напрямую, воздействуя на нейрональные рецепторы, экспрессируемые в афферентах тройничного нерва, либо опосредованно, посредством дегрануляции тучных клеток через М-холинорецепторы (Mikhailov N. et al., 2020).

Известно, что модуляция клиновидно-нёбного ганглия и, следовательно, модуляция высвобождения ацетилхолина может быть одним из способов облегчения боли при мигрени. Показано, что твердая мозговая оболочка крыс, морских свинок и человека снабжается холинергической иннервацией, и эта иннервация расположена вблизи менингеальной сосудистой сети (Tsutsui T. et al., 2020). Так, карбахол вызывает менингеальное высвобождение гистамина, действуя таким образом на афференты тройничного нерва через дегрануляцию менингеальных тучных клеток и тем самым опосредуя головную боль у лиц с мигренью (Shelukhina I. et al., 2017).

Кроме того, ацетилхолин оказывает прямое воздействие на интракраниальное кровообращение, вызывая через мускариновые холинорецепторы при участии оксида азота сосудорасширяющее действие, тем самым провоцируя приступ мигрени и болевого синдрома. При этом, оксид азота, помимо вазодилатации, оказывает стимулирующее влияние на тригеминальную систему (Terwoord J.D., 2020).

ГАМК-ергическая медиаторная система

Предполагается, что в основе ауры при мигрени лежит корковая распространяющаяся депрессия, инициируемая дисбалансом процессов возбуждения и торможения. Нарушения в системе торможения-возбуждения мозга могут быть опосредованы изменениями уровней гамма-аминомасляной кислоты и глутамата (Chan C., Wei D.Y., Goadsby P.J., 2019; Stærmosе T.G. et al., 2019; Peek A. L. et al., 2020).

ГАМК_A-рецепторы локализованы на окончаниях периферических отростков и телах нейронов Гассерова узла, в ядрах тройничного комплекса, где они располагаются на мембране центральных нейронов. Активация периферических ГАМК_A-рецепторов опосредует уменьшение асептического нейрогенного воспаления сосудов мозговых оболочек. Кроме этого, локализованные ГАМК_A-рецепторы на клетках Гассерова узла играют роль в контроле тройничной ноцицепции, повышая чувствительность первичных афферентов (Miller P.S. et al., 2017). Периферические ГАМК_B-рецепторы опосредуют угнетающее действие γ -аминомасляной кислоты на болевую чувствительность окончаний тройничного нерва (Nowak P. et al., 2013). Активация пресинаптических ГАМК_B-рецепторов препятствует высвобождению возбуждающих нейротрансмиттеров из центральных окончаний первичных афферентов (Yang K., Ma H., 2011).

В экспериментах на животных ГАМК_A- и ГАМК_B-агонисты уменьшали выраженность изменений мозгового кровотока, ассоциируемые с развитием корковой распространяющейся депрессии (Holland P.R., Akerman S., Goadsby P.J, 2010). В экспериментах на крысах применение γ -аминомасляной кислоты индуцировало вхождение ионов хлора в нейроны тройничного нерва. Гамма-аминомасляная кислота, действуя через рецепторы ГАМК_A, подавляет активность нейронов тройничного нерва. Кроме того, у кошек ГАМК ингибирует нейроны второго порядка в тригеминоцервикальном комплексе за счет активации рецептора ГАМК_A. Таким образом, ГАМК способна опосредовать снижение активности тройничного нерва и его ответную реакцию (Kalkman H.O., 2020).

1.2 Противомигренозный потенциал 5-НТ_{2A}-антагонистов

Мигрень является сложным и распространенным заболеванием, однако точная патофизиология до конца не изучена. Известно, что в развитии мигренозных атак задействованы сосудистые, тригеминальные и нейротропные механизмы (Ashina M. et al., 2019), ассоциация которых модулирует центральные и периферические эффекты, реализуемые посредством серотониновых рецепторов. Нервные волокна тройничного ганглия, широко распространяющиеся среди сосудов твердой мозговой оболочки, образуют единую морфофункциональную систему – тригемино-цервикальный комплекс. Предполагается, что активация 5-НТ_{2A}-рецепторов индуцирует выделение провоспалительных факторов, в том числе и серотонина, из первичных афферентных

окончаний тройничного нерва и провоцирует нейрогенное воспаление в сосудах твёрдой мозговой оболочки. Такие индукторы воспаления, интра– экстракраниального происхождения, способны инициировать приступы мигрени. Кроме того, считается, что 5-НТ_{2А}-рецепторы, расположенные на чувствительных окончаниях нервных волокон, опосредуют ноцицептивный эффект серотонина. Таким образом, серотониновый компонент занимает важную роль в инициации и патогенезе мигрени, а 5-НТ_{2А}-антагонисты обладают высоким противомигренозным потенциалом.

Неселективный агонист 2 подтипа серотониновых рецепторов – метаклорфенилпиперазин (mCPP) способен вызывать сужение краниальных сосудов, повышать проницаемость капилляров и агрегацию тромбоцитов, индуцируя приступ мигренозной атаки (Jahangir S. et al., 2020; Cuomo A. et al., 2020; Nikaido T. et al., 2020).

Алкалоиды спорыньи – антагонисты 5-НТ₂-рецепторов – эрготамины способны оказывать сосудорасширяющий, антиагрегантный эффекты, уменьшать чувствительность нейронов тройничного нерва, проницаемость сосудов твердой мозговой оболочки и предупреждать нейрогенное воспаление, оказывая тем самым противомигренозный эффект как в острый период, так и на превентивном этапе (Seriani C.E.J., Wilhour D.A., Silberstein S.D., 2019; Chakraborty S. et al., 2020). Кроме антисеротонинового действия, эрготамины обладают выраженным влиянием на адренергические и дофаминергические рецепторы, вызывая при длительном применении снижение артериального давления, тахикардию, тошноту, что существенно ограничивает их применение (Robblee J.V. et al., 2020).

Ципрогептадин и пизотифен – блокаторы 5-НТ_{2А}-рецепторов – способны предупреждать развитие асептического воспаления в церебральных сосудах и оказывать сосудорасширяющий эффект (Alenazy F.O., Thomas M.R., 2020). Данные препараты эффективны при терапии мигрени у детей и подростков, однако они взаимодействуют с гистаминовыми, ацетилхолиновыми и адреналиновыми рецепторами, что вызывает ряд побочных эффектов (сонливость, вялость, повышение аппетита) и ограничивает их использование (Schellack N. et al., 2017; Armer T.A. et al., 2019; Jacobs E.T. et al., 2020; Murray B. P. et al. 2020; Kurt S. et al., 2020).

Кетансерин – антагонист 5-НТ_{2А}-рецепторов – демонстрирует высокое сродство к адренорецепторам, оказывая выраженную гипотензию, не используется как противомигренозное средство (Hosford P.S., Ramage A.G., 2020).

Другой блокатор серотониновых рецепторов 2А подтипа – метисергид, оказывает сосудорасширяющее действие и эффективен как превентивное средство. Однако длительное использование метисергида способно вызывать ретроперитонеальный, плевральный, эндокардиальный фиброз, что существенно ограничивает его применение (Macedo D.L. et al., 2012 Peres M.F.P., Valença M.M., 2017).

Таким образом, 5-НТ_{2А}-блокаторы характеризуются высоким противомигренозным потенциалом, а создание новых высокоселективных препаратов с подобным механизмом действия является актуальным направлением современной фармакологии.

1.3 Анальгетическая и противовоспалительная активность 5-НТ_{2А}-антагонистов

Механизмы, лежащие в основе цефалгий, полностью не изучены. Мигрень характеризуется повторяющимися приступами головной боли, которые длятся от 4 до 72 часов (Schellack N. et al., 2017; Lionetto L. et al., 2020). Боль, от умеренной до сильной, имеет пульсирующий характер, усиливается при физической нагрузке и часто связана с тошнотой, светобоязнью или фонофобией (Vacca Jr V.M., Thomas S.B., 2020). Во время мигрени ноцицептивная информация от черепных кровеносных сосудов в мягкой, твердой и паутинной оболочке передается через сенсорные волокна Аδ и С-типа. Эти волокна берут начало от ганглия тройничного нерва и выступают в область продолговатого мозга и ствола мозга, обозначенную как тригемино-цервикальный комплекс (Goadsby P.J. et al., 2017). Предполагается, что измененная обработка сенсорной информации в каудальном ядре тройничного нерва является причиной многих временных и симптоматических особенностей мигрени (Messlinger K., Balcziaik L.K., Russo A.F., 2020). Ветви тройничного нерва иннервируют экстракраниальные ткани, и, поскольку обработка информации сенсорными нервами является двунаправленной, центральная активация тройничного нерва заметна на коже головы и шеи (Goadsby P.J. et al., 2017).

Предполагается, что тройничная иннервация мозговых оболочек является местом возникновения мигренозной боли (Ashina et al., 2019). Эта теория подтверждается успешным лечением мигрени, основанным на блокаде периферической иннервации тройничного нерва с помощью активной формы онаботулинутоксина А, который облегчает головную боль и мигрень (Awan, 2017; Burstein R. et al., 2020). Существует ряд различных менингеальных факторов, которые дополнительно подтверждают участие мозговых оболочек в возникновении мигренозной боли. Так, соматические волокна тройничного нерва, парасимпатические нервы из клиновидно-нёбного ганглия, менингеальные кровеносные сосуды и местные тучные клетки способны выделять нейротрансмиттеры, нейропептиды и другие активные вещества, формирующие периферический ноцицептивный сигнал. Примечательно, что большинство этих соединений, таких как ацетилхолин, аденозинтрифосфат, серотонин, кальцитонин-ген-родственный пептид, высвобождаемые в мозговых оболочках из одного типа клеток, могут активировать другие клетки, вызывая последующее высвобождение других активных молекул, в том числе и серотонина, что приводит к каскадному эффекту массивной и устойчивой активации воспаления и ноцицепции в мозговых оболочках (Haanes K.A., Edvinsson L., 2019; Chan Y.M. et al., 2019). Центральная нервная система характеризуется широким распространением 5-НТ_{2А}-рецепторов, в том числе в областях, которые, как известно, участвуют в ноцицептивной обработке. Модуляция поступающей ноцицептивной информации происходит на нескольких уровнях в спинном мозге.

Тройнично-парасимпатический рефлекс (Volay H. et al., 2002), может представлять основу для длительного характера мигренозной боли. Активация нейронов тройничного нерва в мозговых оболочках приводит к активации каудального ядра тройничного нерва в стволе мозга и клиновидно-небного ганглия. Эфференты, происходящие из клиновидно-небного ганглия, высвобождают ацетилхолин в мозговых оболочках, образуют самоподдерживающуюся петлю, что может объяснять длительный характер боли при мигрени. Кроме того, местная блокада клиновидно-нёбного ганглия использовалась в качестве успешного лечения симптомов мигрени у пациентов, а однократная инъекция активной формы онаботулинутоксина А в клиновидно-небный ганглий снижала количество приступов головной боли у пациентов, страдающих

кластерной головной болью. Позже этот подход был использован у пациентов с мигренью и значительно снизил частоту её приступов (Bratbak D.F. et al., 2017; Aschehoug I., Bratbak D.F., Tronvik E.A, 2018).

Таким образом, серотонин является одним из ключевых нейромодуляторов передачи боли, действующим как на периферическом, так и на центральном уровне и участвующем в патофизиологии болевых расстройств. На периферии серотонин участвует в воспалительных реакциях, а в центральной нервной системе участвует как в ноцицептивной передаче, так и в нисходящей модуляции боли (Bannister K., Dickenson A.H., 2020). В случаях повреждения тканей, тучные клетки выделяют 5-гидрокситриптамиин, который служит агентом, вызывающим как воспаление, так и потенцирование других медиаторов воспаления. Серотонин, вводимый непосредственно в спинной мозг, вызывает антиноцицептивный эффект в тестах на грызунах (Bardin L., Lavarenne J., Eschalier A., 2000). В центральной нервной системе данной нейромедиатор участвует как в облегчении ноцицептивной передачи в корковых областях мозга, так и в модулировании боли через нисходящие пути. Группа серотонинергических нейронов, входящая в состав ростровентрального мозгового вещества, проецируются в спинной мозг. Там аксоны серотонинергических волокон, контактируя с телами нейрональных клеток и дендритами, обеспечивают проведение или подавление ноцицептивной передачи в зависимости от подтипов 5-НТ-рецепторов, их расположения на терминалях первичных афферентных волокон. Так, спинальные 5-НТ_{2A}-рецепторы опосредуют ингибирующий эффект серотонина на ноцицептивную передачу в позвоночнике, а 5-НТ_{2A}-рецепторы, экспрессируемые парафасцикулярным ядром, обеспечивают проноцицептивную роль серотонина. Нисходящие модуляторные контуры, исходят из надспинальных областей в стволе мозга, проецируются вниз и напрямую модулируют ноцицептивные спинальные афференты, усиливая или уменьшая возбудимость клеток. Множественность эффектов серотонина обусловлена его разнообразным семейством рецепторов и тканями, на которых они расположены. Среди многих классов рецепторов семейство рецепторов 5-НТ₂ является важным регулятором ноцицептивной передачи (Bardoni R., 2019; Sierra S. et al., 2020).

Предполагается, что роль серотонина в периферической ноцицепции частично обусловлена его непосредственным воздействием на первичные ноцицепторы (Lopez

E.R. et al., 2020). Этот периферический проноцицептивный эффект, вызванный активацией 5-HT_{2A}-рецепторов, лежит в основе передачи боли от ноцицепторов к нейронам спинного мозга. Иммуногистохимический анализ периферических нервных волокон продемонстрировал локализацию 5-HT_{2A}-рецепторов на немиелинизированных сенсорных нейронах в дермально-эпидермальных соединениях гладкой кожи, предполагая, что серотонин оказывает свое действие локально в подкожной клетчатке (Okamoto K. et al., 2002). Также наблюдается, что эти рецепторы экспрессируются выше по ходу на нейронах ганглия дорсального корешка, особенно на С-волокнах малого диаметра. Любопытно, что некоторые доклинические модели показывают, что воспалительные состояния, вызванные адьювантом Фрейда или каррагинаном, приводят к повышенной экспрессии мРНК 5-HT_{2A}-рецепторов в ганглиях дорсального корешка (Zhang Y.Q. et al., 2001). Предполагается, что 5-HT_{2A}-рецепторы выполняют функциональную роль в передаче ноцицептивной информации, но его экспрессия может быть изменена индукцией болевых состояний (Neugebauer V., 2020).

Фармакологические исследования с использованием кетансерина, селективного антагониста 5-HT₂, подтвердили роль периферических 5-HT_{2A}-рецепторов в сенсорной ноцицепции. Парентеральное введение кетансерина дозозависимо ослабляло гипералгезию, индуцированную внутриплантарным введением серотонина. Внутриплантарное введение кетансерина дозозависимо ослабляет эффекты серотонина, а введение селективного агониста 5-HT₂, оказывающего свои первичные эффекты через 5-HT_{2A}-рецепторы, вызывая сильное воспалительное состояние, с возникновением ноцифативного поведения (Huang J. et al., 2009; Hu W. et al., 2016).

Общая нейроанатомическая характеристика показывает низкую или умеренную экспрессию 5-HT_{2A}-рецепторов в дорсальном роге животных (Zhang Y.Q. et al., 2001). Однако моторные нейроны вентрального рога высоко экспрессируют 5-HT_{2A}-рецепторы относительно дорсального. 5-HT_{2A}-рецепторы широко локализованы на постсинаптических плазматических мембранах нейронов спинного мозга (Bardoni R., 2019).

Подобно эффектам на периферии, центральные 5-HT_{2A}-рецепторы опосредуют болевые состояния. Так, каррагинан-индуцированное воспаление вызывает сильную иммунореактивность в дорсальном роге, причем этот эффект блокируется локальным

введением кетансерина в пораженную лапу (Hu W. et al., 2016). Также, в исследованиях с каррагином показывают отчётливое повышение регуляции мРНК 5-HT_{2A}-рецепторов в дорсальном роге, а также отмечается повышение уровня экспрессии в вентролатеральном периакведуктальном сером и дорсальном ядре шва. Так, агонист 5-HT_{2A}-рецепторов DOI, оказывает проноцицептивный эффект посредством спинальных 5-HT_{2A}-рецепторов и усиливает болезненные реакции на инъекцию формалина у крыс (Cortes-Altamirano J.L. et al., 2018), а селективный антагонист 5-HT_{2A}-рецепторов, сарпогрелат ослабляет первичную термическую гипералгезию в экспериментах на крысах. Выявление ноцифативного поведения при введении 5-HT_{2A}-агониста и последующее его ослабление антагонистом свидетельствуют о проноцицептивной роли 5-HT_{2A}-рецепторов (Courteix C. et al., 2018).

Таким образом, 5-HT_{2A}-рецепторы опосредуют болевые состояния посредством спинного мозга и периферической нервной системы (Neugebauer V., 2020). Хотя, проалгезические и антигипералгезические эффекты активации 5-HT_{2A}-рецепторов напоминают переменные эффекты 5-HT_{2A}-рецепторов на когнитивную обработку, периферические 5-HT_{2A}-рецепторы опосредуют передачу боли. Очевидно, 5-HT_{2A}-блокаторы обладают высоким анальгетическим потенциалом, а создание новых высокоселективных препаратов с подобным механизмом действия является актуальным направлением современной фармакологии, особенно при терапии болевого синдрома при мигрени.

Тучные клетки широко распространены как в мозговых оболочках человека (Frederick N., Louveau A., 2020) и задействованы в воспалительных состояниях, вовлечённых в формирование мигренозной боли (Kilinc et al., 2017; Koroleva et al., 2020). Их активация приводит к высвобождению проноцицептивных и провоспалительных соединений, находящихся в этих клетках. Так, тучные клетки крыс и человека содержат 5-HT (Roumier A., Béchade C., Maroteaux L., 2019; Nurkhametova D.F. et al., 2020).

Серотонин является триггером ноцицепции менингеального тройничного нерва при мигрени (Kilinc et al., 2017). Различные исследования показали, что активация тучных клеток может вызывать процицептивный эффект в периферических нейроиммунных синапсах в разных тканях (Mikhailov N. et al., 2019). Дегрануляция

лаброцитов, индуцированная у крыс внутрибрюшинной инъекцией соединения 48/80 (Levy D. et al., 2007), вызывала пролонгированную активацию ноцицепции менингеальных клеток, что демонстрирует возможное участие тучных клеток в патологии мигрени.

Стимуляция лаброцитов инициирует кожную болевую гиперчувствительность (Levy D. 2012). Примечательно, что тучные клетки активируются холинергическими соединениями. Например, карбахол способен вызывать высвобождение серотонина из лаброцитов мочевого пузыря крысы (Spanos C. et al., 1996). Также описано высвобождение гистамина из мозговых оболочек крысы в ответ на применение карбахола (Rozniecki et al., 1999; Mikhailov N. et al., 2020).

Серотонин модулирует воспаление кишечника в патогенезе колита. Изменения уровня 5-НТ наблюдались на экспериментальных моделях колита (Alvarado D.M., Ciorba M.A., 2020). Так, снижение экспрессии серотонина у нокдаун-мышей с дефицитом триптофангидроксилазы приводит к отсроченному началу и снижению тяжести вызванного декстран сульфатом натрия колита. Изменения слизистой оболочки при воспалительных заболеваниях кишечника характеризуются язвенными поражениями с выраженной инфильтрацией иммунных клеток и изменениями в серотонин-продуцирующих энтерохромаффинных клетках. 5-НТ способствует выработке провоспалительных цитокинов из макрофагов, а передача сигналов транскрипционного ядерного фактора инициирует серотонин-опосредованную активацию иммунных клеток (Domínguez-Soto Á. et al., 2017). Однако точные функции серотонина в патогенезе воспаления кишечника ясны не полностью. Отчасти это связано с тем, что в кишечнике экспрессируются разные семейства серотониновых рецепторов: 5-НТ_{1А}, 5-НТ_{2А}, 5-НТ_{2В}, 5-НТ₃, 5-НТ₄ и 5-НТ₇, выполняющие различные функции (Wood J.D., 2020).

Кетансерин, являющийся селективным антагонистом 5-НТ_{2А}-рецепторов, оказывает противовоспалительное действие. Кетансерин ингибирует экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота, фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-6 *in vitro* (Xiao J. et al., 2016). Введение кетансерина снижает экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота после эндотоксического шока у мышей (Voronova I. P. et al., 2016). Индуцибельная синтаза оксида азота в основном производится макрофагами,

продуцирующими воспалительные цитокины (фактор некроз опухоли- α и интерлейкин-12) (Cinelli M. A. et al., 2020).

Известно, что экспрессия 5-НТ_{2A}-рецепторов в толстой кишке повышена как у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, так и у мышей с экспериментальным колитом (Xiao J. et al., 2016; Curtis J. J. et al., 2020). Кетансерин подавляет воспаление толстой кишки у мышей с острым экспериментальным колитом, вызванным декстран сульфатом натрия, уменьшает проникновение нейтрофилов и макрофагов в слизистую оболочку кишечника, ингибирует экспрессию провоспалительных медиаторов через 5-НТ_{2A}-рецепторы (Lin E. Y. H. et al., 2020).

Кетансерин ингибирует перибронхиальное воспаление, гиперплазию бокаловидных клеток и перибронхиальный фиброз в экспериментах на мышах (Yang T. et al., 2020).

Таким образом, серотониновые рецепторы 2A подтипа являются потенциально новыми терапевтическими мишенями в качестве противовоспалительных агентов.

1.4 Психотропный потенциал 5-НТ_{2A}-антагонистов

Мигрень часто сопровождается депрессией и тревожными расстройствами (Zhang Q., 2019; Dresler T. et al., 2019). Сопутствующая психическая патология может способствовать переходу от эпизодической к хронической (или даже ежедневной) мигрени (Baldacci F. et al., 2015). Стресс (активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и высвобождение кортизола) может быть причиной раннего начала, постепенного обострения и хронизации мигрени (Grassini S., Nordin S., 2017; Pellegrino A.B.W. et al., 2018). Сами по себе приступы мигрени могут действовать как стрессор, потенциально способствуя увеличению частоты мигрени (Hammond N. G., Colman I., 2020).

Серотониновые рецепторы 2A подтипа широко распространены в коре головного мозга, базальном переднем мозге, гиппокампе, миндалинах, дорсальном таламусе, гипоталамусе, верхнем колликуле, черной субстанции и продолговатом мозге, что указывает на их участие в многочисленных неврологических эффектах, опосредованных серотонином (Xing L. et al., 2020; Zhang G., Stackman Jr R.W., 2020; Li X. et al., 2020).

Префронтальная кора плотно иннервируется серотонинергическими нейронами, исходящими из дорсального и срединного ядер шва (Berthoux C. et al., 2019).

Механизмы, посредством которых серотонин модулирует префронтальнозависимые функции, определяются архитектурой коры, включающей многочисленные специализированные нейронные компоненты, содержащие 5-HT-рецепторы. Так, 5-HT_{2A}-рецепторы, экспрессируемые в префронтальной коре, участвуют в психомиметических эффектах психоделических галлюциногенов, таких как диэтиламин лизергиновой кислоты, мескалин и псилоцибин, которые часто используются для моделирования положительных симптомов шизофрении (Bécamel C. et al., 2017; Kohler R.J., 2020; Chen K. et al., 2020). Активация постсинаптических 5-HT_{2A}-рецепторов, расположенных в пирамидальных нейронах V слоя префронтальной коры галлюциногенными агонистами, приводит к усилению глутаматергической синаптической передачи и увеличению высвобождения глутамата из таламокортикальных терминалов, что и опосредует психотропные эффекты психоделических галлюциногенов (Bécamel C. et al., 2017; Berthoux C. et al., 2019). 5-HT_{2A}-рецепторы также являются основными мишенями антипсихотических средств второго поколения, таких как клозапин, рисперидон и оланзапин, действующих как антагонисты или обратные агонисты (Aringhieri S. et al., 2017; Maffioletti E. et al., 2020; Chyou T., 2020).

Патогенез депрессии объясняется моноаминовой гипотезой, включающей дисфункцию серотонинергической, норадренергической, дофаминергической систем. Эффекты серотонина в развитии депрессии опосредованы различными подтипами серотониновых рецепторов. Рецепторы 5-HT_{2A} присутствуют в дендритах и аксонах нескольких областей головного мозга крысы, включая кору головного мозга, гиппокамп, базальные ганглии и ствол мозга (Gawliński D. et al., 2019).

Нейрогенный компонент патогенеза депрессии опосредован активацией 5-HT_{2A}-рецепторов, способствующей снижению экспрессии нейротрофического фактора мозга в коре и в сыворотке у пациентов с депрессией, а также в гиппокампе животных, что опосредует атрофию его нейронов. Экспрессия данного белка увеличивается в гиппокампе крыс, мозге и сыворотке человека после лечения антидепрессантами. Кроме того, в экспериментах на крысах, при совместном использовании флуоксетина и кетансерина наблюдалось повышение экспрессии мРНК нейротрофического фактора мозга в СА3 области и зубчатой извилине гиппокампа, что частично опосредуется

блокадой 5-HT_{2A}-рецепторов, с последующим ингибированием глутаматергической синаптической передачи (L Neto F. et al., 2011).

5-HT_{2A}-антагонисты вызывают антидепрессантоподобные эффекты, опосредованные блокадой постсинаптических рецепторов подтипа 2A. Антидепрессивный эффект некоторых селективных ингибиторов обратного захвата серотонина усиливается при совместном введении 5-HT_{2A}-антагонистов таких как рисперидон, оланзапин или M100907, главным образом за счёт увеличения высвобождения серотонина, дофамина и норадреналина в медиальной префронтальной коре. Препараты, которые опосредуют как ингибирование обратного захвата серотонина, так и блокаду рецепторов 5-HT_{2A} предложены к использованию в случаях резистентной к лечению депрессии (Макаров С. А., Филатова Е.Г., 2020).

Известные неселективные антагонисты рецептора 5-HT_{2A} ритансерин и миансерин эффективно блокируют анксиогенное действие метаклорфенилпиперазина, оказывая анксиолитическое действие. Нефазодон, обладающий антагонистической активностью в отношении рецепторов 2A подтипа наряду со свойствами ингибирования обратного захвата серотонина и норадреналина, также эффективен для лечения тревожных расстройств (Xu X. et al., 2018).

Очевидно, что атипичные антипсихотики с выраженным антагонистическим профилем в отношении 5-HT_{2A}-рецепторов эффективны при тревожных расстройствах. Учитывая наличие нарушений в функционировании центральной нервной системы при мигрени, связанных с рядом тревожных состояний и эффективностью у ряда пациентов бензодиазепиновых транквилизаторов и антидепрессантов, 5-HT_{2A}-блокаторы позиционируются в качестве потенциальных веществ для лечения психических расстройств, в том числе для терапии тревожных расстройств при мигрени.

1.5 Влияние 5-HT₂-антагонистов на реологию и коагуляцию

Известно, что во время приступа мигрени дисфункция церебральных артерий опосредует бессимптомный инфаркт, что указывает на сосуществование мигрени и инсульта. Клинические данные указывают на связь между мигренью и геморрагическим инсультом, а также между мигренью и транзиторной ишемической атакой. Однако существует мало данных для установления корреляции, согласно которой ишемический инсульт способствует возникновению мигрени (Raut S. et al., 2020).

Как было сказано ранее, серотонин является молекулой-мишенью при лечении депрессии. Предполагается, что селективные ингибиторы обратного захвата 5-НТ, обычно используемые в качестве антидепрессантов, повышают его уровень в синаптической щели и, следовательно, его способность связывать постсинаптические рецепторы. Помимо центральной нервной системы, значительные количества серотонина находятся в желудочно-кишечном тракте и тромбоцитах. После синтеза в желудочно-кишечном тракте 5-НТ в крови попадает в тромбоциты с помощью высокоаффинного переносчика. Большая часть серотонина циркулирующей крови находится в тромбоцитах, тогда как его уровень в плазме составляет лишь небольшую часть цельной крови. Блокируя переносчик на нейронах и тромбоцитах ингибиторы обратного захвата серотонина, способствуют повышению его уровня в плазме (Arihan O. et al., 2019).

Хотя эритроциты не имеют рецепторов серотонина, предполагается, что влияние антисеротониновых препаратов на их агрегацию связано с повышенным уровнем 5-НТ в плазме. Известно, что натридрофурил опосредует снижение агрегации эритроцитов и увеличение деформируемости их мембран *in vitro*, что предполагает положительное влияние на микроциркуляцию (Jung F., Rampling M., 2016; Arihan O. et al., 2019). Для другого антагониста серотониновых рецепторов 2А подтипа кетансерина, показана способность к снижению вязкости крови при низких скоростях сдвига (Forman S. B., Roy K., 2019; Arihan O. et al., 2019).

1.6 Фармакологический профиль 5-НТ_{2A}-антагониста соединения РУ-31

Разработка нового класса биологически активных соединений осуществляется на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ ЮФУ. Было осуществлено создание базы данных новых соединений и произведён прогноз их биологической активности.

Произведенный скрининг ряда азольных соединений позволил выделить перспективный класс бензимидазолов, обладающим высоким уровнем биологической активности (Anisimova V.A. 2013; Кучерявенко А.Ф., 2015; Гречко О.Ю. и др., 2016). Кроме того, молекулы серотонина и бензимидазола являются биоизостерами, следовательно, данные производные потенциально являются лигандами 5-НТ-рецепторов.

В последствии был обозначен ряд соединений с потенциальной антисеротониновой активностью (Яковлев Д.С., 2016), а учитывая наличие данных, о возможности проявления производными бензимидазола противомигренозного действия, были выявлены агенты с 5-НТ-блокирующим действием. В дальнейшем, было определено соединение с высоким серотонинблокирующим действием – РУ-476, и изучены его сосудосуживающие, антиагрегантные и нейрорепрессивные свойства, которые показали перспективность выявленного соединения, в качестве кандидата для создания нового средства для лечения мигрени (Мальцев Д.В., 2014; Яковлев Д.С., 2016). Однако, дигидронитратная соль оказалась подвержена фотодеградации, что недопустимо для хранения предполагаемой пероральной формы.

В связи с этим, были синтезированы неорганические дигидрохлоридная и дигидробромидная солевые формы 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола.

Было произведено выявление наиболее сильного 5-НТ_{2A}-блокатора на модели серотонининдуцированного сокращения матки крыс. Наибольший уровень 5-НТ_{2A}-блокирующей активности был зарегистрирован у дигидрохлорида 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола – соединения РУ-31 (Морковина Я.В. и др., 2017).

В ходе детализации фармакодинамических аспектов противомигренозных свойств при моделировании серотонин-индуцированного спазма мозговых артерий *in vivo* была изучена способность соединения РУ-31 дозозависимо снижать констрикцию мозговых сосудов с последующим расчетом средней эффективной дозы, которая составила 10 мг/кг. Также была показана антиагрегантная активность, при патологии вызванной серотонином.

При изучении рецепторного профиля соединения РУ-31 с применением методик *in vivo* и *in vitro* было показано отсутствие Н₁-гистаминблокирующей, 5-НТ₃- и 5-НТ₄-блокирующей активности. При моделировании ацетилхолининдуцированного сокращения подвздошной кишки и ареколинового тремора соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг оказало ингибирующий эффект, что предполагает усиление противомигренозной активности, опосредуемой основным 5-НТ_{2A}-блокирующим механизмом действия (Агацарская Я. В. и др., 2019). Помимо этого, соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг

подавляет активность ГАМК-блокатора – пикротоксина *in vivo*, существенно увеличивая время возникновения судорог и снижая их количество, а также модулирует функциональную активность нейроцитов срезов гиппокампа, снижая амплитуду и частоту серотонининдуцированных токов в гиппокампальной формации мозга крыс в равной степени с ципрогептадином.

Соединение РУ-31 оказывает анальгетические и противовоспалительное действие, (Агацарская Я.В., 2019). Учитывая выраженность болевого синдрома при мигренозных атаках и вовлеченность серотонина в воспалительном компоненте патогенеза мигренозной атаки, наличие собственной противовоспалительной и анальгетической активности улучшает основное противомигренозное действие.

Таким образом, соединение РУ-31, являющееся активной и стабильной солевой формой 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола, обладающее селективным 5-НТ_{2А}-антагонистическим действием и обезболивающей активностью, является перспективным для создания нового средства для лечения мигрени и требует расширенных исследований его противомигренозных, анальгетических, психотропных и токсикологических свойств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Регулирующие документы

Экспериментальная работа проводилась в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» и требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики (GLP) от 1 апреля 2016 года N 199н» и со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и была одобрена Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (протокол №2032-2017 от 26 июня 2017 года).

