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

Скрипка Мария Олеговна

НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА

3.3.6 - 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

Волгоград, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ **6**

ГЛАВА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА **14**

1.1. Психотропные свойства 16

1.1.1. Антидепрессивная активность 16

1.1.2. Анксиолитическая активность 17

1.2. Противосудорожная активность 20

1.3. Влияние на внутриглазное давление 22

1.4. Противовоспалительная и анальгетическая активности 23

1.5. Противовирусное и антибактериальное действие 24

1.6. Противопротозойная активность 28

1.7. Противоопухолевая активность 29

1.8. Заключение 31

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 33

2.1. Материалы исследования 33

2.2. Методы исследования 37

2.3. Статистическая обработка данных 54

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА НЕЙРОПСИХОТРОПНОГО ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА 55

3.1. Анксиолитическая активность производных хиноксалина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» 55

3.2. Влияние производных хиноксалина на поведение мышей в тесте «Открытое поле» 59

3.3. Оценка антидепрессивных свойств производных хиноксалина в тесте «Подвешивание за хвост» 63

3.4. Влияние производных хиноксалина на локомоторную активность мышей в тестах «Ротарод», «Сетка» и «Проволока» 64

3.5. Зависимость анксиолитического эффекта производных хиноксалина от химической структуры 66

3.6. Заключение 73
ГЛАВА 4. АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 74
4.1. Противотревожный эффект соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» 74
4.1.1. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в зависимости от дозы 74
4.1.2. Длительность эффекта соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» 80
4.2. Анксиолитическая активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на крысах 84
4.3. Атарактическая активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Темная/светлая камера» 87
4.4. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение крыс в тесте «Конфликтная ситуация по Vogel» 88
4.5. Противотревожная активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Оценка тревожно-фобического состояния животных» на крысах 89
4.6. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Открытое поле» 90
4.7. Заключение 92
ГЛАВА 5. НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО ХИНОКСАЛИНА - СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 94
5.1. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Закапывание шариков» 94
5.2. Антидепрессивная активность соединения ЗДМ-81 95
5.2.1. Антидепрессивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Подвешивание за хвост» 96
5.2.2. Антидепрессивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Принудительное плавание по Porsolt» 97
5.2.3. Заключение 98

5.3. Анальгетическая активность соединения ЗДМ-81 98
5.3.1 Анальгетические свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Отдергивания хвоста» 98
5.3.2 Анальгетические свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Горячая пластина» 99
5.3.3. Заключение 100
5.4. Противосудорожная активность соединения ЗДМ-81 100
5.4.1. Антиконвульсивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Максимальный электрошок» 101
5.4.2. Антиконвульсивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Коразоловые судороги» 101
5.5. Исследование миорелаксирующих свойств соединения ЗДМ-81 102
5.6. Заключение 104
ГЛАВА 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 С ОСНОВНЫМИ АГОНИСТАМИ И АНТАГОНИСТАМИ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ 105
6.1. Взаимодействие соединения ЗДМ-81 с лигандами нейромедиаторных систем in vivo 105
6.1.1. Влияние флумазенила на эффекты соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» 105
6.1.2. Действие соединения ЗДМ-81 на 5-гидрокситриптофановый гиперкинез 107
6.1.3. Каталептогенные свойства галоперидола при введении соединения ЗДМ-81 108
6.1.4. Свойства соединения ЗДМ-81 в тесте с ареколином 109
6.1.5. Влияние соединения ЗДМ-81 на эффекты L-ДОФА 110
6.1.6. Эффект никотина при введении соединения ЗДМ-81 111
6.1.7. Действие соединения ЗДМ-81 на выраженность апоморфиновой стереотипии крыс 112
6.1.8. Влияние соединения ЗДМ-81 на эффекты пикротоксина 113

6.1.9. Гипотермическое действие клофелина при введении соединения ЗДМ-81 114
6.1.10. Действие соединения ЗДМ-81 в тесте «Резерпиновая гипотермия»... 115
6.2. Заключение 116
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ 119
ГЛАВА 8. ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 131
8.1 Определение острой токсичности соединения ЗДМ-81..... 131
8.2. Нейротоксические эффекты соединения ЗДМ-81 при введении различных доз изучаемого вещества в многопараметровом нейротоксикологическом тесте по S.Irwin..... 132
8.3. Оценка основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения ЗДМ-81 по показателям ADMET..... 137
8.4. Заключение 138
ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 152
ВЫВОДЫ 156
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 158
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ментальные расстройства являются одними из наиболее распространенных патологий в мире [Rehm et al. 2019; Botturi et al. 2020]. В среднем каждый третий человек в течение жизни страдает психическим расстройством [Christensen et al., 2020]. В дополнение к эпидемиологическим показателям, таким как заболеваемость и смертность, важность психических расстройств можно также оценить с помощью исследований стоимости болезни в рамках экономики здравоохранения: потери мировой экономики от прямых и косвенных издержек, обусловленных психическими заболеваний работников, оценивается в 2,5 трлн долларов США ежегодно [Doran et al., 2019].

Тревожные расстройства являются наиболее распространенными психическими заболеваниями [Александровский, 2014; Bandelow et al., 2022]. Тревога выполняет адаптивную функцию в стрессовых обстоятельствах, но может стать травмирующим фактором в том случае, когда у нее нет мотивации, и в таком случае она представляет собой клинический синдром [Shastry et al., 2016]. В период эпидемии COVID-19 увеличилась распространенность тревожных состояний, а также депрессии и агрессивных эпизодов при одновременном снижении удовлетворенности жизнью [Sher, 2020]. Многие страдают от стрессового расстройства, часто переживаемого в одиночестве [Peteet, 2020].

В настоящее время селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (СИОЗСН) преимущественно рекомендуются при лечении тревожных расстройств ввиду хорошего соотношения пользы и риска. Текущие руководства не рекомендуют бензодиазепины в качестве препаратов первой линии, поскольку они вызывают ряд нежелательных эффектов [Петров и др., 2015; Тюренков и др, 2011; Thibaut et al., 2022]. К «новым анксиолитикам» относятся парциальные агонисты ГАМК (абекарнил), эндогенные модуляторы $ГАМК_A$ (эндозепины), агонисты $ГАМК_B$ (фенибут), мембранные модуляторы $ГАМК_A$ (афобазол), глутаматергические (кетамин) и серотонинергические

анксиолитики (буспирон) [Воронина и др., 2002]. В большинстве случаев они характеризуются менее выраженными нежелательными реакциями, и, в то же время, уступают производным бензодиазепина в эффективности [Ковалев, 1990; Воронина и др., 2002; Середенин и др., 2009; Полковникова и др., 2011; Арушанян, 2012; Шабанов и др, 2016; Багметова и др, 2017].

Значительное внимание исследователей привлекают гетероарилзамещенные производные моноаминовых нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и нейрогормонов, таких как дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин, мелатонин, гистамин и β-фенилэтиламин, а также их близкие структурные аналоги [Lin et al., 2010; Morrow et al., 2020; Cinelli et al., 2020; Kasserra et al., 2016; Papa et al., 2015; Fournier et al., 2012; McKay et al., 2010; Kers et al., 2012; Tintori et al., 2009; Capaldi et al., 2017; Pruitt et al., 2003; Bui et al., 2021]. Таким образом, эти соединения должны представлять интерес прежде всего как нейротропные средства.

В научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного Федерального университета совместно с Северо-Кавказским зональным научно-исследовательским ветеринарным институтом был синтезирован неизвестный ранее тип гетероарилированных аналогов моноаминовых нейротрансмиттеров, а именно о-хиноксалил-2-метилпроизводные β-арилэтиламинов и 2-хиноксалил-2-метил N-метилтриптамина [Zubenko et al., 2020]. Для настоящей работы был получен новый ряд соединений этого типа и изучено действие таких производных на центральную нервную систему лабораторных животных.

Актуальным и целесообразным представляется изучение фармакологических эффектов новых соединений. Таким образом, является перспективным изучение в ходе настоящего исследования нейропсихотропных свойств нового ряда производных хиноксалина с целью оценки перспективности разработки на их основе новых высокоэффективных нейропсихотропных средств.

Тема утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протокол № 1 от 29.01.2020) и включена в план НИР.

Степень разработанности

На современном этапе азотсодержащие гетероциклы представляют особый интерес для разработки новых препаратов или потенциальных лекарственных молекул [Deepika et al., 2011; Ahmad et al., 2017; Kalaria et al., 2018; Kerru et al., 2020; Heravi et al., 2020]. Хиноксалиновый скаффолд, образованный слиянием двух ароматических колец, бензола и пиразина, является одним из гетероциклов, которому уделяется наибольшее внимание [Montana et al. 2021]. Производные хиноксалина характеризуются широким спектром фармакологических активностей: противовирусной [Montana et al., 2020], противоопухолевой [Montana et al., 2019], противолейшманиальной [Barea et al., 2013], противогрибковой [Patidar et al., 2011; Ammar et al., 2002], анальгетической [Tadesse et al., 2012], противовоспалительной [Abu-Hashem et al., 2010; Curry et al., 2005], гипогликемической [Kulkarni et al., 2012], антидепрессивной [Mahesh et al., 2011], противосудорожной [Abul-Khair et al., 2013], анксиолитической [Bhatt et al., 2013], что обусловливает значительное внимание к нему в области синтеза и поиска новых активных фармацевтических субстанций. Механизм действия производных хиноксалина отличается широкой вариабельностью: серотонинергический [Campiani et al., 1999], глутаматергический [Potschka et al., 1998], адренергический [Wheeler et al., 2006], ГАМК-ергический [Jacobsen et al., 1999]. Доступность химического синтеза и широкий спектр биологических активностей позволяет позиционировать хиноксалиновый скаффолд как перспективный с точки зрения медицинской химии для синтеза на его основе активных фармацевтических субстанций для лечения и профилактики ряда заболеваний.

На кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ ранее создана база для проведения исследований нейропсихотропного действия новых рядов соединений различных химических классов – меркаптобензимидазолов, диазепино[1,2-α]бензимидазолов, циклопентаазуления бромидов, имидазопиразинов, тиазолов, триазолодиазепинов, бифенилов и многих других [Maltsev et al., 2021a; Maltsev et al., 2021b; Спасов А. А., Жуковская О. Н. и др.,

2020]. Настоящая работа является первичным исследованием указанной активности производных хиноксалина с целью оценки перспективности данного направления, поиска высокоактивных соединений, а также возможного формирования практических рекомендаций по оптимизации существующих структур на основании полученных экспериментальных данных.

Цель исследования

Оценка нейропсихотропного потенциала действия нового ряда C^2,C^3-производных хиноксалина.

Задачи исследования

1. Провести изучение нейропсихотропного потенциала действия ряда новых производных хиноксалина.
2. Изучить зависимость анксиолитической активности новых соединений от их химической структуры.
3. Исследовать спектр анксиолитического действия соединения, проявившего наибольшую активность.
4. Изучить антидепрессивную активность соединения-лидера.
5. Оценить противосудорожные эффекты соединения с наибольшей активностью.
6. Исследовать анальгетические свойства соединения-лидера.
7. Проанализировать взаимодействие соединения-лидера с основными лигандами нейромедиаторных систем in vivo.
8. Оценить влияние соединения-лидера на содержание основных метаболитов и их моноаминов в головном мозге мышей.
9. Рассчитать характеристики нового соединения с применением методик ADMET.
10. Определить острую токсичность и нейротоксикологический профиль наиболее активного соединения с применением теста «S. Irwin».

Научная новизна исследования

Впервые были изучены нейропсихотропные свойства нового ряда C^2,C^3-производных хиноксалина при внутрижелудочном пути введения исследуемых

веществ. В ходе экспериментальной работы отмечено характерное для данных соединений анксиолитическое, антидепрессивное, анальгетическое действие. Выявлено соединение ЗДМ-81, по уровню анксиолитической активности не уступающее препарату сравнения диазепаму. Получены данные об отсутствии влияния введения соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус животных. Было установлено, что изучаемое соединение относится к классу 3, что соответствует умеренной токсичности. Таким образом, изучаемое соединение может рассматриваться в качестве вещества, проявляющего транквилизирующие свойства.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определена взаимосвязь между анксиолитической активностью C^2,C^3-производных хиноксалина и их химическим строением. Были получены данные, которые могут быть положены в основу направленного поиска новых соединений с нейропсихотропными свойствами. Впервые получены данные о характере нейропсихотропных свойств соединения ЗДМ-81. Впервые была определена полулетальная доза соединения ЗДМ-81, а также получены данные о возможных нежелательных реакциях. Изучаемое соединение ЗДМ-81 характеризуется серотонинергическим механизмом действия.

Методология и методы исследования

Методологическая основа для выполнения исследования соответствовала поставленным задачам и основывалась на технологической базе ФГБОУ ВО «Волгоградского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также ГБУ Волгоградского медицинского научного центра. Исследование осуществлялось на нелинейных половозрелых мышах-самцах и крысах-самцах. Среди нейропсихотропных свойств C^2,C^3-производных хиноксалина изучались анксиолитические, антидепрессивные, психорелаксирующие, противосудорожные, анальгетические. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием теста Колмогорова-Смирнова для определения нормальности распределения данных, а в случае непараметрического распределения - непараметрического критерия

Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Данна с применением ПО GraphPad Prism 7.0.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные C^2,C^3-хиноксалинового скаффолда являются перспективным классом соединений для поиска и изучения новых высокоэффективных анксиолитических средств.

2. Важным фактором проявления противотревожной активности новых соединений являлось наличие во втором положении хиноксалинового скаффолда заместителя, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью, за исключением пара-нитрофенилзамещённого, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина в положении 1.

3. Соединение ЗДМ-81, 2-(2-{[3-(4-трет-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид, проявляет высокую анксиолитическую активность на уровне препарата сравнения диазепама.

Внедрение результатов исследования

Выявленная взаимосвязь структуры и фармакологической активности изученного ряда производных хиноксалина послужит для оптимизации синтеза веществ на базе НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета с целью получения высокоэффективных соединений. Разработанная методология направленного поиска новых соединений с нейропсихотропной активностью применяется в лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ, а также кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ; фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ; фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического

оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с нейропсихотропной активностью, а также критериев статистической обработки данных. Основные результаты диссертационной работы были представлены на научно-практических конференциях:

- 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2020);
- XXV Региональной конференции молодых ученых и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2021 г.);
- 79-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2021);
- 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MedChem-Russia 2021» (Волгоград, 2021 г.).

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора

Скрипка М.О. принимала непосредственное участие в выполнении исследования по изучению фармакологической активности новых производных C^2,C^3-хиноксалина на всех его этапах, а именно: определения подходов к решению поставленных задач, выполнения экспериментальной работы, формулировке обсуждения результатов и разработке практических рекомендаций. Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, а также оформление рукописи.

Структура и объем диссертации

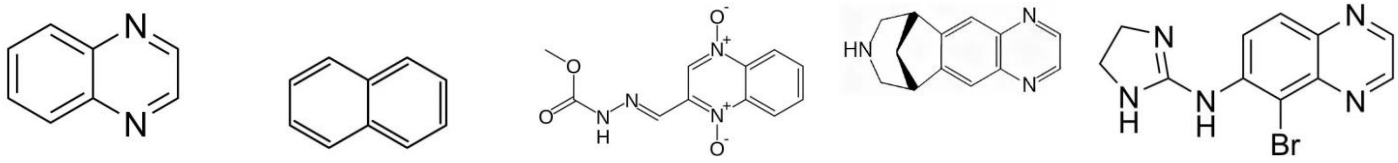
Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы работы, 6 глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, научно-практические

рекомендации, список литературы, содержащий 170 источников, из которых 38 отечественных и 132 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 70 рисунками и содержит 14 таблиц.

ГЛАВА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА

На современном этапе азотсодержащие гетероциклы представляют особый интерес для разработки новых препаратов или потенциальных лекарственных молекул [Deepika et al., 2011; Ahmad et al., 2017; Kalaria et al., 2018; Heravi et al., 2020; Kerru et al., 2020]. Хиноксалиновый скаффолд, образованный слиянием двух ароматических колец, бензола и пиразина, является одним из гетероциклов, которому уделяется наибольшее внимание [Montana et al. 2021]. Хиноксалины являются производными [1,4]диазина и могут называться бензо[b][1,4]диазинами, однако общепринятое тривиальное название основного гетероцикла - хиноксалин - принято ИЮПАК. Присутствие азота изменяет физико-химические и биологические свойства молекулы в сравнении со структурно родственным карбоциклом, нафталином. Незамещенный хиноксалин обладает более низкой резонансной энергией, чем нафталин, и другой полярностью: дипольный момент хиноксалина составляет 0,51 D, тогда как у нафталина - 0,0 D [Lumbroso et al., 1980; McClellan et al., 1963]. Помимо разницы в молекулярном объеме между нафталином и хиноксалином, замена CH-группы на азот обусловливает основные свойства этой гетероциклической системы [Markgraf et al., 1972].