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. Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н. и др., 2012).

2.2 Реактивы и вещества

В исследовании была изучена фармакологическая субстанция РУ-31, синтезированная в лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета¹, представляющая собой дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

Были использованы вещества сравнения: ципрогептадина гидрохлорид (Merck, США), пентоксифиллин (Merck, США), варфарин (Никомед, Дания), диклофенак (Nemofarm, Сербия), нимесулид (МАРБИОФАРМ, Россия), кеторолак (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия), имипрамина гидрохлорид (Merck, США), диазепам (сибазон, ФГУП Московский эндокринный завод, Россия), доксорубин (Merck, США).

Фармакологические реактивы, используемые в исследовании: 5-гидрокситриптофан (Merck, США), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-

¹ Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В.А. Анисимовой, научному сотруднику, к.х.н. О.Н. Жуковской и главному научному сотруднику А.С. Морковнику за синтез и предоставление субстанции соединения РУ-31 для данной работы.

дифенилтетразолия (Merck, США), NEPES (Merck, США), альбумин бычий сывороточный (Merck, США), апоморфин (Merck, США), ареколина гидробромид (Merck, США), галоперидол (раствор в ампулах 5 мг/мл, Мосхимфармпрепараты, Россия), диметилсульфоксид (Helicon, Россия), натрия цитрат (Реахим, Россия), незаменимые аминокислоты (Merck, США), никотин (Merck, США), пенициллин-стрептомицин (Gibco, США), пикротоксин (Merck, США), пируват натрия (Merck, США), раствор натрия хлорида (Агат-Мед, Россия), раствор трипсина-ЭДТА 0,25% (Merck, США), раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия), среда DMEM (Gibco, США), трипановый синий 0,4% (Helicon, Россия), формалин (Агат-мед, Россия), хлоралгидрат (Panreak, Испания), эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США).

В исследованиях были применены наборы реагентов: Тех-Фибриноген-тест (Технология стандарт, Россия), Техпластин-тест (Технология стандарт, Россия), Тромбо-тест (Технология стандарт, Россия), набор для скрининга ингибиторов циклооксигеназы-1 (BioVision, США), набор для скрининга ингибиторов циклооксигеназы-2 (BioVision, США), набор Tango™ HTR2A-*bla* U2OS DA (Thermo Fisher Scientific, США).

2.3 Оборудование и программное обеспечение

Для исследований использовано следующее оборудование: рН-метр (OHAUS, США), актометр (Ugo Basile, Италия), аспиратор (BioSan, Латвия), бактерицидная УФ-лампа (Liston, Россия), бокс антибактериальный (Ламинарные системы, Россия), бур стоматологический (Saeyang microtech, Южная Корея), весы аналитические (OHAUS, США), весы прецизионные (OHAUS, США), вискозиметр (Мелт, Россия), дистиллятор (GFL, Германия), коагулометр (Solar, Белоруссия), концентратор кислорода (Армед, Россия), магнитная мешалка (BioSan, Латвия), микроскоп инвертированный (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), мультимодальный планшетный ридер (BMG Labtech, Германия), плетизмометр (Ugo Basile, Италия), проточный бактерицидный рециркулятор воздуха (BioSan, Латвия), система водоочистительная лабораторная (Merck, США), CO₂-инкубатор (New Brunswick, США), станции автоматической пробоподготовки (Eppendorf, Германия), термостат водяной (GFL, Германия), термошейкер планшетный (BioSan, Латвия), ультразвуковая ванна (Сапфир, Россия), ультразвуковой доплерограф (Минимакс, Россия), установка «Наказуемое взятие

воды» (НПК Открытая Наука, Россия), установка «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Россия), установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Россия), установка «Вынужденное плавание» по Porsolt (НПК Открытая Наука, Россия), центрифуга высокоскоростная (Eppendorf, Германия).

В ходе исследования использовано программное обеспечение: графический редактор Adobe Photoshop (Adobe Systems, США), ПО «Минимакс-Допплер-ММ-Д-К» (Минимакс, Россия), ПО eрBlue™ (Eppendorf, Германия), программа обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), программный пакет BMG LABTECH's Reader Control Software (BMG Labtech, Германия), ПО для анализа данных MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Германия).

Статистическая обработка данных была осуществлена с использованием программных пакетов GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, США).

2.4 Экспериментальные животные

Фармакологические исследования проводились на 696 нелинейных крысах массой 250-320 г, 204 нелинейных мышах массой 20-30 г, 9 кроликах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг.

Животные содержались в стандартных условиях 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)».

2.5 Методы исследования специфического фармакологического действия

2.5.1 Исследование влияния на цереброваскулярный кровоток

Противомигренозное действие изучалось с помощью моделирования преходящей ишемии мозга. Крысы самцы были распределены на 3 группы по 6 особей в каждой. Моделирование ишемии осуществлялось путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий и производилось за 3 дня до начала эксперимента наркотизированным хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно) животным. По прошествии 3 дней, изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг –

эквивалентная доза) вводились внутривенно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до начала эксперимента. После необходимой инкубации веществ, проводилась наркотизация животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) и фиксация головы в стереотаксисе. В теменной кости бором высверливалось отверстие размером до поверхности твердой мозговой оболочки, на трепанированный участок накладывался ватный диск, смоченный физиологическим раствором. Затем проводилась катетеризация бедренной вены и размещение УЗИ-датчика на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания среднемозговой артерии по направлению ее центральной ветви. С помощью ПО «Минимакс-Допплер-ММ-Д-К» (Минимакс, Россия) фиксировались 3 показателя фоновых значений кровотока, для дальнейшего выявления среднего значения кровотока, с учетом девиаций, по которому производился дальнейший расчет. Регистрировался момент введения серотонина (20 мкг/кг) в катетеризированную бедренную вену, от которого производился дальнейший временной отсчет. В течение первой минуты, после введения серотонина, показатели линейной скорости мозгового кровотока регистрировались в течение каждые 15 секунд. После 1 минуты регистрация проводилась раз в минуту, с общим временем записи 5 минут. Уровень фармакологической активности исследуемых соединений оценивался по изменению реакции сосудистого русла, в ответ на введение серотонина, в сравнении с контрольным эффектом серотонина без введения вещества.

2.5.2 Методы исследования противовоспалительных и анальгетических свойств

Противовоспалительное действие *in vivo* изучено с использованием крыс-самцов. Крысы самцы были распределены на 5 групп по 8 особей в каждой. Предварительно было проведено контрольное измерение объема лапки крыс: объем жидкости в см³, вытесненной после погружения лапки в стандартную водную камеру плетизмометра (Ugo Basile, Италия). После контрольного измерения животному подкожно в вентролатеральную поверхность правой задней лапки вводился раствор серотонина (концентрация водного раствора 0,01%) в объеме 0,1 мл. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) и диклофенак (2 мг/кг) вводились внутривенно при помощи интрагастрального зонда через 1 час после введения флогогенного агента и за 1 час до конечного измерения объема лапы крыс.

Через 2 часа после введения серотонина проводилось опытное измерение объема лапки крыс.

Анальгетическое действие *in vivo* было изучено с использованием крыс-самцов. Животные были распределены на 5 групп по 8 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг), диклофенак (2 мг/кг) и кеторолак (3,5 мг/кг) вводили внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до исследования. За 30 минут до проведения тестирования всех животных акклиматизировали в боксе для наблюдения. По истечении времени инкубации производилась инъекция водного раствора формалина (1,5%, 50 мкл) в правую верхнюю часть губы крысы, и животное помещалось в прозрачный бокс для наблюдения. Далее фиксировали среднее число секунд, затраченных на болезненное поведение животного (потирание морды передними и задними лапами). Период наблюдения за одним животным составлял 45 минут, отсчет начинался после инъекции формалина и был разделён на 15 блоков по 3 минуты каждый.

Изучение анальгетической активности с предварительной нитроглицериновой нагрузкой было проведено на крысах-самцах. Животные были распределены на 5 групп по 8 особей в каждой. За 4 часа до введения изучаемых веществ нитроглицерин в дозе 10 мг/кг вводили внутривентрикулярно. По истечению времени инкубации изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг), диклофенак (2 мг/кг) и кеторолак (3,5 мг/кг) вводили внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до исследования. Далее осуществляли проведение исследования согласно вышеописанной методике орофациальной формалиновой гипералгезии.

2.6 Методы исследования психотропных свойств²

2.6.1 Исследование анксиолитической активности

Анксиолитическая активность *in vivo* была изучена при помощи теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Крысы самцы были распределены на 7 групп по 8 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) и диазепам (1 мг/кг) были введены животным внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до исследования. Далее

² Выражаем глубокую признательность к.б.н. Д.В. Мальцеву за помощь в проведении исследования.

животное помещалось в установку «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Россия) и проводилось наблюдение за поведением крысы в течение 3 минут с регистрацией соответствующих показателей: латентный период до выхода в открытый рукав; количество выходов в открытый рукав; суммарное время, проведенное в открытых рукавах лабиринта; общее число переходов из рукава в рукав (темный-темный; темный-светлый; светлый-светлый); количества свешиваний; реактивность; общее время нахождения в центре; количество выглядываний из закрытого рукава; количество болюсов.

Также, анксиолитическая активность *in vivo* изучалась при помощи теста «Наказуемое взятия воды» по Vogel на крысах-самцах. Животные были распределены на 7 групп по 8 особей в каждой. За 72 часа до начала эксперимента животные лишались постоянного доступа к воде, при этом доступ к еде оставался свободным. Через 48 часов, для формирования условного рефлекса, каждая крыса на 5 минут помещалась в установку. Животное находило поилку и начинало пить, после чего изымалось из прибора. После этого крыса вновь ограничивалась в воде на оставшееся время до экспериментального исследования. Через 23 часа производилось внутрижелудочное введение соединения РУ-31 (10 мг/кг) и препаратов сравнения ципрогептадина (14 мг/кг) и диазепама (1 мг/кг) и через 1 час инкубации регистрировались фиксируемые показатели: время первого подхода к поилке, после первого получения болевого раздражения; число подходов к поилке. Животное помещалось в установку и после того как начинало пить, получало короткий удар током (0,5 мА). Аналогично происходило при каждом следующем подходе к поилке. Время наблюдения составляло 10 минут.

2.6.2 Исследование антидепрессивного действия

Антидепрессивная активность *in vivo* была исследована при помощи теста «Принудительное плавание по Porsolt». Крысы самцы были распределены на 7 групп по 8 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) и имипрамин (10 мг/кг) трехкратно (за 24, 8 и 1 час до проведения теста) были введены животным внутрижелудочно при помощи интрагастрального зонда. По истечению 1 часа после последнего введения животные помещались в экспериментальную установку «Принудительное плавание по Porsolt»

(НПК Открытая Наука, Россия), которая заполнялась водой ($t \sim 22-25^{\circ}\text{C}$). Время экспозиции грызунов составляло 10 минут. Уровень воды позволял животному стоять в воде, упираясь задними конечностями в дно цилиндра. Со второй минуты от времени погружения животного в воду регистрировалось время «активного сопротивления» – продолжительность попыток животного покинуть пределы экспериментальной установки, включая активное плавание и прыжки.

2.7 Методы исследования реологических и антикоагуляционных свойств³

2.7.1 Исследование гемореологической активности *in vitro*

Гемореологическая активность *in vitro* изучена с использованием кроликов породы Шиншилла, в качестве доноров крови. Забор крови производился из краевой ушной вены кроликов методом свободного падения капли и стабилизировали 3,8% водным раствором цитрата натрия (рН 6,0).

Исследование кажущейся вязкости крови проводили на вискозиметре (Мелт, Россия) при скоростях сдвига от 300 c^{-1} до 10 c^{-1} (обратных секунд). На основании полученных данных проводился расчет индекса агрегации эритроцитов (ИАЭ, у.е.), как отношение вязкости крови при скорости сдвига 10 c^{-1} к вязкости крови при 100 c^{-1} . Деформируемость эритроцитов вискозиметрическим методом оценивали при стандартизованном гематокрите 45%, при скоростях сдвига 300, 30, 3 c^{-1} . Кроме того, деформируемость эритроцитов крови оценивали по индексу элонгации при фиксированном напряжении сдвига в проточной микрокамере. Её заполняли суспензией эритроцитов (0,5%) в физиологическом растворе, содержащем 0,1% альбумина, после чего производилась фиксация и анализ изображения при помощи графического редактора Adobe Photoshop (Adobe Systems, США). Для изучения агрегации эритроцитов производилось их ресуспендирование в обеднённой тромбоцитами аутологичной плазме. Степень агрегации эритроцитов определялась с помощью метода оптической микроскопии с последующей регистрацией и компьютерным анализом изображения.

2.7.2 Исследование гемореологических эффектов *in vivo*

Гемореологическая активность *in vivo* изучена с использованием крыс-самцов. Животные были распределены на 4 группы по 6 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) вводились

³ Выражаем глубокую признательность д.м.н., доценту Л.В. Науменко за помощь в проведении исследования.

внутрижелудочно при помощи интрагастрального зонда в течение 3 дней. После необходимой инкубации веществ, проводилась наркотизация животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутрибрюшинно), производился оперативный доступ и осуществлялся забор крови из брюшной аорты при стабилизации раствором цитрата натрия. Исследование кажущейся вязкости крови проводили на вискозиметре (Мелт, Россия) при скоростях сдвига от 300 с^{-1} до 10 с^{-1} (обратных секунд), с последующим расчетом индекса агрегации эритроцитов. Деформируемость эритроцитов была исследована вискозиметрическим методом, а также по индексу элонгации при фиксированном напряжении сдвига в проточной микрокамере. Агрегация эритроцитов оценивалась с помощью метода оптической микроскопии.

2.7.3 Исследование антикоагуляционного действия *in vivo*

Антикоагуляционное действие *in vivo* было исследовано с использованием крыс-самцов. Животные были распределены на 5 групп по 6 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10 мг/кг) и препараты сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) и варфарин (0,04 мг/кг) вводили внутрижелудочно при помощи интрагастрального зонда в течение 3 дней 1 раз в сутки (в соответствии с длительностью развития эффектов непрямых антикоагулянтов). Для исследования возможного индуцирования или ингибирования соединением РУ-31 действия варфарина животным в течение 3 дней вводился варфарин и соединение РУ-31 в средних эффективных дозах 1 раз в сутки внутрижелудочно с двухчасовым интервалом.

После необходимой инкубации веществ, проводилось определение времени свертывания крови при помощи модели «Время кровотечения на крысах». У крысы отрезался 1 см кончика хвоста с последующим помещением его в пробирку с физиологическим раствором на водяной бане (37°C) и производилась регистрация времени свертывания крови.

Далее осуществлялась наркотизация животного хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 400 мг/кг), с последующим забором крови из брюшной аорты (стабилизатор – 3,8% цитрат натрия). Подготовка плазмы для исследования осуществлялась путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 минут, с последующим отбором надосадочного слоя плазмы.

Определение основных показателей, отражающих коагуляционное звено гемостаза производилось на коагулометре (Solar, Белоруссия) с использованием наборов реактивов (Технология стандарт, Россия).

2.8 Методы изучения влияния соединения РУ-31 на передачу внутриклеточных и внеклеточных сигналов

2.8.1 Исследование 5-HT_{2A}-антагонистического действия *in vitro*

Детализация 5-HT_{2A}-антагонистического механизма действия *in vitro* проводилась с использованием набора Tango™ HTR2A-*bla* U2OS DA (Thermo Fisher Scientific, США). Производился посев клеток в культуральной среде в 384-луночный планшет с дальнейшим инкубированием в CO₂-инкубаре в течении 24 часов. По истечении времени инкубации производилось внесение соединения РУ-31 и препарата сравнения ципрогептадина в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ. После 30 минутной инкубации производилось внесение в лунки реакционной смеси и детекция и регистрация флуоресценции.

Клетки содержат человеческий рецептор серотонина типа 2A, связанный с сайтом TEV-протеазы, и транскрипционный фактор Gal4-VP16. Данная линия клеток стабильно экспрессирует белок слияния бета-аррестин/TEV-протеазы и репортерный ген бета-лактамазы.

Рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCRs), запускают десенсibilизацию – процесс, опосредованный привлечением внутриклеточных белков аррестина в активированный рецептор. В результате лиганд-индуцированная активация GPCR может быть проанализирована путём мониторинга взаимодействия аррестина с тестируемым рецептором.

Целевой GPCR слит на своем внутриклеточном С-конце с экзогенным фактором транскрипции. Между рецептором и фактором транскрипции вставлена специфическая последовательность расщепления для ненативной протеазы. Этот белок химерного рецептора экспрессируется в клеточной линии, содержащей ген-репортёр, чувствительный к транскрипционному фактору. Клеточная линия также экспрессирует слитый белок аррестин-протеаза, который распознает и расщепляет сайт между рецептором и фактором транскрипции. Анализ проводят путём добавления лиганда к растущим клеткам в течение определённого периода и измерения активности

репортёрного гена. Активация встроеного гена обеспечивает количественное измерение степени взаимодействия между рецептором-мишенью и меченым протеазой партнером аррестином. Кроме того, на него не влияют другие сигнальные пути в клетке, что обеспечивает высокоселективное считывание активации рецептора-мишени.

Технология анализа TangoTM использует оптимизированный для млекопитающих репортёрный ген бета-лактамазы (bla) в сочетании с субстратом с FRET для обеспечения надежного и чувствительного обнаружения в клетках. Клетки загружают сконструированным флуоресцентным субстратом, содержащим два флуорофора: кумарин и флуоресцеин. В отсутствие экспрессии bla молекула субстрата остается интактной. В этом состоянии возбуждение кумарина приводит к передаче энергии резонанса флуоресценции к флуоресцеиновому фрагменту и испусканию зелёного света. Однако в присутствии экспрессии bla субстрат расщепляется, отделяя флуорофоры и нарушая передачу энергии. Возбуждение кумарина в присутствии энзимной активности приводит к синему сигналу флуоресценции.

2.8.2 Исследование взаимодействия с нейромедиаторными системами

Исследование влияния на серотонинергическую систему мозга *in vivo* проводилось в тесте «5-ГТФ гиперкинез». Крысы самцы были распределены на 5 групп по 8 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (2; 10; 30; 50 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) вводили животным внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до эксперимента. Непосредственно перед началом эксперимента снимали исходные показатели до моделирования гиперкинеза. Моделирование проводили введением 5-ГТФ внутривентрикулярно в дозе 300 мг/кг. Показатели выраженности гиперкинеза регистрировали у каждого экспериментального животного, через каждые 10 минут, в течение часа. В качестве регистрируемого параметра считали количество «твитчингов» (встряхиваний головой) в течение минуты.

Исследование влияния на ГАМК-ергическую систему мозга *in vivo* проводили в тесте «Пикротоксиновые судороги». Крысы самцы были распределены на 5 групп по 10 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (2; 10; 30; 50 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) вводили животным внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до эксперимента. Непосредственно перед началом эксперимента снимали исходные показатели до моделирования судорог. После

инкубации производили моделирование судорог введением пикротоксина внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг. Производилась регистрация эффектов пикротоксина по показателям: латентное время развития тремора (в секундах); латентное время развития судорог (в секундах); количество судорожных припадков.

Исследование влияния на М-холинергическую систему мозга *in vivo* проводили в тесте «Ареколиновый тремор». Крысы самцы были распределены на 5 групп по 10 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (2; 10; 30; 50 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) вводили животным внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до эксперимента. Непосредственно перед началом эксперимента снимались исходные показатели до моделирования тремора. После инкубации производили моделирование тремора введением ареколина внутрибрюшинно, в дозе 15 мг/кг. Производилась регистрация эффектов ареколина по показателям: латентное время развития тремора (в секундах), длительность тремора (в секундах).

Исследование влияния на дофаминергическую систему мозга *in vivo* проводили в тестах «Галоперидоловая каталепсия», «Апоморфиновая стереотипия» и «Фенаминовая стереотипия». Изучаемое соединение РУ-31 (2; 10; 30; 50 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14 мг/кг) вводили крысам-самцам внутривентрикулярно при помощи интрагастрального зонда за 1 час до эксперимента. Непосредственно перед началом эксперимента у животных снимали исходные показатели до моделирования патологического состояния.

Моделирование галоперидоловой каталепсии у крыс (8 особей в группе) производили введением галоперидола внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг. Показатели выраженности каталепсии регистрировали через 15, 30, 45 и 60 минут после инъекции галоперидола, финальная точка регистрации – 120 минут после инъекции. Развившуюся каталепсию оценивали по способности сохранять заданную непривычную позу в течение 15 секунд по балльной шкале: 1 балл – передняя лапа слегка отводится и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см.

Моделирование апоморфиновой стереотипии у крыс (6 особей в группе) производили введением апоморфина подкожно в дозе 0,1 мг/кг. Показатели выраженности каталепсии регистрировали через 30, 60, 90 и 120 минут после инъекции апоморфина. Развитие стереотипии оценивали по выраженности стереотипных движений по балльной шкале: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе единичные случаи зевательных движений, непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе зевание, лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия.

Моделирование фенаминовой стереотипии у крыс (6 особей в группе) производили введением фенамина внутривентриально в дозе 5 мг/кг. Регистрация стереотипии проводилась с момента инъекции фенамина до полного прекращения стереотипных движений в часах.

2.8.3 Исследование ингибирования циклооксигеназы

Противовоспалительное действие *in vitro* изучали с применением наборов для скрининга ингибиторов циклооксигеназы 1 и 2 типа (BioVision, США). Анализ основан на флуориметрическом детектировании простагландина G2 - промежуточного продукта реакции, катализируемой циклооксигеназой. После внесения исследуемых веществ (соединения РУ-31, ципрогептадина, диклофенака, нимесулида; 1 мкМ), реакционной смеси и раствора арахидоновой кислоты производили снятие значений флуоресценции и рассчитывали ингибирование активности фермента.

2.9 Методы изучения токсикологических свойств

2.9.1 Исследование цитотоксического действия

Изучение цитотоксического действия *in vitro* проводили при помощи МТТ-теста. Производили культивирование фибробластов кожи человека⁴ в полной питательной среде ЕМЕМ во культуральном флаконе до образования монослоя (85-90%), после чего внесли клеточную суспензию в количестве 10000 клеток в лунку планшета, с последующей 24 часовой инкубацией в СО₂-инкубаторе для адгезии клеток ко дну

⁴ Выражаем благодарность Научно-образовательному центру фармацевтики Казанского федерального университета за предоставление фибробластов кожи человека.

планшета. По истечении инкубации, соединение РУ-31, ципрогептадин и доксорубин в диапазоне концентраций от 1000 – 0,001 мкМ вносили в лунки с последующей инкубацией в течение 48 часов. По истечению времени инкубации производили удаление культуральной среды и внесли реакционную смесь в каждую лунку, с последующей инкубацией, по истечении которой в каждую лунку планшета вносили ДМСО. Далее анализировали поглощение растворов при 555 нм против 650 нм референсных при помощи планшетного ридера. Процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке рассчитывали относительно положительного контроля (100% живых клеток). Производили построение кривых зависимости жизнеспособности клеток (в % относительно контроля) от концентрации добавленных соединений. Рассчитывали IC_{50} веществ (концентрацию, ингибирующую пролиферацию 50% клеток).

2.9.2 Исследование нейротоксикологической активности

Изучение нейротоксикологического действия *in vivo* проводили по методу S. Irwin на белых беспородных мышах-самцах. Животные были распределены на 11 групп по 6 особей в каждой. Изучаемое соединение РУ-31 (10; 20; 50; 75; 100 мг/кг) и препарат сравнения ципрогептадин (14; 28; 70; 105; 140 мг/кг) вводили внутривентрально при помощи интрагастрального зонда. Регистрацию фиксируемых показателей (поведенческие реакции, нервно-мышечные и вегетотропные эффекты) осуществляли на 60 и 120 минутах при помощи установки «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Россия) и актометра (Ugo Basile, Италия).

2.9.3 Исследование острой токсичности

Острая токсичность была изучена на беспородных лабораторных мышах (самцы и самки) и крысах (самцы и самки) при внутривентральном и внутривенном путях введения. Соединение РУ-31 изучалось в дозах 50; 100; 300; 500; 1000; 1500; 2000 мг/кг (крысы-самцы, n=5) и 50; 100; 200; 500; 750; 1000; 1300 мг/кг (крысы-самки, n=5); 25; 50; 100; 300; 400; 500 мг/кг (мыши-самцы, n=6) и 25; 50; 100; 200; 300; 500 мг/кг (мыши-самки, n=6) вводили однократно при помощи интрагастрального зонда. При внутривенном однократном пути соединения РУ-31 изучено в дозах 12,5; 25; 50; 75; 100 мг/кг (крысы-самцы, n=5) и 12,5; 25; 35; 50; 75 мг/кг (крысы-самки, n=5); 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 мг/кг (мыши-самцы, n=6) и 12,5; 25; 50; 100; 200 мг/кг (мыши-самки, n=6).

После введения вещества за животными непрерывно наблюдали в течение 6 часов в первые сутки, через 24 часа и в последующие дни эксперимента через каждые 12 часов. Период наблюдения за животными составил 14 дней.

2.10 Методы статистической обработки

Для обработки экспериментальных фармакологических исследований использовались методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Сергиенко В.И., Бондарева И.Б., Маевский Е.И., 2012), реализованные в программных пакетах GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, США): распределение выборки на нормальность проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В качестве параметрических критериев использовались непарный t-тест; для множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса. В случае непараметрического распределения данных использовались U-критерий Манна-Уитни; критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна – для множественного сравнения. Расчеты концентрационных зависимостей выполнялись с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, АССОЦИИРУЕМЫЕ С РАЗВИТИЕМ МИГРЕНОЗНОГО ПРИСТУПА

Серотонинергическая система играет существенную роль в регуляции тонуса сосудов головного мозга, а нарушение её функционирования лежит в основе ряда цереброваскулярных патологий, в том числе патогенезе мигрени (Nancy J., 2019). Известно, что активация 5-НТ_{2А}-рецепторов вызывает констрикцию сосудов, потенцируя изменение гемодинамики в сосудах головного мозга (D'Andrea G., 2019; Gupta V.K., 2019).

Серотонин также вовлечен в регуляцию болевой чувствительности. Считается, что активация 5-НТ_{2А}-рецепторов, расположенных на чувствительных окончаниях нервных волокон, реализует периферический проанальгетический эффект 5-гидрокситриптамина и лежит в основе передачи боли от ноцицепторов к нейронам спинного мозга (Sommer C., 2010; Xu W. J., 2020; Okumura T., 2020; Liu Q., 2020).

Кроме того, активированные серотониновые рецепторы 2А типа опосредуют выделение провоспалительных факторов, в частности серотонина, из первичных афферентных окончаний тройничного нерва и провоцирует нейрогенное воспаление в сосудах твердой мозговой оболочки, инициируя приступы мигрени (Su M., Yu S., 2018; Edvinsson L., Haanes K. A., Warfvinge K., 2019; Khan S., 2019; Edvinsson L., Haanes K.A., 2020).

Таким образом, особенности патогенеза серотонинопосредованных нарушений мозгового кровообращения предположительно определяют способность 5-НТ_{2А}-антагонистов как потенциальных противомигренозных средств устранять цереброконстрикторные, проноцицетивные и провоспалительные эффекты 5-гидрокситриптамина.

3.1 Сосудистое действие в условиях ишемии

В ранее проведенных исследованиях для соединения РУ-31 было показано наличие выраженной 5-НТ_{2А}-серотонинблокирующей активности и произведено изучение его противомигренозных свойств (Агацарская Я.В., 2019). Выявлено, что

соединение РУ-31 модулирует тонус экстракраниальных и интракраниальных сосудов, не уступая референсному препарату – ципрогептадину.

Кроме того, в структуре нарушений мозгового кровообращения существенное место занимают ишемические поражения головного мозга, часто сопровождающиеся спазмами сосудов мозга. Так, острым и хроническим мигренозным атакам могут сопутствовать вазоконстрикторные ишемические нарушения кровотока (Ersoy A., 2020; Vallabhaneni D., 2020). В связи с чем, принципиальным является дополнительное изучение противомигренозных свойств соединения РУ-31 с использованием адекватных экспериментальных моделей, воспроизводящих основные звенья патогенеза сосудистых патологий мозга.

В условиях ишемии головного мозга наблюдается усиление сосудистых влияний серотонинергической системы (Otlivanchik O., Liberman A. L., 2019; Francillard I., 2020), в связи с чем, в исследовании была изучена способность соединения РУ-31 и препарата сравнения ципрогептадина, как наиболее близкому по механизму действия, устранять выраженное падение скорости мозгового кровотока, вызванное внутривенным введением серотонина в условиях моделирования преходящей ишемии мозга крыс (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

В группе контроля при моделировании серотониновой нагрузки путём внутривенного введения серотонина (20 мкг/кг) зарегистрировано резкое падение линейной скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии.

У животных, которым предварительно (1 час) внутрижелудочно вводили соединение РУ-31 и ципрогептадин и в средних эффективных дозах – 10 мг/кг и 14 мг/кг, выявленных в ранее проведенных исследованиях соответственно, наблюдали статистически значимое снижение падения скорости мозгового кровотока относительно показателей группы контроля, свидетельствующее об уменьшении вазоконстрикторной реакции, возникающей в ответ на введение серотонина. При этом отмечены статистически значимые различия между показателями скорости кровотока в группах животных, получавших соединение РУ-31 и препарат сравнения ципрогептадин (таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина при однократном внутрижелудочном введении на линейную скорость кровотока в системе средней мозговой артерии при серотониновой нагрузке (20 мкг/кг) в условиях переходящей ишемии

Группа	Доза, мг/кг	Максимальное падение СМК, %	Подавление серотонин-опосредованного падения СМК, %
Контроль	–	39,2±0,34	–
РУ-31	10	25,9±0,98*•	34,0±2,50•
Ципрогептадин	14	31,1±0,67*	20,5±1,71

Примечания: СМК – скорость мозгового кровотока. Препарат сравнения ципрогептадин исследован в средней эффективной дозе. Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$); • – различия достоверны относительно показателей группы ципрогептадина, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

В результате исследования было установлено, что соединение РУ-31 способно эффективно снижать выраженность серотонин-индуцированного спазма в условиях ишемии на модели мигренозоподобного нарушения мозгового кровообращения в бассейне средней мозговой артерии. Уровень антисеротонинового эффекта соединения РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг на 17% превосходит аналогичный параметр для препарата сравнения ципрогептадина в средней эффективной дозе 14 мг/кг.

Таким образом, для соединения РУ-31 дополнительно показано наличие значимой противомигренозной активности при моделировании сосудистых серотониновых спазмов в условиях ишемического нарушения кровотока, сопутствующего мигренозоподобным нарушениям мозгового кровообращения.

3.2 Анальгетическая активность

Серотонинергическая система широко вовлечена в регуляцию ноцицепции. Считается, что периферические проноцицептивные 5-НТ_{2А}-рецепторы задействованы в

возбуждении афферентных ноцицептивных волокон и опосредуют развитие цефалгии, в том числе и при мигренозных атаках (Ashina M., 2019; Guo S., 2020).

Ранее для соединения РУ-31 было показано наличие анальгетического потенциала в тестах, моделирующих все уровни функционирования ноцицептивной системы (Агацарская Я.В., 2019). В связи с этим, актуальным является дополнительное изучение анальгетического действия в условиях, наиболее близко отражающих вовлечённое в этиопатогенез мигренозной атаки тригемино-вазкулярное звено модуляции боли.

3.2.1 Анальгетическая активность в орофациальном формалиновом тесте

Принимая во внимание данные об вовлеченности 5-НТ_{2A}-рецепторов в формировании процессов гипералгезии, а также этиопатогенетическую вовлечённость тригемино-вазкулярной системы в процесс развития мигренозных атак (Iyengar S., 2019; Садоха К.А., 2020; Rainero I., 2020), в исследовании была изучена анальгетическая активность соединения РУ-31 и препаратов сравнения в орофациальном формалиновом тесте (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Водный раствор формалина (1,5%, изготавливался *ex tempore* из 37% раствора формальдегида) при введении вызывал развитие двигательного-болевого реакции в виде «потирания морды», при этом воспалительно-болевого реакция формировалась в 2 этапа: с 0 по 12 минуты – острая фаза, и с 12 по 45 минуты – хроническая фаза. Так в контрольной группе животных, после введения формалина воспалительно-болевого реакция начинала развиваться с 3 минуты введения, однако к 6 минуте выраженность болевых реакций снижалась. Следующая волна болевой реакции зафиксирована с 12 минуты и достигала максимальных значений к 24 минуте, после чего выраженность болевых реакций начинала постепенно снижаться. При этом общая длительность болезненного поведения животных контрольной группы в первой фазе составила $28,0 \pm 2,31$ секунды, во второй фазе – $49,7 \pm 3,21$ секунды (таблица 3.2.1.1).

Таблица 3.2.1.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на длительность болезненного поведения (потирания морды) крыс, вызванного подкожной инъекцией водного раствора формалина (1,5%, 50 мкл) в рецептивное поле в орофациальном формалиновом тесте

Группа	Доза, мг/кг	Длительность болезненного поведения, с	
		Фаза 1	Фаза 2
Контроль + формалин	–	28,0±2,31	49,7±3,29
Диклофенак + формалин	2	23,5±3,62	31,2±1,28*
Кеторолак + формалин	3,5	13,8±2,39*	22,5±2,93*
РУ-31 + формалин	10	29,5±3,16	29,5±4,50*
Ципрогептадин + формалин	14	29,4±3,28	32,2±2,97*

Примечания: Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$; * – статистически значимо по отношению к контролю, при непараметрическом распределении, тест Краскела-Уоллиса с пострестом Данна ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Это соответствует картине классического бифазного поведенческого ответа у грызунов на инъекцию формалина (Чайка А.В., Черетаев И.В., Хусаинов Д.Р., 2015; Ткачев С.Ю., 2020). Первая фаза наблюдения отражает реакцию болевых рецепторов на инъекцию, чем и объясняется отсутствие статистически значимых различий в продолжительности «потирания морды» для соединения РУ-31, ципрогептадина и диклофенака по сравнению с контролем. Препарат сравнения кеторолак по данному параметру показал статистически значимые отличия от контрольных значений, уменьшив продолжительность чесательных движений на 51%.

Во второй фазе наблюдения у крыс, предварительно получавших исследуемое вещество или препараты сравнения, было зафиксировано статистически значимое ($p < 0,05$) снижение времени, затраченного на болезненное поведение, в сравнении с контрольным значением. Исследуемое соединение РУ-31 уменьшало время, затраченное на груминг и чесательные движения, на 41%. Препараты сравнения ципрогептадин, диклофенак и кеторолак уменьшали продолжительность болевой реакции на 35%, 37% и 55% соответственно.

Таким образом, в орофациальном формалиновом тесте для соединения РУ-31 была выявлена значимая анальгетическая активность, не уступающая показателям препарата сравнения – кеторолака, и превосходящая показатели диклофенака и известного 5-НТ_{2/2A}-антагониста – ципрогептадина.

3.2.2 Анальгетическое действие в орофациальном формалиновом тесте с нитроглицериновой нагрузкой

Нитроглицерин и его производное оксид азота способны активировать провоспалительные цитокины, способствуя воспалению и вызывая сенсibilизации первичных афферентов – немиелинизированных волокон тройничного нерва. Активация афферентов тройничного нерва, в свою очередь, способствует высвобождению нейропептидов и нейрогенному отёку в мозговых оболочках (He W., 2019; Cavestro C., 2019; Kooshki R., 2020). Кроме того, нитроглицерин способен напрямую активировать афференты тройничного нерва, иннервирующие твердую мозговую оболочку, вызывая раннюю головную боль с последующей вазодилатацией, экстравазацией белка и воспалением твёрдой мозговой оболочки (Wen W., 2020). Известно, что нитроглицерин вызывает мигренозоподобные приступы, сопровождающиеся сенсibilизацией структур тройничного нерва и коры, лежащей в основе боли при мигрени (Harriott A.M., 2019; Demartini C. et al., 2019; Casili G. et al., 2020; Shu H., 2020; Xu W. J. et al., 2020).

Учитывая не только участие 5-НТ_{2A}-рецепторов в формировании процессов гипералгезии, а также этиопатогенетическую вовлечённость тригемино-васкулярной системы в развитие мигренозных атак, в исследовании была изучена анальгетическая активность соединения РУ-31 и препаратов сравнения *in vivo* в модифицированном варианте орофациального формалинового теста, с предварительным однократным внутрибрюшинным введением нитроглицерина (10 мг/кг) с целью индукции характерного для мигрени стойкого повышения возбудимости периферических и центральных звеньев тригемино-васкулярной системы (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Картина классического бифазного поведенческого ответа у грызунов на инъекцию формалина с предварительной интраперитонеальной нитроглицериновой нагрузкой сохранялась. При этом общая длительность болезненного поведения

животных контрольной группы с нитроглицериновой нагрузкой во второй фазе увеличилась на 30% (таблица 3.2.2.1).

Таблица 3.2.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутривенном введении на длительность болезненного поведения (потирания морды) крыс, вызванного подкожной инъекцией водного раствора формалина (1,5%, 50 мкл) в рецептивное поле в орофациальном формалиновом тесте с интраперитонеальной нитроглицериновой нагрузкой (10 мг/кг)

Группа	Доза, мг/кг	Длительность болезненного поведения, с	
		Фаза 1	Фаза 2
Контроль 1 + формалин	–	28,0±2,31	49,7±3,29
Контроль 2 + НГ + формалин	–	31,2±1,84	64,4±2,31 [•]
Диклофенак + НГ + формалин	2	26,2±3,24	32,7±3,32*
Кеторолак + НГ + формалин	3,5	25,3±2,96	31,2±4,22*
РУ-31+ НГ + формалин	10	27,1±0,58	19,3±3,15*
Ципрогептадин + НГ + формалин	14	27,5±0,58	34,7±3,71 [°]

Примечания: НГ – нитроглицерин. Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$; [•] – статистически значимо по отношению к контролю 1, при параметрическом распределении, t -тест ($p < 0,05$); * – статистически значимо по отношению к контролю 2, при параметрическом распределении, t -тест ($p < 0,05$); [°] – статистически значимо по отношению к контролю 2, при непараметрическом распределении, тест Манна-Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Соединение РУ-31 и препараты сравнения не оказывали статистически достоверного снижения времени болезненного поведения животных в первой фазе наблюдения.

Во второй фазе наблюдения у крыс, предварительно получавших исследуемое вещество или препараты сравнения, было зафиксировано статистически значимое ($p < 0,05$) снижение времени, затраченного на груминг и чесательные движения в сравнении с контрольным значением. Так, соединение РУ-31 снизило время болезненного поведения на 70%. Препараты сравнения ципрогептадин, диклофенак и

кеторолак уменьшали продолжительность болевой реакции 46%, 49% и 52% соответственно.

Таким образом, в орофациальном формалиновом тесте с нитроглицериновой нагрузкой для соединения РУ-31 было выявлено статистически значимое подавление болевой трансмиссии в тригемино-вазкулярной системе, значительно превосходящее показатели ципрогептадина, диклофенака и кеторолака.

Полученные данные свидетельствуют о наличии у соединения РУ-31 и препаратов сравнения ципрогептадина, диклофенака и кеторолака периферической анальгетической активности. Соединение РУ-31 по эффективности снижения продолжительности болезненного поведения в орофациальном формалиновом тесте незначительно превосходит эффективность препарата сравнения ципрогептадина, однако достоверных различий выявлено не было. Однако при нитроглицериновой модификации, отражающей одно из этиопатогенетических звеньев болевой передачи в тригемино-вазкулярном комплексе в период мигренозного приступа, соединение РУ-31 оказывало выраженное анальгетическое действие, статистически значимо превосходя препараты сравнения, что, учитывая значимость болевого синдрома при мигренозной патологии, весьма актуально для противомигренозного препарата.

3.3 Противовоспалительное действие

Известно, что 5-HT_{2A}-рецепторы вносят существенный вклад в формирование воспалительных реакций, а их функциональная активность является одной из ключевых в патогенезе воспалительной боли (Xue Y. et al., 2020; Liu Q. et al., 2020). В связи с чем, актуальным являлось исследование противовоспалительных эффектов соединения РУ-31, которое проводили на модели воспалительного отёка лапки крыс, вызванного субплантарным введением серотонина (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Серотонин опосредовал возникновение отёка лапки у экспериментальных животных, при этом в интактной контрольной группе (без субплантарного введения серотонина) развития воспаления и, соответственно, увеличения объёма лапки не выявлено (таблица 3.3.1).

Таблица 3.3.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения ципрогептадина и диклофенака при однократном внутривенном введении на показатели величины воспалительного отёка лапки крысы, вызванного субплантарным введением 0,01% раствора серотонина

Группа	Доза, мг/кг	Исходный объём, см ³	Конечный объём, см ³	Изменение объёма, см ³ (через 2 часа)
Интактный контроль	–	1,244±0,0412	1,241±0,0430	0,018±0,0059
Контроль + серотонин	–	1,169±0,0688	2,510±0,0278	1,341±0,0656*
Диклофенак + серотонин	2	1,381±0,0504	2,324±0,0929	0,943±0,0722*•
РУ-31 + серотонин	10	1,406±0,0513	2,269±0,0995	0,863±0,0819*•
Ципрогептадин + серотонин	14	1,244±0,0471	2,066±0,1223	0,823±0,1000*•

Примечания: Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$. • – различия достоверно относительно показателей группы интактного контроля, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$); * – различия достоверно относительно показателей группы контроля, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

В опытах, проведённых на крысах-самцах, было выявлено, что соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг вызывало подавление развития серотонинового отёка лапки крысы на 36%. Диклофенак в дозе 2 мг/кг способствовал снижению формирования отёка на 30%, а ципрогептадин в дозе 14 мг/кг – на 39% (таблица 3.3.2). При этом показанная величина противовоспалительного действия для соединения РУ-31 статистически незначимо уступала по эффективности ципрогептадину и превышала диклофенак.

Таблица 3.3.2 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения ципрогептадина и диклофенака при внутрижелудочном введении на выраженность воспалительного отека лапки крыс, вызванного субплантарным введением 0,01% раствора серотонина

Группа	Доза, мг/кг	Уменьшение объёма отёка ($\Delta\%$), относительно средних показателей группы контроля
Диклофенак + серотонин	2	30,0 \pm 5,36
РУ-31 + серотонин	10	35,9 \pm 6,09
Ципрогептадин + серотонин	14	39,2 \pm 7,38

Примечание: Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$. Статистическая обработка проводилась с применением однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$) с использованием программы GraphPad Prism v.8.0.

Таким образом, на модели серотонинового отёка лапки крыс было выявлено противовоспалительное действие соединения РУ-31, не уступающее препаратам сравнения ципрогептадину и диклофенаку.

3.4 Заключение

В результате исследования противомигренозного действия соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении установлена его способность эффективно снижать выраженность серотонин-индуцированного спазма сосудов в условиях ишемии на модели мигренозоподобного нарушения мозгового кровообращения в бассейне средней мозговой артерии. На основании полученных данных рассчитан процент снижения скорости мозгового кровотока (25,86 \pm 1,0 для соединения РУ-31 и 31,14 \pm 0,7 для ципрогептадина), согласно которому соединение РУ-31 превосходит препарат сравнения ципрогептадин на 17%.

Таким образом, для соединения РУ-31 доказано наличие мигренозоподобной активности при моделировании сосудистых серотониновых спазмов в условиях преходящей ишемии, что подтверждает и расширяет эффективность его использование в условиях острого и длительного нарушения мозгового кровотока.

В результате исследования анальгетической активности соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении в условиях, отражающих

этиопатогенетическую вовлеченность тригемино-васкулярной системы, выявлено выраженное обезболивающее действие. Установлено, что для соединения РУ-31 характерно подавление ноцицептивных проявлений в условиях периферического уровня организации боли (орофациальная формалиновая гипералгезия). Изучаемое вещество снижает характерные ноцицептивные реакции во II фазе ноцицептивного ответа на 41%, не уступая препаратам сравнения.

В исследовании анальгетической активности соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг при внутрижелудочном введении в модифицированном варианте орофациального формалинового теста, отражающего дополнительную индукцию возбудимости периферических и центральных звеньев тригемино-васкулярной системы, специфичной для приступов мигренозной атаки выявлено, что изучаемое вещество уменьшает ноцицептивное поведение грызунов во II фазе ноцицептивного ответа на 70%, значительно превосходя препараты сравнения.

При изучении влияния соединения РУ-31 на выраженность воспалительного отёка, индуцированного субплантарным введением раствора серотонина, установлено, что соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении способствовало снижению отёка лапки на 36%. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у соединения РУ-31 противовоспалительного действия.

Наличие мигренозоподобной, анальгетической и противовоспалительной активности в условиях характерных для мигренозной сосудистой патологии позволяют позиционировать соединение РУ-31 в качестве высокоэффективного противомигренозного агента с широким потенциалом действия.

ГЛАВА 4. ПСИХОТРОПНЫЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31

Серотонинергическая нейротрансмиссия играет ключевую роль в регуляции функций центральной нервной системы. Известно, что гиппокампальная формация, в особенности посредством активности зоны CA1, участвует в патогенезе мигренозного процесса (Delgado M. et al., 2005; Stein D.J. et al., 2007; Berthoux C. et al., 2019; Mann J.J. et al., 2019).

В ранее проведенных исследованиях было показано, что функционирование ГАМК-ергической системы гиппокампальной формации активно связано с серотонинергической системой, активность которой способна оказывать десинхронизирующее действие на нейрональную активность мозга крыс. Было выявлено, что соединение РУ-31 способно устранять данное нейрональное десинхронизирующее действие серотонина (Агацарская Я.В., 2019).

Кроме того, дисфункция серотонинергической системы является одним из основных факторов в основе патогенеза тревожных расстройств и депрессии, а фобические и депрессивные эффекты, возникающие в результате этих патологических состояний, опосредованы действием серотонина и его взаимодействием с 5-НТ-рецепторами, в том числе и центральными постсинаптическими 5-НТ_{2А} (Bubar M.J., Cunningham K.A., 2006; Benyamina A., Naassila M., Bourin M., 2012; Quesseveur G. et al., 2012).

Таким образом, 5-НТ_{2А}-блокаторы перспективны для терапии тревожных расстройств и депрессивных состояний, сопутствующих мигрени (Burch R., 2019; Zhang Q., 2019).

Кроме того, ранее было показано наличие выраженного анксиолитического действия для высокоактивного 5-НТ_{2А}-блокатора соединения РУ-476 (Мальцев Д.В., 2014), представляющего собой дигидронитратную соль 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]-бензимидазола, однако имеющую склонность к фотодеградации, что, в совокупности, свидетельствует о целесообразности проведения расширенного блока исследований психотропного профиля соединения РУ-31.

4.1 Анксиолитические свойства

Учитывая вовлечённость серотонина в осуществление физиологических поведенческих реакций, в частности процессы, связанные с развитием тревожных состояний (Leonard В.Е., 2006; Zangrossi Jr Н. et al., 2020), в исследовании была изучена способность соединения РУ-31 и препаратов сравнения, оказывать анксиолитическое действие (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

4.1.1 Исследование анксиолитической активности соединения РУ-31 и ципрогептадина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» изучается поведение грызунов в условиях естественного страха животных перед открытыми освещёнными участками установки, а также страха высоты и падения. В ходе исследования производили фиксацию ряда показателей, представленных в таблице 4.1.1.1.

Таблица 4.1.1.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на поведение крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Группа	Доза, мг/кг	Фиксируемые показатели		
		Латентное время до выхода в светлый рукав	Количество выходов в светлый рукав	Общее время в светлом рукаве, с
Контроль	–	21,6±1,09	1,1±0,13	13,8±1,44
Диазепам	1	19,5±1,98	2,3±0,25	70,0±3,82*
РУ-31	2	41,0±4,58	2,0±0,42	62,0±7,69*
	10	20,8±1,99	2,6±0,38*	63,3±4,85*
	30	62,3±6,39*	1,4±0,32	30,3±5,77
	50	81,8±5,34*	1,3±0,45	21,0±7,79
Ципрогептадин	14	33,3±5,13	0,6±0,18	6,8±2,87
Группа	Доза, мг/кг	Фиксируемые показатели		
		Реактивность	Количество переходов	Общее время нахождения в центре, с
Контроль	–	1,5±0,27	1,6±0,26	15,3±3,34

Диазепам	1	3,4±0,71	5,8±0,65*	14,0±2,71
РУ-31	2	2,4±0,42	5,9±0,40*	27,6±10,15
	10	3,1±0,48	4,9±0,69	13,6±6,81
	30	10,4±4,66	5,3±0,62*	28,0±10,14
	50	10,3±2,16*	1,8±0,59	9,9±1,76
Ципрогептадин	14	18,0±3,97*	3,4±0,46	24,9±7,39
Группа	Доза, мг/кг	Фиксируемые показатели		
		Количество сवेशиваний	Количество выглядываний	Болюсы
Контроль	–	1,9±0,52	4,5±0,60	0,9±0,40
Диазепам	1	6,5±0,94*	3,8±0,31	1,3±0,73
РУ-31	2	6,6±0,75*	2,5±0,53	1,0±0,38
	10	5,8±0,77	1,9±0,35	0,8±0,49
	30	2,8±0,62	2,4±0,42	1,9±0,52
	50	2,8±1,07	1,6±0,38*	1,5±0,50
Ципрогептадин	14	2,1±0,48	0,4±0,26*	2,6±0,86

Примечания. Препараты сравнения исследованы в средней эффективной дозе. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при непараметрическом распределении, тест Краскелла-Уолесса с пострестом Данна ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Так, животные контрольной группы практически не выходили более одного раза в открытый рукав, а время пребывания в нем составляло не более 8% от всего периода наблюдения. Низкий показатель количества переходов между рукавами лабиринта у данной группы также характеризует наличие тревожности и уменьшение исследовательского интереса животных.

Развитие анксиолитического эффекта оценивали по увеличению числа заходов в светлые рукава и времени нахождения в них. Так, у крыс, получавших диазепам, повышалось количество выходов в светлый рукав более чем в 2 раза, а также

увеличивалось время пребывания в нем в 5 раз. Данный факт может свидетельствовать о развитии анксиолитического эффекта у животных под действием диазепама.

У животных под действием соединения РУ-31 в дозе 2 мг/кг было зарегистрировано статистически незначимое увеличение количества выходов в светлый рукав, а также статистически значимое (по отношению к контрольной группе) увеличение времени нахождения в светлом рукаве, соответствующее препарату сравнения диазепаму. Таким образом, для соединения РУ-31 в дозе 2 мг/кг была продемонстрирована тенденция к развитию анксиолитического действия.

При изучении данных о поведенческой активности животных в группе, получавшей действием РУ-31 в дозе 10 мг/кг выявлено увеличение общего время в светлом рукаве статистически превосходит аналогичный показатель контроля, а также статистически значимое увеличение количества выходов в светлый рукав, соответствующее по данному показателю в группе животных, получавшей диазепам. В результате для соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг была показана анксиолитическая активность, сопоставимая с препаратом сравнения диазепамом.

Под действием соединения РУ-31 в дозе 30 мг/кг была замечена тенденция к снижению анксиолитического действия. Так, общее время нахождения в светлом рукаве и количество выходов остаются на достаточно высоком уровне в сравнении с контрольной группой, однако различия статистически незначимы.

В результате изучения соединения РУ-31 в дозе 50 мг/кг было показано дальнейшее снижение анксиолитического эффекта. Так, отмечено уменьшение количества выходов в светлый рукав, а также снижение общего времени, проведенного в нём по сравнению с группами животных, получавших соединение РУ-31 в дозах 2, 10 и 30 мг/кг.

Для препарата сравнения ципрогептадина, наличие анксиолитической активности выявлено не было. Так, количество выходов в светлый рукав, а также время, проведенное в открытом отсеке установки, не превышали значения данных показателей для контрольной группы животных.

Таким образом, для соединения РУ-31 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» было показано наличие анксиолитической активности, при этом, наиболее выражено эффект проявлялся в дозе 10 мг/кг.

4.1.2 Исследование анксиолитического действия соединения РУ-31 в тесте «Наказуемого взятия воды» по Vogel

Методика конфликтной ситуации по Vogel основана на создании у животных состояния беспокойства, тревоги и страха с использованием наказующего раздражителя, подавляющего проявления условного и безусловного поведения (Vogel J.R., Beer В., Clody D.E., 1971; Миронов А.Н. и др., 2012).

Большинство животных контрольной группы, после получения удара электрическим током после первого подхода к поилке, в течение наблюдаемого периода, больше не совершало попыток утолить жажду, в связи с чем, время первого подхода к поилке (после первого использования наказующего раздражителя) составляло весь период наблюдения (таблица 4.1.2.1).

Таблица 4.1.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на поведение крыс в тесте «Наказуемое взятие воды по Vogel»

Группы	Доза, мг/кг	Время первого подхода к поилке, с	Время второго подхода к поилке, с	Число подходов к поилке
Контроль	–	30,4±5,09	586,6±8,90	0,3±0,16
Диазепам	1	28,7±1,80	205,1±8,05*	2,8±0,25*
РУ-31	2	36,5±5,20	200,6±9,03*	2,8±0,31*
	10	34,5±1,50	211,0±8,05*	3,5±0,19*
	30	33,8±1,26	227,6±6,92*	4,0±0,27*
	50	34,8±1,05	232,6±5,80*	4,9±0,52*
Ципрогептадин	14	54,4±7,91	336,6±13,29	1,1±0,13

Примечания: препараты сравнения исследованы в средней эффективной дозе. Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при непараметрическом распределении, тест Краскелла-Уолесса с посттестом Данна ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

В группе животных, получавших диазепам, было отмечено снижение страха перед наказанием. Так, время подхода к поилке после удара током (второго подхода к поилке)

снижалось в 2,9 раза, при этом, увеличивалось общее количество попыток утолить жажду, что свидетельствует о развитии анксиолитического эффекта.

У животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 2 мг/кг, отмечалось статистически значимое по отношению к контрольной группе уменьшение времени второго подхода к поилке. При этом, было выявлено статистически достоверное увеличение количества подходов к поилке.

У животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, было выявлено статистически значимое снижение времени подхода к поилке после первого удара тока, а также количества подходов к поилке. По обоим показателям соединение РУ-31 значительно превосходило препарат сравнения, проявляя выраженный анксиолитический эффект. В дозах 30 и 50 мг/кг наблюдает некоторое увеличение времени подхода к поилке после первого удара током, однако статистически значимо превосходящее данный параметр контрольной группы. При этом, количество подходов к поилке статистически значимо увеличивалось.

У животных, получавших ципрогептадин, было отмечено статистически незначимое уменьшение времени подхода к поилке после удара током, однако количество подходов не отличалось от контрольной группы.

Таким образом, наиболее выраженная анксиолитическая активность соединения РУ-31 в тесте «Наказуемое взятия воды» по Vogel была выявлена в дозах 2 и 10 мг/кг. В дозах 30 и 50 мг/кг было зарегистрировано снижение анксиолитического эффекта.

3.2 Антидепрессивные эффекты

Серотониновые рецепторы 2А типа вовлечены в патогенез депрессивных состояний (Gawliński D. et al., 2019; Steinberg L.J. et al., 2019), в связи с чем, в исследовании была изучена способность соединения РУ-31 и препаратов сравнения, оказывать антидепрессивное действие (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Существенных изменений в поведении животных до посадки в установку зарегистрировано не было. Так, крысы из опытных групп вели себя без видимых отклонений в сравнении с контрольными особями. С момента начала времени фиксации изучаемого параметра (времени «активного сопротивления»), для животных отмечали

изменение латентного времени «замирания». Препарат сравнения – имипрамин, в дозе 10 мг/кг, после трехкратного введения вызывал выраженное повышение времени активного сопротивления практически в 4 раза, в сравнении с результатами контрольной группы животных (таблица 4.1.2.1).

Таблица 4.1.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при внутрижелудочном введении на поведение крыс в тесте «Принудительное плавание по Porsolt»

Группа	Доза, мг/кг	Время «активного сопротивления», с
Контроль	–	47,3±5,47
Имипрамин	10	202,0±3,44*
РУ-31	2	196,1±3,57*
	10	128,5±6,77*
	30	122,9±2,92*
	50	106,4±12,77
Ципрогептадин	14	63,4±4,48

Примечания. Препараты сравнения исследованы в средней эффективной дозе. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при параметрическом распределении, однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Бонферрони ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Соединение РУ-31 в дозе 2 мг/кг достоверно увеличивало продолжительность попыток животного покинуть пределы экспериментальной установки в 4 раза, незначительно уступая группе препарата сравнения имипрамина.

В дозе 10 и 30 мг/кг вещество увеличивало продолжительность попыток животного покинуть пределы экспериментальной установки более чем в 2 раза, с тенденцией к снижению антидепрессивного эффекта с увеличением дозы.

В дозе 50 мг/кг отмечено снижение антидепрессивного эффекта соединения РУ-31, исследуемый показатель статистически незначимо превышал контрольные измерения.

После интрагастрального введения ципрогептадина зарегистрировано незначительное отклонение фиксируемого показателя от контрольного значения.

В результате изучения антидепрессивного эффекта было показано, что соединение РУ-31 в дозе 2 мг/кг проявляет выраженные антидепрессивные эффекты, соответствующие препарату сравнения имипрамину. С увеличением дозы, наблюдается снижение антидепрессивной активности.

4.3 Заключение

Таким образом, по результатам проведенного исследования, можно утверждать о способности соединения РУ-31 снижать чувство тревоги и страха в различных тестах, отражающих анксиогенез. По уровню проявляемого эффекта соединение РУ-31 во всем диапазоне исследуемых доз проявляло анксиолитическое действие по уровню активности соизмеримое с диазепамом в дозе 1 мг/кг. Наиболее выраженное антифобическое действие было выявлено в дозе 10 мг/кг, с дальнейшим увеличением дозы отмечено снижение оказываемого эффекта. Для препарата сравнения ципрогептадина наличие антифобического действия показано не было.

В результате изучения антидепрессивного эффекта было показано, что соединение РУ-31 в дозе 2 и 10 мг/кг проявляет выраженную антидепрессивную активность, сопоставимую с препаратом сравнения имипрамином в дозе 10 мг/кг. С увеличением дозы зафиксировано снижение выраженности антидепрессивного эффекта. Для препарата сравнения ципрогептадина наличие антидепрессивной активности выявлено не было.

Таким образом, наличие у соединения РУ-31 антимигренозной, а также выявленной антифобической и антидепрессивной активности расширяет терапевтический потенциал данного агента.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КОАГУЛЯЦИЮ КРОВИ

Мигренозные атаки часто сопровождаются изменениями гемореологии, что патогенетически определяется нейроваскулярными изменениями, а также гемореологическими изменениями, такими как гиперкоагуляция и повышенная вязкость крови, что в совокупности, приводит к ухудшению кровотока в системе мелких сосудов, а это, в свою очередь, усугубляет течение патологического процесса (Табеева Г.Р., 2010; Harriott A.M., Barrett K.M., 2015; Mawet J., 2015; Табеева Г.Р., 2017; Садоха К.А. и др., 2019).

Известно, что активация 5-НТ₂-рецепторов вызывает констрикцию мозговых сосудов, изменяет проницаемость капилляров и повышает агрегацию тромбоцитов (Kaun G., Krishan P., 2020). Серотонин вовлечён в регуляцию сосудистого тонуса и вязкость крови, в частности процессы, связанные с развитием микроциркуляторной патологии при мигрени, при этом синдром гипервязкости сопровождается повышением числа клеток крови, повышением внутренней вязкости эритроцитов, изменение механических свойств мембраны, усилением их агрегации (Bamalan O.A., Khalili Y., 2019).

В ранее проведённых исследованиях, для соединения РУ-31 было показано наличие выраженного антиагрегантного действия в условиях моделирования агрегации тромбоцитов, индуцированной введением серотонина, а также коллагеном, А23187, аденозиндифосфатом. Кроме того, соединение РУ-31 оказывало антитромбогенное действие в условиях тромбоза, индуцированного хлоридом железа (Агацарская Я.В., 2019).

Учитывая тесное взаимодействие тромбоцитарного звена, реологических свойств и коагуляционного потенциала, актуальным является исследование способности соединения РУ-31 влиять на реологические и коагуляционные свойства крови. Исследование гемореологических свойств было проведено в два этапа – *in vitro*, при моделировании «синдрома повышенной вязкости» и *in vivo*.

5.1 Гемореологическая активность *in vitro*

Изучение способности соединения РУ-31 и препаратов сравнения, оказывать влияние на реологические свойства крови проводили при моделировании «синдрома

повышенной вязкости» *in vitro*. В ходе этого исследования изучали влияние соединения РУ-31 на вязкость крови, агрегацию эритроцитов в аутологичной плазме и деформируемость отмытых эритроцитов, ресуспендированных в буфере (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

5.1.1 Влияние соединения РУ-31 на вязкостные характеристики крови кроликов при моделировании «синдрома повышенной вязкости»

Моделирование «синдрома повышенной вязкости» производили путём термостатирования образцов (таблица 5.1.1.1).

Таблица 5.1.1.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения на вязкость крови кроликов, подвергшейся тепловому воздействию с целью моделирования «синдрома повышенной вязкости» (температура – 42⁰С, период инкубации – 1 час) *in vitro*

Группа	Концентрация, мкМ	мПа*с					
		300 с ⁻¹	200 с ⁻¹	100 с ⁻¹	50 с ⁻¹	20 с ⁻¹	10 с ⁻¹
Интактный контроль	–	4,3±0,11	4,4±0,12	4,9±0,11	6,1±0,18	7,7±0,25	9,6±0,49
Контроль (моделирование гипервязкости)	–	4,8±0,11•	5,0±0,12•	6,1±0,26•	7,5±0,32•	9,9±0,46•	13,1±0,58•
Пентоксифиллин (моделирование гипервязкости)	100	4,0±0,21*	4,1±0,21*	5,1±0,30*	6,5±0,51	8,6±0,47	11,2±0,87
РУ-31 (моделирование гипервязкости)	0,1	4,5±0,26	4,6±0,24	5,5±0,32	7,1±0,51	9,5±0,77	12,2±1,17
	1	4,1±0,23*	4,2±0,23*	4,9±0,35*	6,3±0,52	8,6±0,75	11,3±1,43
	10	4,0±0,30*	4,1±0,28*	4,7±0,29*	5,8±0,35*	7,7±0,53*	9,5±0,92*
Ципрогептадин (моделирование гипервязкости)	0,1	4,3±0,13*	4,4±0,15*	5,4±0,27*	6,8±0,46	9,1±0,67	11,7±1,21
	1	4,2±0,13*	4,3±0,15*	5,2±0,17*	6,8±0,32	9,2±0,41	11,6±0,70
	10	4,1±0,25*	4,1±0,21*	4,8±0,31*	6,4±0,53	7,6±0,65*	9,5±0,89*

Примечания: с⁻¹ – обратные секунды. Данные представлены в виде М±т (среднее ± стандартная ошибка), n=6; • – различия достоверны относительно показателей измерений интактного контроля, при непараметрическом распределении, с использованием U-критерия Манна-Уитни (p<0,05); * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений (моделирование гипервязкости), при непараметрическом распределении, с использованием U-критерия Манна-Уитни (p<0,05). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Так, выявлено статистически значимое увеличение вязкости прогретых образцов крови во всем диапазоне исследуемых скоростей сдвига – при скорости сдвига 300 с^{-1} вязкость крови возросла на 10%; 50 с^{-1} – на 19%; 10 с^{-1} – на 27%.

При добавлении к образцам крови, подвергшихся тепловому воздействию пентоксифиллина в концентрации 100 мкМ, наблюдается общая тенденция снижения вязкости крови при высоких скоростях сдвига. Так, при скорости сдвига от 300 с^{-1} до 100 с^{-1} снижение вязкости крови в сравнении с контрольными образцами, подвергшихся тепловому воздействию, в среднем составило 17% ($p < 0,05$). В более низком диапазоне скоростей сдвига также наблюдается снижение вязкости крови, однако достоверных различий по отношению к контрольным измерениям при моделировании патологии выявлено не было.

Показатели вязкости крови под действием соединения РУ-31 в концентрации 0,1 мкМ достоверно не изменялись. Однако, значения вязкости крови под действием соединения РУ-31 в концентрации 1 мкМ достоверно снижались по отношению к контролю (при моделировании гипертермии) при высоких скоростях сдвига. Так, при скорости сдвига от 300 с^{-1} до 100 с^{-1} снижение вязкости крови в сравнении с контрольными образцами, подвергшихся тепловому воздействию, в среднем составило 17% ($p < 0,05$). В концентрации 10 мкМ соединение РУ-31 оказывало влияние на вязкостные характеристики во всем диапазоне скоростей сдвига. Так, в диапазоне скоростей сдвига от 300 с^{-1} до 100 с^{-1} снижение вязкости крови в сравнении с контрольными образцами, подвергшихся тепловому воздействию, в среднем составило 19%, от 50 с^{-1} до 20 с^{-1} – 23%, при 10 с^{-1} – 27%.