Хиноксалиновый скаффолд в последние годы привлек внимание как структурный фрагмент большого количества потенциальных терапевтических средств непосредственно или в форме N-оксида или N,N'-диоксида [Carta et al., 2005; Carta et al., 2006]. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены производные хиноксалина, такие как, например, ветеринарное антибактериальное средство и стимулятор роста карбадокс, средство для лечения никотиновой зависимости варениклин или средство для лечения открытоугольной глаукомы бримонидин (Рисунок 1).



хиноксалин *нафталин* *карбадокс* *варениклин* *бримонидин*

Рисунок 1 - Химическое строение хиноксалина, нафталина, а также карбадокса, варениклина и бримонидина

Хиноксалин характеризуется широким спектром фармакологической активности - противовирусной [Montana et al., 2020], противоопухолевой [Montana et al., 2019], противолейшманиальной [Barea et al., 2013], противогрибковой [Ammar et al., 2002; Patidar et al., 2011], анальгетической [Tadesse et al., 2012], противовоспалительной [Abu-Hashem et al., 2010], гипогликемической [Kulkarni et al., 2012], антидепрессивной [Mahesh et al., 2011], противосудорожной [Abul-Khair et al., 2013], анксиолитической [Bhatt et al., 2013], что обусловливает значительное внимание к нему в области медицинской химии. Кроме того, поскольку хиноксалин также входит в состав известных антибиотиков широкого спектра действия, таких как эхиномицин, предполагается, что производные хиноксалина обладают и антимикобактериальной активностью (Рисунок 2) [Gonzalez et al., 2012].

Проведены исследования некоторых хиноксалинов – ингибиторов фосфодиэстеразы 10 в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения заболеваний центральной нервной системы млекопитающих, таких как шизофрения, биполярное и обсессивно-компульсивное расстройства, а также при лечении ожирения, инсулиннезависимого диабета и нарушений толерантности к глюкозе, метаболического и болевого синдромов [Malamas et al., 2009; Malamas et al., 2011]. Schering Corporation заявила, что 1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин вместе с 3,4-дигидро-1,4-бензоксазином и 3,4-дигидро-1,4-бензотиазином используются в качестве агонистов 2C-адренергических рецепторов для лечения и профилактики аллергического ринита, диареи, глаукомы, застойной сердечной недостаточности,

ишемической болезни сердца, маниакальных расстройств, депрессии, тревожного расстройства и шизофрении [McCormich et al., 2008].

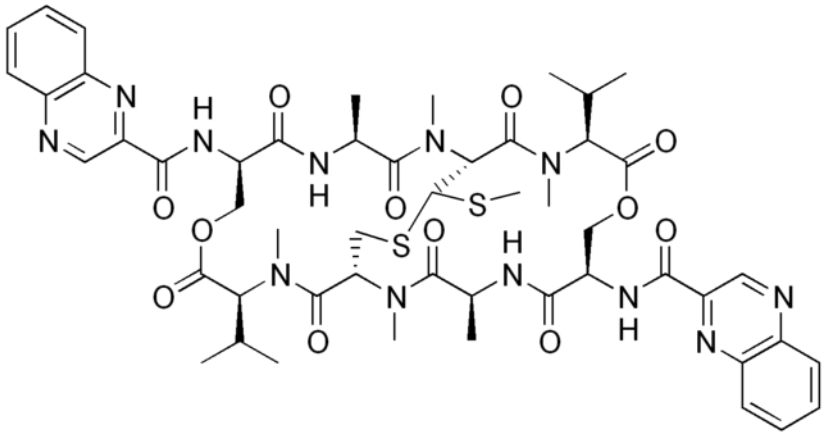


Рисунок 2 - Химическое строение эхиномицина

Механизм действия производных хиноксалина отличается широкой вариабельностью: серотонинергический [Campiani et al., 1999], глутаматергический [Potschka et al., 1998], адренергический [Wheeler et al., 2006], ГАМК-ергический [Jacobsen et al., 1999]. Простота химического синтеза и широкий спектр биологических активностей позволяет позиционировать хиноксалиновый скаффолд как перспективный с точки зрения медицинской химии для синтеза на его основе активных фармацевтических субстанций для лечения и профилактики ряда заболеваний. Разработки на его основе химических соединений с различными фармакологическими активностями представлены далее.

1.1. Психотропные свойства

1.1.1. Антидепрессивная активность

5-Гидрокситриптамин, широко известный как серотонин, является нейротрансмиттером, участвующим в большом количестве физиологических и патофизиологических процессов, действующих через подтипы рецепторов, от 5-HT_1 до 5-HT_7. Почти все подтипы рецепторов принадлежат к семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), но специфический подтип рецептора 5-HT_3 представляет собой лиганд-управляемый ионный канал [Mahesh et al., 2011]. Антагонисты этого рецептора вызывают различные эффекты, такие как

противорвотное действие при тошноте, вызванной химиолучевой терапией рака, а также антидепрессивное, анксиолитическое, антипсихотическое и противовоспалительное. Однако препараты, применяемые при депрессивных состояниях, характеризуются отсроченным началом действия, что обусловливает потребность в новых антидепрессантах с более безопасным и быстрым действием. Новая серия 3-замещенных-2-карбоксамидов хиноксалина была разработана в качестве антагонистов рецептора 5-HT_3. Все синтезированные соединения проявляли антагонизм к рецепторам 5-HT_3, причем некоторые из них - больший, чем препарат сравнения ондансетрон, например [3-этоксихиноксалин-2-ил][4-метилпиперазин-1-ил]метанон и N-[2-(1H-индол-3-ил)этил]-3-этоксихиноксалин-2-карбоксамид [Mahesh et al., 2011]. Соединение N-3-метоксихиноксалин-2-карбоксамид показало наиболее выраженный антагонизм к 5-HT_3-рецепторам [Husain et al., 2011]. Также были синтезированы 3-бензил-2-замещенные хиноксалины в качестве новых ингибиторов моноаминоксидазы А (МАО-А). Ингибиторы МАО применяются для лечения некоторых неврологических заболеваний, таких как депрессия и болезнь Паркинсона, а также их используют в качестве антидепрессантов и седативных средств. В этом исследовании конечные соединения оценивали на их ингибирующую активность в отношении МАО-А *in vitro* с использованием серотонина в качестве субстрата.

1.1.2. Анксиолитическая активность

В исследовании Bhatt et al., 2013, была оценена анксиолитическая активность производного хиноксалина 6g, (4-бензилпиперазин-1-ил)(3-метоксихиноксалин-2-ил)метанона. Анксиолитическую активность 6g (1 и 2 мг/кг, внутрибрюшинно) оценивали на мышах с помощью батареи поведенческих тестов на тревожность, таких как приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), темная/светлая камера (ТСК), тест заглядываний в отверстия (hole board test) и тест открытого поля (ОП) с диазепамом (2 мг/кг, внутрибрюшинно) в качестве стандартного анксиолитика. Новое химическое соединение 6g (2 мг/кг, внутрибрюшинно) и диазепам (2 мг/кг, внутрибрюшинно) значительно увеличили процент времени, проведенного в светлых рукавах установки, и количество

выходов в открытый рукав в тесте ПКЛ. В тесте ТСК соединение 6g и диазепам значительно увеличивали общее время пребывания в светлом отсеке, а также количество переходов из одного отделения в другое. Соединение 6g (1 и 2 мг/кг, внутрибрюшинно) и диазепам (2 мг/кг, внутрибрюшинно) также значимо увеличивали количество заглядываний, и значительно уменьшали латентный период первого заглядывания в тесте отверстий по сравнению с контрольной группой. Кроме того, 6g (2 мг/кг, внутрибрюшинно) и диазепам (2 мг/кг, внутрибрюшинно) значительно увеличивали локомоторную активность в тесте ОП [Bhatt et al., 2013].

В работе Kurhe et al., 2014, было изучено соединение 6k, N-(бензо[d]тиазол-2-ил)-3-этоксихиноксалин-2-карбокамид. Противотревожную активность 6k (1, 2 и 4 мг/кг, внутрибрюшинно) оценивали на мышах с применением аналогичного перечня поведенческих тестов. Диазепам (2 мг/кг, внутрибрюшинно) служил препаратом сравнения. В результате 6k значительно увеличило время и число выходов в открытый рукав ПКЛ по сравнению с контрольной группой. Кроме того, 6k значительно увеличило центральную и периферическую активность животных в тесте ОП, а также число стоек и время в центральной области установки. Отмечено снижение латентного периода входа в темную камеру, вместе с тем было увеличено количество переходов и время нахождения в светлой камере в тесте ТСК при введении 6k мышам по сравнению с контрольной группой. В тесте отверстий 6k значительно увеличивало количество наклонов головы и пересекаемых квадратов; тогда как латентный период для первого погружения головы и количество болюсов уменьшились по сравнению с контрольной группой [Kurhe et al., 2014] (Рисунок 3).

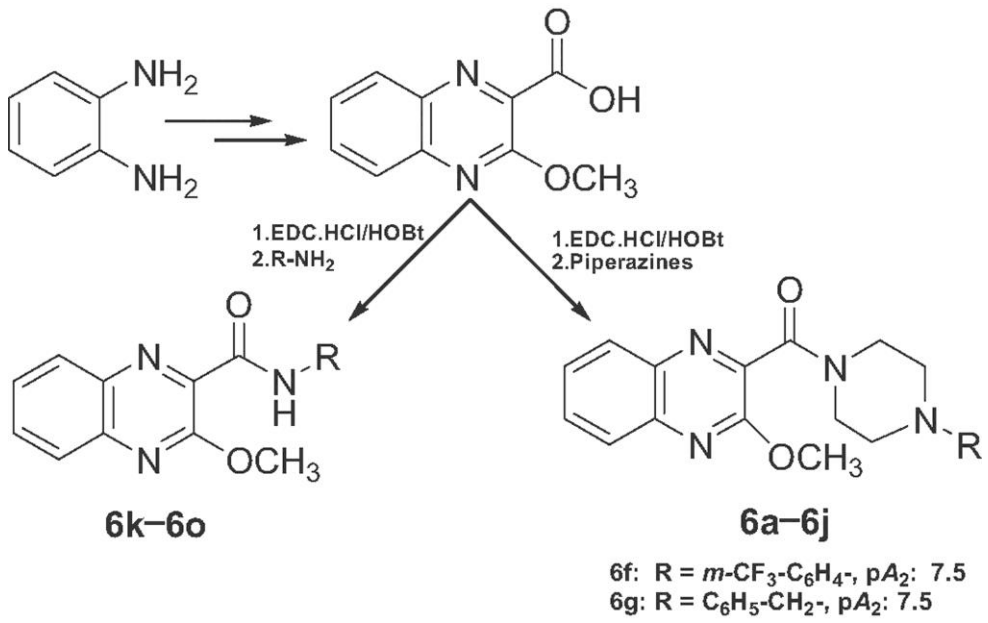


Рисунок 3 - Производные хиноксалина с антидепрессивными и анксиолитическими свойствами 6k, 6g и их структурные аналоги

Исследование Kurhe et al., 2015, посвящено изучению антидепрессантоподобных эффектов нового антагониста рецепторов 5-HT_3 (4-фенилпиперазин-1-ил)(хиноксалин-2-ил)метанона (4a) на модели хронического непредсказуемого легкого стресса (UCMS). Животных подвергали воздействию различных стрессоров в течение 28 дней. На 15-й день стрессовых процедур мышам вводили соединение 4a (2 и 4 мг/кг, перорально), эсциталопрам (10 мг/кг, перорально) или растворитель (10 мл/кг, перорально) до 28-го дня вместе с UCMS. После этого были проведены поведенческие тесты, такие как открытое поле (ОП), тест предпочтения сахарозы, тест принудительного плавания (ПП), тест подвешивания за хвост (ПЗХ) и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Биохимические анализы, такие как оценка уровня перекисного окисления липидов, нитритов, восстановленного глутатиона (ГЛТ), каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), оценивались в гомогенате мозга мышей. В результате соединение 4a проявило зависимое от дозы увеличение потребления сахарозы, уменьшение времени неподвижности в ПП и ПЗХ, увеличения числа выходов в открытый рукав и времени в светлом рукаве ПКЛ. Кроме того, биохимические изменения под влиянием 4a возвращались на уровень контрольных значений, что было исследовано по снижению перекисного

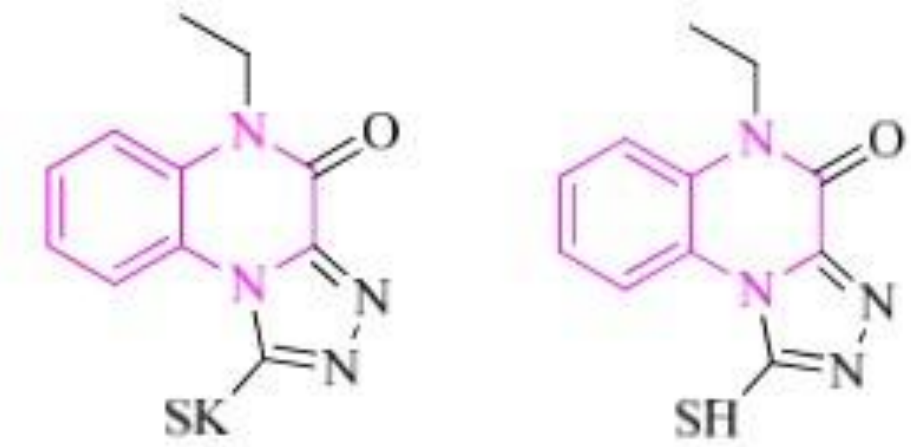
окисления липидов и нитритов и повышению антиоксидантных ферментов, таких как ГЛТ, каталаза и СОД. Таким образом, соединение 4a проявляет антидепрессивный потенциал, предотвращая вызванные UCMS поведенческие и биохимические изменения у мышей [Kurhe et al., 2015].

1.2. Противосудорожная активность

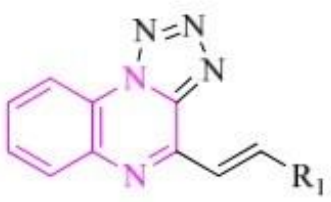
Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в центральной нервной системе млекопитающих. В случае чрезмерной стимуляции постсинаптических рецепторов глутамата ввиду высокой степени высвобождения возбуждающих аминокислот возникает гибель нейронов и ассоциированные нейродегенеративные расстройства, такие как болезнь Альцгеймера и Хантингтона [Mueller et al., 2011]. Было показано, что антагонисты AMPA-R (рецептора α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) не имеют побочных эффектов, таких как шизофрения, и многие производные хиноксалина были синтезированы и протестированы в отношении рецептора AMPA [Takano et al., 2003]. Соединение 7-[[4-[N-[4-карбоксифенил]карбамоилокси]метил]имидазолил]-3,4-дигидро-6-нитро-3-оксохиноксалин-2-карбоновая кислота (GRA-293) была идентифицирована как новый антагонист AMPA-R благодаря ее высокой эффективности и хорошей селективности *in vitro*, а мощное нейропротекторное действие GRA-293 на животной модели *in vivo* выше, чем у известных используемых соединений хиноксалина. Эти эффекты обусловлены новым заместителем, а именно замещенным бензольным кольцом с уретановой связью с имидазолом в положении C^7, что приводит к сильному сродству к AMPA-R и способствует высокой эффективности на животных моделях. Это соединение характеризуется потенциалом для лечения острой церебральной ишемии [Takano et al., 2003].

Abul-Khair и др. (2013) синтезировали гибриды (1,2,4)триазоло(4,3-а)хиноксалин-4(5H)-она. Для указанных соединений был проведен докинг для изучения их способа связывания с рецептором AMPA, поскольку AMPA является мишенью для значительного числа противосудорожных средств. Соединения, которые имели хорошие показатели стэкинга, оценивали на наличие

противосудорожных свойств *in vivo*. Соединения 50a и 50b проявили самую высокую активность [Abul-Khair et al., 2013] (Рисунок 4).

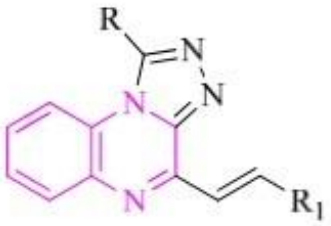


Соединения 50a и 50b.