При добавлении к образцам крови, подвергшихся тепловому воздействию ципрогептадина наблюдалась общая тенденция снижения вязкости крови при высоких скоростях сдвига во всем диапазоне изучаемых концентраций, несколько превосходя по уровню активности соединение РУ-31. Однако изменения реологических свойств крови при низких скоростях сдвига наблюдалась только в концентрации 10 мкМ. При скоростях сдвига 20 с^{-1} изменения составили 23%, при 10 с^{-1} – 27%, что соответствует по величине активности соединению РУ-31 в данной концентрации.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено, что наибольшую активность соединения РУ-31 и ципрогептадин демонстрируют в концентрации 10 мкМ, сопоставимую с пентоксифиллином в концентрации 100 мкМ.

5.1.2 Влияние соединения РУ-31 на параметры агрегации эритроцитов кроликов в аутологичной плазме при моделировании «синдрома повышенной вязкости»

Моделирование «синдрома повышенной вязкости» путём термостатирования образцов крови приводило к статистически значимому увеличению показателей агрегации эритроцитов в аутологичной плазме (таблица 5.1.2.1). Так, при тепловом воздействии, степень агрегации эритроцитов образцов увеличилась на 54% по сравнению с интактными пробами.

Таблица 5.1.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения на агрегацию эритроцитов крови кроликов в аутологичной плазме, подвергшейся тепловому воздействию с целью моделирования «синдрома повышенной вязкости» (температура – 42⁰С, период инкубации – 1 час) *in vitro*

Группа	Концентрация, мкМ	ПА, у.е.
Интактный контроль	–	0,12±0,027
Контроль (моделирование гипервязкости)	–	0,26±0,026 [•]
Пентоксифиллин (моделирование гипервязкости)	100	0,07±0,014*
РУ-31 (моделирование гипервязкости)	0,1	0,27±0,082
	1	0,07 ±0,014*
	10	0,06±0,006*
Ципрогептадин (моделирование гипервязкости)	0,1	0,22±0,057
	1	0,09±0,019*
	10	0,07±0,003*

Примечания: ПА – показатель агрегации (отношение количества агрегатов к количеству эритроцитов). Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. [•] – различия достоверны относительно показателей измерений интактного контроля, при непараметрическом распределении, с использованием *U*-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$); * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений (моделирование гипервязкости), при непараметрическом распределении, с использованием *U*-критерия Манна-

Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

При добавлении к образцам крови, подвергшихся тепловому воздействию, пентоксифиллина в концентрации 100 мкМ происходило снижение агрегации эритроцитов на 73%.

Для соединения РУ-31 в концентрации 0,1 мкМ не отмечалось влияние на выраженность агрегации эритроцитов, однако с повышением концентрации до 1 и 10 мкМ наблюдалось достоверное снижение данного показателя на 73% и 77% соответственно.

При добавлении ципрогептадина к пробам крови, подвергшихся тепловому воздействию, в концентрации 0,1 мкМ влияния на эритроциты выявлено не было. При увеличении концентрации ципрогептадина до 1 и 10 мкМ наблюдалось значимое снижение агрегации эритроцитов на 65% и 73% соответственно.

Таким образом, наиболее выраженное действие на агрегационную способность эритроцитов в аутологичной плазме соединения РУ-31 оказывает в концентрациях 1 и 10 мкМ, по уровню активности, не уступая препарату сравнения пентоксифиллину в концентрации 100 мкМ и превосходя препарат сравнения ципрогептадин.

5.1.3 Влияние соединения РУ-31 на деформируемость отмытых эритроцитов кроликов при моделировании «синдрома повышенной вязкости»

Деформируемость эритроцитов оценивалась двумя способами – косвенным, путём измерения вязкости суспензии отмытых эритроцитов, и прямым, путём измерения степени элонгации эритроцитов в проточной микрокамере.

Моделирование «синдрома повышенной вязкости» путём термостатирования образцов крови с последующей отмывкой и ресуспендированием буфером приводило к статистически достоверному повышению её вязкости, что косвенно свидетельствует об ухудшении деформируемости эритроцитов (таблица 5.1.3.1).

Таблица 5.1.3.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения на вязкость суспензии отмытых эритроцитов кроликов, подвергшейся тепловому воздействию с целью моделирования «синдрома повышенной вязкости» (температура – 42⁰С, период инкубации – 1 час) *in vitro*

Группа	Концентрация, мкМ	мПа*с		
		300 с ⁻¹	30 с ⁻¹	3 с ⁻¹
Интактный контроль	–	2,7±0,06	4,1±0,05	7,2±0,26
Контроль (моделирование гипервязкости)	–	3,0±0,02*	4,6±0,15*	8,4±0,18*
Пентоксифиллин (моделирование гипервязкости)	100	2,7±0,10•	4,2±0,24	7,2±0,24•
РУ-31 (моделирование гипервязкости)	1	2,9±0,11	4,4±0,29	7,9±0,36
Ципрогептадин (моделирование гипервязкости)	1	2,8±0,05•	4,5±0,13	7,8±0,11•

Примечания: с⁻¹ – обратные секунды. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; • – различия достоверны относительно показателей измерений интактного контроля, при непараметрическом распределении, с использованием *U*-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$); * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений (моделирование гипервязкости), при непараметрическом распределении, с использованием *U*-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы *GraphPad Prism v.8.0*.

При добавлении к суспензии отмытых эритроцитов, подвергшихся тепловому воздействию, пентоксифиллина в концентрации 100 мкМ отмечено снижение вязкости суспензии при высоких и низких скоростях сдвига. Так, при скоростях сдвига 300 с⁻¹ и 3 с⁻¹ снижение вязкости в сравнении с контрольными образцами, подвергшихся тепловому воздействию составило 10% и 14% соответственно ($p < 0,05$).

Соединение РУ-31 в концентрации 1 мкМ не оказывало статистически достоверного влияния на вязкость суспензии отмытых эритроцитов. При этом, ципрогептадин в концентрации 1 мкМ, достоверно снижал вязкость суспензии при скоростях сдвига 300 с⁻¹ и 3 с⁻¹ в среднем на 7%.

Кроме того, для определения влияния соединений на деформируемость эритроцитов использовали прямой метод измерения степени элонгации эритроцитов в проточной микрокамере. Экспериментальный синдром повышенной вязкости крови

сопровождается изменениями структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов, что подтверждается уменьшением деформируемости красных клеток крови (таблица 5.1.3.2). При этом индекс удлинения эритроцитов достоверно уменьшался на 32%.

Таблица 5.1.3.2 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения на деформируемость эритроцитов кроликов, подвергшейся тепловому воздействию с целью моделирования «синдрома повышенной вязкости» (температура – 42⁰С, период инкубации – 1 час) *in vitro*

Группа	Концентрация, мкМ	ИДЭ, у.е.
Интактный контроль	–	0,28±0,008
Контроль (моделирование гипервязкости)	–	0,19±0,007 [•]
Пентоксифиллин (моделирование гипервязкости)	100	0,26±0,010*
РУ-31 (моделирование гипервязкости)	1	0,21±0,007
Ципрогептадин (моделирование гипервязкости)	1	0,20±0,012

Примечания: ИДЭ – индекс деформации эритроцитов, Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; [•] – различия достоверны относительно показателей измерений интактного контроля, при непараметрическом распределении, с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$); * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений (моделирование гипервязкости), при непараметрическом распределении, с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Следует отметить, что пентоксифиллин статистически достоверно увеличивал деформируемость эритроцитов крови кроликов на 37%.

Соединение РУ-31 и ципрогептадин не оказывали достоверных изменений на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов кролика.

Таким образом, соединение РУ-31 не оказывало статистически достоверных изменений на вязкостные характеристики суспензии отмытых эритроцитов и структурно-функциональные свойства их мембран.

5.2 Гемореологические эффекты *in vivo*

Учитывая выявленные *in vitro* гемореологические эффекты соединения РУ-31, а именно влияние на вязкостные характеристики и агрегацию эритроцитов в аутологичной плазме в условиях моделирования «синдрома повышенной вязкости», целесообразным являлось изучение способности соединения РУ-31 и препаратов сравнения, оказывать влияние на реологические свойства крови *in vivo* на крысах (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

5.2.1 Влияние соединения РУ-31 на вязкостные характеристики крови крыс

Пентоксифиллин, вводимый животным внутрижелудочно, проявлял общую тенденцию снижения вязкости крови (таблица 5.2.1.1).

Таблица 5.2.1.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на вязкость крови крыс

Группа	Доза, мг/кг	мПа*с					
		300 с ⁻¹	200 с ⁻¹	100 с ⁻¹	50 с ⁻¹	20 с ⁻¹	10 с ⁻¹
Контроль	–	4,0±0,09	4,1±0,05	5,0±0,11	6,5±0,26	8,7±0,43	11,3±0,52
Пентоксифиллин	4	3,6±0,04*	3,7±0,05*	4,4±0,12*	5,3±0,11*	7,3±0,33*	8,8±0,49*
РУ-31	10	3,6±0,14*	3,7±0,17*	4,3±0,20*	5,5±0,37	7,2±0,38*	8,8±0,56*
Ципрогептадин	14	3,9±0,26	4,0±0,25	4,7±0,32	5,8±0,51	7,3±0,27*	9,6±0,15*

Примечания: с⁻¹ – обратные секунды. Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при параметрическом распределении, с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Так, показатели вязкости крови, при высоких скоростях сдвига в среднем снижены на 11%, а при скорости сдвига 10 с⁻¹ сжижение вязкости достигло 22% ($p < 0,05$).

Соединение РУ-31 при высоких скоростях оказывало достоверное снижение вязкости крови сопоставимое с пентоксифиллином – 11%. Аналогичные данные получены и при скорости сдвига 10 с⁻¹ – 22%.

Ципрогептадин достоверное изменение вязкости крови оказывал при низких скоростях сдвига – в среднем снижая её на 16%, несколько уступая препарату сравнения пентоксифиллину.

Таким образом, выявлено, что соединение РУ-31 при внутрижелудочном введении демонстрирует влияние на вязкость крови сопоставимую с пентоксифиллином.

5.2.2 Влияние соединения РУ-31 на параметры агрегации эритроцитов крыс в аутологичной плазме

Пентоксифиллин, введённый внутрижелудочно, вызывал достоверное снижение степени агрегации эритроцитов на 31% по сравнению с интактными пробами (таблица 5.1.2.1).

Таблица 5.2.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на агрегацию эритроцитов крови крыс в аутологичной плазме

Группа	Доза, мг/кг	ПА, у.е.
Контроль	–	0,62±0,062
Пентоксифиллин	4	0,43±0,039*
РУ-31	10	0,44±0,072*
Ципрогептадин	14	0,72±0,110

Примечания: ПА – показатель агрегации. Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при параметрическом распределении, с использованием t -критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Соединение РУ-31 сопоставимо с пентоксифиллином вызывал достоверное снижение уровня агрегация эритроцитов – на 29%. Ципрогептадин не оказывал достоверного влияния на агрегационную способность эритроцитов.

Таким образом, соединение РУ-31 уменьшает агрегацию эритроцитов в аутологичной плазме, по уровню активности сопоставимую с препаратом сравнения пентоксифиллином.

5.2.3 Влияние соединения РУ-31 на деформируемость отмытых эритроцитов крыс

В образцах крови, отобранных у животных, внутрижелудочно получавших пентоксифиллин, и в последствии отмытых и ресуспендированных буфером, отмечено статистически достоверное снижение вязкости крови при высокой и низкой скоростях сдвига в среднем на 10%, что косвенно свидетельствует об улучшении деформируемости мембран эритроцитов (таблица 5.1.3.1).

Таблица 5.2.3.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на вязкость суспензии отмытых эритроцитов и их деформируемость

Группа	Доза, мг/кг	мПа*с			ИДЭ, у.е.
		300 с ⁻¹	30 с ⁻¹	3 с ⁻¹	
Контроль	–	3,4±0,06	5,6±0,08	10,3±0,13	0,27±0,007
Пентоксифиллин	4	3,1±0,02*	5,3±0,08	9,3±0,11*	0,25±0,004
РУ-31	10	3,3±0,07	5,6±0,08	9,9±0,22	0,27±0,005
Ципрогептадин	14	3,3±0,06	5,5±0,12	10,1±0,19	0,25±0,004

Примечания: с⁻¹ – обратные секунды; ИДЭ – индекс деформации эритроцитов. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, при непараметрическом распределении, с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Соединение РУ-31 и ципрогептадин не оказывал влияние на вязкостные характеристики крови и деформируемость суспензии отмытых эритроцитов.

5.3 Антикоагуляционное действие

Изменение свёртываемости крови при мигренозных атаках ухудшает кровоток в системе мелких сосудов, что усугубляет течение патологического процесса (Tietjen G. E., Collins S. A., 2018). Учитывая это, а также возможность влияния ципрогептадина на выраженность эффектов непрямых антикоагулянтов (D'Amico J.M., 2013), в исследовании была изучена способность соединения РУ-31 и препаратов сравнения, а

также комбинации соединения РУ-31 и варфарина, изменять коагуляционные свойства крови.

Для исследования влияния соединения РУ-31 на гемостаз проводили определение времени свертывания крови при помощи модели «Время кровотечения на крысах» (материалы и методы подробно представлены в главе 2). Так, время кровотечения из хвоста крыс контрольной группы составило в среднем 31 секунды (таблица 5.3.1).

Таблица 5.3.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при внутрижелудочном введении на время кровотечения из хвоста крыс

Группа	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с
Контроль	–	30,8±2,46
Варфарин	0,04	71,0±9,33*
Варфарин + РУ-31	0,04+10	76,7±2,88*
РУ-31	10	39,2±4,37
Ципрогептадин	14	39,2±0,87

Примечания: препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

У животных, получивших варфарин, достоверно увеличивалось время кровотечения на 56% по сравнению с контрольной группой животных. При совместном введении варфарина и соединения РУ-31, время кровотечения достоверно увеличилось на 60% по сравнению с контрольной группой.

Статистически незначимое удлинение времени кровотечения крови наблюдалось у животных, получивших соединение РУ-31 и ципрогептадин (в среднем на 9 секунд по сравнению с контрольной группой).

В ходе изучения коагуляционного звена гемостаза (материалы и методы подробно представлены в главе 2) были определены тромбиновое, протромбиновое, активированное парциальное тромбопластиновое время и содержание фибриногена (таблица 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения при внутрижелудочном введении на параметры коагулограммы интактных крыс

Группа	Доза, мг/кг	ТВ	ПТВ	АПТВ	Фибриноген
Контроль	–	31,7±0,76	19,0±2,13	27,5±2,07	5,9±0,10
Варфарин	0,04	41,7±2,05*	28,0±2,81*	45,8±2,01*	6,7±0,31
Варфарин + РУ-31	0,04+10	50,3±2,96*•	37,9±2,92*•	45,3±2,54*	6,4±0,28
РУ-31	10	35,2±1,62	26,7±0,73	27,0±1,92	6,3±0,27
Ципрогептадин	14	36,0±2,42	24,5±1,61	26,6±2,80	6,4±0,22

Примечания: ТВ – тромбиновое время; ПТВ – протромбиновое время; АПТВ – активированное парциальное тромбластиновое время. Препараты сравнения исследованы в средних эффективных дозах. Данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$; * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$). • – данные достоверны по отношению к варфарину, с использованием t -критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Продолжительность тромбинового времени, отражающего общее время свёртывания, у группы животных, получающих варфарин, достоверно увеличивалась на 24%, при этом комбинация варфарина и соединения РУ-31 достоверно увеличивала продолжительность изучаемого параметра на 37% и на 17%, по сравнению с контрольной группой животных и группой, получавшей только варфарин соответственно. Соединение РУ-31 и ципрогептадин статистически недостоверно увеличивал данный показатель.

У животных, получающих варфарин, продолжительность протромбинового времени, отражающего внешний и общий путь свёртывания крови, достоверно увеличивалась на 32%. В группе животных, получающих варфарин совместно с соединением РУ-31 было выявлено выраженное удлинение данного показателя по сравнению с контрольной группой животных – на 50%, также статистически значимо превосходящий данный показатель у группы животных, получавших только варфарин. У животных, получающих соединение РУ-31 и ципрогептадин, было выявлено недостоверное незначительное увеличение протромбинового времени свёртывания.

В группе животных, получающих варфарин и в группе животных, получающих варфарин, совместно с РУ-31 активированное частичное тромбопластиновое время свёртывания, отражающее внутренний и общий путь свёртывания крови, увеличивалось в среднем на 39%, однако между собой достоверно не отличались. На скорость свёртывания крови по внутреннему пути активации соединения РУ-31 и ципрогептадин не оказывали влияние.

Таким образом, было выявлено, что соединение РУ-31 не оказывает достоверного влияния на показатели свёртывающей системы крови. Так, соединение РУ-31 не изменяет «время кровотечения» и показатели коагулограммы. Однако, в группе животных, получающих варфарин в комбинации с соединением РУ-31, выявлены удлинение тромбинового и протромбинового времени свёртывания крови, что свидетельствует об усилении влияния комбинации на процессы свёртывания крови по внешнему пути активации.

5.4 Заключение

Таким образом, в ходе проведённого исследования показано, что соединение РУ-31 оказывает влияние на вязкость крови в условиях моделирования «синдрома гипервязкости» *in vitro* и у интактных животных при однократном внутривенном введении, по уровню активности сопоставимое с препаратом сравнения пентоксифиллином.

Кроме того, соединение РУ-31 способно снижать агрегацию эритроцитов в плазме в условиях повышенной вязкости крови. Однако, деформируемость суспензии отмытых эритроцитов, без влияния различных компонентов плазмы, соединение РУ-31 не изменяет, что свидетельствует о его воздействии на плазменный компонент данного показателя.

В результате исследования антикоагуляционных свойств было выявлено, что соединение РУ-31 не оказывает достоверного влияния на показатели свёртывающей системы крови. Однако, комбинация варфарина и соединения РУ-31 приводит к удлинению протромбинового и тромбинового времени, что свидетельствует об усилении влияния комбинации на процессы свёртывания крови по внешнему пути активации.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ 5-HT_{2A}-АНТАГОНИСТА СОЕДИНЕНИЯ РУ-31 НА ПЕРЕДАЧУ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ

Серотониновый рецептор подтипа 2A является метаботропным G-белок-сопряжённым рецептором. Известно, что 5-HT_{2A}-рецепторы соединяются преимущественно с сигнальным каскадом, осуществляемым белком Gαq. После стимуляции рецептора агонистом, субъединицы Gαq и βγ диссоциируют, что приводит к инициации нисходящих эффекторных сигнальных каскадов. Gαq стимулирует активность фосфолипазы C, гидролизующей фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой и вызывающей высвобождение диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Это, в свою очередь, приводит к активации протеинкиназы C и выделению ионов кальция (Seyedabadi M., Ghahremani M.H., Albert P.R., 2019).

Кроме того, у 5-HT_{2A} рецепторов имеется множество дополнительных пострецепторных сигнальных каскадов, помимо основного. В частности, эти дополнительные сигнальные каскады включают в себя активацию фосфолипазы A2 с образованием арахидоновой кислоты, активацию фосфолипазы D, семейства Rho-ГТФ-аз (гуанидинтрифосфатазы подсемейства Rho – Ras homolog – семейства родственных белков), Rho-киназы (киназы подсемейства Rho), ERK-киназ (extracellular signal regulated kinase – киназа, управляемая внеклеточным сигналом). В числе них белки-регуляторы G-белкового сигналинга (RGS-белки), к суперсемейству которых относятся β-аррестины (Bohn L.M., Schmid C.L., 2010).

Регуляция передачи сигналов β-аррестинами включает множество компонентов: они могут быть десенсибилизаторами, посредниками сигнальных каскадов не-G-белков и/или участвовать в эндоцитозе рецептора (Gray J.A., Roth B.L., 2001; Bohn L.M., Schmid C.L., 2010; Shenoy S.K., Lefkowitz R.J., 2011). Причём данный процесс зависит не только от изоформы рецептора, но и лиганда, который связан с рецептором, а также клеточной среды, в которой он экспрессируется. В центральной нервной системе, вещества, которые способны нарушать взаимодействие 5-HT_{2A}-рецептор/β-аррестин, могут изменять чувствительность рецептора к уровню серотонина, присутствующего в мозге, и поддерживать необходимый базальный серотонинергического тонуса при одновременном устранении чрезмерной чувствительности рецептора к эндогенному

серотонину (Schmid C.L., Raehal K.M., Bohn L.M., 2008). Блокада постсинаптических и пресинаптических 5-НТ_{2А}-рецепторов способна приводить к изменению внутриклеточного и межклеточного сигналинга.

Детальное исследование механизма действия таких веществ важно для понимания особенностей специфической активности, а также прогноза нежелательных побочных эффектов, характерных для группы серотониноблокаторов.

В ранее проведённых исследованиях был показан 5-НТ_{2А}-антагонистический механизм действия (Морковина Я.В. и др., 2017) и выявлено наличие противовоспалительных свойств для соединения РУ-31 (подробнее материалы по исследованию противовоспалительного действия соединения РУ-31 представлены в главе 3). Кроме того, было проведено изучение взаимодействия соединения РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг с основными нейромедиаторными системами *in vivo* и выявлено влияние на серотонинергическую, холинергическую, дофаминергическую и ГАМК-ергическую системы мозга (Агацарская Я.В., 2019). В связи с чем, целесообразным являлось детальное изучение влияния соединения РУ-31 на внутриклеточный и межклеточный сигналинг.

6.1 5-НТ_{2А}-антагонистическое действие, блокирующее пострецепторный β-аррестинный каскад

Детализацию 5-НТ_{2А}-антагонистического механизма действия соединения РУ-31 *in vitro* проводили на трансфицированных клетках с использованием тест-системы Tango™ HTR2A-*bla* U2OS DA (Thermo Fisher Scientific, США) (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Клетки содержат человеческий рецептор серотонина подтипа 2А, связанный с сайтом TEV-протеазы, и транскрипционный фактор Gal4-VP16 и стабильно экспрессируют белок слияния бета-аррестин/TEV-протеазы и репортёрный ген бета-лактамазы.

5-НТ_{2А}-рецепторы, сопряжённые с G-белком, при активации запускают десенсibilизацию – процесс, опосредованный привлечением внутриклеточных белков аррестина в активированный рецептор. В результате лиганд-индуцированные

активация/блокирование рецептора могут быть проанализированы путём детекции взаимодействия аррестина с изучаемым 5-НТ_{2А}-рецептором (рисунок 6.1.1).

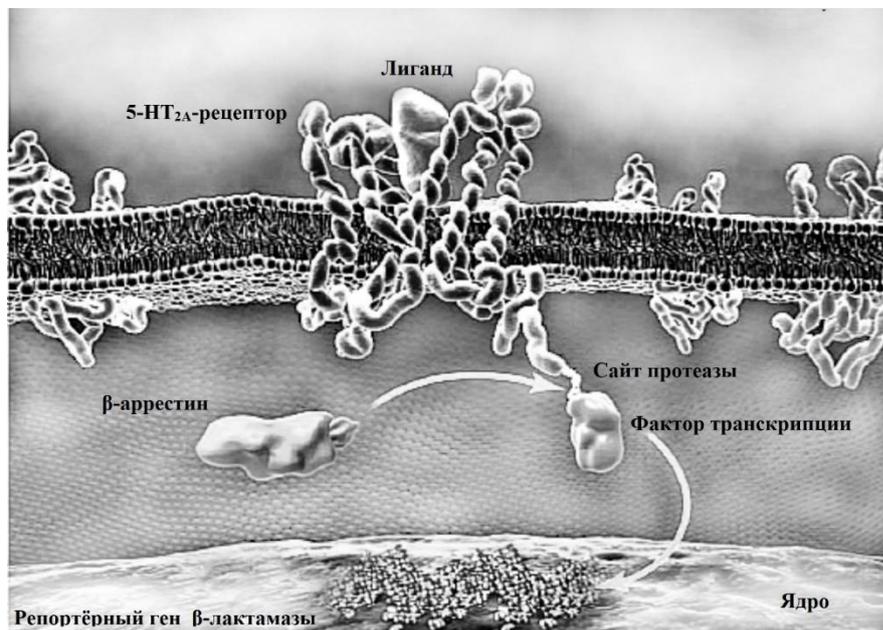


Рисунок 6.1.1 – Дизайн внутриклеточного каскада тест-системы Tango™ HTR2A-bla U2OS DA

Примечания. При связывании лиганда и активации 5-НТ_{2А}-рецептора β-аррестин рекрутируется в рецептор, модифицированный на С-конце и активирует фактор транскрипции, связанный с сайтом расщепления протеазой. Протеаза, в свою очередь, отщепляет фактор транскрипции от рецептора, фактор транскрипции немедленно перемещается в ядро, и β-лактамаза активируется (Tango™ HTR2A-bla U2OS DA and Dividing Cell-based Assay User Guide).

В ходе исследования, было проведено изучение наличия и выраженности 5-НТ_{2А}-антагонистического действия соединения РУ-31 и препарата сравнения ципрогептадина (рисунок 6.1.2).

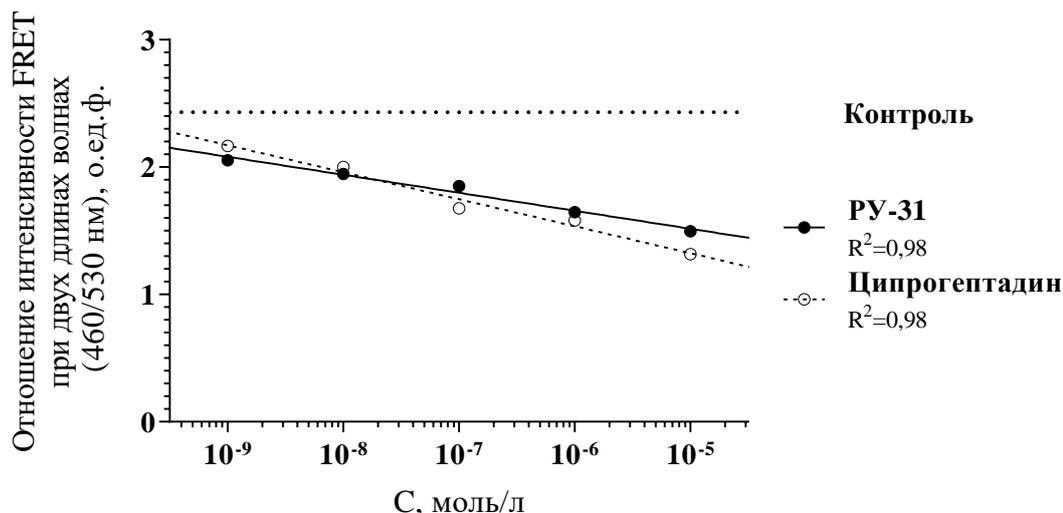


Рисунок 6.1.2 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина на выраженность 5-НТ_{2А}-блокирующего действия *in vitro*

Примечания: 5-НТ_{2А}-антагонистическая активность *in vitro* исследована с использованием клеточной трансфецированной тест-системы Tango™ HTR2A-bla U2OS DA (Thermo Fisher Scientific, США). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Было показано, что соединение РУ-31, внесённое к клеткам, оказывает 5-НТ_{2А}-антагонистическое действие, причём выраженность этого эффекта увеличивается с возрастанием концентрации. При этом, максимальное антагонистическое действие зафиксировано в концентрации 10 мкМ. Стоит отметить, что соединение РУ-31 незначительно статистически недостоверно уступает по уровню активности препарату сравнения ципрогептадину.

Таким образом, соединение РУ-31 блокирует внутриклеточный β-аррестинновый пострецепторный каскад в концентрации 1-10 мкМ.

6.2 Влияние на активность циклооксигеназы 1 и 2

Учитывая вовлечённость серотонина в воспалительный компонент патогенеза мигрени (Kilinc et al., 2017; Koroleva et al., 2020), а также наличие собственной противовоспалительной активности и антиагрегантного эффекта соединения РУ-31, реализуемого посредством основного антисеротонинового действия, необходимым этапом детализированного изучения механизмов действия соединения РУ-31 являлось

исследования его вторичного влияния на активность циклооксигеназ, как основных провоспалительных триггеров.

Детализация аспектов противовоспалительного действия соединения РУ-31 *in vitro* проведена с применением наборов для скрининга ингибиторов циклооксигеназы 1 и 2 типа (BioVision, США). Анализ основан на флуориметрическом детектировании простагландина G2 - промежуточного продукта реакции, катализируемой циклооксигеназой (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

Результаты изучения влияния соединения РУ-31 и препаратов сравнения в концентрации 1 мкМ на активность ЦОГ-1 представлены на рисунке 6.2.1.

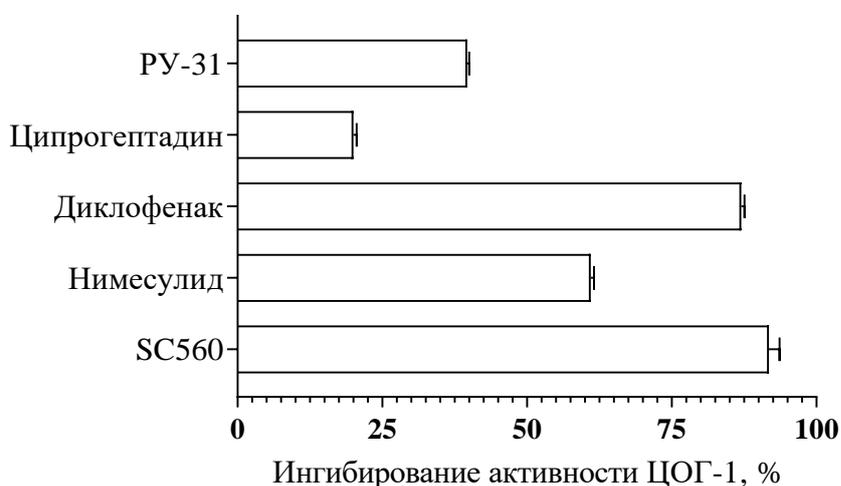


Рисунок 6.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения нимесулида, диклофенака и ципрогептадина на активность циклооксигеназы типа 1 *in vitro*

Примечания: противовоспалительное действие *in vitro* изучено с применением флуориметрического набора для скрининга ингибиторов циклооксигеназы 1 типа (BioVision, США). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

По результатам исследования для соединения РУ-31 и препаратов сравнения был рассчитан процент ингибирования. Так, вещество сравнения SC560 ингибирует активность ЦОГ-1 на 92%, нимесулид – на 60%, диклофенак – на 87%. Соединение РУ-31 по уровню влияния на циклооксигеназу типа 1 превосходит препарат сравнения ципрогептадин (20%), ингибируя провоспалительный фермент на 40%.

Также, было проведено изучение способности подавлять активность циклооксигеназы 2 типа соединением РУ-31 и препаратами сравнения в концентрации 1 мкМ с последующим расчётом процента её ингибирования (рисунок 6.2.2).

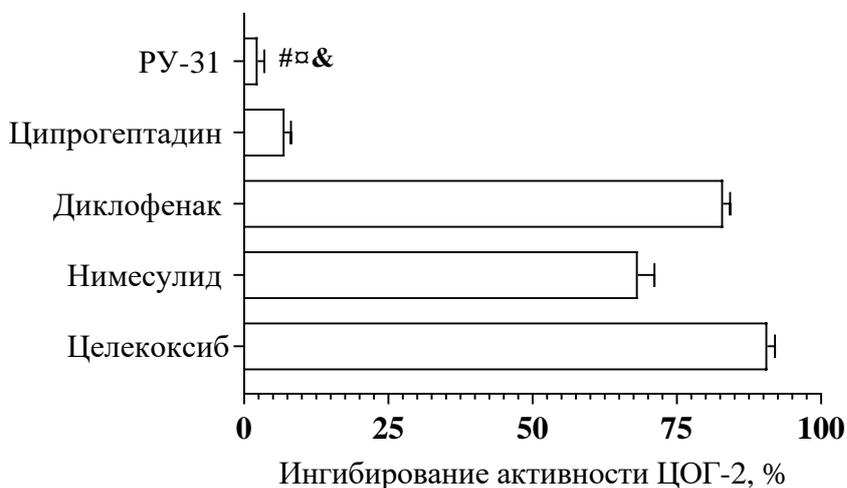


Рисунок 6.2.2 – Влияние соединения РУ-31 и препаратов сравнения нимесулида, диклофенака и ципрогептадина на ингибирование активности циклооксигеназы типа 2 *in vitro*

Примечания: противовоспалительное действие *in vitro* изучалось с применением флуорометрического набора для скрининга ингибиторов циклооксигеназы 2 типа (BioVision, США). # – статистически значимо по отношению к целекоксибу, при непараметрическом распределении, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$); □ – статистически значимо по отношению к нимесулиду, при непараметрическом распределении, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$); & – статистически значимо по отношению к диклофенаку, при непараметрическом распределении, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Так, препарат сравнения целекоксиб ингибирует активность циклооксигеназу типа 2 на 91%, нимесулид – на 68%, диклофенак – на 83%. Соединение РУ-31 и ципрогептадин не оказывают выраженного ингибирования данной изоформы циклооксигеназы. Так процент ингибирования ЦОГ-2 для соединения РУ-31 составил 2%, для ципрогептадина – 7%.

По результатам исследования активности соединения РУ-31 в отношении ингибирования циклооксигеназ, были рассчитаны коэффициенты селективности –

отношение степени ингибирования конститутивного фермента ЦОГ-1 к индуцибельной ЦОГ-2. Так, коэффициент селективности нимесулида составил 0,88, диклофенака – 1,05, соединения РУ-31 – 20, ципрогептадина – 2,86. Рассчитанный индекс селективности подтверждает преимущественное влияние соединения РУ-31 на циклооксигеназу типа 1.

Таким образом, соединение РУ-31 оказывает ингибирующее влияние на ЦОГ-1. Выраженного влияния на ЦОГ-2 изучаемое соединение не оказывает.

6.3 Взаимодействие с нейромедиаторными системами *in vivo*

Учитывая влияние соединения РУ-31 в дозе 10 мг/кг на серотонинергическую, холинергическую, дофаминергическую и ГАМК-ергическую системы мозга *in vivo*, целесообразным является детальное изучение сохранения и выраженности выявленных эффектов в широком диапазоне доз с целью прогнозирования возможных побочных эффектов, в связи с чем, было проведено определение способности исследуемого соединения изменять эффекты различных модуляторов основных нейромедиаторных систем организма (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

6.3.1. Серотонинергическая система мозга

5-гидрокситриптофан, введённый внутривнутрибрюшинно, приводил к возникновению гиперкинезии у экспериментальных животных (таблица 6.3.1.1).

Таблица 6.3.1.1 – Влияние соединения РУ-31 при внутрижелудочном введении на гиперкинез у мышей, вызванный 5-ГТФ, введённым внутривнутрибрюшинно в дозе 300 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Количество твитчингов в течение минуты					
		10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин
Контроль + 5-ГТФ	–	10,8±1,07	15,9±1,11	11,6±2,03	5,1±0,83	1,6±0,38	0,3±0,16
РУ-31 + 5-ГТФ	2	4,9±2,39	12,1±2,58	5,6±1,36	1,3±0,49*	0,4±0,18*	0,0±0,00
	10	3,1±0,95*	4,8±1,28*	2,9±1,06*	0,9±0,48*	0,0±0,00*	0,0±0,00
	30	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00
	50	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00*	0,0±0,00

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$. * – различия достоверно относительно показателей группы контроля, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

В контрольной группе животных максимальное количество встряхиваний головой отмечено на 20 минуте после введения 5-гидрокситриптофана. В дальнейшем уровень гиперкинеза снижался.

У крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 2 мг/кг, достоверно снижалось количество встряхиваний головой начиная с 40 минуты после введения 5-гидрокситриптофана на 75%. У крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, начиная с 10 минуты после введения, достоверно снижались эффекты 5-гидрокситриптофана на 71%.

У животных, получавших соединение РУ-31 в дозах 30 и 50 мг/кг, полностью подавлялось возникновение гиперкинезии в ответ на внутрибрюшинное введение 5-гидрокситриптофана в дозе 300 мг/кг.

Вывлеченные результаты согласуются с ранее полученными данными о 5-НТ_{2A}-рецепторной активности соединения РУ-31, так как активация 5-НТ_{2/2A}-подтипов рецептора приводит, к развитию гиперкинезии.

Таким образом, на модели «5-ГТФ гиперкинез» было выявлено дозозависимое центральное серотонин-блокирующее действие соединения РУ-31. Установлено, что максимальный эффект соединения РУ-31 оказывает в дозе 30 мг/кг.

6.3.2. ГАМК-ергическая система мозга

Пикротоксин, введённый внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг, опосредовал возникновение судорог и тремора. Так, время возникновения тремора составляло в среднем 4 минуты (таблица 6.3.2.1).

Таблица 6.3.2.1 – Влияние соединения РУ-31 при внутрижелудочном введении на судороги у мышей, вызванные пикротоксином, введённым внутривентриально в дозе 2,5 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Время развития тремора, мин	Время развития судорог, мин	Количество судорожных приступов
Контроль + пикротоксин	–	4,3±0,19	8,1±0,91	9,6±0,56
РУ-31 + пикротоксин	2	4,9±0,37	12,9±0,29*	6,7±0,87*
	10	6,4±0,21*	23,6±0,53*	5,8±0,68*
	30	8,2±0,28*	27,9±0,33*	5,5±0,52*
	50	12,5±0,29*	31,9±0,73*	4,6±0,34*

Примечания: данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=10$. * – различия достоверно относительно показателей группы контроля, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Даннета ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Первый приступ клонических судорог (время возникновения судорог) у мышей в контрольной группе в среднем возникал через 8 минут после введения пикротоксина. За период наблюдения в контрольной группе количество судорожных приступов составило около $9,6 \pm 0,56$ раза. В группе животных, которые предварительно внутрижелудочно получали соединение РУ-31 в дозе 2 мг/кг, отмечено достоверное увеличение времени наступления судорог. Так, время наступления судорог достоверно увеличивалось на 37% по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы. У животных данной группы также отмечено достоверное снижение количества судорожных приступов на 30%. У животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, выявлено достоверное увеличение времени наступления как тремора, так и приступа судорог. Так, время возникновения тремора увеличивалось на 33%, а время наступления судорог – на 66%. Также отмечалось снижение количества судорожных приступов на 40%.

При увеличении дозы до 30 и 50 мг/кг выраженность способности соединения РУ-31 снижать судорожный эффект пикротоксина увеличивается. Так, время возникновения тремора увеличивается на 48% и 66%, время наступления судорог увеличивалось на

71% и 75%, количество судорожных припадков уменьшается на 43 и 52% соответственно для 30 и 50 мг/кг ($p < 0,05$).

Таким образом, в тесте пикротоксиновых судорог выявлено дозозависимое ГАМК-миметическое действие соединения РУ-31.

6.3.3. М-холинергическая система мозга

Ареколин, введённый внутривентриально в дозе 15 мг/кг, опосредовал возникновение тремора. Так, в контрольной группе животных после введения ареколина у крыс отмечены гиперсаливация и тремор. Латентный период возникновения тремора в контрольной группе составил 46 секунд, а длительность составила более 20 минут (таблица 6.3.3.1).

Таблица 6.3.3.1 – Влияние соединения РУ-31 при внутривентриальном введении на длительность тремора у крыс, вызванного ареколином, введённым внутривентриально в дозе 15 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Время развития эффекта, с	Длительность эффекта, с
Контроль + ареколин	–	45,9±3,89	1226,0±40,62
РУ-31 + ареколин	2	53,4±2,02	1007,0±40,53*
	10	59,0±1,36*	973,4±25,25*
	30	79,7±1,39*	406,4±10,44*
	50	88,5±1,46*	265,8±8,77*

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=10$. * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кейлса ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

При введении соединения РУ-31 в дозе 2 мг/кг не было выявлено статистически значимых изменений латентного периода возникновения тремора. При этом установлено его влияние на длительность ареколинового тремора у крыс – уменьшение на 18%.

У животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, отмечено статистически значимое увеличение латентного периода возникновения тремора на 22%, длительность ареколинового тремора у крыс уменьшалась на 21%.

При увеличении дозы до 30 и 50 мг/кг выраженность способности соединения РУ-31 снижать эффекты ареколина увеличивается. Так, время возникновения тремора увеличивается на 42% и 48%, длительность тремора уменьшается на 67% и 78% соответственно для 30 и 50 мг/кг ($p < 0,05$).

Таким образом, в тесте ареколинового тремора выявлено дозозависимое влияние соединения РУ-31 на центральную М-холинергическую нейротрансмиссию.

6.3.4. Дофаминергическая система мозга

Исследование взаимодействия соединения РУ-31 с дофаминергической системой мозга *in vivo* проводили в тестах «Галоперидоловой каталепсии», «Апоморфиновая стереотипия» и «Фенаминовая стереотипия».

Галоперидоловая каталепсия

Галоперидол, введённый внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг, в контрольной группе приводил к возникновению каталепсии (таблица 6.3.4.1).

Таблица 6.3.4.1 – Влияние соединения РУ-31 при внутривенном введении на выраженность каталепсии у крыс, галоперидолом, введённым внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Выраженность каталепсии (в баллах)				
		15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	120 мин
Контроль + галоперидол	–	2,5±0,38	2,8±0,16	2,9±0,13	3,0±0,0	2,8±0,25
РУ-31 + галоперидол	2	2,4±0,42	2,6±0,18	2,6±0,18	3,0±0,0	2,6±0,18
	10	1,9±0,4	2,4±0,18	2,5±0,2	2,8±0,16	2,3±0,25
	30	1,5±0,42	2,3±0,31	2,4±0,26	2,4±0,26	1,8±0,31
	50	1,3±0,37	1,9±0,35	2,0±0,27	1,9±0,3	1,6±0,26*

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=8$. * – * – различия достоверно относительно показателей группы контроля, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

При введении соединения РУ-31 в диапазоне доз 2 – 30 мг/кг было выявлено статистически незначимое уменьшение каталептогенного эффекта галоперидола. При увеличении изучаемой дозы до 50 мг/кг отмечено достоверное уменьшение эффекта галоперидола на 120 минуте наблюдения ($p < 0,05$).

Апоморфиновая стереотипия

Апоморфин, введённый подкожно в дозе 0,1 мг/кг, способствовал возникновению стереотипного поведения у животных. Так, максимальный балл выраженности стереотипии был достигнут на 90 минуте после введения дофаминового агониста, дальнейшее наблюдение показывало постепенное снижение эффектов апоморфина (таблица 6.3.4.2).

Таблица 6.3.4.2 – Влияние соединения РУ-31 при внутрижелудочном введении на выраженность стереотипии у крыс, вызванной апоморфином, введённым подкожно в дозе 0,1 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Выраженность стереотипии (в баллах)			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль + апоморфин	–	0,7±0,21	1,5±0,22	1,7±0,21	1,2±0,31
РУ-31 + апоморфин	2	0,3±0,21	1,2±0,17	1,3±0,42	1,2±0,48
	10	0,7±0,21	1,5±0,21	1,7±0,21	0,8±0,16
	30	0,3±0,21	0,7±0,33	1,2±0,31	0,8±0,4
	50	0,6±0,22	0,5±0,22	1,2±0,17	0,5±0,22

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Введение соединения РУ-31 в дозах 2 – 50 мг/кг приводило к незначительному снижению выраженности апоморфинового ответа у экспериментальных животных, однако достоверных различий между показателями группы контроля и опытными группами выявлено не было.

Фенаминовая стереотипия

Фенамин, введённый внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг/кг, в контрольной группе крыс приводил к возникновению беспокойства и стереотипного поведения (таблица 6.3.4.3).

Таблица 6.3.4.3 – Влияние соединения РУ-31 при внутрижелудочном введении на выраженность стереотипии у крыс, фенамином, введённым внутривенно в дозе 0,1 мг/кг

Группа	Доза, мг/кг	Латентное время возникновения стереотипии (в минутах)	Длительность стереотипии (в часах)
Контроль + фенамин	–	7,5±0,43	4,1±0,16
РУ-31 + фенамин	2	7,8±0,31	9,1±0,29*
	10	9,8±0,48*	12,3±0,29*
	30	12,2±0,79*	15,3±0,17*
	50	13,8±0,65*	17,4±0,32*

Примечания: данные представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. * – различия достоверны относительно показателей контрольных измерений, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой критерием Ньюмена-Кеулса ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

При изучении влияния соединения РУ-31 в дозе 2 мг/кг на продолжительность стереотипного поведения у животных отмечено существенное увеличение длительности стереотипии на 55% по сравнению с группой контроля.

У животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 10 мг/кг, выявлено достоверное увеличение времени наступления стереотипии и её продолжительности. Так, время возникновения стереотипии увеличивалось на 23%, а продолжительность – на 67%.

При увеличении дозы до 30 и 50 мг/кг выраженность способности соединения РУ-31 опосредовать эффекты фенамина увеличивается. Так, время возникновения стереотипии увеличивается на 39% и 46%, а продолжительность стереотипных движений – на 73% и 76%, соответственно для 30 и 50 мг/кг ($p < 0,05$).

Таким образом, по результатам изучения взаимодействия соединения РУ-31 с дофаминергической системой мозга *in vivo* установлено увеличение действия фенамина, что, учитывая низкую активность изучаемого соединения в тестах галоперидоловой каталепсии и апоморфиновой стереотипии, свидетельствует о выраженном

неспецифическом влиянии соединения РУ-31 на обратный захват дофамина и незначительном влиянии на центральные звенья дофаминергической системы.

6.4 Заключение

В ходе исследования, с использованием технологии трансфицированных клеток, было показано наличие для соединения РУ-31 дозозависимого 5-НТ_{2A}-антагонистического действия, опосредующего запуск внутриклеточного пострецепторного β -аррестинного каскада, по уровню эффективности сопоставимого с препаратом сравнения ципрогептадином.

В ходе детализации аспектов противовоспалительного действия было показано, что соединение РУ-31 ингибирует ЦОГ-1 и не оказывает выраженного влияния на ЦОГ-2.

Также, в ходе исследования было проведено определение способности исследуемого соединения РУ-31 изменять эффекты различных модуляторов основных нейромедиаторных систем организма.

Так, в тесте «5-ГТФ гиперкинез» отмечено снижение эффектов 5-гидрокситриптофана в опытных группах, получавшей соединение РУ-31, причём с увеличением дозы соединения выраженность центрального серотонинблокирующего эффекта увеличивалась.

В тесте индуцированных пикротоксином тремора и судорог, основанных на взаимодействии пикротоксина с ГАМК-рецепторами, выявлено снижение эффектов индуктора в опытной группе. Под влиянием соединения РУ-31 увеличивалось время наступления тремора и снижалось количество судорожных припадков. Выявленные данные свидетельствуют о наличии ГАМК-миметического действия у соединения РУ-31, возрастающего с увеличением дозы.

Кроме того, для соединения РУ-31 показано наличие взаимодействия с модулятором центрального М-холинергического звена нейротрансмиссии – ареколином. В тесте с развитием тремора у крыс, опосредованного введением ареколина, при введении соединения РУ-31 было отмечено снижение длительности тремора, а также времени его возникновения. При этом, с увеличением дозы соединения РУ-31, зафиксировано усиление подавления эффектов ареколина.

В ходе определения D_2 -дофаминергического действия соединения РУ-31 не было выявлено значимого влияния на стереотипию, вызванную апоморфином, а также влияние на каталептогенное действие галоперидола. Однако, в тесте фенаминовой стереотипии соединение РУ-31 существенно увеличивало продолжительность эффектов фенамина, что может свидетельствовать о возможном влиянии соединения РУ-31 на обратный захват дофамина.

Таким образом, для соединения РУ-31 подтверждено блокирование внутриклеточного β -аррестинного пострецепторного каскада в концентрации 1-10 мкМ. Подтверждена возможность дозозависимо изменять внеклеточные эффекты индуктора, преимущественно осуществляемые через 2 тип серотониновых рецепторов, а также определены наличие ГАМК-миметического действия, способности влиять на центральное М-холинергическое звено и обратный захват дофамина в широком диапазоне доз. Полученные данные позволяют предположить отсутствие у соединения РУ-31 характерных для 5-НТ_{2А}-блокаторов нежелательных эффектов на центральную нервную систему, а также наличие сопутствующих основному эффекту анксиолитического и антидепрессивного действия, что подтверждается полученными ранее данными (подробнее данные о выявленных психотропных свойствах представлены в главе 4).

ГЛАВА 7. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-31

Для детализации результатов и исключения возможных ложноположительных ответов, связанных с прямым токсическим влиянием на клеточные элементы, и функциональность ферментных систем, целесообразным является исследование цитотоксических свойств соединения РУ-31 в концентрациях, продемонстрировавших влияние на внутриклеточный пострецепторный β -аррестинновый каскад, а также ингибирование активности циклооксигеназы (подробнее материалы по исследованию влияния соединения РУ-31 на внутриклеточный и межклеточный сигналинг представлены в главе 6). Кроме того, использование при изучении безопасности и оценки токсичности первичных клеток человека позволяет получить более полную картину о токсических характеристиках соединения РУ-31, что является актуальным для дальнейшего прогнозирования нежелательных эффектов при экстраполяции полученных данных на человека.

Серотониновые рецепторы 2А подтипа широко вовлечены в регуляцию различных процессах центральной нервной системы, в том числе в регуляцию физиологических и поведенческих процессов. Для 5-НТ_{2А}-блокаторов характерно наличие спектра типичных нейropsychотропных и нейротоксических побочных эффектов. Принимая это во внимание, необходимым этапом изучения нейropsychотропных эффектов соединения РУ-31 представляется исследование его влияния на функционально-поведенческий статус животных в дополнении к исследованию острой токсичности.

7.1 Цитотоксическое действие

МТТ-тест основан на восстановлении соли тетразолия (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) оксиредуктазами жизнеспособных и метаболически активных клеток с образованием пурпурных кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически.

В ходе проведенного исследования были получены значения абсорбции при 555 нм (референсная $\lambda=650$ нм), отражающие количественную оценку конвертированного МТТ-реагента в формазан митохондриальными и цитоплазматическими редуктазами. По результатам проведенного исследования, относительно положительного контроля

был рассчитан процент метаболической активности клеток, отражающий количество жизнеспособных клеток в % относительно контрольных значений. При помощи нелинейного регрессионного анализа был произведен расчет IC_{50} изучаемых соединений. Так, IC_{50} препарата сравнения доксорубина составляет 1,8 мкМ (рисунок 7.1.1).

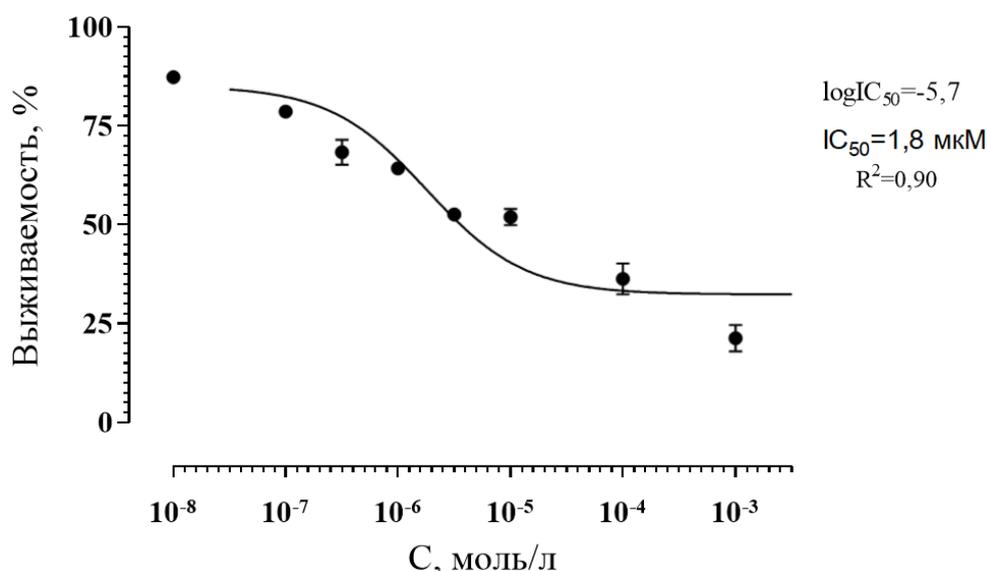


Рисунок 7.1.1 – Влияние доксорубина на выживаемость клеток в МТТ-тесте (фибробласты кожи человека)

Примечание: статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0 с использованием методов нелинейного регрессионного анализа.

Для соединения РУ-31 данный показатель составил 36,8 мкМ ($R^2=0,98$), уступая препарату сравнения доксорубину на 95%. Для ципрогептадина полуингибирующая концентрация составила 452 мкМ ($R^2=0,98$) (рисунок 7.1.2).

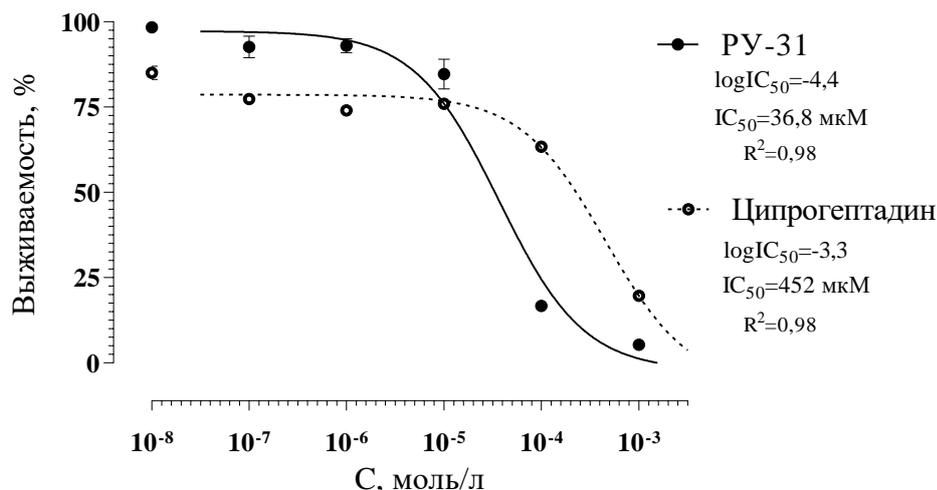


Рисунок 7.1.2 – Влияние соединения РУ-31 и препарата сравнения ципрогептадина на выживаемость клеток в МТТ-тесте (фибробласты кожи человека)

Примечание: статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0 с использованием методов нелинейного регрессионного анализа.

Таким образом, соединение РУ-31 в концентрациях 0,01-10 мкМ по показателю цитотоксичности в МТТ-тесте на первичных фибробластах кожи человека значительно уступает препарату сравнения ципрогептадину, однако не проявляет цитотоксических эффектов в сравнении с референсным цитостатиком доксорубицином.

7.2 Нейротоксикологические свойства

Исследование нейротоксикологических свойств соединения РУ-31 проводилось с использованием метода S. Irwin (Irwin S., 1964), позволяющего оценить воздействие соединения РУ-31 на вегетативные, эмоциональные, сенсомоторные, двигательные и другие поведенческие реакции лабораторных животных, и, таким образом, изучить влияние изучаемого соединения на общеклиническое состояние животных и оценить его нейротоксический потенциал.

Изучение влияния соединения РУ-31 и препарата сравнения ципрогептадина на функционально-поведенческий статус мышей, проводили в параллельных группах, получавших исследуемые вещества в дозах, начинающихся со средней эффективной (ЭД₅₀) и с кратным увеличением средней эффективной дозы в 2, 5, 7,5 и 10 раз (материалы и методы подробно представлены в главе 2).

У животных контрольной группы не отмечено наличие спонтанной вокализации, стереотипного поведения, беспокойства или агрессии в поведении. Показатели настороженности, пассивности, груминга и спонтанной двигательной активности согласуются с поведением интактных животных. В ряду параметров, характеризующих нервно-мышечное возбуждение, отсутствуют изменения, свидетельствующие о развитии гипер- или гипотонуса (тремор, подергивание, судороги и расстройство походки). Рефлексы на внешние раздражители соответствуют норме (таблица 7.2.1).

Таблица 7.2.1 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина при внутрижелудочном введении на поведенческую активность мышей (в баллах)

Группа	Доза, мг/кг	Время измерения, минуты		
		0	60	120
<i>Пассивность</i>				
Норма	–	0	0	0
Контроль	–	0,0±0,01	0,0±0,01	0,0±0,01
РУ-31	10	0,0±0,01	0,0±0,01	0,0±0,01
	20	0,0±0,01	0,0±0,01	0,0±0,01
	50	0,0±0,01	0,0±0,01	0,3±0,21
	75	0,0±0,01	2,3±0,21*	2,2±0,17*
	100	0,0±0,01	2,7±0,33*	2,3±0,33*
Ципрогептадин	14	0,0±0,01	0,0±0,01	0,0±0,01
	28	0,0±0,01	0,0±0,01	0,0±0,01
	70	0,0±0,01	0,0±0,01	0,3±0,21
	105	0,0±0,01	0,7±0,32	1,0±0,01*
	140	–	–	–
<i>Груминг</i>				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01

РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	3,3±0,42	3,5±0,34
	75	4,0±0,01	1,7±0,21*	1,5±0,22*
	100	4,0±0,01	1,0±0,01*	1,0±0,01*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	105	4,0±0,01	3,0±0,01	3,3±0,21
	140	–	–	–
Спонтанная двигательная активность				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	3,5±0,22	3,5±0,22
	75	4,0±0,01	3,0±0,01*	3,0±0,26
	100	4,0±0,01	2,5±0,22*	2,7±0,21*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	3,7±0,21	3,3±0,21
	28	4,0±0,01	3,3±0,26	3,8±0,17
	70	4,0±0,01	3,2±0,30	3,0±0,26
	105	4,0±0,01	2,5±0,72	2,5±0,42*
	140	–	–	–

Примечания: данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. «–» – данные отсутствуют в связи с летальностью животных. * – статистически значимо по отношению к контролю, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Даннета ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Вегетативные эффекты сохранялись на исходном уровне в течение всего периода наблюдения (ЧДД, температура, цвет кожи, размер зрачка), негативная симптоматика не развивалась (птоз/экзофтальм, повышенная саливация).

У животных, получавших в средней эффективной дозе 10 мг/кг соединение РУ-31, не отмечено значимых изменений изучаемых показателей данного многопараметрового тестирования (таблица 7.2.1 и 7.2.2).

Таблица 7.2.2 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина при внутрижелудочном введении на нервно-мышечную возбудимость мышей (в баллах)

Группа	Доза, мг/кг	Время измерения, минуты		
		0	60	120
<i>Реакция на прикосновение</i>				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
РУ-31	10	4,0±0,01	3,7±0,21	3,7±0,21
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	3,5±0,43	3,5±0,56
	75	4,0±0,01	2,8±0,31	3,0±0,01
	100	4,0±0,01	2,2±0,17*	2,7±0,33*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	3,7±0,21	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	3,5±0,43	2,0±0,01*
	105	4,0±0,01	3,0±0,01	2,8±0,17
	140	–	–	–
<i>Реакция на болевой раздражитель</i>				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01

РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	3,3±0,42	3,5±0,34
	75	4,0±0,01	1,7±0,21*	1,5±0,22*
	100	4,0±0,01	1,0±0,01*	1,0±0,01*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	105	4,0±0,01	3,0±0,01	3,2±0,17
	140	–	–	–
Реакция на стук				
Норма	–	4	4	4
Контроль				
	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	4,0±0,01	4,3±0,21
	75	4,0±0,01	3,7±0,21	3,5±0,22
	100	4,0±0,01	2,0±0,17*	3,0±0,01*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	3,7±0,21	3,7±0,21
	105	4,0±0,01	3,2±0,17	3,3±0,21
	140	–	–	–
Расстройство походки				
Норма	–	0	0	0
Контроль				
	–	0	0	0

РУ-31	10	0	0	0
	20	0	0	0
	50	0	0	0
	75	0	2,8±0,31*	2,2±0,17*
	100	0	2,0±0,01*	2,0±0,01*
Ципрогептадин	14	0	0	0
	28	0	0,5±0,22	0
	70	0	1,2±0,4	1,0±0,37
	105	0	0,8±0,31	1,0±0,37
	140	–	–	–
Тонус конечностей				
Норма	–	4	4	4
Контроль				
	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	75	4,0±0,01	3,8±0,17	3,8±0,17
	100	4,0±0,01	3,0±0,01*	3,7±0,21
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	3,5±0,22	3,8±0,17
	105	4,0±0,01	4,3±0,21	4,0±0,01
	140	–	–	–

Примечания: данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. «–» – данные отсутствуют в связи с летальностью животных. * – статистически значимо по отношению к контролю, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Даннета ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

Ципрогептадин в дозе ЭД₅₀ – 14 мг/кг – вызывал снижение уровня спонтанной двигательной активности с нарастанием эффекта ко второму часу наблюдения.

При исследовании соединения РУ-31 в дозе, превышающей среднюю эффективную в 2 раза, регистрируемые параметры, характеризующие поведенческие реакции и нервно-мышечную возбудимость, соответствовали аналогичным параметрам контрольной группы.

Из показателей, описывающих вегетативный статус, через 1 час после введения соединения РУ-31 у животных отмечено развитие незначительной гипотермии. Остальные параметры, в сравнении с группой контроля, не изменились (таблица 7.2.3).

Таблица 7.2.3 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина при внутрижелудочном введении на вегетативные эффекты у мышей (в баллах)

Группа	Доза, мг/кг	Время измерения, минуты		
		0	60	120
<i>Температура тела, °C</i>				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	20	4,0±0,01	3,0±0,01	3,0±0,01
	50	4,0±0,01	3,5±0,22	3,2±0,17
	75	4,0±0,01	2,2±0,17*	2,0±0,01*
	100	4,0±0,01	2,0±0,01*	2,0±0,01*
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	3,7±0,21	3,7±0,21
	70	4,0±0,01	3,0±0,01	3,2±0,17
	105	4,0±0,01	2,5±0,22*	2,5±0,22*
	140	–	–	–

<i>Частота дыхательных движений</i>				
Норма	–	4	4	4
Контроль	–	4,0±0,01	4,2±0,26	4,3±0,21
РУ-31	10	4,0±0,01	4,0±0,01	3,8±0,26
	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	50	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	75	4,0±0,01	5,3±0,21*	5,2±0,17
	100	4,0±0,01	5,2±0,17*	5,0±0,01
Ципрогептадин	14	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	28	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
	70	4,0±0,01	5,0±0,01	5,0±0,01
	105	4,0±0,01	5,2±0,17*	5,2±0,17
	140	–	–	–

Примечания: данные представлены в виде $M \pm t$ (среднее \pm стандартная ошибка), $n=6$. «–» – данные отсутствуют в связи с летальностью животных. * – статистически значимо по отношению к контролю, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Даннета ($p < 0,05$). Статистическая обработка проведена с применением программы GraphPad Prism v.8.0.

В группе животных, получавшей ципрогептадин в дозе, превышающей среднюю эффективную в 2 раза, зафиксирован спад двигательной активности. Для других показателей достоверного различия с контрольными значениями выявлено не было.

При увеличении средней эффективной дозы соединения РУ-31 в 5 раз регистрированы изменения спонтанной двигательной активности, а именно уменьшение количества переходов в актометре. Гипотермические эффекты сохранялись на том же уровне, что и в дозе 20 мг/кг.

В группе животных, получавших ципрогептадин в дозе $5 \times \text{ЭД}_{50}$, отмечено снижение показателей нервно-мышечного возбуждения. Так, на фоне некоторого снижения тонуса конечностей животного, изменялась походка мышей (качающаяся с подтягиванием задних лап в процессе движения), снижался уровень рефлексов,

связанных с реакцией на внешние раздражители, в частности на тактильное восприятие. Указанные эффекты дополнялись повышенной частотой дыхательных движений и снижением температуры тела.

Показатели спонтанной двигательной активности в исследуемой группе имели тенденцию к дальнейшему снижению. Описанная картина изменений в настоящем многопараметровом тестировании за счет совокупности указанных признаков может свидетельствовать о развитии седации с выраженной вегетотропной симптоматикой у животных.

Наиболее выраженные нарушения функционально-поведенческого статуса наблюдались при введении соединения РУ-31 в более высоких дозах. Так, при увеличении дозы соединения РУ-31 до $7,5 \times \text{ЭД}_{50}$ (75 мг/кг) отмечено изменение двигательной активности мышей. Животные становились более пассивными, меньше передвигались, в единичных случаях отмечалось снижение тонуса конечностей и расстройство походки. Учитывая это, а также урежение частоты краткосрочного груминга и снижение реакции на прикосновение, можно предположить наличие угнетающего воздействия у соединения РУ-31 в дозе 75 мг/кг на центральную нервную систему, в целом, проявляющееся в виде выраженной седации животных. Было отмечено, что при введении соединения РУ-31 у мышей увеличивается латентность ноцицептивной реакции в сравнении с контрольными показателями. Со стороны вегетативной нервной системы отмечено повышение частоты дыхательных движений и понижение температуры тела.