51

a: R_1= 4-(F)C_6H_4, **b**: R_1= C_6H_5



52

a: R= CF_3, R_1= 4-(OCH_3)C_6H_4; **b**: R= CF_3, R_1= 4-(F)C_6H_4; **c**: R= CH_3, R_1= 4-(F)C_6H_4; **d**: R= H, R_1= 4-(F)C_6H_4; **e**: R= 4-(F)C_6H_4, R_1= 4-(OCH_3)C_6H_4

Соединения 51a-51b и 52a-52e.

Рисунок 4 - Химическое строение соединений, описанных в тексте

Новые гибриды 4-стирилтетразоло[1,5-a]хиноксалина и 1-замещенного-4-стирил[1,2,4]триазоло[4,3a]хиноксалина были синтезированы Wagle et al. (2009). Синтезированные соединения были предварительно проверены на противосудорожную активность на модели коразоловых судорог. Соединения 51a-51b и 52a-52e проявляли активность, сравнимую с препаратом сравнения диазепамом. Исследование зависимости структура-активность показало, что соединения, содержащие группу CF_3, H или CH_3 в положении 1 и 4-фторфенильный фрагмент или 4-метоксифенильные заместители в положении C^4 указанных соединений, проявляют хорошую противосудорожную активность [Wagle et al., 2009] (Рисунок 4).

1.3. Влияние на внутриглазное давление

Глаукома — это группа заболеваний, которые поражают зрительный нерв, включая потерю ганглиозных клеток сетчатки в характерном паттерне оптической невропатии и экскавации головки зрительного нерва. Почти 67 миллионов человек во всем мире страдают глаукомой, которая остается одной из главенствующих причин необратимой слепоты на втором месте по распространенности после катаракты [Quigley et al., 2011; Muacevic et al., 2021]. Альфаган® (бримонидин) является относительно селективным агонистом альфа-2-адренергических рецепторов и в его состав входит (5-бром-N-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-6-хиноксалин. Этот препарат действует как противоглаукомное средство благодаря своей способности снижать внутриглазное давление, облегчая симптомы глаукомы [Deepika et al., 2011; Husain et al., 2011] (Рисунок 5).

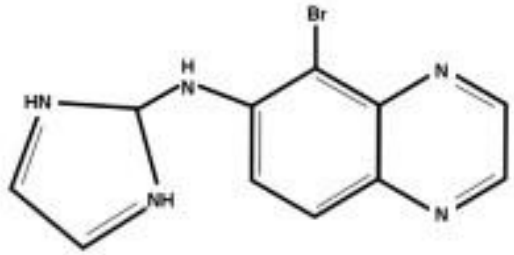
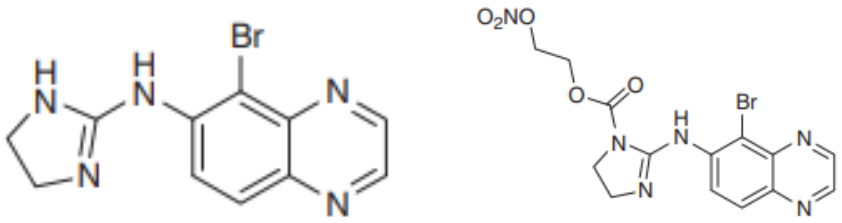


Рисунок 5 - Химическое строение бримонидина

В 2006 г. в исследовании, проводимом компанией Allergan, Inc., описано производное хиноксалина для лечения заболеваний сетчатки [Wheeler et al., 2006], а в 2008 г. была составлена водная офтальмологическая композиция для коррекции нарушений внутриглазного давления, содержащая 5-бром-6-(2-имидазолин-2-иламино)хиноксалина тартрат, названное соединением 1. Раствор, содержащий соединение 1, под торговым названием Комбиган (Combigan) в настоящее время используется в виде офтальмологического средства для лечения глаукомы с добавлением тимолола малеата [Olejnik et al., 2008]. В том же году другая группа ученых отказалась от новой группы хиноксалинов с потенциальным применением в качестве препаратов для лечения высокого внутриглазного давления и глаукомы [Benedini et al., 2008]. Это соединение структурно родственно соединению 1, но содержит нитрооксигруппу –

фармакофор, обусловливающий сосудорасширяющие свойства, и названо соединением 2 [Gresele et al., 2006] (Рисунок 6).



Соединение 1 *Соединение 2*

Рисунок 6 - Химическое строение соединений 1 и 2, описанных в тексте

1.4. Противовоспалительная и анальгетическая активности

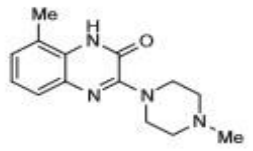
Производные 1,4-ди-N-оксида хиноксалина, такие как 4-(7-фтор-3-метил-хиноксалин-2-ил)-6-(3,4,5-триметокси-фенил)-пиримидин-2-иламин и 2,6,7-триметил-3-[5-(3,4,5-триметокси-фенил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил]-хиноксалин проявили *in vivo* противовоспалительный эффект, более выраженный, чем у препарата сравнения индометацина, а также снижали концентрацию липоксигеназы *in vitro*. Липоксигеназа является ферментом, необходимым для метаболизма арахидоновой кислоты (АК), что приводит к образованию лейкотриенов - провоспалительных медиаторов, участвующих в генезе гипертермии, а также бронхиальной астмы и некоторых сердечно-сосудистых заболеваний [Burguete et al., 2011].

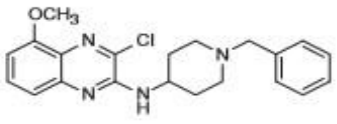
В 2006 г. Johnson&Johnson заявили, что хиноксалины способны влиять на миграцию лейкоцитов в очаг воспаления путем модуляции гистаминового рецептора 4 типа с потенциальным использованием при лечении воспалительных заболеваний [Venable, 2006]. Соединение 31 являлось одним из наиболее активных *in vitro* и *in vivo*. Исследования другой группы хиноксалинов с потенциальным использованием при воспалительных заболеваниях были остановлены в 2009 г ввиду широкого перечня побочных эффектов [Gong et al., 2009]. Доказано, что эти соединения обладают способностью ингибировать сфингозилфосфорилхолиновый (СФХ) рецептор. СФХ действует как важный сигнальный медиатор в иммунных процессах, включая пролиферацию, миграцию

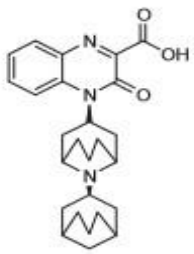
и воспаление клеток. Соединение 32 изучено *in vitro* и *in vivo,* и проявило выраженную биологическую активность.

Было продемонстрировано, что конденсация пиримидина, тиазолопиримидина, пиразолопиридина, ядра пиридопиридина, *n*-хлорфенила, *n*-метоксифенила или пиридина к хиноксалиновому фрагменту ведет к проявлению значительного противовоспалительного, а также обезболивающего действия [Abu-Hashem et al., 2010]. Были также синтезированы 4-Алкокси-6,9-дихлор[1,2,4]триазоло[4,3-a]хиноксалины и протестированы на противовоспалительную активность как ингибиторы провоспалительных цитокинов TNF-a и IL-6 [Guirado et al., 2012]. Результаты показали эффективность указанных соединений в отношении обоих цитокинов.

В 2012 г. было заявлено, что ряд хиноксалинов дополнен пиперидиновым каркасом с потенциальной анальгетической активностью [Goehring et al., 2012]. Эти производные были способны модулировать ORL-1 рецептор, который играет роль в модуляции боли [Fioravanti et al., 2008]. Соединение 33 с эффективностью связывания *in vitro* с рецептором ORL-1 также продемонстрировал *in vivo* активность в отношении воспалительной альгезии. Также заявлено о серии хиноксалиновых производных, замещенных фосфоновой кислотой или соответствующим сложным эфиром, способных лечить или предотвращать боль путем модуляции рецептора ORL-1 [Tadesse et al., 2012] (Рисунок 7).







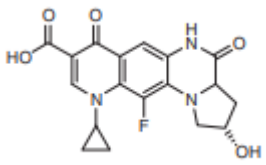
Соединение 31 *Соединение 32* *Соединение 33*

Рисунок 7 - Химическое строение описанных соединений

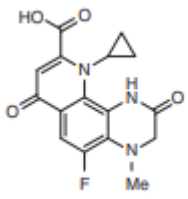
1.5. Противовирусное и антибактериальное действие

В 2006 году Qaisi и др. описали пиридо[2,3-g]хиноксалины, структурно родственные соединению 24, для которых характерна антибактериальная

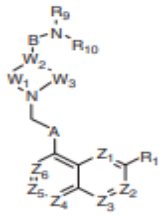
активность в отношении *S. aureus* и *E. coli* [Qaisi et al., 2006]. При этом производное хиноксалина со схожей структурой под шифром 34 не проявило подобной активности. В 2007 г. компания GlaxoGroup Ltd. заявила о производных нафталина, хинолина, нафтиридина и хиноксалина с общей формулой III, эффективных при терапии бактериальных инфекций млекопитающих [Daines et al., 2007; Miller et al., 2007] без публикации биологических данных об антибактериальной активности какого-либо производного хиноксалина. Немного позднее, в 2011, Sugiyama и др. описали 2,3-бис(дигалогенметил)хиноксалин и его 1,4-ди-N-оксид - соединения 35 и 36 - в качестве активных ингредиентов бактерицидных композиций [Sugiyama et al., 2011]. 1,4-ди-N-оксид хиноксалина под шифром 37 также был описан как антибактериальный агент для обработки медицинской техники [Antonik et al., 2007]. Структуры этих соединений были родственны карбадоксу. Стоит отметить, что в различных источниках заявлена разработка хиноксалин-содержащих сериновых ингибиторов протеазы NS3 с потенциальной активностью против вируса гепатита С (HCV) [Gai et al., 2012; Harper et al., 2010]. Макроциклический хиноксалин под шифром 38 был одним из отклоненных кандидатов в лекарственные средства ввиду низкой эффективности (Рисунок 8).



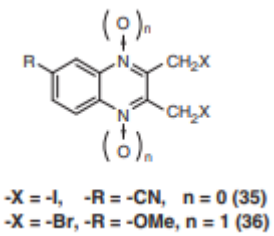
Соединение 24



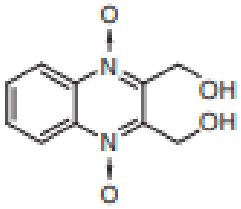
Соединение 34



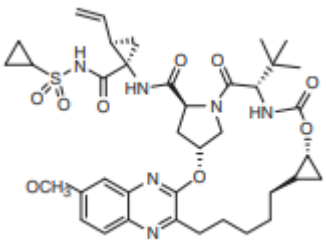
Соединения группы III



Соединения 35 и 36



Соединение 37



Соединение 38

Рисунок 8 - Химическое строение описанных соединений

Вирусы, такие как вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1) и типа 2 (HSV-2), принадлежат к семейству Herpesviridae, имеют двухцепочечную ДНК [Kang et al., 2011; Koonin et al., 2006] и высокую гомологию в структуре генома и последовательности ДНК. Эти вирусы могут вызывать различные заболевания от бессимптомной инфекции до молниеносных диссеминированных заболеваний, включая лабиальный герпес, кератит, генитальный герпес и энцефалит [Xiang et al., 2012].

Существует большое количество препаратов для лечения ВПГ-инфекций, таких как ацикловир, ганцикловир, пенцикловир, валацикловир и фамцикловир [Balfour Jr et al., 1999; Kang et al., 2011]. Среди перечисленных средств ацикловир является наиболее распространенным лекарственным препаратом. Тем не менее, появляются лекарственно-устойчивые штаммы ВПГ, и их число увеличивается [Field et al., 1994], что является стимулом для поиска новых противовирусных препаратов.

Синтезированы новые серии 6H-индоло[2,3-b]хиноксалинов, проведена оценка их активности в отношении вирусов герпеса: соединение 2,3-диметил(диметиламиноэтил)-6H-индоло-[2,3-b]хиноксалин характеризовалось наиболее выраженной противовирусной активностью. Это соединение было способно ингибировать репликацию ВПГ-1, цитомегаловируса и вируса ветряной оспы в культуре тканей в концентрациях 1-5 мМ, в зависимости от количества вируса и типа клеток, используемых в анализе. Также соединение 2,3-диметил-6-(диметиламиноэтил)-6H-индоло-(2,3-b)хиноксалин проявляло высокую активность в отношении ВПГ, а производные с 6-(2-диметиламиноэтил) боковой цепью благодаря своим ДНК-связывающим свойствам проявляли улучшенную биологическую активность [Deepika et al., 2011]. Имеются также данные об индолохиноксалинах - 2,3-диметил-6-(диметиламиноэтил)-6H-индоло[2,3-b]хиноксалинах - со способностью инактивировать вирионы в высоких концентрациях (около 300 мМ) и снижать синтез вирусной ДНК и белка в более низких концентрациях (около 3 мМ) [Husain et al., 2011] (Рисунок 9).

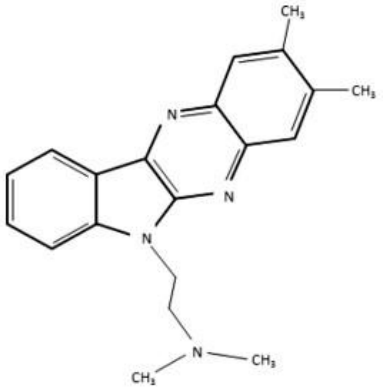


Рисунок 9 - Химическое строение 2,3-диметил-6-(диметиламиноэтил)-6H-индоло-(2,3-b)хиноксалина

В клинической практике широко представлены препараты для терапии синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), возбудителем которого является вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) [Fairchild et al., 2011]. Примерами являются ингибиторы ненуклеозидной обратной транскриптазы, которые взаимодействуют со специфическим аллостерическим несубстратным сайтом связывания обратной транскриптазы ВИЧ-1 [Patidar et al., 2011]. Соединение 6-хлор-3,3-диметил-4-изопропенилоксикарбонил-3,4-дигидрохиноксалин-2-[1H]-тион было синтезировано и оценено на ферментативную активность, и было обнаружено, что оно является очень мощным ингибитором как активности обратной транскриптазы ВИЧ-1, так и репликации ВИЧ-1 в культурах тканей. В то же время, как и некоторые другие ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, это соединение не было эффективным против вируса иммунодефицита человека-2 [Husain et al., 2011].

Флуоресцентный анализ *in vitro* показал, что перечень производных хиноксалина, предположительно взаимодействующий с неструктурным белком 1 гриппа А (NS1A), в различной степени нарушал взаимодействие РНК-NS1A, что явилось основой для разработки препаратов для лечения гриппа А [You et al., 2011]. В указанном исследовании была подготовлена библиотека на основе производных 2,3-дифурил-4-хиноксалин-R-метилкарбоксамида с 2-фурильными группами в положениях 2 и 3 и фенильной группой в положении 6 с промежуточной амидной группой (Рисунок 10).