При 7,5-кратном увеличении эффективной дозы ципрогептадина отмечено развитие сходной симптоматики с группой животных, получавших соединение РУ-31 в дозе 75 мг/кг. Наиболее существенное изменение было связано с угнетением рефлексов, в частности, реакции на звуковой раздражитель.

Обобщая полученные результаты можно сделать заключение об отсутствии значимого нейротоксического влияния соединения РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг, а также дозах, превышающих эффективную в 2 и 5 раз. С увеличением дозы до 75 мг/кг и выше у животных развивается выраженная седация, а также отмечено снижение болевой чувствительности (таблица 7.2.4).

Таблица 7.2.4 – Влияние соединения РУ-31 и ципрогептадина при внутрижелудочном введении на функционально-поведенческий статус мышей

Тестируемые параметры	РУ-31					Ципрогептадин					
	Доза, мг/кг										
	10	20	50	75	100	14	28	70	105	140	
Поведенческие реакции											
Вокализация	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Гибель животных
Настороженность	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Пассивность	–	–	–	↑↑	↑↑	–	–	–	–	↑↑	
Стереотипия	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Беспокойство	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Агрессия	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Грумминг	–	–	↓	↓↓	↓↓	–	–	–	–	↓	
Спонтанная двигательная активность	–	–	–	↓	↓↓	–	–	–	–	↓	
Нервно-мышечная возбудимость											
Реакция на прикосновение	–	–	–	–	↓	–	–	↓	↓	↓	Гибель животных
Реакция на боль	–	–	↓	↓↓	↓↓	–	–	–	–	↓	
Реакция на стук	–	–	–	↓	↓↓	–	–	↓	↓	↓	
Тремор	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Подергивание	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Судороги	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Расстройство походки	–	–	–	↑↑	↑↑	–	↑	↑	↑	↑	
Тонус конечностей	–	–	–	–	↓	–	–	↓	–	–	
Вегетативные эффекты											
Птоз/экзофтальм	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Гибель животных
Размер зрачка	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Саливация	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Уринация	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Дефекация	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Температура	–	–	↓	↓↓	↓↓	–	–	↓	↓↓	↓↓	
Цвет кожи	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Частота дыхательных движений	–	–	–	↑↑	↑↑	–	–	↑	↑↑	↑↑	

Примечания: ↓ – изменения, связанные с ослаблением тестируемого показателя; ↑ – изменения, связанные с усилением тестируемого показателя; – отсутствие изменений; ↓↑ – изменения, статистически незначимо отличающиеся от контрольной группы; ↓↓/↑↑ – изменения, статистически значимо отличающиеся от контрольной группы.

При сравнительном анализе обращает на себя внимание появление симптомов угнетения двигательной активности и изменения нервно-мышечной возбудимости в

группах, получавших ципрогептадин в более низких дозах, чем в группах, получавших соединение РУ-31.

Аналогичная тенденция выявлена и для параметров, отражающих состояние вегетативных реакций. Для более высоких доз ($5 \times \text{ЭД}_{50}$ и $7,5 \times \text{ЭД}_{50}$) картина развития наиболее значимых нейрофункциональных нарушений для животных, получавших соединение РУ-31 и ципрогептадин, оставалась схожей. При этом стоит отметить, что при дальнейшем увеличении дозы до десятикратно превышающей среднюю эффективную у животных, получавших ципрогептадин, зарегистрирована летальность, в то время как для соединения РУ-31 отмечено только изменение нейрофункционального статуса. При этом в течение последующего наблюдения за животными, получавшими соединение РУ-31, после окончания многопараметрового тестирования летальности не наступила.

7.3.1 Острая токсичность при внутрижелудочном пути введения у мышей

В группе опытных животных, получавших соединение в дозе 25 – 50 мг/кг, в отличие от группы контрольных животных, отмечена отчетливая тенденция снижения спонтанной подвижности с сохранением, но незначительным снижением реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители, седация, незначительное нарушение координации движений, у части мышей самок клонические судороги.

В группах мышей, получавших соединение РУ-31 в дозах 200 и 300 мг/кг, кроме вышеперечисленных симптомов появлялись признаки атаксии. При увеличении дозы до 400 мг/кг отмечено появление стереотипии и судорожного синдрома с лево- и правосторонним поворотом туловища вокруг собственной оси.

При увеличении дозы соединения РУ-31 до 500 мг/кг у самцов и самок отмечено появление ярко выраженного тонико-клонического синдрома с лево- и правосторонним поворотом туловища вокруг собственной оси, паралич нижних конечностей и гибель всех животных в группе в течение 0,5 – 2,5 часов после введения исследуемого соединения.

По результатам проведенных двухнедельных наблюдений установлена ранняя и отдаленная гибель в группе мышей самцов, получавших внутрижелудочно соединение

РУ-31 в дозе 300 мг/кг на 7 сутки. В группах мышей самок отдаленная гибель не установлена.

По результатам гибели мышей рассчитаны величины LD₅₀ исследуемого соединения с использованием методов линейного регрессионного анализа (таблица 7.3.1.1).

Таблица 7.3.1.1 – Показатели острой токсичности соединения РУ-31 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения белым беспородным мышам

Вид животного	LD ₅₀ , мг/кг	SD, мг/кг
Мыши – самцы	156,3	138,07 – 176,88
Мыши – самки	135,0	103,09 – 176,87

Примечание: Статистическая обработка Microsoft Excel 2016 с использованием методов линейного регрессионного анализа.

Таким образом, при наблюдении за опытными группами мышей, получавших соединение РУ-31 в дозах от 200 до 500 мг/кг внутрижелудочно, и при сравнении состояния с контрольной группой мышей, выявлена характерная клиника интоксикации: угнетение локомоций, снижение реакций на болевые, тактильные и звуковые раздражители, учащение дыхания, тонико-клонические судороги с лево- и правосторонним поворотом туловища вокруг собственной оси. При этом у самок мышей опытных групп отмечена более выраженная реакция на токсическое действие соединения РУ-31, чем у мышей самцов, гибель мышей самок в первые сутки эксперимента наступала по времени раньше, чем у самцов. По истечению первых суток наблюдений общее состояние животных, получавших изучаемое соединение, восстанавливалось до исходного уровня.

7.3.2 Острая токсичность при внутрижелудочном пути введения у крыс

В группе крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 50 мг/кг ранняя и отдаленная гибель животных не выявлена, состояние животных данной группы не отличалось от животных контрольной группы.

В группе крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 100 мг/кг, в отличие от группы контрольных животных, отмечено сокращение локомоций с нарушением координации движений.

В группе крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 500 мг/кг, выявлено снижение локомоций и реакций на болевые, тактильные и слуховые раздражители.

При увеличении вводимой дозы соединения РУ-31 до 1000 мг/кг у самцов зарегистрировано появление судорожного синдрома. При введении крысам самкам соединения РУ-31 в дозе 1300 мг/кг отмечено появление судорожного синдрома в течение первых четырёх часов после введения исследуемого соединения с летальным исходом всех крыс самок.

При введении соединения РУ-31 крысам самцам в дозе 2000 мг/кг отмечено снижение локомоций с нарушением координации движения, угнетение реакций на болевые, тактильные и слуховые раздражители, увеличение частоты дыхания, отсутствие груминга, седация, появление судорожного синдрома и гибель всех самцов данной группы в первые сутки наблюдения.

По результатам гибели крыс рассчитана величина LD₅₀ исследуемого соединения по методу Литчфилда и Уилкоксона (таблица 7.3.2.1).

Таблица 7.3.2.1 – Показатели острой токсичности соединения РУ-31 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения белым беспородным крысам

Вид животного	LD ₅₀ , мг/кг	SD, мг/кг
Крысы – самцы	549,6	304,67 – 991,24
Крысы – самки	449,3	318,64 – 782,33

Примечание: Статистическая обработка Microsoft Excel 2016 с использованием методов линейного регрессионного анализа.

Таким образом, при наблюдении за крысами, получавшими соединение РУ-31 внутрижелудочно в токсических дозах от 1000 до 2000 мг/кг и при сравнении общего состояния с контрольной группой крыс, выявлена характерная картина интоксикации – угнетение локомоций, снижение реакций на болевые, тактильные и звуковые раздражители, учащение дыхания, тонико-клонические судороги. Период проявления интоксикации длился 5-6 часов. При этом у самок крыс опытных групп отмечена более выраженная реакция на токсическое действие соединения РУ-31, чем у крыс самцов, гибель крыс самок в первые сутки эксперимента наступала по времени раньше, чем у самцов. При последующем наблюдении за крысами опытных групп в течение 14 суток

было отмечено, что общее состояние животных, получавших соединение РУ-31, восстанавливалось до исходного уровня.

7.3.3 Острая токсичность при внутривенном пути введения у мышей

В группе опытных мышей, получавших соединение РУ-31 в дозах 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 мг/кг, в отличие от группы контрольных мышей, после введения вещества отмечена отчетливая тенденция снижения частоты дыхания, спонтанной подвижности, снижение реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители, отсутствие груминга в течение 6 часов наблюдения после введения вещества. При этом у опытных животных не зафиксировано наличие тремора, судорожного синдрома. Указанные эффекты нивелировались до состояния контрольных показателей через 24 часа наблюдений. Через сутки состояние особей мышей соответствовало норме и особям контрольной группы.

По результатам гибели мышей рассчитана величина LD₅₀ исследуемого соединения по методу Литчфилда и Уилкоксона (таблица 7.3.3.1).

Таблица 7.3.3.1 – Показатели острой токсичности соединения РУ-31 через 14 суток после однократного внутривенного введения белым беспородным мышам

Вид животного	LD ₅₀ , мг/кг	SD, мг/кг
Мыши – самцы	63,9	44,79 – 91,44
Мыши – самки	54,8	47,35 – 63,44

Примечание: Статистическая обработка Microsoft Excel 2016 с использованием методов линейного регрессионного анализа.

Признаки интоксикации у выживших животных сохранялись 7-8 часов, через сутки общее состояние мышей соответствовало норме. В последующие дни наблюдения общее состояние и поведение животных не отличалось от контрольной группы. Отмечено, что в местах введения соединения РУ-31 не возникает гиперемии и отечности тканей, что указывает на отсутствие у препарата местного раздражающего действия.

7.3.4 Острая токсичность при внутривенном пути введения у крыс

В группе опытных крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 12,5 мг/кг, в отличие от группы контрольных животных, в отдельных случаях отмечены

незначительные и кратковременные снижение груминга, снижение частоты дыхания, локомоции, реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители.

В группе крыс, получавших соединение РУ-31 в дозе 25, 50 и 75 и 100 мг/кг, выявлено сокращение локомоций с нарушением координации движений, снижение реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители.

По результатам гибели крыс рассчитана величина LD₅₀ исследуемого соединения по методу Литчфилда и Уилкоксона (таблица 7.3.3.1).

Таблица 7.3.4.1 – Показатели острой токсичности соединения РУ-31 через 14 суток после однократного внутривенного введения белым беспородным крысам

Вид животного	LD ₅₀ , мг/кг	SD, мг/кг
Крысы – самцы	59,0	46,14 – 75,41
Крысы – самки	47,3	40,87 – 54,74

Примечание: Статистическая обработка Microsoft Excel 2016 с использованием методов линейного регрессионного анализа.

Признаки интоксикации у выживших животных сохранялись 7-8 часов, через сутки общее состояние крыс соответствовало норме. В последующие дни наблюдения общее состояние и поведение крыс не отличалось от контрольной группы, отдаленной гибели не зафиксировано. На местах введения соединения (хвостовая вена) не зафиксировано гиперемии, отёка и раздражения.

7.4 Заключение

В результате проведённого исследования цитотоксичности в МТТ-тесте на фибробластах кожи человека установлена полуингибирующая концентрация (IC₅₀) соединения РУ-31, которая составила 36,8 мкМ (R²=0,98), уступая препарату сравнения ципрогептадину на 92% и превосходя референсный цитостатик доксорубицин на 95%. Это свидетельствует о существенно более низком уровне токсичности данного соединения для клеток человека по сравнению с известным цитостатиком доксорубицином.

При изучении нейрофункционального статуса животных установлено, что для соединения РУ-31 в средней эффективной дозе и дозах, превышающих среднюю эффективную в 2 и 5 раз, не характерно влияние на функциональное состояние

вегетативной нервной системы, нервно-мышечное возбуждение и поведение животных. Наиболее значимыми из симптомов передозировки являются седация, снижение рефлекторных реакций на внешние раздражители; со стороны функционального состояния вегетативной нервной системы – повышение частоты дыхательных движений, гипотермия. При этом, для препарата сравнения ципрогептадина был отмечен более низкий уровень доз, приводящих к развитию симптомов интоксикации, а именно снижению спонтанной двигательной активности, изменению нервно-мышечного возбуждения, изменению параметров, отражающих вегетативный статус.

При изучении токсических свойств соединения РУ-31 получены значения LD_{50} при внутрижелудочном введении половозрелым мышам самцам составляет 156,28 мг/кг, мышам самкам – 135,03 мг/кг; при внутрижелудочном введении половозрелым крысам самцам составляет 549,55 мг/кг, крысам самкам – 499,28 мг/кг; при внутривенном введении половозрелым мышам самцам составляет 64,01 мг/кг, мышам самкам – 54,81 мг/кг; при внутривенном введении половозрелым крысам самцам составляет 58,98 мг/кг, крысам самкам – 47,31 мг/кг.

Общее состояние выживших животных, получавших соединение РУ-31 внутрижелудочно или внутривенно, через сутки восстанавливалось до исходного уровня. Наблюдение за животными опытных групп в последующие 14 дней эксперимента не показало гендерных различий в подвижности и реактивности на введенное вещество.

Соединение РУ-31 по величине LD_{50} согласно классификации токсичности по И.В. Березовской и И.В. Саноцкого соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мигрень является распространённым заболеванием со сложной патофизиологией, включающей ассоциацию сосудистых, тригеминальных и нейротропных звеньев (Амелин А.В., 2011; Соколов А.Ю. и др., 2017). Центральные и периферические эффекты, возникающие в ходе инициации и патогенеза данной патологии, реализуются посредством серотониновых рецепторов, в частности 2A подтипом (Мирзоян Р.С. и др., 2006; Амелин А.В., 2011).

На сегодняшний день основная терапия заболевания направлена на купирование развившего приступа – устранение головной боли и вегетативной симптоматики. Для этого используются препараты из разных фармакологических групп – противорвотные, обезболивающие, нестероидные противовоспалительные средства, триптаны (Амелин А.В., 2011; Осипова В.В., 2018). К сожалению, для представленных фармакологических групп характерно наличие побочных эффектов. Так, применение анальгетиков повышает вероятность развития абзусной головной боли, что ухудшает течение мигрени. Противорвотные препараты высокоэффективны при приёме в начале приступа мигренозной атаки, а применение триптанов ограничено в период ауры (Antonaci F., 2016). Учитывая наличие побочных эффектов и значительных ограничений при приеме лекарственных средств, используемых для профилактики и купирования приступов, создание и разработка новых соединений является актуальным и необходимым направлением современной фармакологии (Мирзоян Р.С. и др., 2006), а принимая во внимание данные о вовлечённости серотонинергического звена и 5-НТ_{2A}-рецепторов в патогенез мигрени, 5-НТ_{2A}-блокаторы представляют собой перспективный класс в качестве антимигренозных агентов.

В Волгоградском государственном медицинском университете осуществляется разработка нового класса биологически активных соединений с серотонинблокирующим механизмом действия. В ходе исследований было выявлено соединение с высоким антисеротониновым действием – РУ-476. Были показаны противомигренозные, антиагрегантные и нейрорпсихотропные свойства (Мальцев Д.В., 2014; Яковлев Д.С., 2016), что свидетельствовало о перспективности данного соединения в качестве антимигренозного агента, однако, соединение оказалось

подвержено фотодеградации, что ограничивает хранение предполагаемой пероральной формы.

В дальнейшем, была синтезирована неорганическая дигидрохлоридная солевая форма 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола (Anisimova A.V. et al. 2013) – соединение РУ-31, обладающее селективным 5-НТ_{2А}-антагонистическим действием и показавшее высокую противомигренозную, антиагрегантную и анальгетическую активность (Агацарская Я.В., 2019), что потребовало расширенных изучений его фармакологических и токсикологических свойств и легло в основу настоящего исследования.

Настоящее исследование было направлено на расширенное изучение фармакологического потенциала соединения РУ-31. Учитывая сложный патогенез мигренозных атак, а также выявленные свойства соединения РУ-31, было проведено развёрнутое исследование его антимигренозных и анальгетических эффектов в условиях морфофункционально отражающих основные звенья патогенеза данной патологии. Кроме того, учитывая тот факт, что мигрень часто сопровождается психическими изменениями (депрессиями и тревожными расстройствами) (Азимова Ю. Э. и др., 2016; Татарина К. В., Артеменко А. Р., 2017; Баюшкина Л. И., Наприенко М. В., 2019) был изучен психотропный потенциал соединения РУ-31. А принимая во внимание данные об изменении реологических свойств крови, было проведено исследование влияния соединения РУ-31 на реологические и коагуляционные параметры крови. Кроме того, для расширения представления о механизмах возникновения выявленных свойств, а также получения данных о безопасности соединения РУ-31 было проанализировано его влияние на внутриклеточные пострецепторный и внеклеточный сигналинг и оценены его токсические свойства.

Учитывая, что острые и хронические мигренозные атаки часто сопровождаются вазоконстрикторными ишемическими нарушениями кровотока, на первом этапе исследования были изучены противомигренозные свойства соединения РУ-31 в условиях, воспроизводящих основные звенья патогенеза сосудистых патологий мозга. Так, на основании данных, полученных в условиях, отражающих вазоконстрикторные ишемические нарушения кровотока, был рассчитан процент падения скорости мозгового

кровотока ($25,86 \pm 1,0$ для соединения РУ-31 и $31,14 \pm 0,7$ для ципрогептадина), согласно которому соединение РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг превосходит препарат сравнения ципрогептадин в 1,2 раза. Выявленная эффективность соединения РУ-31 при моделировании сосудистых серотониновых спазмов в условиях преходящей ишемии, свидетельствует об высокой эффективности данного соединения в состоянии острого и длительного нарушения мозгового кровотока.

Болевой синдром в период мигренозных атак является выраженным симптомом, сохраняющимся от нескольких часов до нескольких дней, а учитывая вовлеченность периферических 5-НТ_{2А}-рецепторов в сенсорную ноцицепцию (Aira Z. et al., 2012; Viguiet F. et al., 2013; Kato K. et al., 2015; Huang B.Q. et al, 2015), изучение обезболивающей активности соединения РУ-31 являлось необходимым этапом.

В исследовании анальгетической активности соединения РУ-31 в условиях, отражающих этиопатогенетическую вовлеченность тригемино-вазкулярной системы, а также дополнительную индукцию возбудимости периферических и центральных звеньев тригемино-вазкулярной системы, специфичной для приступов мигренозной атаки выявлено, что соединения РУ-31 в средней эффективной дозе оказывает выраженное антиноцицептивное действие (орофациальная формалиновая гипералгезия – 41%, орофациальная формалиновая гипералгезия с нитроглицериновой нагрузкой – 70%).

Известно, что в терапии мигрени, наибольшей эффективностью для лечения приступов легкой и умеренной выраженности в группе противовоспалительных препаратов обладают диклофенак, индометацин, ацетилсалициловая кислота (Ingledue M., 2014). Однако длительное применение указанных препаратов ограничено проявлением ряда побочных эффектов, таких как тромбоцитопения, агранулоцитоз, нефропатия, гастродуоденопатия (Vaena et al., 2017).

При исследовании влияния соединения РУ-31 на выраженность воспалительного отека, индуцированного субплантарным введением раствора серотонина, установлено, что соединение РУ-31 (10 мг/кг) способствует снижению отека лапки на 36%.

Таким образом, учитывая данные о этиопатогенезе и выраженного болевого компонента в ходе мигренозного приступа, а также вовлеченности 5-НТ_{2А}-рецепторов в

патогенез воспалительной боли, выявленные эффекты расширяет спектр антимигренозного действия соединения РУ-31.

5-HT_{2A}-рецепторы широко распространены в центральной нервной системе, что указывает на их участие в многочисленных неврологических эффектах, опосредованных серотином (Puig M.V., 2010; Bombardi C., 2014; Nosjar C., 2015). Дисфункция серотонинергической системы является одним из основных факторов в основе патогенеза тревожных расстройств и депрессии, часто наблюдаемых у людей с мигренью (Lin C.X. et al., 2015; Ishima T. et al., 2015; Qesseveur G. et al., 2016). Предполагается, что эффективность антидепрессантов при мигрени связана не только с их влиянием на обмен 5-гидрокситриптамина и других моноаминов, а также с модуляцией активности серотонинергических нейронов в центральной нервной системе.

На втором этапе, в ходе исследования психотропного потенциала соединения РУ-31, была показана способность данного соединения снижать чувство тревоги и страха в различных тестах, отражающих анксиогенез, причём, во всем диапазоне исследуемых доз (2 – 50 мг/кг) соединение РУ-31 проявляло анксиолитическое действие по уровню активности соизмеримое с диазепамом в дозе 1 мг/кг. Так, наиболее выраженное антифобическое действие было выявлено в средней эффективной дозе 10 мг/кг, а с дальнейшим увеличением дозы наблюдалось снижение оказываемого эффекта.

В результате изучения антидепрессивного эффекта было показано, что соединение РУ-31 в дозе 2 и 10 мг/кг проявляет выраженную антидепрессивную активность, сопоставимую с препаратом сравнения имипрамином в дозе 10 мг/кг. С увеличением дозы наблюдалось снижение выраженности антидепрессивного эффекта.

Таблица 8.1 – Психотропный потенциал соединения РУ-31

Исследуемые свойства	Доза, мг/кг			
	2	10	30	50
Анксиолитическая активность	+	+	+	+
Антидепрессивная активность	+	+	+	–

Примечания: «+» – статистически значимый эффект; «–» – отсутствие статистически значимого эффекта.

Для препарата сравнения ципрогептадина наличие анксиолитической и антидепрессивной активности выявлено не было.

Таким образом, учитывая наличие тревожно-депрессивных состояний при мигрени, патогенетически связанных с серотонинергической системой, а также эффективность антидепрессантов в профилактическом лечении мигрени, наличие анксиолитического и антидепрессивного действия соединения РУ-31 расширяет его эффективность в терапии мигрени.

Известно, что активация 5-НТ₂-рецепторов вызывает констрикцию мозговых сосудов, изменяет проницаемость капилляров и повышает агрегацию тромбоцитов, что в совокупности изменяет вязкостные характеристики крови и вызывает процессы, связанные с развитием микроциркуляторной патологии при мигрени (Табеева Г.Р., 2010; Harriott A.M., Barrett K.M., 2015; Mawet J., 2015; Табеева Г.Р., 2017).

В исследовании реологических свойств показано, что соединение РУ-31 оказывает влияние на вязкость крови в условиях моделирования «синдрома гипервязкости» *in vitro* и у интактных животных при внутрижелудочном введении, по уровню активности сопоставимое с препаратом сравнения пентоксифиллином.

Кроме того, соединение РУ-31 способно снижать агрегацию эритроцитов в плазме в условиях повышенной вязкости крови. Стоит отметить, что на деформируемость суспензии отмытых эритроцитов, то есть, без вовлечения компонентов плазмы, соединение РУ-31 влияние не оказывает. Данный факт может свидетельствовать о вовлечении плазменного компонента в агрегацию эритроцитов.

В исследовании антикоагуляционных свойств было выявлено, что соединение РУ-31 не оказывает достоверного влияния на показатели свёртывающей системы крови. Однако, комбинация варфарина и соединения РУ-31 приводит к удлинению протромбинового и тромбинового времени. Данный факт, может свидетельствовать об усилении влияния комбинации варфарина и соединения РУ-31 на процессы свёртывания крови по внешнему пути активации.

Таким образом, учитывая реологические и ишемические нарушения, наблюдаемые в ходе приступа мигрени и отягощающие её течение, способность

соединения РУ-31 снижать вязкость крови и тем самым улучшать состояния микроциркуляторного русла усиливает его основное действие.

В центральной нервной системе, вещества, которые способны нарушать взаимодействие 5-НТ_{2А}-рецептор – β -аррестин, могут изменять чувствительность рецептора к уровню серотонина, присутствующего в мозге, и поддерживать необходимый базальный серотонинергический тонус при одновременном устранении чрезмерной чувствительности рецептора к эндогенному серотонину (Schmid C.L. at all, 2008). Блокада постсинаптических и пресинаптических 5-НТ_{2А}-рецепторов способна приводить к изменению внутриклеточного и межклеточного сигналинга.

В связи с вышесказанным, на следующем этапе, было проведено исследование механизма действия и влияния соединения РУ-31 на передачу внутриклеточных и внеклеточных сигналов, что важно для расширения представления не только о механизмах возникновения выявленных эффектов, но возможности прогнозирования нежелательных побочных эффектов, характерных для группы серотониноблокаторов.

В ходе исследования, с использованием технологии трансфицированных клеток, было показано наличие для соединения РУ-31 дозозависимого 5-НТ_{2А}-антагонистического действия, опосредующего запуск внутриклеточного пострецепторного β -аррестинного каскада, по уровню эффективности сопоставимого с препаратом сравнения ципрогептадином. Принимая во внимание тот факт, что наиболее выраженное влияние на β -аррестинный каскад соединение РУ-31 оказывает в максимально изученной концентрации 10 мкМ, можно предположить о преобладании внутриклеточного сигналинга, осуществляемым белком Gαq.

В ходе детализации аспектов выявленного противовоспалительного действия соединения РУ-31 была показана умеренная ингибирующая активность в отношении циклооксигеназы типа 1 и незначительное влияние на циклооксигеназу типа 2. Полученные данные подтверждают преимущественное влияние антисеротонинового компонента в ходе изучения противовоспалительных свойств соединения РУ-31.

Для соединения РУ-31 ранее были выявлены эффекты, показывающие наличие взаимодействия с серотонинергической, ГАМК-ергической, холинергической и дофаминергической системами мозгами в средней эффективной дозе 10 мг/кг, однако

исследований для всего диапазона доз не проводились. Таким образом, для понимания возникновения основных эффектов, а также прогнозирования возможных побочных реакций, было проведено изучение способности соединения РУ-31 изменять эффекты различных модуляторов основных нейромедиаторных систем организма в диапазоне доз от низких до субтоксических (рисунок 8.1).

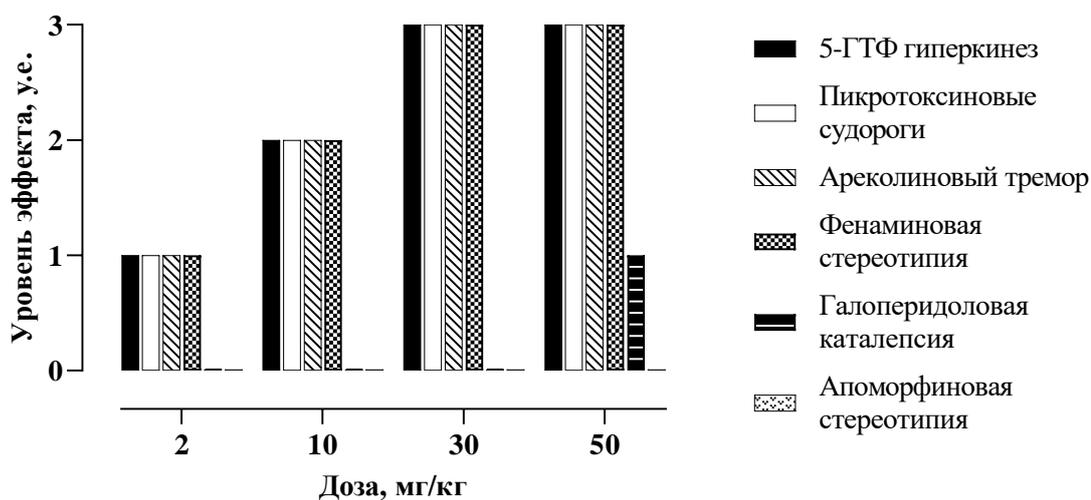


Рисунок 8.1 – Взаимодействие соединения РУ-31 с агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo*

Примечания: 0 – нет статистически значимого эффекта; 1 – слабо выраженный эффект; умеренно выраженный эффект; 3 – сильно выраженный эффект.

Так, в тесте «5-ГТФ гиперкинез», отражающем активацию серотонинергической системы, отмечалось снижение эффектов 5-гидрокситриптофана под действием соединения РУ-31, причём с увеличением дозы соединения выраженность центрального серотонинблокирующего эффекта увеличивалась. Эффекты 5-ГТФ снижались при использовании соединения РУ-31 в минимальной дозе 2 мг/кг. При увеличении дозы до 10 мг/кг наблюдалось полное подавление эффектов индуктора уже на пятидесятой минуте наблюдения. Более того, соединение РУ-31, введённое в дозах 30 и 50 мг/кг, полностью предотвращало развитие гиперкинезии, индуцированной 5-гидрокситриптофаном. Полученные данные подтверждают 5-НТ_{2A}-антагонистическую активность, так как именно блокирование 5-НТ_{2/2A}-рецепторов приводит к подавлению эффектов 5-ГТФ.

В тесте индуцированных пикротоксином тремора и судорог, основанных на взаимодействии пикротоксина с ГАМК-рецепторами, наблюдалось снижение эффектов пикротоксина в опытной группе. Соединение РУ-31 в минимальной дозе 2 мг/кг приводил к отсрочке возникновения тремора и длительности судорожных припадков. При увеличении дозы до 10 – 50 мг/кг увеличивалось время наступления тремора и судорог и снижалось количество судорожных припадков. Учитывая, что пикротоксин является антагонистом ГАМК-рецепторов, выявленные эффекты свидетельствуют о наличии ГАМК-миметического действия у соединения РУ-31, возрастающего с увеличением дозы.

Известно, что нарушения в системе ГАМК участвуют в развитии сенситизации, опосредующей головной боль. Кроме того, дисфункция системы ГАМК играет роль в коморбидности мигрени с депрессией и психозами. ГАМК-ергические нейроны, расположенные в ядрах ствола мозга, образуют нисходящие связи со структурами тройничного нерва и задействованы в антиноцицептивной регуляции. Так, ГАМК-рецепторы, расположенные на периферических отростках нейронов тройничного узла и ядрах тройничного нерва, при активации опосредуют уменьшение асептического нейрогенного воспаления сосудов мозговых оболочек, а также обеспечивают блокаду проведения ноцицептивной информации на периферическом и центральном уровнях.

Выявленное ГАМК-миметическое действие соединения РУ-31 расширяет представления о механизмах, выявленных антиноцицептивного, противовоспалительного, анксиолитического и антидепрессивного действий данного противомигренозного агента.

Кроме того, для соединения РУ-31 показано наличие взаимодействия с модулятором центрального М-холинергического звена нейротрансдачи – ареколином. В тесте с развитием тремора у крыс, опосредованного введением ареколина, активирующего центральные М-холинорецепторы, при введении соединения РУ-31 было отмечено устранение эффектов индуктора. Так, снижение длительности эффектов ареколина наблюдалось под влиянием изучаемого соединения уже в минимальной дозировке 2 мг/кг соединения РУ-31. С увеличением дозы соединения РУ-31 до 10 мг/кг, наблюдалось усиление устранения эффектов ареколина – снижение и длительности тремора и времени его возникновения. Максимально выраженное действие соединения

РУ-31 оказывало в дозах 30 и 50 мг/кг. Возможно, в данных субтоксических дозах, проявление вегетативных влияния соединения РУ-31 – сухость во рту, отёк слизистой.

Известно, что парасимпатическая нервная система участвует в развитии асептического нейрогенного воспаления мозговых сосудов в патогенезе мигрени, ацетилхолин также регулирует тонус мозговых сосудов. Кроме того, холинергическая система задействована в ноцицептивной регуляции. Таким образом, блокада центральных М₁-холинорецепторов вносит вклад реализацию анальгетической и противовоспалительной активностей соединения РУ-31.

Дисбаланс дофаминергической системы лежит в основе как самой мигрени, так и её коморбидных расстройств – тревоги и депрессии. Дофамин в момент мигренозных приступов задействован в механизмах ноцицепции, участвует в регуляции тонуса церебральных сосудов.

В ходе определения D₂-дофаминергического действия соединения РУ-31 не было выявлено значимого влияния на стереотипию, вызванную апоморфином во всём диапазоне изучаемых доз. Также не выявлено существенное влияния изучаемого соединения на каталептогенное действие галоперидола.

Однако, в тесте фенаминовой стереотипии соединение РУ-31 существенно увеличивало продолжительность эффектов индуктора. Так, соединение РУ-31 в минимальной дозе 2 мг/кг вызывало удлинение времени стереотипного поведения, индуцированного фенамином. При увеличении дозы изучаемого соединения до 10 – 50 мг/кг увеличивалось как время наступления стереотипии, так и её длительность. Полученные данные могут свидетельствовать о неспецифическом влиянии соединения РУ-31 в дозах, превышающих среднюю эффективную, на дофаминергическую нейротрансмиссию, в частности, на обратный захват дофамина. Выявленные эффекты коррелируют с данными, полученными при изучении антидепрессивных свойств соединения РУ-31. Выявленное неспецифическое влияние данного соединения на обратный захват моноаминов в субтоксических дозах объясняет нивелирование антидепрессивных эффектов, наблюдаемых в средней эффективной дозе 10 мг/кг и более низкой дозе 2 мг/кг.

Обобщённые результаты проведённого фармакологического анализа *in vivo* представлены в таблице 8.2.

Таблица 8.2 – Взаимодействие соединения РУ-31 с агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo*

Нейромедиаторная система	Регистрируемый показатель	Тип мишени	Доза, мг/кг			
			2	10	30	50
Серотонинергическая	5-ГТФ гиперкинез	5-НТ _{2А} -рецепторы	↓	↓	↓	↓
ГАМК-ергическая	Пикротоксиновые судороги	ГАМК _А -рецепторы	↑	↑	↑	↑
Холинергическая	Ареколиновый тремор	М-холинорецепторы	↓	↓	↓	↓
Дофаминергическая	Галоперидоловая каталепсия	D ₂ -рецепторы	–	–	–	–
	Апоморфиновая стереотипия	D ₂ -рецепторы	–	–	–	–
	Фенаминовая стереотипия	Транспортёры	↑	↑	↑	↑

Примечания: «↓» – антагонистический эффект; «↑» – агонистический эффект; «–» – отсутствие статистически значимого эффекта.

Таким образом, подтверждена возможность дозозависимо изменять внеклеточные эффекты индуктора, преимущественно осуществляемые через 2 тип серотониновых рецепторов, а также определены наличие ГАМК-миметического действия, способности влиять на центральное М-холинергическое звено и обратный захват дофамина в широком диапазоне доз, что, принимая во внимание данные о вовлечении этих систем в патогенез мигрени и её коморбидных расстройств, существенно расширяет основное 5-НТ_{2А}-блокирующее действие.

На заключительном этапе расширенного исследования свойств соединения РУ-31 была проведена оценка его токсичности.

Исследование цитотоксических свойств соединения РУ-31 было проведено в концентрациях, продемонстрировавших блокирование внутриклеточного пострецепторного β-аррестинного каскада, на первичных клетках человека, что позволяет получить более полную картину о токсических характеристиках соединения РУ-31. Так, в МТТ-тесте на фибробластах кожи человека установлена полуингибирующая концентрация (IC₅₀) соединения РУ-31, которая составила 36,8 мкМ (R²=0,98), уступая препарату сравнения доксорубину на 95%. Это позволяет сделать предположение о существенно более низком уровне токсичности данного соединения для клеток человека по сравнению с известным цитостатиком доксорубином.

Обобщение результатов изучения влияния соединения РУ-31 на нейрофункциональный статус животных представлены в таблице 8.3.

Таблица 8.3 – Влияние соединения РУ-31 на изменение параметров функционально-поведенческого статуса мышей при однократном внутривенном введении

Тестируемые параметры	Доза, мг/кг				
	ЭД ₅₀	2×ЭД ₅₀	5×ЭД ₅₀	7,5×ЭД ₅₀	10×ЭД ₅₀
Поведенческие реакции					
Пассивность	–	–	–	↑	↑
Груминг	–	–	–	↓	↓
Спонтанная двигательная активность	–	–	↓	↓	↓
Нервно-мышечная возбудимость					
Реакция на прикосновение	–	–	–	↓	↓
Реакция на боль	–	–	–	↓	↓
Реакция на стук	–	–	–	–	↓
Расстройство походки	–	–	–	↑	↑
Тонус конечностей	–	–	–	–	–
Вегетативные эффекты					
Температура	–	–	–	↓	↓
Частота дыхательных движений	–	–	–	↑	↑

Примечания: ЭД₅₀ – средняя эффективная доза; «↓» – изменения, связанные с ослаблением тестируемого показателя; «↑» – изменения, связанные с усилением тестируемого показателя.

При изучении нейрофункционального статуса животных установлено, что для соединения РУ-31 в средней эффективной дозе и дозах, превышающих среднюю эффективную в 2 и 5 раз, не характерно влияние на функциональное состояние вегетативной нервной системы, нервно-мышечное возбуждение и поведение животных. Для соединения РУ-31 в дозах, превышающих среднюю эффективную в 7,5 и более раз, отмечено, что животные становятся более пассивными, снижалась их двигательная активность, в единичных случаях отмечалось снижение тонуса конечностей и расстройство походки. Выявленные данные позволяют объяснить снижение антидепрессивного эффекта соединения РУ-31 с увеличением дозы.

В ходе проведения исследования острой токсичности на крысах и мышах обоего пола и двух путях введения (внутрижелудочном и внутривенном) была рассчитана величина полумлетальной дозы (таблица 8.2).

Таблица 8.4 – Показатели острой токсичности соединения РУ-31 через 14 суток на мышах и крысах обоего пола

Вид животного	Пол животного	Путь введения	LD ₅₀ , мг/кг	SD, мг/кг
Мыши	♂	Внутрижелудочный	156,3	138,07 – 176,88
	♀		135,0	103,09 – 176,87
Крысы	♂		549,6	304,67 – 991,24
	♀		449,3	318,64 – 782,33
Мыши	♂	Внутривенный	63,9	44,79 – 91,44
	♀		54,8	47,35 – 63,44
Крысы	♂		59,0	46,14 – 75,41
	♀		47,3	40,87 – 54,74

Примечание: Статистическая обработка Microsoft Excel 2016 с использованием методов линейного регрессионного анализа.

Таким образом, соединение РУ-31 по величине LD₅₀ согласно классификации токсичности по И.В. Березовской и И.В. Саноцкого соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 может быть отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

Заключение

Таким образом, соединение РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг проявляет способность устранять серотонинопосредованные сосудистые спазмы и оказывает анальгетическое действие в условиях орофациальной формалиновой гипералгезии. Выявлено наличие противовоспалительного действия. Показано влияние на вязкостные характеристики крови. Показано наличие анксиолитического, антидепрессивного действия в диапазоне доз 2 – 50 мг/кг. Соединение РУ-31 по величине LD₅₀ отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

Выявленные свойства в совокупности существенно расширяет противомигренозный потенциал соединения РУ-31.

ВЫВОДЫ

1. Соединение РУ-31 в средней эффективной дозе 10 мг/кг проявляет способность устранять серотонинопосредованные сосудистые спазмы в условиях длительного нарушения мозгового кровотока, превосходя препарат сравнения ципрогептадин на 40%.
2. Для соединения РУ-31 в средней эффективной дозе характерно выраженное анальгетическое действие, по уровню активности превосходящее препарат сравнения ципрогептадин:
 - в условиях теста орофациальной формалиновой гипералгезии на 30%
 - в условиях теста орофациальной формалиновой гипералгезии с нитроглицериновой нагрузкой на 44%.
3. Соединение РУ-31 в средней терапевтической дозе 10 мг/кг снижает выраженность серотонининдуцированной воспалительной реакции, по уровню эффективности соответствуя препаратам сравнения ципрогептадину и диклофенаку.
4. Для соединения РУ-31 характерно наличие выраженной анксиолитической активности в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Наказуемое взятие воды по Vogel» в дозах 2 и 10 мг/кг. В тесте «Принудительное плавание по Porsolt» соединение РУ-31 проявляет наиболее выраженную антидепрессивную активность в дозе 2 мг/кг.
5. Соединение РУ-31 оказывает влияние на реологические свойства крови, снижая её вязкость и агрегацию эритроцитов, но, не изменяя их деформируемость. По выраженности указанных эффектов соединение РУ-31 соответствует препаратам сравнения ципрогептадину и пентоксифиллину.
6. Соединение РУ-31 не влияет на основные параметры коагуляционного звена гемостаза в дозе 10 мг/кг. Комбинация варфарина и соединения РУ-31 приводит к удлинению протромбинового и тромбинового времени на 26% и 17% соответственно.
7. Для соединения РУ-31 характерно наличие 5-НТ_{2A}-антагонистического механизма действия:
 - *in vitro* в диапазоне концентраций 0,01 – 1 мкМ, по уровню эффективности сопоставимого с препаратом сравнения ципрогептадином

– *in vivo* в диапазоне доз 2-50 мг/кг, наиболее выраженный эффект отмечается в дозах, превосходящих среднюю эффективную в 3 и 5 раз.

8. Соединение РУ-31 оказывает ГАМК-миметическое, М-холиноблокирующее действие *in vivo* в диапазоне до 2 – 50 мг/кг.
9. Для соединения РУ-31 характерна ингибирующая активность в отношении циклооксигеназы типа 1, превосходя по эффективности препарат сравнения ципрогептадин и уступая диклофенаку, при статистически незначимом влиянии на циклооксигеназу типа 2.
10. Соединение РУ-31 оказывает умеренное цитотоксическое действие на фибробласты кожи человека, по уровню эффекта сопоставимое с препаратом сравнения ципрогептадином и уступающее по выраженности токсических свойств препарату сравнения доксорубицину. Для соединения РУ-31 характерно отсутствие влияния на функциональное состояние вегетативной нервной системы, нервно-мышечное возбуждение и поведение животных в средней эффективной дозе и дозах, превышающих среднюю эффективную в 2 и 5 раз. Соединение РУ-31 по величине LD₅₀ отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты о фармакодинамических свойствах соединения РУ-31, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть включены в общий отчёт расширенного доклинического исследования специфической фармакологической активности нового противомигренозного средства.

Данные о токсичности, а также предположительном взаимодействии соединения РУ-31 с препаратами из групп антикоагулянтов, симпатомиметиков, ингибиторов моноаминооксидазы могут быть использованы для формирования брошюры исследователя.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан

5-НТ – 5-гидрокситриптамин

АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ИДЭ – индекс деформации эритроцитов

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НГ – нитроглицерин

НПК – научно-производственная компания

ПА – показатель агрегации

ПО – программное обеспечение

ПТВ – протромбиновое время

СМК – скорость мозгового кровотока

ТВ – тромбиновое время

ТВС – тригемино-вазкулярная система

ЦОГ – циклооксигеназа

bla – ген β -лактамазы

СGRP – пептид, связанный с геном кальцитонина

DOI - специфический агонист рецептора 5-НТ2А

ЕМЕМ – среда МЕМ-Игла

ЕРК-киназа – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase)

FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии

Gal-VP16 – транскрипционный фактор

GPCRs – трансмембранные семиспиральные рецепторы, сопряжённые с G-белком, рецепторы

mCPP – метахлорфенилпиперазин

МТТ - тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

NO – монооксид азота

Rho – Ras homolog – семейства родственных белков

Rho-ГТФ-аза – гуанидинтрифосфатаза подсемейства Rho

Rho-киназа – киназа семейства Rho

SD – доверительный интервал

TEV-протеаза – высокоспецифичная цистеиновая протеаза вируса гравировки табака

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агацарская, Я.В. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола / Я.В. Агацарская, Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – №. 1 (69).
2. Агацарская, Я.В. Фармакологические свойства 9-диметиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)-имидазо[1,2- α]бензимидазола: Дисс.... канд. фарм. наук. Волгоград, 2019. – с.138.
3. Азимова, Ю.Э. Мигрень и эрготы: от истории к современности / Ю.Э. Азимова, В.В. Осипова // Consilium medicum Ukraina. – 2011. – С. 22.
4. Азимова, Ю.Э. Мигрень, кофеин, эрготамин: классическое трио / Ю.Э. Азимова, А.П. Рачин // Поликлиника. – 2016. – №. 1-1. – С. 28-30.
5. Амелин, А.В. Мигрень. Патогенез, клиника, фармакотерапия [Текст] / А.В. Амелин, Ю.Д. Игнатов, А.А. Скоромец [и др.] – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 256 с.
6. Баюшкина, Л.И. Хроническая мигрень и эмоциональные коморбидные нарушения / Л.И. Баюшкина, М.В. Наприенко // Российский журнал боли. – 2019. – Т. 17. – №. S1. – С. 37-38.
7. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / Березовская И.В. // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – №. 3. – С. 32-34.
8. Бугаева, Л.И. Исследование острой токсичности бромантана / Л.И. Бугаева, В.Е. Веровский, И.Н. Иежица и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63. – №. 1. – С. 57-61.
9. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин, М.А. Яркова и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть. – 2012. – Т. 1.
10. Воронина, Т.А. Перспективы поиска новых анксиолитиков / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65. – №. 5. – С. 4-17.

11. Ганьшина, Т.С. Нейромедиаторный механизм действия тропоксина в сравнении с противомигреновыми препаратами / Т.С. Ганьшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66. – №. 3. – С. 17-20.
12. Ганьшина, Т.С. Тропоксин – новое средство для лечения мигрени / Т.С. Ганьшина, А.А. Горбунов, А.В. Гнездилова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – №. 1. – С. 19-23.
13. Гречко, О.Ю. Анальгетическая активность производного бензимидазола на моделях воспалительной боли / О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, А.А. Спасов [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 2 (58).-С.101-103.
14. Калитин, К.Ю. ГАМКергический механизм противосудорожного эффекта соединения РУ-1205 / К. Ю. Калитин, О.Ю. Гречко, А. А. Спасов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – №. 11. – С. 582-588.
15. Кучерявенко, А.Ф. Антиагрегантная активность *in vitro* новых производных бензимидазола / А.Ф. Кучерявенко, В.С. Сиротенко, К.А. Гайдукова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – №. 1 (53)
16. Макаров, С.А. Антидепрессанты в профилактике мигрени / С.А. Макаров, Е.Г. Филатова // Медицинский алфавит. – 2017. – Т. 2. – №. 15. – С. 33-40.
17. Мальцев, Д.В. 5-НТ_{2А}-антагонисты в ряду новых производных бензимидазола и изучение их фармакологического действия: Дисс... канд. биол. наук. Волгоград, 2014. – с. 179.
18. Мирзоян, Р.С. Изыскание и изучение новых цереброваскулярных и противомигренозных средств / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, А.В. Топчян [и др.] // Бюлл. сибирской мед. - 2006. - Т. 5 - Прил. 2. – С. 55-57.
19. 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 и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 2012. – С. 480-488.

20. Мирзоян, Р.С. Трансляционный потенциал экспериментальной фармакологии цереброваскулярных расстройств / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, Г.А. Ким, Е.В. Курза [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2019. – Т. 13. – №. 3.
21. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев // 2012.
22. Морковина, Я.В. Адренергическая и серотонинергическая активность нового соединения с антимигренозными свойствами / Я. В. Морковина, Ю. В. Семенова, Д. А. Салихов [и др.] // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. – 2017. – №. 1 (53).
23. Муравьев, А.В. Агрегация эритроцитов и их мембранная эластичность у больных анемией злокачественных новообразований: механизмы изменений под влиянием эпоэтина альфа / А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко и др. // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2016. – Т. 33. – №. 6. – С. 422-428.
24. Нурхаметова, Д.Ф. Медиаторы тучных клеток как триггеры боли при мигрени: сравнение гистамина и серотонина в активации первичных афферентов в менингеальных оболочках крысы / Д.Ф. Нурхаметова, К.С. Королёва, О.Ш. Гафуров [и др.] // *Российский физиологический журнал им. Сеченова*. – 2019. – Т. 105. – №. 10. – С. 1225–1235.
25. Осипова, В.В. Первичные головные боли в практике невролога и терапевта / В.В. Осипова // 2018.
26. Парфенов, А.С. Анализатор крови реологический АКР-2 / А.С. Парфенов, А.В. Пешков, Н.А. Добровольский // *Определение реологических свойств крови: Методические рекомендации*. М. – 1994.
27. Петров, В.И. Основные результаты доклинического изучения субстанции 9-[2-(4-изопропилфенокси) этил] аденина, обладающего психотропной активностью / В.И. Петров, А.А. Озеров, М.С. Новиков [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – №. 3. – С. 13-13.
28. Петров, В.И. Фундаментальные и прикладные достижения ученых ВолГМУ в области фармакологии / В.И. Петров, А.А. Спасов, И.Н. Тюренков [и др.] //

- Актуальные проблемы стратегии развития Волгограда: под ред. В.С. Боровик. – 2012. – Городские вести.
29. Плотников, М.Б. Моделирование синдрома повышенной вязкости крови у крыс: оценка взаимосвязи гемореологических показателей и их информативности при ишемии мозга / М.Б. Плотников, А.А. Колтунов, О.И. Алиев и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – Т. 122. – №. 9. – С. 274-275.
 30. Полухина, Е.В. Ультразвуковая диагностика ретроперитонеального фиброза / Е.В. Полухина, Л.О. Глазун // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2016. – №. 5. – С. 11-21.
 31. Садоха, К.А. Мигренозный инсульт: миф или реальность / К.А. Садоха, В.В. Евстигнеев, А.М. Головкин [и др.] // Медицинские новости. – 2019. – №. 1 (292).
 32. Садоха, К.А. Мигрень: настоящее и будущее / К.А. Садоха // Медицинские новости. – 2020. – №. 2. – С. 32-38.
 33. Саноцкий, И.В. Основные понятия токсикологии / И.В. Саноцкий // Методы определения токсичности и опасности химических веществ — М.: Медицина. – 1970. – С. 101-108.
 34. Сергиенко, В.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств; под ред. А.Н. Миронова. // В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, Е. И. Маевский // Ч. – 2012. – Т. 1. – С. 889-940.
 35. Соколов, А.Ю. Возможный нейрофизиологический механизм реализации антицефалгического эффекта периферической нейростимуляции / А.Ю. Соколов, О.А. Любашина, С.С. Пантелеев [и др.] // Российский журнал боли. – 2017. – №. 1. – С. 4-5.
 36. Соколов, А.Ю. Роль серотониновых рецепторов в механизмах формирования мигрени / А.Ю. Соколов, О.А. Любашина, С.С. Пантелеев // Нейрохимия. – 2011. – Т. 28. – №. 2. – С. 104-112.
 37. Спасов, А.А. Современные направления разработки новых средств для лечения мигрени. Акцент на антагонистов 5-НТ2А-рецепторов / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, А. А. Бригадирова [и др.] // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45. – №. 3. – С. 238-251.

38. Табеева, Г.Р. Мигрень и инсульт / Г.Р. Табеева // *Consilium Medicum*. – 2010. – Т. 12. – №. 2. – С. 17-22
39. Табеева, Г.Р. Современная концепция патофизиологии и новые мишени терапии мигрени / Г.Р. Табеева, З. Кацарава // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2020. – Т. 12. – №. 4. – С. 143-152.
40. Табеева, Г.Р. Цереброваскулярные расстройства, ассоциированные с мигренью / Г. Р. Табеева // *Медицинский совет*. – 2017. – №. 10 С. 328-330
41. Татаринова, К.В. Влияние клинических проявлений мигрени, депрессии и нарушения сна на качество жизни пациентов с хронической мигренью / К.В. Татаринова, А. Р. Артеменко // *Нервно-мышечные болезни*. – 2017. – Т. 7. – №. 1.
42. Ткачев, С.Ю. Модели болевого синдрома в экспериментальной онкологии / С.Ю. Ткачев, О.И. Кит, А.Ю. Максимов [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2020. – №. 1. – С. 94-94.
43. Тринус, Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства / Ф.П. Тринус, Н.А. Мохорт, Б.М. Клебанов // *Киев: Здоровье*. – 1975. – С. 218.
44. Филатова, Е.Г. Диагностика и лечение мигрени: рекомендации российских экспертов / Е.Г. Филатова, В.В. Осипова, Г.Р. Табеева [и др.] // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2020. – Т. 12. – №. 4. – С. 4-14.
45. Чайка, А.В. Методы экспериментального доклинического тестирования анальгетического действия различных факторов на лабораторных крысах и мышях / А.В. Чайка, И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. – 2015. – Т. 1. – №. 1 (67).
46. Черников, М.В. Анализ функционально значимых структурных фрагментов веществ с 5-НТ₂-и 5-НТ₃-антагонистической активностью / М.В. Черников, П.М. Васильев, А.А. Спасов // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2013. – Т. 11. – №. 3. – С. 38-41.
47. Шалькевич, Л.В. Особенности коморбидной патологии при мигрени без ауры у детей и влияние лечения на течение болезни / Л.В. Шалькевич, И.В. Жевнеронок // *Международный неврологический журнал*. – 2018. – №. 2 С. 96.

48. Шумкин, М.В. Распространение мигрени в современном мире / М.В. Шумкин // Наука и инновации в XXI веке: актуальные вопросы, открытия и достижения. – 2020. – С. 189-193.
49. Яковлев, Д.С. Анксиолитические свойства соединения РУ-1204 – нового 5-HT₃-антагониста / Д.С. Яковлев, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Инновационные достижения фундаментальных и прикладных медицинских исследований в развитии здравоохранения Волгоградской области. – 2010. – С. 246-251.
50. Яковлев, Д.С. Конденсированные азолы – новый класс лигандов серотониновых рецепторов: Дисс... докт. мед. наук. Волгоград, 2016. – с. 339.
51. Яковлев, Д.С. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 / Д.С. Яковлев, К.Т. Султанова, Е.А. Золотова и др. // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – №. 1.
52. Aira, Z. Selective impairment of spinal mu-opioid receptor mechanism by plasticity of serotonergic facilitation mediated by 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors / Z. Aira, I. Buesa, G.G. del Caño [et al.] // Pain. – 2012. – Vol. 153. – №. 7. – P. 1418-1425.
53. Albott, C.S. The antidepressant effect of repeat dose intravenous ketamine is delayed by concurrent benzodiazepine use / C.S. Albott, P.R. Shiroma, K.R. Cullen [et al.] // The Journal of clinical psychiatry. – 2017. - Vol. 78. – №. 3. – P. 308-209.
54. Alenazy, F.O. Novel antiplatelet targets in the treatment of acute coronary syndromes / F.O. Alenazy, M.R. Thomas // Platelets. – 2020. – P. 1-14.
55. Alvarado, D.M. Serotonin receptors regulate inflammatory response in experimental colitis / D.M. Alvarado, M.A.Ciorba //The Journal of Nutrition. – 2020.
56. Anisimova, V.A. Synthesis and pharmacological activity of amides of 2, 3-dihydroimidazo-and 2, 3, 4, 10-tetrahydropyrimido [1, 2-a] benzimidazolyl-n-acetic acids / V.A. Anisimova, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov [et al.] //Pharmaceutical chemistry journal. – 2013. – Vol. 46. – №. 11. – P. 647-652.
57. Arihan, O. Effects of two selected SSRIs on hemorheological parameters in rats / O. Arihan, S.C. Yabanoglu, G. Ucar [et al.] //Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2019. – Vol. 71. – №. 1. – P. 27-38.

58. Aringhieri, S. Clozapine as the most efficacious antipsychotic for activating ERK 1/2 kinases: role of 5-HT_{2A} receptor agonism / S. Aringhieri, S. Kolachalam, C. Gerace [et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. – 2017. – Vol. 27. – №. 4. – P. 383-398.
59. Armer, T.A. Development of a Novel, Clinical-stage Drug for the Prevention of Migraine Based on Receptor Activity Mapping and Achievement of a Target Receptor Profile / T.A. Armer, M. Guzman, S.W. Borland [et al.] // *Headache*. – 2019. – Vol. 59. – P. 137-137.
60. Aschehoug, I. Long-Term Outcome of Patients With Intractable Chronic Cluster Headache Treated With Injection of Onabotulinum Toxin A Toward the Sphenopalatine Ganglion—An Observational Study / I. Aschehoug, D.F. Bratbak, E.A. Tronvik // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2018. – Vol. 58. – №. 10. – P. 1519-1529.
61. Ashina, M. Migraine and the trigeminovascular system – 40 years and counting / M. Ashina, J.M. Hansen, T.P. Do [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2019. – Vol. 18, №. 8. – P. 795-804.
62. Åstrand, A. et al. In vitro characterization of new psychoactive substances at the μ -opioid, CB1, 5HT_{1A}, and 5-HT_{2A} receptors – On-target receptor potency and efficacy, and off-target effects / A. Åstrand, D. Guerrieri, S. Vikingsson [et al.] // *Forensic Science International*. – 2020. – Vol. 317. – P. 110553.
63. Avona, A. Repetitive stress in mice causes migraine-like behaviors and calcitonin gene-related peptide-dependent hyperalgesic priming to a migraine trigger / A. Avona, B.N. Mason, J. Lackovic [et al.] // *Pain*. – 2020. – Vol. 161. – №. 11. – P. 2539-2550.
64. Baena, C.P. The effectiveness of aspirin for migraine prophylaxis: a systematic review / C.P. Baena, R.C. D'Amico, H. Slongo [et al.] // *Sao Paulo Medical Journal*. – 2017. – Vol. 135. – №. 1. – P. 42-49.
65. Baldacci, F. Migraine features in migraineurs with and without anxiety–depression symptoms: A hospital-based study / F. Baldacci, C. Lucchesi, M. Cafalli [et al.] // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2015. – Vol. 132. – P. 74-78.
66. Bamalan, O.A. Physiology, Serotonin / O.A. Bamalan, A.Y. Khalili // *StatPearls [Internet]*. – StatPearls Publishing, 2019.
67. Bannister, K. Central Nervous System Targets: Supraspinal Mechanisms of Analgesia / K. Bannister, A.H. Dickenson // *Neurotherapeutics*. – 2020. – P. 1-7.

68. Bardin, L. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats / L. Bardin, J. Lavarenne, A. Eschalier // *Pain*. – 2000. – Vol. 86. – №. 1-2. – P. 11-18.
69. Bardoni, R. Serotonergic modulation of nociceptive circuits in spinal cord dorsal horn / R. Bardoni // *Current Neuropharmacology*. – 2019. – Vol. 17. – №. 12. – P. 1133-1145.
70. Bécamel, C. Growing evidence for heterogeneous synaptic localization of 5-HT_{2A} receptors / C. Bécamel, C. Berthoux, A. Barre [et al.] // – 2017.
71. Benyamina, A. Potential role of cortical 5-HT_{2A} receptors in the anxiolytic action of cyamemazine in benzodiazepine withdrawal / A. Benyamina, M. Naassila, M. Bourin // *Psychiatry research*. – 2012. – Vol. 198. – №. 2. – P. 307-312.
72. Berthoux, C. Sustained activation of postsynaptic 5-HT_{2A} receptors gates plasticity at prefrontal cortex synapses / C. Berthoux, A. Barre, J. Bockaert [et al.] // *Cerebral Cortex*. – 2019. – Vol. 29. – №. 4. – P. 1659-1669.
73. Bohn, L.M. Serotonin receptor signaling and regulation via β -arrestins / L.M. Bohn, C.L. Schmid // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. – 2010. – Vol. 45. – №. 6. – P. 555-566.
74. Bolay, H. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model / H. Bolay, U. Reuter, A.K. Dunn [et al.] // *Nature medicine*. – 2002. – Vol. 8. – №. 2. – P. 136-142.
75. Bombardi, C. Neuronal localization of the 5-HT₂ receptor family in the amygdaloid complex / C. Bombardi // *Frontiers in pharmacology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 68.
76. Bratbak, D.F. Pilot study of sphenopalatine injection of onabotulinumtoxinA for the treatment of intractable chronic migraine / D.F. Bratbak, S. Nordgård, L.J. Stovner [et al.] // *Cephalalgia*. – 2017. – Vol. 37. – №. 4. – P. 356-364.
77. Bubar, M.J. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence / M.J. Bubar, K.A. Cunningham // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2006. – Vol. 6. – №. 18. – P. 1971-1985.
78. Burch, R. Antidepressants for preventive treatment of migraine / R. Burch // *Current treatment options in neurology*. – 2019. – Vol. 21. – №. 4. – P. 18.
79. Burstein, R. Mechanism of action of OnabotulinumtoxinA in chronic migraine: A narrative review / R. Burstein, A.M. Blumenfeld, S.D. Silberstein [et al.] // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2020. – Vol. 60. – №. 7. – P. 1259-1272.

80. Casili, G. Dimethyl fumarate alleviates the nitroglycerin (NTG)-induced migraine in mice / G. Casili, M. Lanza, A. Filippone [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2020. – Vol. 17. – №. 1. – P. 1-16.
81. Cavestro, C. Novelty in inflammation and immunomodulation in migraine / C. Cavestro, M. Ferrero, S. Mandrino [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2019. – Vol. 25. – №. 27. – P. 2919-2936.
82. Ceriani, C.E.J. Novel medications for the treatment of migraine / C.E.J. Ceriani, D.A. Wilhour, S.D. Silberstein // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2019. – Vol. 59. – №. 9. – P. 1597-1608.
83. Chakraborty, S. Migraine-A Review on Current Strategies in Diagnosis, Management and Evaluation Methods-An Update / S. Chakraborty, A. Jayaraman, N.J. Lakshmi [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2020. – Vol. 12. – №. 5. – P. 691-697.
84. Chan, C. Biochemical modulation and pathophysiology of migraine / C. Chan, D.Y. Wei, P.J. Goadsby // *Journal of Neuro-Ophthalmology*. – 2019. – Vol. 39. – №. 4. – P. 470-479.
85. Chan, Y.M. Relating excitatory and inhibitory neurochemicals to visual perception: A magnetic resonance study of occipital cortex between migraine events / Y.M. Chan, K. Pitchaimuthu, Q.Z. Wu [et al.] // *Plos one*. – 2019. – Vol. 14. – №. 7. – P. e0208666.
86. Chen, K. Lysergic acid diethylamide causes mouse retinal damage by up-regulating p-JAK1/p-STAT1 / K. Chen, X. He, C. Li [et al.] // *Cutaneous and Ocular Toxicology*. – 2020. – Vol. 39. – №. 2. – P. 106-110.
87. Chyou, T. Comparative risk of Parkinsonism associated with olanzapine, risperidone and quetiapine in older adults-a propensity score matched cohort study / T. Chyou, R. Nishtala, P.S. Nishtala // *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. – 2020. – Vol. 29. – №. 6. – P. 692-700.
88. Cinar, I. The role of 5-HT₇ receptors on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats with high-fat diet exacerbated coronary endothelial dysfunction / I. Cinar, Z. Halici, B. Dincer [et al.] // *Human & Experimental Toxicology*. – 2020. – P. 0960327120916821.

89. Cinelli, M.A. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition / M. A. Cinelli, H.T. Do, G.P. Miley et al. // *Medicinal research reviews*. – 2020. – Vol. 40. – №. 1. – P. 158-189.
90. Clemow, D.B. Lasmiditan mechanism of action—review of a selective 5-HT_{1F} agonist / D.B. Clemow, K.W. Johnson, H.M. Hochstetler [et al.] // *The Journal of Headache and Pain*. – 2020. – Vol. 21. – №. 1. – P. 1-13.
91. Cortes-Altamirano, J.L. 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₇ receptors and their role in the modulation of pain response in the central nervous system / J.L. Cortes-Altamirano, A. Olmos-Hernandez, H.B. Jaime [et al.] // *Current neuropharmacology*. – 2018. – Vol. 16. – №. 2. – P. 210-221.
92. Courteix, C. 5-HT_{2A} Receptors and Pain / C. Courteix, A. Dupuis, P.Y. Martin [et al.] // *5-HT_{2A} Receptors in the Central Nervous System*. – Humana Press, Cham, 2018. – P. 339-352.
93. Cuomo, A. Medicina personalizzata con trazodone a rilascio prolungato e/o trazodone “once-a-day”: dai trial di ricerca alla pratica clinica / A. Cuomo, A. Fiorentini, C. Vampini [et al.] // *Rivista di Psichiatria*. – 2020. – Vol. 55. – №. 5. – P. 255-261.
94. Curtis, J.J. 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors contribute to the exacerbation of targeted and non-targeted effects of ionizing radiation-induced cell death in human colon carcinoma cells / J.J.Curtis, N.T. Vo, C.B. Seymour et al. // *International Journal of Radiation Biology*. – 2020. – Vol. 96. – №. 4. – P. 482-490.
95. D’Andrea, G. The role of neurotransmitters and neuromodulators in the pathogenesis of cluster headache: a review / G. D’Andrea, A. Gucciardi, F. Perini [et al.] // *Neurological Sciences*. – 2019. – Vol. 40. – №. 1. – P. 39-44.
96. D’Amico, J.M. Constitutively active 5-HT₂/α₁ receptors facilitate muscle spasms after human spinal cord injury / J.M. D’Amico, K.C. Murray, Y. Li [et al.] // *Journal of neurophysiology*. – 2013. – Vol. 109. – №. 6. – P. 1473-1484.
97. de Vries, T. Pharmacological treatment of migraine: CGRP and 5-HT beyond the triptans / T. de Vries, C.M. Villalón, A. MaassenVanDenBrink // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – C. 107528.
98. Deka, S. Pharmacology of Serotonin and Its Receptors / S. Deka, R. Bania, P. Borah [et al.] // *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*. – Springer, Singapore, 2020. – P. 183-212.