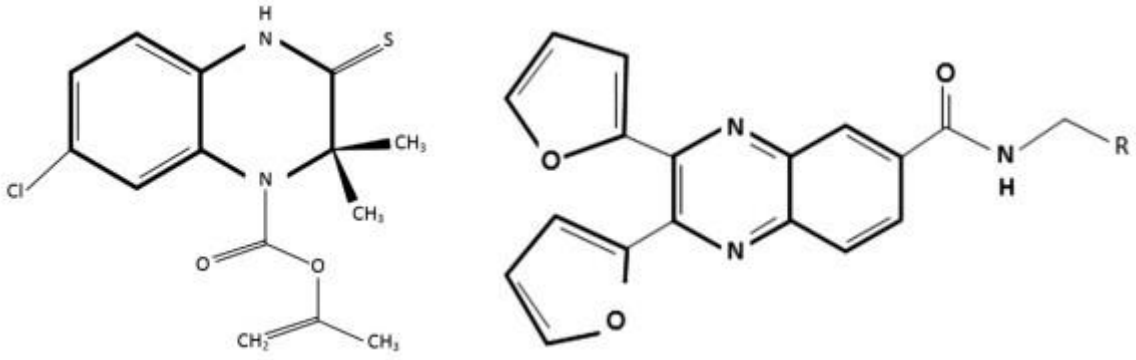


Рисунок 10 - Химическое строение *6-хлор-3,3-диметил-4-изопропенилокси-карбонил-3,4-дигидрохиноксалин-2-[1H]-тиона* и *2,3-дифурил-4-хиноксалин-R-метилкарбоксамида* (описание в тексте)

1.6. Противопротозойная активность

Лейшманиоз является паразитарным заболеванием, вызываемым простейшими рода *Leishmania* в тропических и субтропических районах мира, и, несмотря на все усилия по борьбе с этим заболеванием, ежегодно регистрируется около 1-2 миллионов новых случаев [Croft et al., 2003; Husain et al., 2011]. Большинство препаратов, доступных против лейшманиоза, характеризуются высокой стоимостью и длительностью терапии, а их эффективность уменьшается со временем, вероятно, из-за повышения резистентности [Torres et al., 2011]. В свою очередь, малярия относится к тропическим паразитарным заболеванием, вызываемым *Plasmodium falciparum*, и является причиной более чем миллиона летальных случаев ежегодно. Указанные факторы обусловливают необходимость разработки экономически более доступных и эффективных препаратов [Torres et al., 2011; Vicente et al., 2008]. Были получены 14 новых карбонитрильных производных 3-амино-1,4-ди-N-оксидхиноксалина. Эти соединения были оценены на противомалярийную и противолейшманиальную активность *in vitro* в отношении *P. falciparum* (колумбийский штамм FCR-3) и *Leishmania amazonensis* (штамм MHOM/BR/76/LTB-012A). Исследование показало, что соединения с одной галогенной группой в положениях 6 и 7 обеспечивают эффективный подход для дальнейшей разработки противомалярийных и противолейшманиозных препаратов. Сообщалось об ингибировании некоторыми производными N,N-диоксида хиноксалина роста *Trypanosoma cruzi*. Результаты

свидетельствуют о взаимосвязи структура-активность, выражающей важную взаимную корреляцию между используемыми дескрипторами (физико-химическими свойствами, биологической активностью и липорастворимостью) [Aguirre et al., 2004].

1.7. Противоопухолевая активность

В 2008 г. некоторые пиридохиноксалины были заявлены как средства с противоопухолевой и/или антибактериальной активностью [Qaisi et al., 2006]. Пиридо[3,2-g]пирроло[1,2-a]хиноксалин 24 был одним из наиболее эффективных ингибиторов роста линий опухолевых клеток *in vitro* (см. рисунок 3). Впоследствии теми же авторами была описана новая гетероциклическая схема вокруг системы хиноксалина с общей формулой (II), для которых, в дополнение к противоопухолевой и антибактериальной активности, не заявлена противовирусная активность [Boese et al., 2009] (Рисунок 11).

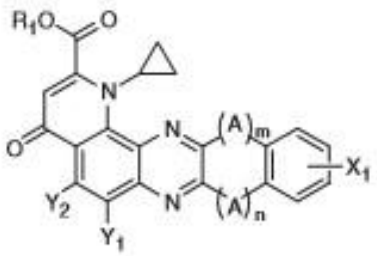
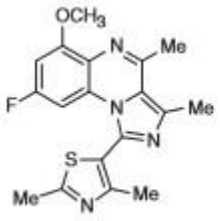


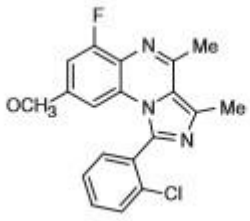
Рисунок 11 - Соединения с общей формулой (II)

В 2008 г. были описаны изоиндолхиноксалины с противоопухолевой активностью *in vitro* [Cirrincione et al., 2008]. Был изучен механизм цитотоксической активности этих соединений, которые структурно родственны производному хиноксалина под шифром 22. Например, производное хиноксалина 25 связывается с ДНК путем интеркаляции. С другой стороны, имидазохиноксалины, структурно родственные соединениям 1-3 и 25, были заявлены в 2010 г. в качестве противоопухолевых средств [Deleuze-Masquefa et al., 2013]. Производное хиноксалина 26 было заявлено как одно из наиболее активных агентов *in vitro* и *in vivo* с описанием его токсичности *in vivo* у здоровых животных и исследований механизма действия.

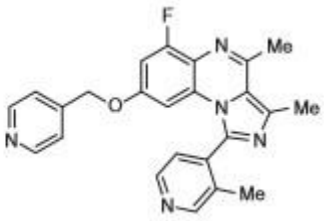
В 2010 году исследователи из Университета Шаосина описали аналоги кантаридина, который содержит хиноксалин [Deng et al., 2010]. Кантаридин является естественным ангидридным компонентом майлабриса, препарата традиционной китайской медицины, с терапевтическим потенциалом при раке поджелудочной железы [Li et al., 2010]. Среди разработанных аналогов кантаридина производное хиноксалина 27 показало выраженную активность *in vitro*. В том же году описан ряд хиноксалиновых производных мочевины и тиомочевины, характеризующихся противораковой активностью *in vitro* [Claus et al., 2010]. Производное хиноксалина 28 было одним из наиболее активных. В 2012 г. были описаны соединения, родственные соединению 28, также с противоопухолевой активностью [Natarajan et al., 2012]. Изучение механизма действия показало, что эти хиноксалины обладают потенциалом ингибировать не только рост опухолей, но также и метастазирование. Координация хиноксалинов с использованием скаффолда как части структуры лиганда или атома азота в составе хиноксалина в качестве координированного атома с различными металлами также была описана как стратегия получения новых противоопухолевых препаратов (Рисунок 12).



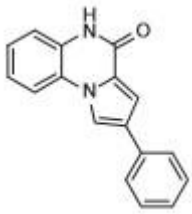
Соединение 1



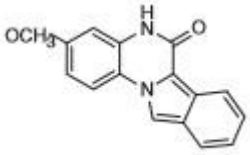
Соединение 2



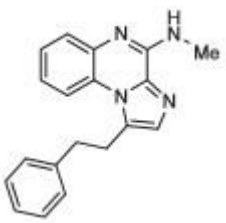
Соединение 3



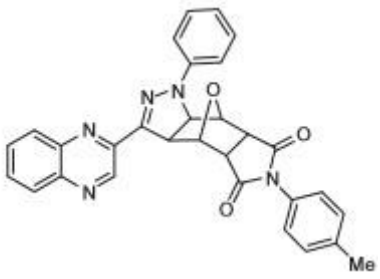
Соединение 22



Соединение 25



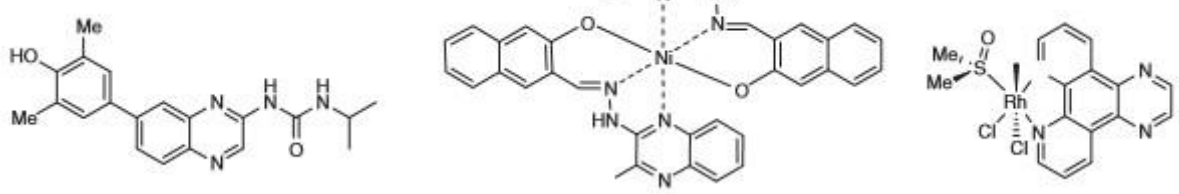
Соединение 26



Соединение 27

Рисунок 12 - Химическое строение описанных соединений

Комплексы меди (II) и никеля (II), использующие в качестве лиганда 2-гидразонохиноксалин, были заявлены как противоопухолевые агенты, а Ni-комплекс 29, был одним из наиболее активных *in vitro* в отношении линии раковых клеток яичников A2780 [Bangalore et al., 2010]. В 2009 г. в качестве противоопухолевых средств заявлены родий (III) или иридий (III) с хиноксалиновыми лигандами [Gust et al., 2009]. Например, Rh-комплекс 30 продемонстрировал выраженную активность *in vitro* в отношении опухолевых клеток MC-7 и HT-29. В 2011 г. компания Nippon Chemical Ind. раскрыла серию металлических комплексов фосфина, содержащих хиноксалин в качестве лиганда с противоопухолевой активностью и низкой токсичностью [Oohara et al., 2011]. В этих случаях координированные атомы, два атома фосфора, располагались во 2-м и 3-м положениях системы хиноксалина, а атом переходного металла был представлен Cu, Au или Ag (Рисунок 13).



Соединение 28 *Соединение 29* *Соединение 30*

Рисунок 13 - Химическое строение описанных соединений

1.8. Заключение

Таким образом, для производных хиноксалина показан широкий спектр биологических активностей, среди которых противопротозойная, противовирусная, противовоспалительная, анальгетическая, противоглаукомная, антиконвульсивная, антидепрессивная, анксиолитическая, противогрибковая, а также гипогликемическая [González et al., 2012; Ajani et al., 2014; Carta et al., 2005; Pereira et al., 2015; Tariq et al., 2018]. Производные указанного скаффолда являются перспективными для изучения во многих областях медицинской химии [Montana et al. 2021]. В рамках настоящего исследования представляет интерес изучение нейропсихотропного потенциала нового ряда C^2,C^3-производных

хиноксалина, а именно анксиолитических, антидепрессивных и седативных свойств новых соединений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

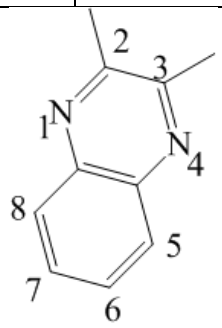
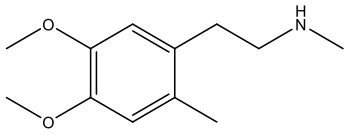
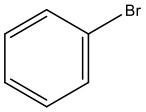
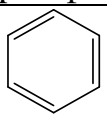
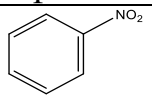
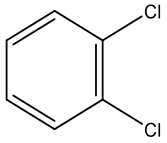
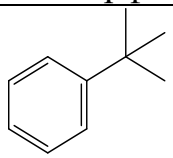
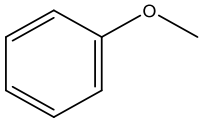
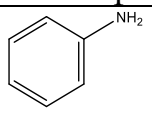
В ходе исследования было изучено 15 новых производных хиноксалина, синтезированных коллаборацией ученых НИИ физико-органической химии Южного Федерального университета научными сотрудниками Диваевой Л.Н. и Морковником А.С., а также Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского ветеринарного института Зубенко А.А. и Клименко А.И [Zubenko et al., 2020]. Выражаем признательность научным сотрудникам за синтез и предоставление изучаемых субстанций для настоящего исследования. Соединения, представленные в настоящей работе, ранее не изучались на фармакологическую активность. Среди изученных соединений у девяти (субстанции под шифром ЗДМ-3, ЗДМ-4, ЗДМ-5, ЗДМ-10, ЗДМ-81, ЗДМ-96, ЗДМ-97, ЗДМ-98 и ЗДМ-99) в R_1 положении находится 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин, у четырех (соединения ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-84, ЗДМ-85) - 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N,2-диметоксипропан-2-амин, у ЗДМ-8 - 2-метил-(1H-индол-3-ил)-N-метилэтан-1-амин и у ЗДМ-86 - 2-метил(фенил-N,N-диметилпропан-2-амин). В качестве R_2 заместителя большинства соединений – ЗДМ-3, ЗДМ-7, ЗДМ-8, ЗДМ-84 – выступает 4-бромфенил, у двух соединений – ЗДМ-10 и ЗДМ-86 – в указанном положении находится 3,4-дихлорфенил. Среди азотсодержащих R_2 можно выделить ЗДМ-5 - 4-нитрофенил - и ЗДМ-97 - 4-аминофенил. Субстанция ЗДМ-85 содержит оксазин-содержащий радикал - бензо[b][1,4]оксазин-3(4H)-он. Метоксигруппу содержат в R_2 положении соединения ЗДМ-96, ЗДМ-98 и ЗДМ-99. Среди неполярных заместителей R_2 положения, содержащих только углеводородную цепь – соединения ЗДМ-4 с фенильным радикалом, ЗДМ-6 с метильной группой и ЗДМ-81 с *трет*-бутил фенилом. Эти соединения содержат радикалы в положении R_2 без атомов с выраженной элетроотрицательностью, стягивающих на себя электронную плотность (N, O, Cl, Br). Большинство изученных соединений характеризуются наличием кислотного остатка – гидрохлориды, дигидрохлориды, гидробромиды и оксалаты. Пять соединений нового ряда производных

хиноксалина по своей химической природе являются основаниями и не содержат кислотного остатка – ЗДМ-8, ЗДМ-84, ЗДМ-85, ЗДМ-98 и ЗДМ-99 (Таблица 1).

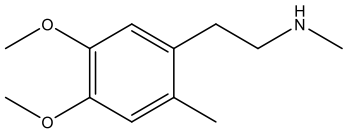
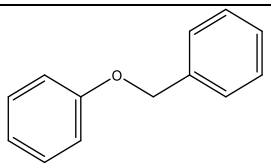
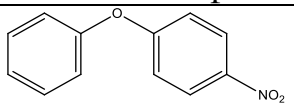
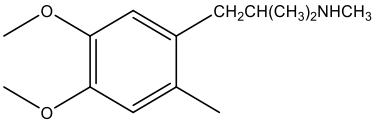
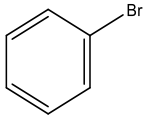
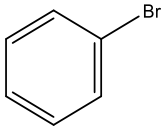
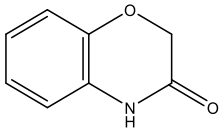
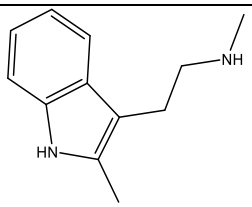
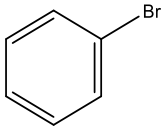
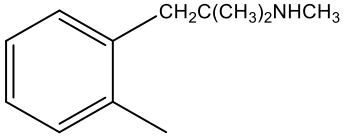
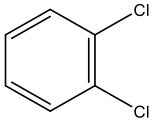
При проведении экспериментов были использованы следующие вещества: Диазепам (раствор для внутривенного и внутримышечного введения в ампулах «Сибазон», 5 мг/мл, АО «Органика», Россия); Коразол («Sigma», США); Имипрамин (таблетки «Мелипрамин», 25 мг, ЭГИС ЗАО Фармацевтический завод, Россия); Амитриптилин (таблетки «Амитриптилин», 25 мг, ФГУП Московский эндокринный завод, Россия); Буторфанол (раствор для внутривенного и внутримышечного введения «Буторфанол», 2 мг/кг, ФГУП Московский эндокринный завод, Россия); Флумазенил (раствор для внутривенного введения «Анексат», 0.5 мг/5 мл, Cenexi SAS, Франция); Пикротоксин («Sigma», США); Галоперидол (раствор для внутримышечного введения в ампулах «Галоперидол», 5 мг/мл, Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко, Россия); L-ДОФА («Sigma», США); Апоморфин («ICN Biomedical», США); 5-гидрокситриптофан («Sigma», США); Клофелин (таблетки «Клофелин», 15 мг, ФГУП Московский эндокринный завод, Россия); Резерпин (таблетки «Резерпин», 25 мг, «Польфа», Польша); Серотонин («Sigma», США); Норадреналин («Sigma», США); Дофамин («Sigma», США); ГИУ («Sigma», США); Флуоксетин (капсулы «Флуоксетин», 20 мг, АО Медисорб, Россия).

Исследования проведены на нелинейных половозрелых белых мышах-самцах массой 18-22 г. и нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», а также отвечали директивам 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP) от 17.02.2020 г.

Таблица 1 - Химическая структура нового ряда производных хиноксалина

№	Шифр	R_1	R_2	·nX	Молекулярная масса
		 хиноксалин			
1	ЗДМ-3	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин	 4-бромфенил	HBr	573.33
2	ЗДМ-4		 фенил	HBr	493.43
3	ЗДМ-5		 4-нитрофенил	$(COOH)_2$	548.55
4	ЗДМ-10		 3,4-дихлорфенил	HBr	563.32
5	ЗДМ-81		 4-*трет*-бутилфенил	HCl	506.09
6	ЗДМ-96		 4-метоксифенил	2HCl	502.44
7	ЗДМ-97		 4-аминофенил	2HCl	501.44

Окончание таблицы 1

№	Шифр	R_1	R_2	·nX	Молекулярная масса
8	ЗДМ-98	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин	 4-бензилоксифенил	-	519.65
9	ЗДМ-99		 4-(4-нитрофенокси)фенил	-	550.62
10	ЗДМ-6	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N,2-диметоксипропан-2-амин	CH_3 метил	HCl	416.97
11	ЗДМ-7		 4-бромфенил	HCl	497.89
12	ЗДМ-84		 4-бромфенил	-	520.47
13	ЗДМ-85		 бензо[b][1,4]оксазин-3(4*H*)-он	-	512.24
14	ЗДМ-8	 2-метил-(1*H*-индол-3-ил)-N-метилэтан-1-амин	 4-бромфенил	-	471.40
15	ЗДМ-86	 2-метил(фенил-N,N-диметилпропан-2-амин)	 3,4-дихлорфенил	HBr	531.32

Примечание: выражаем особую благодарность в предоставлении информации о химических структурах и названиях веществ сотрудникам лабораторий НИИ ФОХ ЮФУ и СКЗНИВИ.

2.2. Методы исследования

2.2.1. «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Эксперимент был проведен на белых беспородных мышах-самцах массой 18-22 г. Животные были случайным образом разделены на группы по 6 особей. Методика основана на естественном предпочтении грызунами темных нор, боязни открытых пространств и падения с высоты [Спасов А. А., Мальцев Д. В. и др., 2020]. Приподнятый крестообразный лабиринт (ООО НПК «Открытая наука», Россия) [Султанова и др., 2018] представляет собой установку с двумя светлыми, открытыми рукавами и двумя темными, закрытыми, располагающимися в форме креста друг напротив друга. На пересечении рукавов находится центральная площадка (5 см * 5 см). Стенки закрытых рукавов возвышаются на 30 см над лабиринтом. Для освещения использовалась лампа (300 лк), размещенная на высоте 25 см [Воронина Т. А. и др., 2012]. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду внутрижелудочно в объеме 0,1 мл на 10 г живого веса мыши. Мыши группы препарата сравнения получали диазепам (в/ж) в дозе 1 мг/кг в эквивалентном объеме. Грызунам опытных групп вводили экспериментальные соединения под шифром ЗДМ в дозе, эквимолярной препарату сравнения. Все соединения и дистиллированную воду вводили животным за 30 минут до начала тестирования внутрижелудочно атравматичным металлическим зондом. После введения препаратов животные содержались индивидуально. В начале тестирования мышь помещалась на центральную площадку головой к светлому рукаву, и в течение 5 минут фиксировались следующие параметры: время нахождения в светлых рукавах установки (с), число выходов, свешиваний и выглядываний в открытые рукава, а также общее число переходов мышей между рукавами установки и количество болюсов.

2.2.2. «Открытое поле»

Методика «Открытого поля» используется для оценки нейролептического, психорелаксирующего, седативного, миорелаксирующего, анксиолитического потенциала новых соединений. Исследования были проведены на беспородных белых мышах-самцах массой 18-22 г. Животные были случайным образом

разделены на группы по 6 особей. Установка «Открытое поле» (ООО НПК «Открытая наука», Россия) представляет собой круглую арену диаметром 44 см и высотой стенок 32 см, на дне которой темными линиями отмечены квадранты. На пересечениях линий находятся небольшие отверстия диаметром 1 см. Для освещения арены использовалась лампа (300 лк). Животные контрольной группы получали дистиллированную воду внутрижелудочно в объеме 0,1 мл на 10 г живой массы. В качестве препарата сравнения был выбран бензодиазепиновый анксиолитик диазепам в дозе 1 мг/кг. Введение соединений и дистиллированной воды производилось животным за 30 минут до начала эксперимента. В ходе наблюдения за животными регистрировали показатели: горизонтальную и вертикальную двигательную активность, поисковую активность (заглядывания животного в отверстия), число выходов животных в освещенный центр установки.

2.2.3. «Ротарод»

Животных помещали на горизонтальный стержень диаметром 3 см, вращающийся с постоянной скоростью 10 оборотов в минуту [Воронина Т.А. и др., 2002]. Регистрировали время удерживания на вращающемся стержне (максимальное время наблюдения за одним животным 30 с), а также моторную функцию и степень нарушения координации грызунов.

2.2.4. «Сетка» и «Проволока»

В тестах «Проволока» и «Сетка» фиксировалась способность мышей удерживаться на них в течение 30 с. Измерение миорелаксирующей активности в тесте «Сетка» выражали в баллах таким образом: если животное все время эксперимента держалось за проволоку всеми 4 лапами – эта мышь оценивалась в 4 балла, если 3 лапами – 3 балла, 2 лапами – 2 балла, 1лапой – 1 балл, если животное падало с установки – 0 баллов. Измерение миорелаксирующей активности в тесте «Проволока» так же выражали в баллах: если животное во время эксперимента было способно подтянуться всем телом и забраться всеми 4 лапами на проволоку – 4 балла, если мышь была способна воспользоваться только 3 конечностями и оставалась в подвешенном состоянии – 3 балла, если животное

все время эксперимента висело на 2 лапах – 2 балла, если висело на 1 лапе – 1 балл, если мышь падала с установки – 0 баллов [Klein S.M. et al., 2012; Миронов А. Н. и др., 2012].

2.2.5. «Темная/светлая камера»

Тест «Темная/светлая камера» может использоваться для поиска новых соединений с анксиолитической активностью наравне с «Приподнятым крестообразным лабиринтом», а также позволяет оценить влияние соединений на мышечный тонус грызунов. Установка представляет собой два отсека (20 см × 20 см × 15 см), светлый и темный, разделенных непрозрачной перегородкой, в которой имеется переход (4 см). Для освещения светлой части использовалась настольная лампа мощностью 300 люкс, размещенная над светлым отсеком на высоте 25 см. Контрольной группе животных внутрижелудочно вводилась дистиллированная вода, группе диазепама – диазепам (1 мг/кг). Во время 5-минутного тестирования регистрируется общее время, проведенное животным в светлой камере установки (с), число вертикальных стоек, а также латентное время перехода в темный отсек и общее количество переходов между отсеками.

2.2.6. «Наказуемое взятие воды по Vogel»

Методика «Наказуемого взятия воды по Vogel» является конфликтным тестом для оценки противотревожного действия препаратов, широко применяющимся для подтверждения искомой активности экспериментальных субстанций [Vogel J.R. et al., 1971; Миронов А.Н. и др., 2012]. В ходе теста возникает конфликт между питьевым и защитным рефлексом крыс. Установка представляет собой коробку (5 см * 30 см * 20 см), на дне которой располагается решетка из нержавеющей стали. Снаружи для животных установлена поилка (бутылка с водой) с металлической питьевой трубкой. До начала эксперимента животных помещают на питьевую депривацию на 48 часов. После индивидуального помещения крыс в экспериментальную установку первый подход к поилке наказывается электрической стимуляцией (0,1 мА, 1 с). В течение 10 минут теста фиксируется число подходов животных к поилке после первого удара током. Под действием диазепама (1 мг/кг) и других анксиолитиков

наблюдаются значительно более частые подходы к поилке, чем в группе контроля (дистиллированная вода).

2.2.7. «Оценка тревожно-фобического состояния животных»

В тесте тревожно-фобического состояния животных (ТФС) предполагается, что для оценки степени стрессированности животных необходимо принимать во внимание реакцию животного на ряд адекватных тест-стимулов, модулирующих основные аффективные состояния, например, тревогу и агрессию [Лебедев А. А. и др., 2016]. Контрольной группе крыс вводили дистиллированная вода в объеме 1 мл на 100 г живого веса. Животным опытных групп внутрижелудочно за 30 минут до начала эксперимента вводили производные хиноксалина в эквимолярной препарату сравнения дозе, либо диазепам в дозе 1 мг/кг. Большинство тестов методики проводили с применением установки «Открытое поле». В ходе эксперимента исключено грубое инструментальное воздействие на животных и возникновение у них сильных конкурентных мотиваций; тесты серии легко воспроизводимы, а полученные данные не требуют длительной обработки [Шабанов П. Д., Морозов А. И. и др., 2016].

Методика включает основные ситуации, в которых крысы реагируют проявлением страха и тревоги: 1) столкновение с незнакомым неживым объектом или незнакомой ситуацией; 2) появление в поле зрения животного руки экспериментатора или контакт с ней [Спасов А.А., Мальцев Д.В. и др., 2020]. При оценке результатов теста ТФС учитывали следующие параметры:

1) в зависимости от времени выполнения теста: латентное время спуска с платформы (тест 1), латентное время прохождения через отверстие (тест 2), латентное время выхода из домика (тест 3), латентное время выхода из центра «Открытого поля» (тест 4). В данном случае тесты оценивались: 0 баллов – крыса совершает действие за время от 0 до 30 с; 1 балл – за 31-60 с; 2 балла – за 61-180 с; 3 балла - более чем за 180 с либо не выполняет тест.

2) в зависимости от реакции животного: спонтанное пячение в «Открытом поле» (тест 5), пячение при виде руки экспериментатора (тест 6), затаивание/вокализация/прижимание ушей при контакте с рукой

экспериментатора (тесты 7-9) [3]. Пячение в «Открытом поле» оценивалось при резкой смене освещенности либо спонтанно у крыс: 0 баллов – отсутствие реакции; 1 балл – пячение в пределах 0-0,5 квадратов; 2 балла – 0,5-2 квадратов; 3 балла – более 2 квадратов. Результаты тестов 6-9 оценивались следующим образом: 0 баллов - реакция отсутствует при приближении руки экспериментатора к животному и его поглаживании; 1 балл - реакция возникает при поглаживании; 2 балла – реакция возникает при виде руки экспериментатора; 3 балла – реакция сохраняется после прекращения поглаживания животного.

Далее проводили суммирование всех баллов по каждому тесту, осуществляли сравнение между группами животных и анализ данных: чем больше баллов в сумме, тем выше степень тревожности животного [Спасов А.А., Мальцев Д.В. и др., 2020].

2.2.8. «Закапывание шариков»

Тест «Закапывания шариков» позволяет оценить не только противотревожный, но и антифобический, антикомпульсивный потенциал новых соединений [Шабанов П. Д. и др., 2017]. Мышам предъявляется множество стеклянных блестящих шариков в количестве 24 штук диаметром по 1 см, расположенных на пятисантиметровым слое опилок в индивидуальной клетке (30 см * 20 см * 13 см). Объекты характеризуются анксиогенным действием на животных и вызывают состояние, гомологичное обсессиям и стимулирующее компульсивное закапывание. Под действием транквилизаторов число закопанных как минимум на две трети шариков к концу 30-минутной сессии снижается относительно контрольной группы. Все соединения вводили мышам внутрижелудочно через зонд за 30 минут до начала тестирования.

2.2.9. «Принудительное плавание по Porsolt»

Тест является классическим для определения антидепрессивного потенциала новых соединений [Porsolt R.D. et al., 1977]. В ходе теста мышь помещается в прозрачную колбу, наполненную водой комнатной температуры, контролируемой термометром. Более холодная вода может явиться следствием сниженной подвижности животных, в то время как слишком теплая вода является

миорелаксирующим фактором. Количество воды рассчитывается таким образом, чтобы мышь не доставала задними лапками до дна ёмкости, обычно около 20-22 см. Препараты сравнения - амитриптилин (10 мг/кг) и имипрамин (8 мг /кг). Вещества вводили животным перорально трехкратно: за 24, 6 и 1 час до начала тестирования. В начале теста животное помещалось в колбу, фиксировали время иммобилизации или фризинга (с) – время полной неподвижности грызуна, ассоциируемое с поведением отчаяния, когда животное не предпринимает попыток выбраться из неблагоприятной ситуации. Стоит отметить, что, хотя время тестирования составляет 6 минут, первые две минуты эксперимента считаются адаптационными для животного, и поэтому в обсчете результатов не учитываются.

2.2.10. «Подвешивание за хвост»

Тест «Подвешивания за хвост» является альтернативой тесту «Принудительного плавания по Porsolt» и характеризуется схожим принципом. В отличие от указанной методики, мышь не подвергается воздействию воды как дополнительного фактора внешней среды, а также на результаты теста не влияют индивидуальные особенности мыши (например, число лапок) или способность к плаванию [Steru L. et al., 1985]. В ходе теста мыши безболезненно подвешиваются за хвост на липкой ленте на 20-25 см над поверхностью (установка «Тест подвешивания за хвост», ООО НПК «Открытая наука», Россия), не видя друг друга во избежание взаимодействий. Во время 6-минутного тестирования мышь предпринимает попытки избежать неудобного положения, подтянуться вверх и забраться по хвосту на перекладину. Регистрируется время иммобилизации мышей (с) как показатель безысходного и депрессивного поведения. В отличие от теста «Принудительного плавания по Porsolt», в статистический анализ входят все 6 минут тестирования.

2.2.11. «Отдергивание хвоста»

Исследование проводилось на мышах-самцах (n=6). Аппарат «Tail-flick» (UgoBasil, Италия) предназначен для оценки спинального анальгетического эффекта новых соединений [D'Amour F. E. et al., 1941]. Инфракрасное излучение

фокусируется на дистальной трети хвоста животного с помощью прибора. Во избежание термического травмирования животных температура нагревания не превышает 55 °С, а время воздействия – 15 с. При достижении болевого порога мышь отдёргивает хвост от излучателя, время отдёргивания автоматически фиксируется прибором. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода отдёргивания хвоста по сравнению с контролем. Животные опытной группы получали буторфанол (1 мг/кг, в/б) за 60 минут до теста. Группе контроля вводили физиологический раствор.

2.2.12. «Горячая пластина»

Установка «Hot plate» (UgoBasil, Италия) представляет собой нагревающуюся пластину, окруженную прозрачным цилиндром радиусом 7,5 см. Тест основан на супраспинальном поведенческом ответе животных на температурное болевое воздействие [Kitchen I. et al., 1985]. При помещении животного в установку и превышением порога болевой чувствительности наблюдали различные реакции: отдергивание задней лапы, облизывание подушечек лап, либо подпрыгивание. В отличие от теста «Отдергивания хвоста», тест «Горячей пластины» позволяет предположить вовлеченный уровень ЦНС в зависимости от типа поведенческой реакции. Мышей помещали в цилиндр и регистрировали латентный период полизывания задней лапки (с). Во избежание травмирования животных температура нагревания не превышала 55 °С, а время воздействия – 30 с. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции по отношению к контролю. Контрольной группе вводили физиологический раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Животным экспериментальных групп внутрибрюшинно за 60 минут до начала теста вводили вещество в дозе 17,5 мг/кг или буторфанол (1 мг/кг).

2.2.13. «Максимальный электрошок»

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах массой 18-22 г, разделенных на группы по 6 особей. В тесте максимального электрошока

наибольшую активность проявляют противосудорожные препараты с механизмом действия, связанным с модуляцией или блокированием потенциал-зависимых натриевых каналов – фенитоин, карбамазепин, вальпроат. Животные группы контроля получали дистиллированную воду перорально за 30 минут до начала теста. В качестве препарата сравнения выступила вальпроевая кислота. Исследуемое соединение вводили внутрижелудочно в эффективной дозе для проявления анксиолитического эффекта (17,5 мг/кг). Во время проведения теста животные получали электрический стимул – 50 Hz, 50 mA - длительностью 0,2 с. Оценивали летальность животных после получения электрического разряда.

2.2.14. «Коразоловые судороги»

Тест позволяет оценить антиконвульсивную активность субстанций, чей механизм действия связан с ГАМК-ергической нейромедиаторной системой – например, диазепам. Коразол вводят подкожно мышам в область шейного отдела спины. Животные наблюдаются в течение 30 минут с регистрацией основного показателя – первых генерализованных клонических судорог с утратой рефлекса переворачивания. Определяли также летальность животных после введения коразола. Препарат сравнения диазепам вводили внутрижелудочно за 30 минут до введения коразола. Контрольная группа получала дистиллированную воду. Опытная группа получала экспериментальное соединение в эффективной дозе для проявления анксиолитической активности – 17,5 мг/кг, внутрижелудочно, за 30 минут до начала теста.

2.2.15. Влияние флумазенила на эффекты соединений в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Для первичной оценки взаимодействия ЗДМ-81 с ГАМК-ергической системой использовался тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах с применением антагониста бензодиазепиновых рецепторов флумазенила (ACS, США, 1 мг/кг). В качестве препарата сравнения использован диазепам (1 мг/кг). Доза ЗДМ-81 была рассчитана эквимолярно диазепаму и составила 1,75 мг/кг. Группа контроля получала растворитель (дистиллированную воду) в эквивалентном объеме: 0,1 мл на 10 г веса животного. Опытные группы получали:

1) диазепам (1 мг/кг); 2) диазепам (1 мг/кг) и флумазенил (1 мг/кг, за 30 минут до введения диазепама); 3) ЗДМ-81 (1,75 мг/кг); 4) ЗДМ-81 (1,75 мг/кг) и флумазенил (1 мг/кг, за 30 минут до введения ЗДМ-81). Все вещества вводились мышам атравматичным зондом внутрижелудочно, тестовое наблюдение начиналось через 30 минут после их введения. Регистрировались параметры: время (с) и число выходов мышей в открытый рукав [Коновалова и др., 2011].