99. Delgado, M. Anxiolytic-like effect of a serotonergic ligand with high affinity for 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors / M. Delgado, A.G. Caicoya, V. Greciano [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2005. – Vol. 511. – №. 1. – P. 9-19.
100. Demartini, C. Nitroglycerin as a comparative experimental model of migraine pain: from animal to human and back / C. Demartini, R. Greco, A.M. Zanaboni [et al.] // *Progress in neurobiology*. – 2019. – Vol. 177. – P. 15-32.
101. Domínguez-Soto, Á. Serotonin drives the acquisition of a profibrotic and anti-inflammatory gene profile through the 5-HT_{7R}-PKA signaling axis / A. Domínguez-Soto, A. Usategui, M. de las Casas-Engel [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-15.
102. Dresler, T. Understanding the nature of psychiatric comorbidity in migraine: a systematic review focused on interactions and treatment implications / T. Dresler, S. Caratozzolo, K. Guldolf [et al.] // *The journal of headache and pain*. – 2019. – Vol. 20. – №. 1. – P. 51.
103. Edvinsson, J.C.A. The fifth cranial nerve in headaches / J.C.A. Edvinsson, A. Viganò, A. Alekseeva [et al.] // *The journal of headache and pain*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1-17.
104. Edvinsson, L. Does inflammation have a role in migraine? / L. Edvinsson, K.A. Haanes, K. Warfvinge // *Nature Reviews Neurology*. – 2019. – Vol. 15. – №. 8. – P. 483-490.
105. Edvinsson, L. Views on migraine pathophysiology: Where does it start? / L. Edvinsson, K.A. Haanes // *Neurology and Clinical Neuroscience*. – 2020. – Vol. 8. – №. 3. – P. 120-127.
106. Ersoy, A. Is ischemia associated with the formation of White matter lesions in migraine? / A. Ersoy, H. Yasar, C. Mertoglu [et al.] // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2020. – P. 105770.
107. Forman, S.B. Vasoactive and antiplatelet agents / S. B. Forman, K. Roy // *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy E-Book*. – 2019. – P. 358.
108. Francillard, I. Is there a timing for sensitivity to acute cerebral ischemia in migraine patients? / I. Francillard, L. Grangeon, A. Cornillot [et al.] // *Journal of the neurological sciences*. – 2020. – Vol. 408. – P. 116528.
109. Frederick, N. Meningeal lymphatics, immunity and neuroinflammation / Frederick N., Louveau A. // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2020. – Vol. 62. – P. 41-47.

110. Frederiksen, S.D. Perivascular neurotransmitters: regulation of cerebral blood flow and role in primary headaches / S.D. Frederiksen, K.A. Haanes, K. Warfvinge [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2019. – Vol. 39. – №. 4. – P. 610-632.
111. Gawliński, D. Adaptive mechanisms following antidepressant drugs: Focus on serotonin 5-HT_{2A} receptors / D. Gawliński, I. Smaga, M. Zaniowska [et al.] // *Pharmacological Reports*. – 2019. – Vol. 71. – №. 6. – P. 994-1000.
112. Goadsby, P.J. Pathophysiology of migraine: a disorder of sensory processing / P.J. Goadsby, P.R. Holland, M. Martins-Oliveira [et al.] // *Physiological reviews*. – 2017.
113. Grassini, S. Comorbidity in migraine with functional somatic syndromes, psychiatric disorders and inflammatory diseases: a matter of central sensitization? / S. Grassini, S. Nordin // *Behavioral Medicine*. – 2017. – Vol. 43. – №. 2. – P. 91-99.
114. Gray, J.A. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists / J.A. Gray, B.L. Roth // *Brain research bulletin*. – 2001. – Vol. 56. – №. 5. – P. 441-451.
115. Greco, R. Inhibition of monoacylglycerol lipase: Another signalling pathway for potential therapeutic targets in migraine? / R. Greco, C. Demartini, A.M. Zanaboni [et al.] // *Cephalalgia*. – 2018. – T. 38. – №. 6. – C. 1138-1147.
116. Guo, S. Low frequency activation of the sphenopalatine ganglion does not induce migraine-like attacks in migraine patients / S. Guo, K. Falkenberg, H.W. Schytz [et al.] // *Cephalalgia*. – 2020. – P. 0333102420921156.
117. Gupta, V.K. Pathophysiology of migraine: an increasingly complex narrative to 2020 / V.K. Gupta // *Future Neurology*. – 2019. – Vol. 14. – №. 2. – P. FNL12.
118. Haanes, K.A. Pathophysiological mechanisms in migraine and the identification of new therapeutic targets / K.A. Haanes, L. Edvinsson // *CNS drugs*. – 2019. – Vol. 33. – №. 6. – P. 525-537.
119. Hammond, N.G. The role of positive health behaviors in the relationship between early life stress and migraine / N.G. Hammond, I. Colman // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2020. – Vol. 60. – №. 6. – P. 1111-1123.
120. Harriott, A.M. Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing / A.M. Harriott, L.C. Strother, M. Vila-Pueyo [et al.] // *The Journal of Headache and Pain*. – 2019. – Vol. 20. – №. 1. – P. 91.

121. Harriott, A.M. Dissecting the association between migraine and stroke / A.M. Harriott, K. M. Barrett // *Current neurology and neuroscience reports*. – 2015. – Vol. 15. – №. 3. – P. 5
122. He, W. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β release and contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced migraine model / W. He, T. Long, Q. Pan [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2019. – Vol. 16. – №. 1. – P. 1-17.
123. Holland, P.R. Cortical spreading depression-associated cerebral blood flow changes induced by mechanical stimulation are modulated by AMPA and GABA receptors / P.R. Holland, S. Akerman, P.J. Goadsby // *Cephalalgia*. – 2010. – Vol. 30. – №. 5. – P. 519-527.
124. Hosford, P.S. Involvement of 5-HT in cardiovascular afferent modulation of brainstem circuits involved in blood pressure maintenance / P.S. Hosford, A.G. Ramage // *Serotonin*. – Academic Press, 2019. – P. 239-270.
125. Hu, W. Blockade of 5-HT_{2A} receptors at the site of inflammation inhibits activation of spinal dorsal horn neurons in rats / W. Hu, Y. Zhang, Q. Cai [et al.] // *Brain research bulletin*. – 2016. – Vol. 124. – P. 85-94.
126. Huang, B.Q. Effects of blockade of 5-HT_{2A} receptors in inflammatory site on complete Freund's adjuvant-induced chronic hyperalgesia and neuropeptide Y expression in the spinal dorsal horn in rats / B.Q. Huang, B. Wu, Y. Hong [et al.] // *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*. – 2015. – Vol. 67. – №. 5. – P. 463-469.
127. Huang, J. Treatment with ketanserin produces opioid-mediated hypoalgesia in the late phase of carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats / J. Huang, Q. Cai, Y. Chen [et al.] // *Brain research*. – 2009. – Vol. 1303. – P. 39-47.
128. Ingledue, V.F. PURLs: Treating migraine: the case for aspirin / V.F. Ingledue, A. Mounsey // *The Journal of family practice*. – 2014. – Vol. 63. – №. 2. – P. 94.
129. Irwin, S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics*. – 1964. – Vol. 5. – P. 174-179.
130. Ishima, T. Potentiation of neurite outgrowth by brexpiprazole, a novel serotonin–dopamine activity modulator: a role for serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors / T. Ishima, T. Futamura, Y. Ohgi [et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. – 2015. – Vol. 25. – №. 4. – P. 505-511.

131. Iyengar, S. CGRP and the trigeminal system in migraine / S. Iyengar, K.W. Johnson, M.H. Ossipov [et al.] // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2019. – Vol. 59. – №. 5. – P. 659-681.
132. Jacobs, E.T. Cyproheptadine for Serotonin Toxicity: an Updated Systematic Review and Grading of Evidence / E.T. Jacobs, K.G. Akers, V. Vohra [et al.] // *Current Emergency and Hospital Medicine Reports*. – 2020. – P. 1-9.
133. Jahangir, S. Is there an association between migraine and major depressive disorder? A narrative review / S. Jahangir, D. Adjepong, H.A. Al-Sham [et al.] // *Cureus*. – 2020. – Vol. 12. – №. 6.
134. Jones, L.A. The ever-changing roles of serotonin / L.A. Jones, E.W. Sun, A.M. Martin [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2020. – P. 105776.
135. Jung, F. Role of blood viscosity in the microcirculation / F. Jung, M. Rampling // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. – 2016. – Vol. 64. – №. 3. – P. 251-254.
136. Kalkman, H.O. Stress-Induced Alteration in Chloride Transporters in the Trigeminal Nerve May Explain the Comorbidity between Depression and Migraine / H.O. Kalkman // *Psychiatry International*. – 2020. – Vol. 1. – №. 2. – P. 36-41.
137. Kato, K. The effect of a 5-HT_{2A} receptor antagonist on pain-related behavior, endogenous 5-hydroxytryptamine production, and the expression 5-HT_{2A} receptors in dorsal root ganglia in a rat lumbar disc herniation model / K. Kato, M. Sekiguchi, S.I. Kikuchi [et al.] // *Spine*. – 2015. – Vol. 40. – №. 6. – P. 357-362.
138. Kaur, G. Understanding Serotonin 5-HT_{2A} Receptors-regulated cellular and molecular Mechanisms of Chronic Kidney Diseases / G. Kaur, P. Krishan // *Renal Replacement Therapy*. – 2020. – Vol. 6. – №. 1. – P. 1-11.
139. Khan, S. Meningeal contribution to migraine pain: a magnetic resonance angiography study / S. Khan, F. M. Amin, C. E. Christensen [et al.] // *Brain*. – 2019. – Vol. 142. – №. 1. – P. 93-102.
140. Kilinc, E. Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: implications for migraine pain / E. Kilinc, C. Guerrero-Toro, A. Zakharov [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 116. – P. 160-173.
141. Kohler, R.J. The Effects of Low Dose Lysergic Acid Diethylamide Administration in a Rodent Model of Delay Discounting. / R.J. Kohler // – 2020.

142. Kooshki, R. Activation orexin 1 receptors in the ventrolateral periaqueductal gray matter attenuate nitroglycerin-induced migraine attacks and calcitonin gene related peptide up-regulation in trigeminal nucleus caudalis of rats / R. Kooshki, M. Abbasnejad, S. Esmaeili-Mahani [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 178. – P. 107981.
143. Koroleva, K. Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against the ATP-Induced Meningeal Nociception / K. Koroleva, E. Ermakova, A. Mustafina [et al.] // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 266.
144. Kurt, S. Obesity Induced by the Neurological Drugs / S. Kurt, O. Sumbul, B. Cevik [et al.] // *Frontiers in Clinical Drug Research-CNS and Neurological Disorders*. – 2020. – Vol. 8. – P. 35.
145. Leonard, B.E. HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system / B.E. Leonard // *Neuroimmunomodulation*. – 2006. – Vol. 13. – №. 5-6. – P. 268-276.
146. Levy, D. Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression / D. Levy // *Current pain and headache reports*. – 2012. – Vol. 16. – №. 3. – P. 270-277.
147. Levy, D. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache / D. Levy, R. Burstein, V. Kainz [et al.] // *Pain*. – 2007. – Vol. 130. – №. 1-2. – P. 166-176.
148. Li, X. The rs6311 of serotonin receptor 2A (5-HT_{2A}) gene is associated with alexithymia and mental health / X. Li, L. He, J. Liu [et al.] // *Journal of Affective Disorders*. – 2020.
149. Lin, C.X. Association between HTR2A T102C polymorphism and major depressive disorder: a meta-analysis in the Chinese population / C.X. Lin, Z. Hu, Z. M. Yan // *International journal of clinical and experimental medicine*. – 2015. – Vol. 8. – №. 11. – P. 20897.
150. Lin, E.Y.H. Neutrophil extracellular traps impair intestinal barrier function during experimental colitis / E.Y.H. Lin, H.J. Lai, Y.K. Cheng [et al.] // *Biomedicines*. – 2020. – Vol. 8. – №. 8. – P. 275.
151. Lionetto, L. Polyamines serum levels in episodic and chronic migraine / L. Lionetto, M. Guglielmetti, F. Cipolla [et al.] // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2020.
152. Liu, Q. Role of 5-HT receptors in neuropathic pain: potential therapeutic implications / Q. Liu, X. Yao, S. Gao [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2020. – P. 104949.

153. Lopez, E.R. Serotonin enhances depolarizing spontaneous fluctuations, excitability, and ongoing activity in isolated rat DRG neurons via 5-HT4 receptors and cAMP-dependent mechanisms / E.R. Lopez, A.G. Carbajal, J.B. Tian [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2020. – C. 108408.
154. Macedo, D.L. Methysergide to prevent migraine and cluster headache and the possibility of retroperitoneal fibrosis / D.L. Macedo, P.A. Soares, D.D.S. Freitas [et al.] // *Revista Dor*. – 2012. – Vol. 13. – №. 3. – P. 277-281.
155. Maffioletti, E. Association study between HTR2A rs6313 polymorphism and early response to risperidone and olanzapine in schizophrenia patients / E. Maffioletti, P. Valsecchi, A. Minelli [et al.] // *Drug Development Research*. – 2020.
156. Mann, J.J. Quantification of 5-HT1A and 5-HT2A receptor binding in depressed suicide attempters and non-attempters / J.J. Mann, A.V. Metts, R.T. Ogden [et al.] // *Archives of Suicide Research*. – 2019. – Vol. 23. – №. 1. – P. 122-133.
157. Martinelli, D. Chronic migraine and Botulinum Toxin Type A: Where do paths cross? / D. Martinelli, S. Arceri, L. Tronconi [et al.] // *Toxicon*. – 2020. – Vol. 178. – P. 69-76.
158. Mawet, J. Migraine and stroke: in search of shared mechanisms / J. Mawet, T. Kurth, C. Ayata // *Cephalalgia*. – 2015. – Vol. 35. – №. 2. – P. 165-181
159. May, A. Hypothalamic regulation of headache and migraine / A. May, R. Burstein // *Cephalalgia*. – 2019. – Vol. 39. – №. 13. – P. 1710-1719.
160. Messlinger, K. Cross-talk signaling in the trigeminal ganglion: role of neuropeptides and other mediators / K. Messlinger, L.K. Balcziak, A.F. Russo // *Journal of Neural Transmission*. – 2020. – P. 1-14.
161. Mikhailov, N. Mechanosensitive meningeal nociception via Piezo channels: Implications for pulsatile pain in migraine? / N.Mikhailov, J. Leskinen, I.Fagerlund [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2019. – Vol. 149. – P. 113-123.
162. Mikhailov, N. Parasympathetic cholinergic and peptidergic mechanisms of trigeminal pain / N. Mikhailov, I. Shelukhina, K. Koroleva [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 2017. – Vol. 142. – P. 102-102.
163. Mikhailov, N. The role of the meningeal lymphatic system in local inflammation and trigeminal nociception implicated in migraine pain / N. Mikhailov, K. Koroleva, A. Abdollahzadeh [et al.] // *bioRxiv*. – 2020.

164. Miller, P.S. Structural basis for GABA A receptor potentiation by neurosteroids / P.S. Miller, S. Scott, S. Masiulis [et al.] // *Nature structural & molecular biology*. – 2017. – Vol. 24. – №. 11. – P. 986.
165. Murray, B.P. Two Cases of Serotonin Syndrome After Bupropion Overdose Treated With Cyproheptadine / B.P. Murray, J.E. Carpenter, J. Sayers [et al.] // *The Journal of Emergency Medicine*. – 2020.
166. Nancy, J. Molecular mimicry of anti-migraine drugs with neurotransmitters, dopamine (DA) & serotonin (5-HT) and its role in the treatment of migraine. / J. Nancy // – 2019.
167. Neto, F.L. Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence / F.L. Neto, G. Borges, S. Torres-Sanchez [et al.] // *Current neuropharmacology*. – 2011. – Vol. 9. – №. 4. – P. 530-552.
168. Neugebauer, V. Serotonin – pain modulation / V. Neugebauer // *Handbook of Behavioral Neuroscience*. – Elsevier, 2020. – Vol. 31. – P. 309-320.
169. Nguema Ongone, T. Synthesis of Surfactants Derived from 2-Mercaptobenzimidazole and Study of Their Acute Toxicity and Analgesic and Psychotropic Activities / T. Nguema Ongone, L. El Ouasif, M. El Ghoul [et al.] // *Biochemistry research international*. – 2019.
170. Nikaido, T. Ethenzamide Exerts Analgesic Effect at the Spinal Cord via Multiple Mechanisms of Action Including the 5HT2B Receptor Blockade in the Rat Formalin Test / T. Nikaido, C. Maruyama, M. Hamanaka [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2020. – P. b19-01050.
171. Nocjar, C. Serotonin-2C and-2a receptor co-expression on cells in the rat medial prefrontal cortex / C. Nocjar, K.D. Alex, A. Sonneborn [et al.] // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 297. – P. 22-37.
172. Nosedá, R. Neuropeptides and neurotransmitters that modulate thalamo-cortical pathways relevant to migraine headache / R. Nosedá, D. Borsook, R. Burstein // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2017. – Vol. 57. – P. 97-111.
173. Nowak, P. Antinociceptive Effects of H₃ (R-Methylhistamine) and GABA B (Baclofen)-Receptor Ligands in an Orofacial Model of Pain in Rats / P. Nowak, M. Kowalińska-Kania, D. Nowak [et al.] // *Neurotoxicity research*. – 2013. – Vol. 24. – №. 2. – P. 258-264.

174. Nurkhametova, D.F. Mast cell mediators as pain triggers in migraine: comparison of histamine and serotonin in the activation of primary afferents in the meninges in rats / D.F. Nurkhametova, K.S. Koroleva, O.S. Gafurov [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2020. – T. 50. – №. 7. – С. 900-906.
175. Okamoto, K. 5-HT_{2A} receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats / K. Okamoto, H. Imbe, Y. Morikawa [et al.] // *Pain*. – 2002. – Vol. 99. – №. 1-2. – P. 133-143.
176. Okumura, T. 5-HT_{2A} receptors but not cannabinoid receptors in the central nervous system mediate levodopa-induced visceral antinociception in conscious rats / T. Okumura, T. Nozu, M. Ishioh [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2020. – P. 1-7.
177. Okumura, T. Adenosine A₁ receptor agonist induces visceral antinociception via 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, dopamine D₁ or cannabinoid CB₁ receptors, and the opioid system in the central nervous system / Okumura, T. Nozu, M. Ishioh [et al.] // *Physiology & Behavior*. – 2020. – P. 112881.
178. Otlivanchik, O. Migraine as a Stroke Mimic and as a Stroke Chameleon / O. Otlivanchik, A.L. Liberman // *Current pain and headache reports*. – 2019. – Vol. 23. – №. 9. – P. 63.
179. Peek, A.L. Brain GABA and glutamate levels across pain conditions: A systematic literature review and meta-analysis of 1H-MRS studies using the MRS-Q quality assessment tool / A.L. Peek, T. Rebeck, N.A. Puts [et al.] // *NeuroImage*. – 2020. – Vol. 210. – P. 116532.
180. Pellegrino, A.B.W. Perceived triggers of primary headache disorders: a meta-analysis / A.B.W. Pellegrino, R.E. Davis-Martin, T.T. Houle [et al.] // *Cephalalgia*. – 2018. – Vol. 38. – №. 6. – P. 1188-1198.
181. Peres, M.F.P. Medications we miss in headache treatment in Brazil / M.F.P. Peres, M.M. Valença // *Headache Medicine*. – 2017. – Vol. 8. – №. 2. – P. 55-57.
182. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M.L. Jalfre // *Nature*. – 1977. – T. 266. – №. 5604. – С. 730-732.
183. Puig, M.V. Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors / M.V. Puig, A. Watakabe,

- M. Ushimaru [et al.] // *Journal of neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – №. 6. – P. 2211-2222.
184. Qesseveur, G. Genetic dysfunction of serotonin 2A receptor hampers response to antidepressant drugs: a translational approach / G. Qesseveur, A.C. Petit, H.T. Nguyen [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol. 105. – P. 142-153.
185. Qesseveur, G. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression / G. Qesseveur, H.T. Nguyen, A.M. Gardier [et al.] // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2012. – Vol. 21. – №. 11. – P. 1701-1725.
186. Rainero, I. Migraine pathways and the identification of novel therapeutic targets / I. Rainero, F. Roveta, A. Vacca [et al.] // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2020. – T. 24. – №. 3. – C. 245-253.
187. Raut, S. Migraine and ischemic stroke: deciphering the bidirectional pathway / S. Raut, U. Singh, D. Sarmah [et al.] // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2020. – Vol. 11. – №. 11. – P. 1525-1538.
188. Redelinghuys, C. Serotonin/5-hydroxytryptamine (5-HT) physiology / C. Redelinghuys // *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*. – 2020. – Vol. 26. – №. 6. – P. 149-152.
189. Robblee, J.V. Triptan and ergotamine overdoses in the United States: analysis of the National Poison Data System / J.V. Robblee, R.J. Butterfield, A.M. Kang [et al.] // *Neurology*. – 2020. – Vol. 94. – №. 14. – P. e1460-e1469.
190. Roumier, A. Serotonin and the immune system / A. Roumier, C. Béchade, L. Maroteaux // *Serotonin*. – Academic Press, 2019. – P. 181-196.
191. Rozniecki, J.J. Differential effect of histamine 3 receptor-active agents on brain, but not peritoneal, mast cell activation / J.J. Rozniecki, R. Letourneau, M. Sugiultzoglou [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1999. – Vol. 290. – №. 3. – P. 1427-1435.
192. Rubio-Beltrán, E. Is selective 5-HT_{1F} receptor agonism an entity apart from that of the triptans in antimigraine therapy? / E. Rubio-Beltrán, A. Labastida-Ramírez, C.M. Villalón [et al.] // *Pharmacology & therapeutics*. – 2018. – Vol. 186. – P. 88-97.
193. Sahithi, A.S.T. Migraine: Update and Future Perspectives / A.S.T. Sahithi, T. Muthu, R. Saraswathy // *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. – 2020. – Vol. 10. – №. 4. – P. 179.

194. Sarkar, P. Structure, dynamics and lipid interactions of serotonin receptors: excitements and challenges / P. Sarkar, S. Mozumder, A. Bej [et al.] // *Biophysical Reviews*. – 2020. – P. 1-22.
195. Scelzo, E. Migraine and rare neurological disorders / E. Scelzo, M. Kramer, S. Sacco [et al.] // *Neurological Sciences*. – 2020. – P. 1-8.
196. Schellack, N. Migraine headaches in a nutshell / N. Schellack, O. Mogole, N. Magongwa [et al.] // *South African Family Practice*. – 2017. – Vol. 59. – №. 6. – P. 12-14.
197. Schmid, C.L. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on β -arrestin-2 interactions in vivo / C.L. Schmid, K.M. Raehal, L.M. Bohn // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – №. 3. – P. 1079-1084.
198. Seyedabadi, M. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential / M. Seyedabadi, M.H. Ghahremani, P.R. Albert // *Pharmacology & therapeutics*. – 2019. – Vol. 200. – P. 148-178.
199. Shelukhina, I. Cholinergic nociceptive mechanisms in rat meninges and trigeminal ganglia: potential implications for migraine pain / I. Shelukhina, N. Mikhailov, P. Abushik [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 163.
200. Shenoy, S.K. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction / S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz // *Trends in pharmacological sciences*. – 2011. – Vol. 32. – №. 9. – P. 521-533.
201. Shu, H.A Pre-Existing Myogenic Temporomandibular Disorder Increases Trigeminal Calcitonin Gene-Related Peptide and Enhances Nitroglycerin-Induced Hypersensitivity in Mice / H. Shu, S. Liu, Y. Tang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – №. 11. – P. 4049.
202. Sierra, S. Adjunctive effect of the serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist lorcaserin on opioid-induced antinociception in mice / S. Sierra, K.M. Lippold, D.L. Stevens [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 167. – P. 107949.
203. Smith, C. Recent Advances in Antiemetics: New Formulations of 5-HT₃ Receptor Antagonists in Adults / C. Smith, M. Smith, R. Cunningham [et al.] // *Cancer nursing*. – 2020. – Vol. 43. – №. 4. – P. 217-228.
204. Sommer, C. Serotonin in pain and pain control / C. Sommer // *Handbook of behavioral neuroscience*. – Elsevier, 2010. – Vol. 21. – P. 457-471.

205. Spanos, C. Carbachol-induced bladder mast cell activation: augmentation by estradiol and implications for interstitial cystitis / C. Spanos, M. El-Mansoury, R. Letourneau [et al.] // *Urology*. – 1996. – Vol. 48. – №. 5. – P. 809-816.
206. Spasov, A.A. Adamantane derivatives: Pharmacological and toxicological properties / A.A. Spasov, T.V. Khamidova, L.I. Bugaeva [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2000. – T. 34. – №. 1. – С. 1-7.
207. Stærmosse, T.G. Cortical GABA in migraine with aura-an ultrashort echo magnetic resonance spectroscopy study / T.G. Stærmosse, M.K. Knudsen, H. Kasch [et al.] // *The Journal of Headache and Pain*. – 2019. – Vol. 20. – №. 1. – P. 110.
208. Stein, D.J. 5-HT 2A: its role in frontally mediated executive function and related psychopathology / D.J. Stein, S. Hemmings, H. Moolman-Smook [et al.] // *CNS spectrums*. – 2007. – Vol. 12. – №. 7. – P. 512-516.
209. Steinberg, L.J. 5-HT1A receptor, 5-HT2A receptor and serotonin transporter binding in the human auditory cortex in depression / L.J. Steinberg, M.D. Underwood, M.J. Bakalian // *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. – 2019. – Vol. 44. – №. 5. – P. 294.
210. Su, M. Chronic migraine: a process of dysmodulation and sensitization / M. Su, S. Yu // *Molecular pain*. – 2018. – Vol. 14. – P. 1744806918767697.
211. Terwoord, J.D. Novel role of acetylcholine in vascular control in humans: дис. – Colorado State University, 2020.
212. Tietjen, G.E. Hypercoagulability and migraine / G.E. Tietjen, S.A. Collins // *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. – 2018. – Vol. 58, №. 1. – P. 173-183.
213. Tsutsui, T.A Rare case of schwannoma arising from the dura mater of the petrosal surface in the posterior cranial fossa / T. Tsutsui, Y. Yamao, K. Yoshida [et al.] // *World neurosurgery*. – 2020. – Vol. 141. – P. 188-191.
214. Turan, N. Investigating the antidepressant-like effects of some benzimidazole-piperidine derivatives by in-vivo experimental methods / N. Turan, U.D. Özkay, N.O. Can [et al.] // *Letters in Drug Design & Discovery*. – 2019. - Vol. 16. – №. 3. – P. 341-346.
215. Vacca, Jr V.M. Migraine variants: Nursing considerations / Jr V.M. Vacca, S.B. Thomas // *Nursing2020*. – 2020. – Vol. 50. – №. 11. – P. 34-41.
216. Vallabhaneni, D. Acute and chronic ischemia in the bilateral cerebellar border zones in patient with migraine with associated diffusion weighted imaging findings / D.

- Vallabhaneni, G. Smith, A.L. Reyes [et al.] // *Clinical Imaging*. – 2020. – Vol. 60. – №. 1. – P. 33-37.
217. Viguiet, F. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms—implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types / F. Viguiet, B. Michot, M. Hamon [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 716. – №. 1-3. – P. 8-16.
218. Vila-Pueyo, M. Targeted 5-HT_{1F} therapies for migraine / M. Vila-Pueyo // *Neurotherapeutics*. – 2018. – Vol. 15. – №. 2. – P. 291-303.
219. Villalón, C.M. The role of serotonin receptors in the control of cardiovascular function / C.M. Villalón // *The Serotonin System*. – Academic Press, 2019. – P. 45-61.
220. Vogel, J.R. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents / J.R. Vogel, B. Beer, D.E. Clody // *Psychopharmacologia*. – 1971. – Vol. 21. – №. 1. – P. 1-7.
221. Voronova, I.P. 5-HT_{2A} receptors control body temperature in mice during LPS-induced inflammation via regulation of NO production / I.P. Voronova, G.M. Khramova, E.A. Kulikova et al. // *Pharmacological research*. – 2016. – Vol. 103. – P. 123-131.
222. Wang, S. Signaling interaction between facial and meningeal inputs of the trigeminal system mediates peripheral neurostimulation analgesia in a rat model of migraine / S. Wang, J. Wang, K. Liu [et al.] // *Neuroscience*. – 2020.
223. Wen, W. Fructus Vitis methanolic extract attenuates trigeminal hyperalgesia in migraine by regulating injury signal transmission / W. Wen, H. Chen, K. Fu [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2020. – Vol. 19. – №. 1. – P. 85-94.
224. Wood, J.D. Serotonergic integration in the intestinal mucosa / J.D. Wood // *Current Pharmaceutical Design*. – 2020. – Vol. 26. – №. 25. – P. 3010-3014.
225. Xiao, J. Effects of ketanserin on experimental colitis in mice and macrophage function / J. Xiao, L. Shao, J. Shen et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2016. – Vol. 37. – №. 3. – P. 659-668.
226. Xing, L. Serotonin Receptor 2A Activation Promotes Evolutionarily Relevant Basal Progenitor Proliferation in the Developing Neocortex / L. Xing, N. Kalebic, T. Namba [et al.] // *Neuron*. – 2020.
227. Xu, W.J. Involvement of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in mediating the ventrolateral orbital cortex-induced antiallodynia in a rat model of neuropathic pain /

- W.J. Xu, Y.Y. Wang, Y. Zhao [et al.] // *NeuroReport*. – 2020. – T. 31. – №. 2. – C. 167-173.
228. Xu, X. Pharmacological Characterization of H05, a Novel Serotonin and Noradrenaline Reuptake Inhibitor with Moderate 5-HT_{2A} Antagonist Activity for the Treatment of Depression / X. Xu, Y. Wei, Q. Guo [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2018. – Vol. 365. – №. 3. – P. 624-635.
229. Yang, K. Blockade of GABA_B receptors facilitates evoked neurotransmitter release at spinal dorsal horn synapse / K. Yang, H. Ma // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 193. – P. 411-420.
230. Yang, T. Serotonin receptors 5-HTR_{2A} and 5-HTR_{2B} are involved in cigarette smoke-induced airway inflammation, mucus hypersecretion and airway remodeling in mice / T. Yang, H. Wang, Y. Zeng [et al.] // *International immunopharmacology*. – 2020. – Vol. 81. – P. 106036.
231. Yücel, Y. Association of polymorphisms within the serotonin receptor genes 5-HTR_{1A}, 5-HTR_{1B}, 5-HTR_{2A} and 5-HTR_{2C} and migraine susceptibility in a Turkish population / Y. Yücel, B.C. Salih Coşkun, H.H. Özdemir [et al.] // *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. – 2016. – Vol. 14. – №. 3. – P. 250.
232. Zangrossi, Jr H. Serotonin in panic and anxiety disorders / Jr H. Zangrossi, C.M. Del Ben, F.G. Graeff [et al.] // *Handbook of Behavioral Neuroscience*. – Elsevier, 2020. – Vol. 31. – P. 611-633.
233. Zhang, G. The receptors role of in serotonin memory 5-HT and cognition / G. Zhang, Jr R.W. Stackman // *10 Years of Neuropharmacology*. – 2020. – P. 22501.
234. Zhang, Q. The exploration of mechanisms of comorbidity between migraine and depression / Q. Zhang, A. Shao, Z. Jiang [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2019. – Vol. 23. – №. 7. – P. 4505-4513.
235. Zhang, Y.Q. Expression of 5-HT_{2A} receptor mRNA in rat spinal dorsal horn and some nuclei of brainstem after peripheral inflammation / Y.Q. Zhang, X. Gao, G.C. Ji [et al.] // *Brain research*. – 2001. – Vol. 900. – №. 1. – P. 146-151.