2.2.16. «5-гидрокситриптофановый гиперкинез»

Методика основана на способности 5-гидрокситриптофана в дозе 200-300 мг/кг активировать 5-HT_{2A} серотониновые рецепторы, что приводит к периодическим встряхиваниям головой у экспериментальных животных [Pranzetelli M.R. et al., 1989]. Эксперимент проводили на 12 белых мышах-самцах, разделенных случайным образом на две группы (контрольную и опытную, n=6). В эксперименте использованы: 1) группа контроля (5-ГТФ, «Sigma», США, 300 мг/кг, в/б); 2) опытная группа (ЗДМ-81, 17,5 мг/кг, в/ж, за 30 минут до введения 5-ГТФ). Число встряхиваний головой оценивалось каждые 10 минут в экспериментальных группах на протяжении 60 минут после введения 5-ГТФ [Мальцев и др., 2021]. Оценка результатов теста проводилась путем сравнения параметров опытной группы с контролем.

2.2.17. «Ареколиновый тремор»

Для центральных холиномиметиков характерно развитие *in vivo* гиперкинеза либо судорог. Для определения степени центрального М-холинергического потенциала ЗДМ-81 применяли тест с ареколином, при проведении которого у мышей развивались гиперсаливация и тремор: 1) контрольная группа мышей получала ареколин в дозе 15 мг/кг в/б; 2) опытная группа получала ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в/ж за 30 минут до введения ареколина. Регистрация длительности тремора (с) и латентного периода его возникновения (с) проводилась сразу после введения ареколина [Мальцев и др., 2021].

2.2.18. Тест взаимодействия с L-ДОФА

Для определения у соединения ЗДМ-81 МАО-ингибирующего действия был использован тест взаимодействия с L-ДОФА. Методика основана на возможности

L-ДОФА вызывать у животных стереотипию при применении в высоких дозах (500 мг/кг), а также в низких (100 мг/кг), при условии одновременного введения экспериментальных животным L-ДОФА (100 мг/кг) и ингибиторов моноаминооксидазы [Андреева Н. И., 2005]. Исследование субстанции на наличие МАО-ингибирующего действия проводили на мышах с введением первой контрольной группе (n=6) L-ДОФА (500 мг/кг, в/б, «Sigma», США), второй контрольной группе - L-ДОФА (100 мг/кг, в/б), опытной группе – L-ДОФА (100 мг/кг, в/б) через 30 минут после введения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж) [Спасов и др., 2020]. Для интерпретации результатов использовали балльную шкалу оценок: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия.

2.2.19. Тест взаимодействия с никотином

Тест взаимодействия с никотином позволяет оценить влияние исследуемых веществ на Н-холинергическую нейропередачу. Известно, что никотин в дозе 4 мг/кг и более способен усиливать проведение нервно-мышечного импульса. *In vivo* это регистрируется как тремор и судороги. Не наблюдается возникновения судорог при введении мышам никотина в дозе 2 мг/кг и менее, что можно использовать для определения Н-холинергического действия новых соединений [Андреева Н.И., 2005]. Эксперименты были выполнены на 24 мышах-самцах (n=6): 1) первая группа контроля получала никотин (2 мг/кг), в результате чего у животных развивался тремор, но судорог не наблюдалось; 2) вторая группа контроля получала никотин (4 мг/кг), что приводило к развитию судорог у 100% мышей; 3) первая опытная группа получала ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж) за 30 минут до введения никотина (2 мг/кг); 4) вторая опытная группа получала ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж) за 30 минут до введения никотина (4 мг/кг). Результаты теста оценивались процентным отношением животных, у которых развивались судороги или тремор, к общему числу животных в группе [Мальцев и др., 2021].

2.2.20. Тест апоморфиновой стереотипии

Введение в малых дозах апоморфина (0,01-0,15 мг/кг) приводит к возникновению стереотипии у крыс, что ассоциируется с активацией пресинаптических дофаминергических рецепторов [Островская Р. У. и др., 2012]. Оценку двигательной стереотипии проводили при введении апоморфина (0,1 мг/кг) подкожно (п/к) крысам в область шейного отдела спины. Контрольная группа (n=6) получала физиологический раствор в/ж за 30 минут до введения апоморфина, опытная - ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж). Показатели апоморфиновой стереотипии фиксировали через 30, 60, 90 и 120 минут после введения апоморфина [Спасов и др., 2020]. Для оценки использовалась балльная шкала: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе единичные случаи зевательных движений, непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе зевание, лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. О выраженности влияния изучаемого соединения на дофаминергическую нейропередачу судили по сравнению показателей опытных групп с контрольными.

2.2.21. Влияние экспериментальных соединений на каталептогенный эффект галоперидола

Типичные нейролептики (трифтазин, этаперазин, галоперидол) угнетают двигательную активность и ориентировочные рефлексы, а также вызывают каталепсию *in vivo,* что обусловлено блокированием D_2-рецепторов [Андреева Н. И., 2005]. Тестирование проводилось на 12 крысах-самцах (n=6). Соединение ЗДМ-81 вводили в/ж в дозе 17,5 мг/кг, группа контроля получала дистиллированную воду. Через 60 минут производилась инъекция галоперидола в/б в дозе 3 мг/кг. Степень каталепсии оценивали по способности крысы сохранять заданную экспериментатором позу в течение 15 секунд через 15, 30, 45, 60 и 120 минут после введения галоперидола по балльной шкале [Cox B. et al., 1967]: 1 балл – передняя лапа крысы слегка отведена и помещается на подставку высотой 3 см; 2 балла – крыса стоит на задних лапах, одна передняя помещена на

подставку высотой 10 см; 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см.

О способности нового соединения блокировать дофаминергические рецепторы 2 типа судили по изменению выраженности каталептогенной реакции в опытных группах по отношению к контролю [Трегубова и др., 2015].

2.2.22. «Клофелиновая гипотермия»

Для выявления возможного фармакологического взаимодействия с пресинаптическими α_2-адренорецепторами изучалась способность соединений влиять на гипотермическое действие клофелина [Андреева Н.И., 2005]. Исследование выполняли на 18 крысах-самцах (n=6). Группа интактного контроля не получала соединений, группа негативного контроля получала клофелин в/б в дозе 0,1 мг/кг, опытная группа получала клофелин в/б в дозе 0,1 мг/кг, а также ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг. Ректальную температуру животных оценивали с применением электронного термометра «OMRON» каждые 30 мин эксперимента в течение 2 часов. О влиянии соединений на α_2-адренорецепторы судили по изменению эффектов опытных групп относительно групп контроля.

2.2.23. Влияние соединений на судорожный эффект пикротоксина

Антагонистическое взаимодействие пикротоксина с рецепторами ГАМК лежит в основе характерной для него способности вызывать у экспериментальных животных тремор и повторяющиеся клонические судороги [Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л., 2012]. Исследование проводилось на 12 белых беспородных мышах-самцах, разделенных на две группы по шесть животных в каждой. Эффекты соединения ЗДМ-81 изучали при введении мышам внутрижелудочно в дозе 17,5 мг/кг, в контрольной группе животные получали дистиллированную воду [Агацарская и др., 2019]. Все растворы вводили за 30 минут до введения пикротоксина (2,5 мг/кг, в/б). После этого в течение 60 минут наблюдали за животными, отмечая латентный период появления тремора (с), латентный период развития судорог (с) и количество судорожных приступов. Оценку результатов теста проводили путем сравнения параметров опытных групп с контрольными показателями.

2.2.24. «Резерпиновая гипотермия»

Резерпин является препаратом с известным симпатолитическим действием, которым обусловлены его общий гипотермический эффект, способность вызывать блефароптоз у экспериментальных животных и некоторые другие свойства [Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л., 2012]. Опыты проведены на 18 мышах-самцах (n=6). Тест «Резерпиновая гипотермия» на мышах включал: 1) интактный контроль; 2) контроль с резерпином («Польфа», Польша, 2,5 мг/кг, в/б); 3) опытную группу, получавшую ЗДМ-81 (17,5 мг/кг, в/ж) за 30 минут до введения резерпина. Оценивалось изменение ректальной температуры мышей до введения резерпина, а также через 240 и 270 минут эксперимента. Ректальную температуру животных оценивали с применением электронного термометра «OMRON», Германия. Оценку результатов теста проводили путем сравнения параметров опытных групп с контрольными показателями.

2.2.25. Хронический непредсказуемый легкий стресс (UCMS)

В течение 4 недель моделирования стресса животные подвергались воздействию различных непредсказуемых стрессоров, случайным образом распределенных в течение 1 недели [Kurhe et al., 2015], например: 24-часовая депривация пищи, 24-часовая депривация воды, 1-часовое воздействие запаха хищника (крысы), 7-часовой наклон клетки (45°), ночное освещение, 24-часовая загрязненная клетка (200 мл воды в 100 г подстилки из опилок), 6-минутное принудительное плавание при 12°C, 24-часовое воздействие постороннего предмета (например, куска пластика). Контрольные животные не проходили процедуру. После моделирования хронического легкого стресса биологические пробы животных были переданы для исследования ВЭЖХ.

2.2.26. Влияние соединения ЗДМ-81 на содержание основных моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей

Экспериментальное соединение ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), диазепам (1 мг/кг), имипрамин (8 мг/кг), амитриптилин (10 мг/кг), а также дистиллированная вода вводились мышам за 30 минут до декапитации, произведенной после наркотизации животных хлоралгидратом (300 мг/кг, в/б). Исследования

проводили в соответствии с методиками, описанными в работах Ковалева Д. Г. (2010) и Смирновой Л. А. (2013, 2019) с соавторами. После декапитации животных мозг помещали в жидкий азот. Биологические пробы хранились при температуре -20^{0}С не более недели [Смирнова и др., 2013]. В качестве анализата использовали 25% гомогенаты мозга в 0,1 Н $HClO_4$, получаемые с применением гомогенизатора Silent Crusher (Германия). Количественное определение содержания биогенных аминов и их метаболитов проводилось методом ВЭЖХ на хроматографе с флуоресцентным детектором Shimadzu (Япония) при длине волны экстинкции 280 нм и длине волны эмиссии 320 нм. В работе использовалась колонка Supelcosil LC-18 (5 мкм; 100 мм*4,6 мм). Мобильная фаза содержала 5% ацетонитрила для ВЭЖХ (УФ 210 нм) (Россия) и 95% буферной системы, состоящей из однозамещенного фосфата калия 50 мМ, pH 3,0 [Смирнова и др., 2019]. В работе использовались стандарты норадреналина (Sigma, США), допамина (Sigma, США) и метаболита допамина - дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК, Sigma, США), серотонина (Sigma, США) и метаболита серотонина - гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК, Sigma, США). Идентификацию исследуемых веществ и расчет концентраций проводили по методу абсолютных стандартов [Ковалев и др., 2010]. Валидационные характеристики количественного определения биогенных аминов в биологических пробах представлены в Таблице 2. Для расчета концентрации использовались калибровочные графики (Рисунки 14-18).

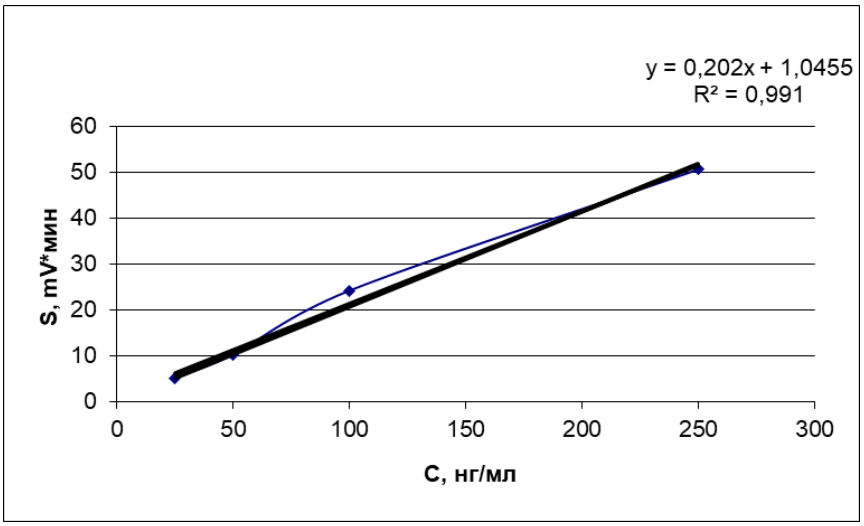


Рисунок 14 - Зависимость площади хроматографического пика от концентрации серотонина в биологической пробе

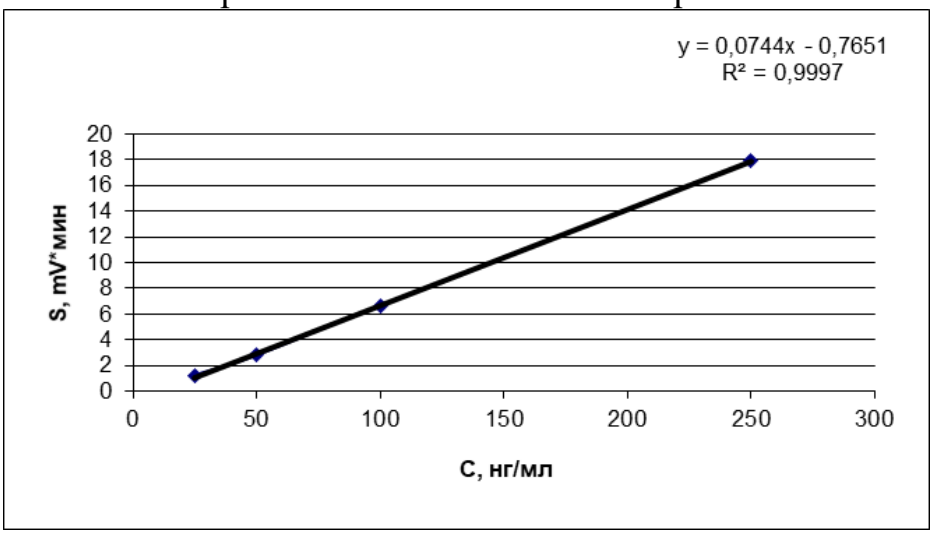


Рисунок 15 - Зависимость площади хроматографического пика от концентрации дофамина в биологической пробе

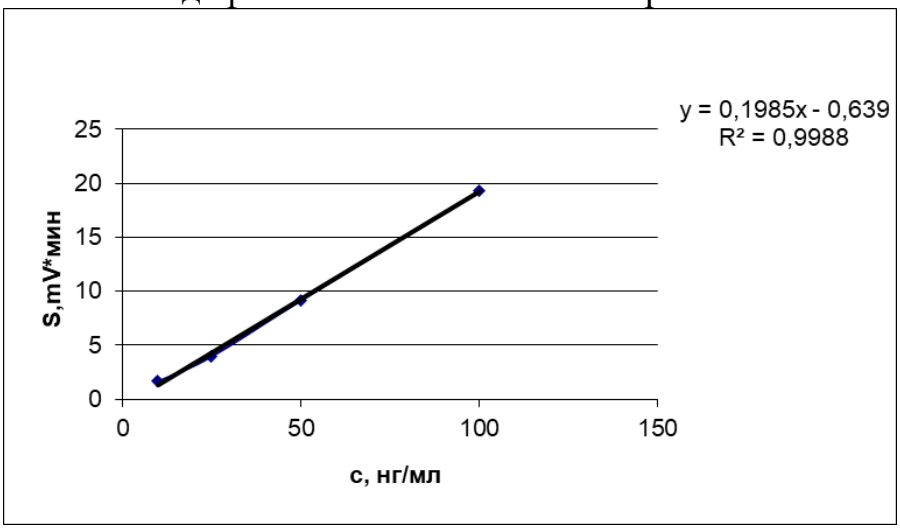


Рисунок 16 - Зависимость площади хроматографического пика от концентрации норадреналина в биологической пробе

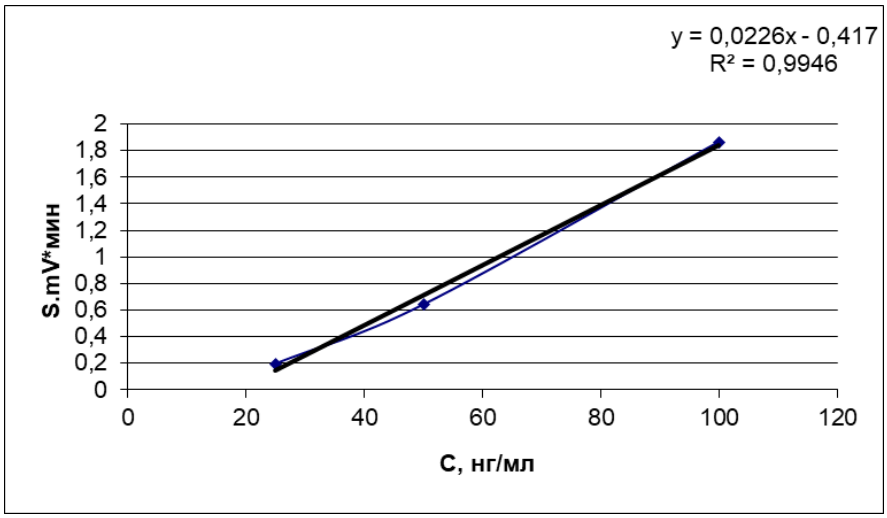


Рисунок 17 - Зависимость площади хроматографического пика от концентрации ДОФУК в биологической пробе

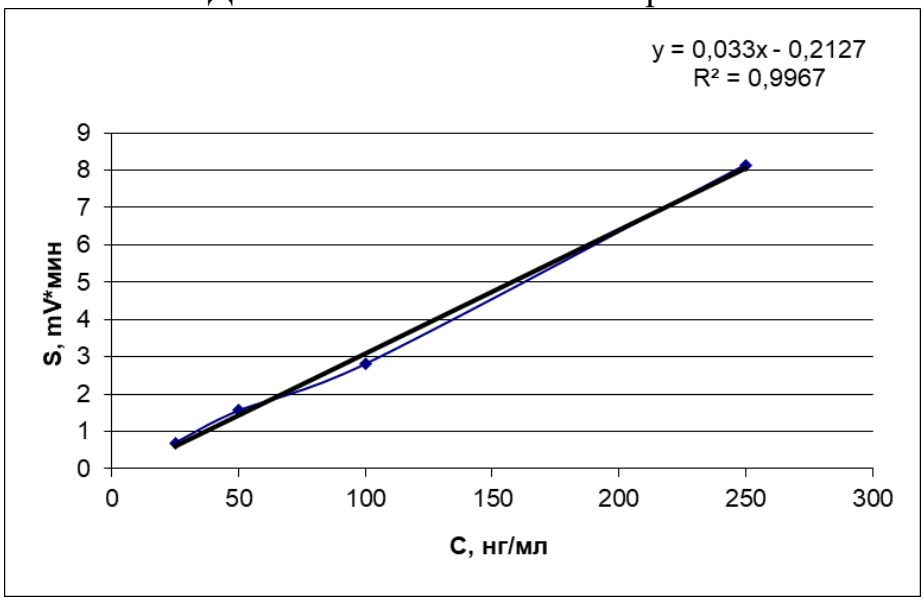


Рисунок 18 - Зависимость площади хроматографического пика от концентрации 5-ОИУК в биологической пробе

Таблица 2 - Валидационные характеристики количественного определения биогенных аминов в биологических пробах

Биогенный амин	Аналитический диапазон, нг/мл	R^2	Прецизионность	Точность	Предел количественного определения, нг/мл
Серотонин	25-250	0,991	≤10%	>95%	25
Норадреналин	10-100	0,9988			10
Дофамин	25-250	0,9997			25
ДОФУК	25-100	0,9946			25
5-ОИУК	25-250	0,9967			25

2.2.27. Оценка острой токсичности соединения ЗДМ-81

Оценку острой токсичности соединения ЗДМ-81 проводили на белых нелинейных мышах–самцах массой 18-22 г при однократном внутрижелудочном введении [Арзамасцев Е.В. и др., 2012]. Животные помещались в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде и пище. Регистрация гибели животных осуществлялась через 14 дней после введения вещества. Вещество вводилось в дозах 500, 750, 1000, 1500 и 2000 мг/кг. На основании полученных результатов рассчитывался $ЛД_{50,}$ оцененный по методу Литчфилда-Вилкоксона [Беленький М.Л., 1963].

2.2.28. Нейротоксикологический профиль соединения ЗДМ-81 в комплексе тестов по S. Irwin

Эксперименты проводили на половозрелых мышах-самцах массой от 18 до 22 г в количестве 30 особей, из которых было сформировано пять экспериментальных групп – одна контрольная и четыре опытных. Вещество ЗДМ-81 вводили мышам внутрижелудочно атравматичным металлическим зондом в эффективной дозе 17,5 мг/кг и в дозах, кратных эффективной в 10 и 50 раз – 175 и 800 мг/кг [Спасов и др., 2019]. Исследование нейротоксикологического профиля соединения ЗДМ-81 проводилось по методу «S.Irvin» [Roux et al., 2004] в модификации НИИ фармакологии ВолгГМУ [Бугаева Л. И. и др., 2000]. После введения животным экспериментального соединения ЗДМ-81 оценивали спектр изменения поведенческих реакций (настороженность, пассивность, агрессия, беспокойство и спонтанная двигательная активность), нервно-мышечных (судороги, парезы, тремор и реакции на раздражители) и вегетотропных эффектов (размер зрачка, птоз верхнего века, уринация, дефекация, саливация, цвет кожи, частота дыхания и температура тела). Нормальное значение параметра оценивалось в 4 балла, изменение параметра в среднем на 25% соответствовало изменению в 1 балл. Увеличение параметра по шкале от 4 до 8 баллов указывало на возрастание внешне наблюдаемых эффектов, а снижение от 4 до 0 баллов - на его угнетение [Бугаева и др., 2012]. В шкале оценок нейротоксикологического профиля соединения для признаков, в норме отсутствующих или

присутствующих в незначительной степени, активность выражалась от 0 до 8 баллов, где 0 принимался за отсутствие эффекта. По результатам исследования прогнозировали доклиническую степень безопасности нового соединения и обозначали его минимальную токсическую дозу ($ТД_{мин}$).

2.2.28. Оценка основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения ЗДМ-81 по показателям ADMET

Для наиболее активного соединения был произведен анализ методом ADMET *in silico*, с использованием наиболее популярные интернет-сервисов для определения фармакокинетических свойств соединения: ProTox 2 [Banerjee et al., 2018], SwissADME [Daina et al., 2017], pkCSM [Pires et al., 2015], admetSAR [Chen et al., 2012] и ADMETlab [Dong et al., 2017].

2.3. Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием ПО GraphPadPrism 7.0, США. Соответствие полученной выборки нормальному распределению данных осуществляли с применением теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили непараметрическим парным тестом Вилкоксона. Сравнение двух независимых выборок осуществляли с использованием непараметрического парного теста (U-критерий Манна–Уитни). Сравнение трех и более независимых выборок проводили параметрическими (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Даннета) и непараметрическими (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна) методами. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p<0,05$.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА НЕЙРОПСИХОТРОПНОГО ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА

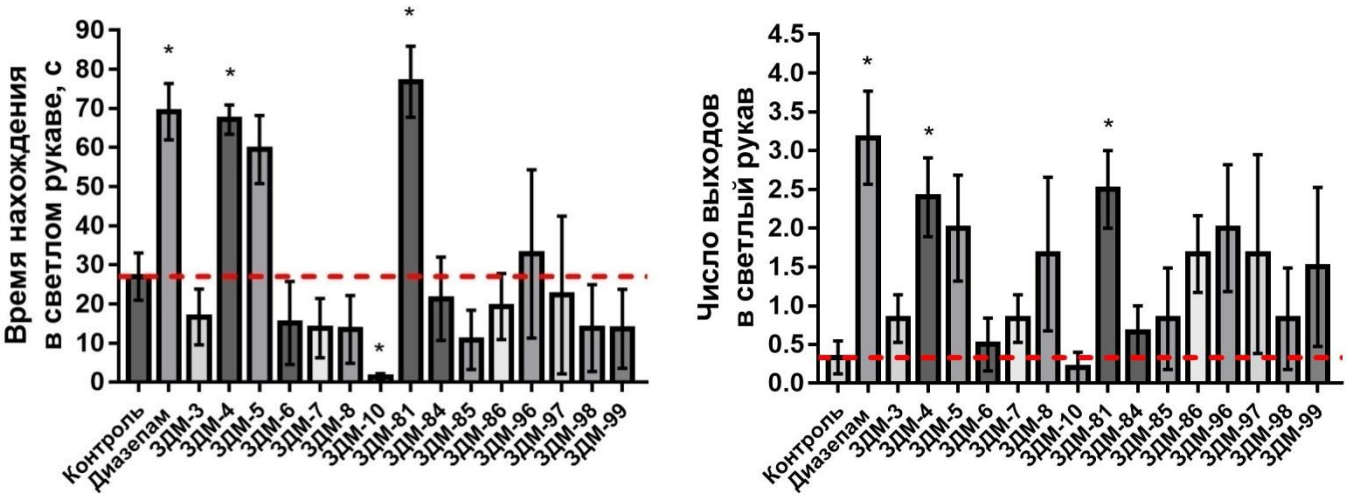
Хиноксалин является химическим скаффолдом с широким спектром фармакологических активностей, среди которых противоопухолевая, антигельминтная, противопротозойная, антимикробная, антидепрессивная, противосудорожная, анксиолитическая. На современном этапе интерес для исследователей представляют нейротропные эффекты хиноксалинов.Для первичной оценки нейропсихотропного потенциала новых соединений были изучены их противотревожные, психорелаксирующие и антидепрессивные свойства на моделях «Приподнятого крестообразного лабиринта», «Открытого поля» и «Подвешивания за хвост», соответственно.

3.1. Анксиолитическая активность производных хиноксалина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Методика «Приподнятого крестообразного лабиринта» была выбрана как базовая для поиска веществ с анксиолитической активностью. Этот тест является классическим для поиска соединений с противотревожными свойствами среди представителей различных химических классов и входит в список методик, рекомендуемых для доклинического исследования анксиолитической активности новых соединений [Миронов и др., 2012].

На предмет наличия противотревожного эффекта было протестировано 15 новых производных хиноксалина. Препарат сравнения диазепам в дозе 1 мг/кг проявил характерный для него анксиолитический эффект: время пребывания животных в светлых рукавах установки под влиянием диазепама статистически значимо возросло до 69,1±7,20 с в сравнении с контрольными значениями – 27,0±6,05 с. Число выходов животных в открытые рукава лабиринта было увеличено с 0,3±0,21 в контрольной группе до 3,2±0,60 в группе препарата сравнения. Изученные производные хиноксалина проявили различный уровень противотревожного действия. По показателю времени пребывания мышей в светлых рукавах установки ПКЛ соединения ЗДМ-4 (67,2±3,75 с) и ЗДМ-81 (76,8±9,06 с) были охарактеризованы анксиолитическим действием на уровне

препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг ($p<0,05$). Под действием соединений ЗДМ-3, ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-8, ЗДМ-10, ЗДМ-84, ЗДМ-85, ЗДМ-86, ЗДМ-97, ЗДМ-98 и ЗДМ-99 время пребывания мышей в светлых рукавах установки оставалось на уровне контрольных значений или было снижено относительно него. Это может свидетельствовать об отсутствии выраженного анксиолитического эффекта указанных соединений. Соединение ЗДМ-10 по данному показателю проявило эффект, близкий к анксиогенному – 1,3±0,88 с. По числу выходов в открытые рукава установки ПКЛ соединения ЗДМ-4 (2,4±0,50) и ЗДМ-81 (2,5±0,50) проявили противотревожное действие, близкое к диазепаму и значимо отличающееся от группы контроля. Параметры животных под влиянием соединений ЗДМ-3, ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-10, ЗДМ-84, ЗДМ-85, ЗДМ-98 и ЗДМ-99 не существенно отличались от контрольных значений. Животные, получавшие данные соединения, практически не выходили в освещенные участки установки, вели себя апатично, не проявляли интереса к неисследованным областям лабиринта. Под действием субстанций ЗДМ-5, ЗДМ-8, ЗДМ-86, ЗДМ-96 и ЗДМ-97 число выходов в светлый рукав было несколько выше контроля, однако статистически достоверных различий обнаружено не было (Рисунок 19).

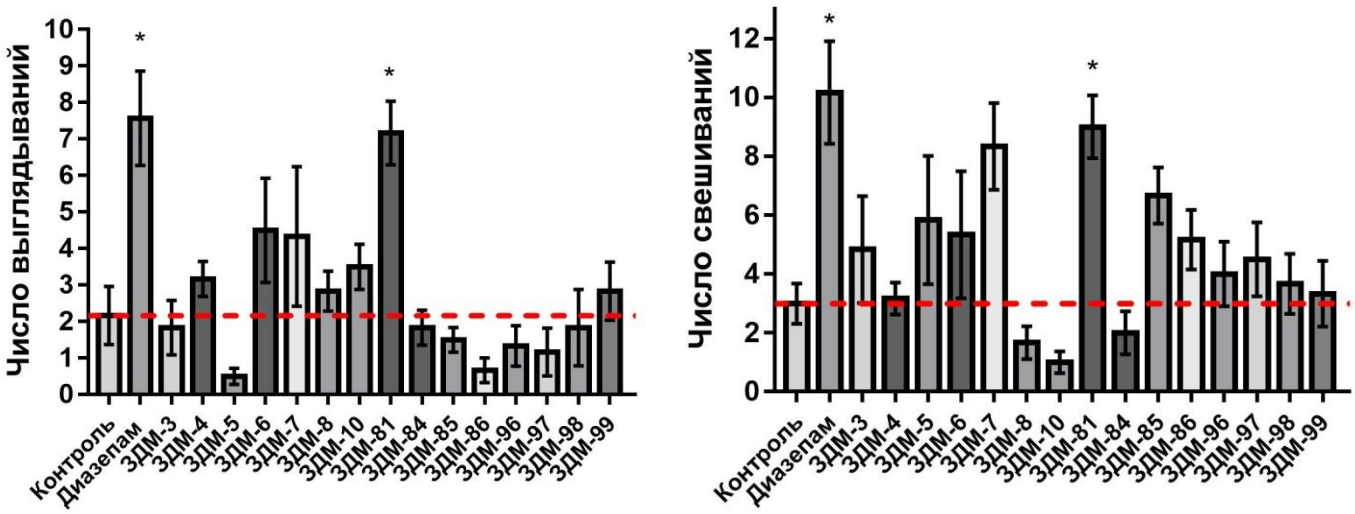


А **Б**

Рисунок 19 - Анксиолитическое действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к*

контролю (p<0,05, критерий Краскелла -Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»

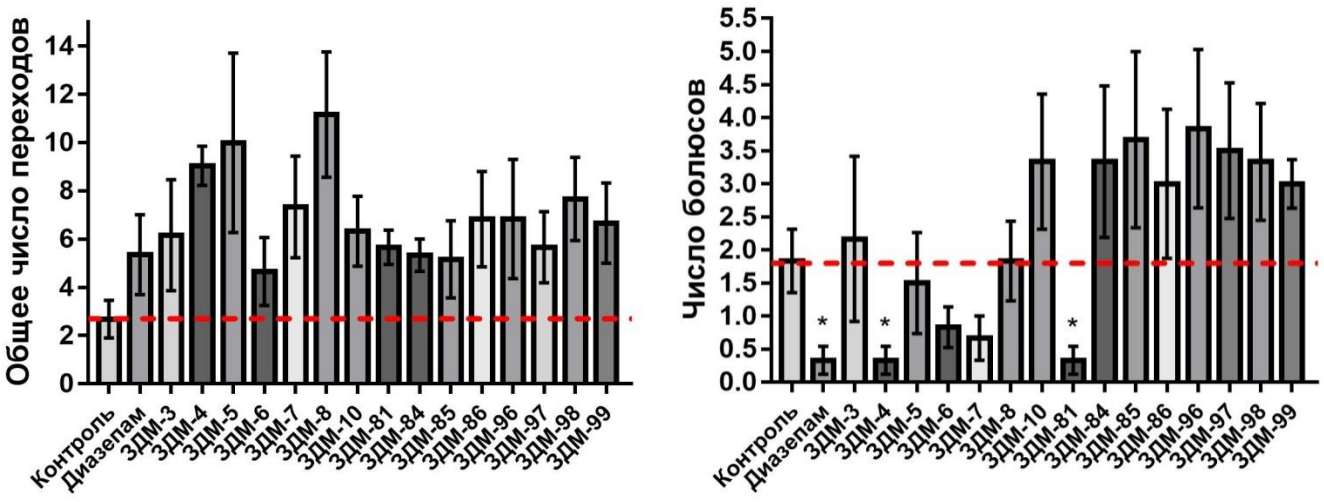
Как известно, методика «Приподнятого крестообразного лабиринта» основана на естественном страхе грызунов перед открытыми и освещенными местностями, а также их боязни падения с высоты. Помимо основных анксиолитических параметров – времени и числа пребывания животных в открытых рукавах установки, можно оценить дополнительные – число свешиваний и выглядываний мышей в открытые рукава, а также число болюсов как показатель эмоциональности лабораторных животных. В группе диазепама наблюдалось значительное повышение числа выглядываний и свешиваний по сравнению с группой контроля: 10,1±1,74 и 7,6±1,28 в группе диазепама против 3,0±0,68 и 2,16±0,79 в группе контроля соответственно. При введении животным соединений ЗДМ-6 (4,5±1,43), ЗДМ-7 (4,3±1,90) и ЗДМ-81 (7,2±0,87) число выглядываний было увеличено по сравнению с контрольной группой, в случае с ЗДМ-81 наблюдалось статистически значимое различие. Под действием ЗДМ-3 (1,8±0,74), ЗДМ-4 (3,1±0,47), ЗДМ-8 (2,8±0,54), ЗДМ-10 (3,5±0,61), ЗДМ-98 (1,8±1,04) и ЗДМ-99 (2,8±0,79) показатель находился на уровне контрольных значений. Для соединений ЗДМ-5 (0,5±0,22), ЗДМ-84 (1,8±0,47), ЗДМ-85 (1,5±0,34), ЗДМ-86 (0,7±0,33), ЗДМ-96 (1,3±0,55) и ЗДМ-97 (1,2±0,65) число выглядываний мышей было снижено относительно контроля. Число свешиваний было статистически значимо увеличено только для группы ЗДМ-81 (9,0±1,06). Соединения ЗДМ-7 (8,3±1,47), ЗДМ-85 (6,7±0,95) и ЗДМ-86 (5,2±1,01) также существенно повышали количество свешиваний животных с края светлого рукава (Рисунок 20).



А **Б**

Рисунок 20 - Анксиолитическое действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание:* * *- отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выглядываний мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число свешиваний мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»*

Общее число переходов в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» было повышено для всех соединений по сравнению с контрольной группой (2,7±0,78), однако статистически значимых различий выявлено не было. Число болюсов, как показатель эмоциональности животных в условиях теста, было снижено по сравнению с контролем (1,8±0,47) для группы диазепама (0,3±0,21), ЗДМ-4 (0,3±0,21) и ЗДМ-81 (0,3±0,21) (p<0,05, Рисунок 21).



А **Б**

Рисунок 21 - Анксиолитическое действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Общее число переходов мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число болюсов мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»*

Таким образом, по результатам теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» наиболее активными соединениями являются ЗДМ-4 и ЗДМ-81. Мыши под действием указанных соединений были более активны, больше времени проводили в светлых рукавах установки, не боялись исследовать новые пространства, чаще выглядывали и свешивались с краев лабиринта. Наиболее выраженную анксиолитическую активность проявляет соединение ЗДМ-81: уровень его эффекта статистически достоверно соответствует препарату сравнения диазепаму в дозе 1 мг/кг.

3.2. Влияние производных хиноксалина на поведение мышей в тесте «Открытое поле»

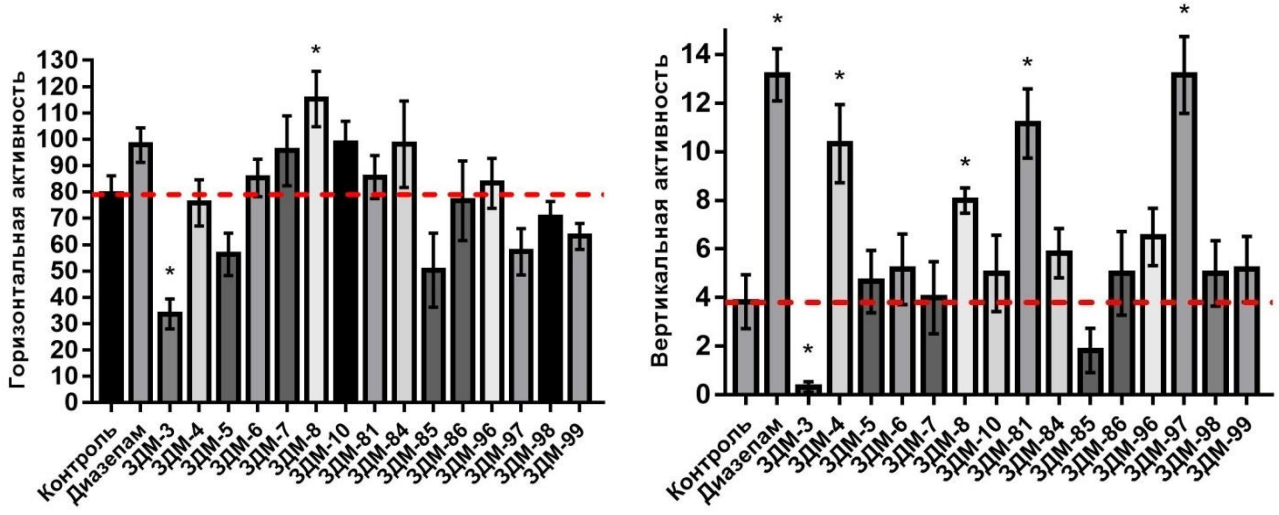
Тест «Открытое поле» был выбран в качестве метода поиска для определения нейропсихотропного потенциала ряда производных хиноксалина ввиду широкого спектра эффектов, оцениваемых с его помощью:

анксиолитический, психорелаксирующий, седативный, нейролептический, исследовательский потенциал.

Горизонтальная двигательная активность грызунов в данном тесте оценивалась методом подсчета числа квадрантов, пересеченных мышью за время эксперимента. В группе контроля показатель составил 79,3±6,87 квадрантов, в то время как в группе препарата сравнения диазепама – 97,8±6,52. Некоторое стимулирующее влияние диазепама объясняется выбранной дозой в 1 мг/кг, в которой отчетливо выражен его противотревожный эффект без нежелательной седации и миорелаксации. При подавлении естественного страха мышей перед открытой освещенной местностью начинает преобладать исследовательский интерес к новым неизученным пространствам. Для соединения ЗДМ-3 (33,6±5,68) отмечено значимое подавление двигательной активности животных ($p<0,05$), что может быть связано с его анксиогенным потенциалом, описанным в результатах теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Аналогичная картина, но без значимых различий, наблюдается для соединений ЗДМ-5 (56,3±8,07), ЗДМ-85 (50,3±14,10), ЗДМ-97 (57,3±8,80) и ЗДМ-99 (63,2±4,90) – мыши под влиянием этих соединений совершали меньше передвижений по «Открытому полю» по сравнению с контролем. После введения животным соединений под шифром ЗДМ-4 (75,8±8,76), ЗДМ-6 (85,3±7,08), ЗДМ-7 (95,7±13,31), ЗДМ-10 (98,5±8,39), ЗДМ-81 (85,7±8,16), ЗДМ-84 (98,2±16,40), ЗДМ-86 (76,7±15,13), ЗДМ-96 (83,3±9,49) и ЗДМ-98 (70,3±6,13) показатели горизонтальной двигательной активности соответствовали уровню контрольных значений. Соединение ЗДМ-8 (115,3±10,5) статистически значимо повышало уровень двигательной активности мышей в сравнении с контролем ($p<0,05$). Для этого соединения вероятна психостимулирующая активность.

Вертикальная двигательная активность грызунов в этом тесте характеризует не только уровень мышечного тонуса, но и исследовательский интерес, и некоторое анксиолитическое действие новых соединений. Для препарата сравнения диазепама было ожидаемо повышено число вертикализаций животных до 13,2±1,07 раз в сравнении с контролем – 3,8±1,10 раз. Животные под влиянием

соединения ЗДМ-3 практически не совершали вертикальных стоек (0,3±0,21), значимо снижая показатель в сравнении с контролем ($p<0,05$). Аналогично препарату сравнения, для соединений ЗДМ-4 (10,3±1,60), ЗДМ-8 (8,0±0,51), ЗДМ-81 (11,2±1,42), ЗДМ-97 (13,2±1,57) также было отмечено значительное увеличение вертикализаций грызунов ($p<0,05$). Для остальных соединений ряда уровень вертикальной активности мышей не отличался от контрольных значений (Рисунок 22).



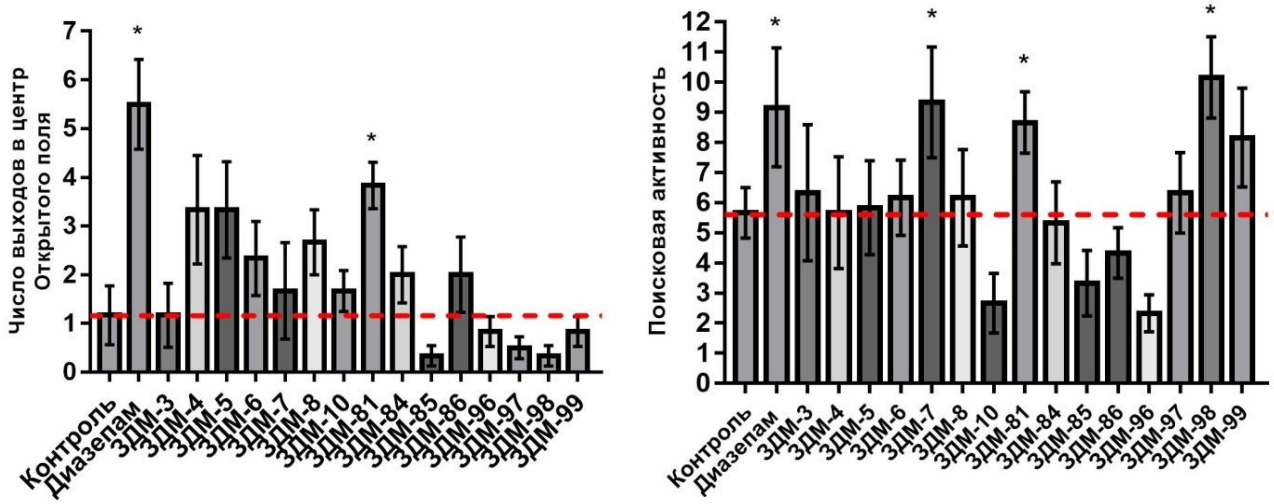
А **Б**

Рисунок 22 - Влияние производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), на поведение мышей в тесте «Открытое поле», внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p<0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число пересеченных квадрантов (горизонтальная двигательная активность); Б – Число вертикальных стоек (вертикальная двигательная активность)*

Показатель числа выходов мышей в центр освещенного «Открытого поля» позволяет дополнительно оценить противотревожный потенциал исследуемых соединений. Для диазепама (5,5±0,92) и соединения ЗДМ-81 (3,8±0,47) были отмечены значительно более частые пересечения мышами центрального квадранта ($p<0,05$) по отношению к контролю (1,1±0,60). Мыши под влиянием ЗДМ-4 (3,3±1,11), ЗДМ-5 (3,3±0,98), ЗДМ-6 (2,3±0,76) и ЗДМ-8 (2,6±0,66) выходили в центр чаще контроля, однако статистически значимой зависимости не

отмечено. Для остальных соединений число выходов животных в центр «Открытого поля» оставалось на уровне контрольных значений.

Поисковая активность мышей оценивалась по числу изученных животным отверстий на дне установки «Открытое поле». Этот параметр отражает исследовательский интерес мыши к новым объектам или пространствам, в обычных условиях подавленный анксиогенным влиянием освещенной территории. Мыши под влиянием диазепама, ЗДМ-7, ЗДМ-81 и ЗДМ-98 более часто обследовали отверстия, проявляли больше интереса к неизученным норкам. Для остальных соединений ряда производных хиноксалина показатели незначительно отличались от уровня контрольных (Рисунок 23).



А **Б**

Рисунок 23 - Влияние производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), на поведение мышей в тесте «Открытое поле», внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна),пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выходов в центр «Открытого поля»; Б – Число обследованных норок (поисковая активность)*

3.3. Оценка антидепрессивных свойств производных хиноксалина в тесте «Подвешивание за хвост»

Для оценки антидепрессивного потенциала новых соединений выбрана методика «Подвешивание за хвост». В группе контроля время замираний мышей составило в среднем 152,5±12,99 с, в то время как в группах препаратов сравнения – классических трициклических антидепрессантов амитриптилина в дозе 10 мг/кг и имипрамина в дозе 8 мг/кг – показатель был на уровне 35,0±9,83 с и 44,2±6,36 с, соответственно. Отмечено статистически значимое различие между контролем и группами препаратов сравнения. Для экспериментальных соединений ЗДМ-4 (134,7±13,29 с), ЗДМ-5 (143,2±10,56 с), ЗДМ-8 (132,7±18,54 с), ЗДМ-10 (128,7±10,81 с), ЗДМ-84 (142,2±21,9 с), ЗДМ-85 (165,2±12,22 с), ЗДМ-86 (162,2±6,90 с), ЗДМ-96 (173,5±14,96 с), ЗДМ-97 (147,3±19,87 с), ЗДМ-98 (161,3±12,21 с) и ЗДМ-99 (174,0±6,46 с) время замираний находится на уровне контрольных значений ($p<0,05$). Это может свидетельствовать об отсутствии антидепрессивной активности для указанных соединений в условиях теста «Подвешивание за хвост». Мыши под влиянием данных субстанций предпринимали мало попыток избежать дискомфорта от подвешивания, совершали в целом меньше движений, вели себя более апатично в ходе эксперимента. Для соединений ЗДМ-6 (95,8±11,54 с), ЗДМ-7 (104,7±15,31 с) и ЗДМ-81 (92,8±11,85 с) исследуемый параметр был заметно снижен относительно контроля, не достигая, однако, уровня препаратов сравнения и не характеризуясь статистически значимым различием с контрольной группой животных ($p<0,05$). Принимая во внимание результаты проведенных исследований в «Открытом поле», где было показано отсутствие стимулирующего влияния соединений ЗДМ-6, ЗДМ-7 и ЗДМ-81 на горизонтальную двигательную активность мышей, что могло бы повлиять на результат данного теста, антидепрессивное действие указанных соединений можно охарактеризовать как умеренное (Рисунок 24).

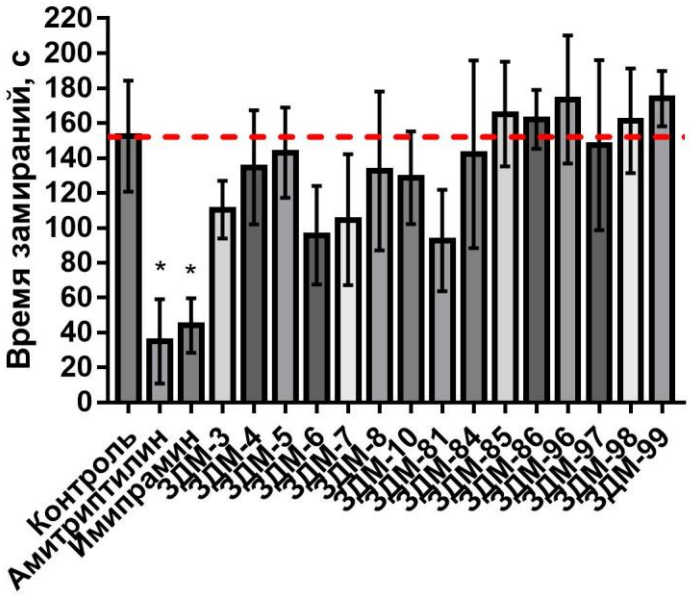


Рисунок 24 - Антидепрессивное действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения амитриптилину (10 мг/кг), в условиях теста «Подвешивание за хвост», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

3.4. Влияние производных хиноксалина на локомоторную активность мышей в тестах «Ротарод», «Сетка» и «Проволока»

Для широкого ряда транквилизаторов характерно влияние на мышечный тонус животных и человека в виде нежелательной миорелаксации. Для пациентов, чья профессиональная деятельность связана с концентрацией внимания, этот побочный эффект зачастую становится причиной отказа от продолжения лечения и, как следствие, снижением комплаентности. Для изучения миорелаксирующих свойств производных хиноксалина были выбраны методики «Ротарод», «Сетка» и «Проволока» [Миронов А. Н. и др., 2012].

В тесте «Ротарод» время удерживания на вращающемся стержне для группы контроля составило 28,0±1,29 с, для группы диазепама – 19,2±1,70 с; выявленные миорелаксирующие свойства являются характерными для группы производных бензодиазепина. Мыши под влиянием ЗДМ-96 продержались на вращающемся стержне в среднем 23,3±1,14 с, что достоверно отличается от контрольных значений. Для остальных 14 экспериментальных соединений не

отмечено значимого влияния на мышечный тонус грызунов в условиях теста «Ротарод» (Рисунок 25).

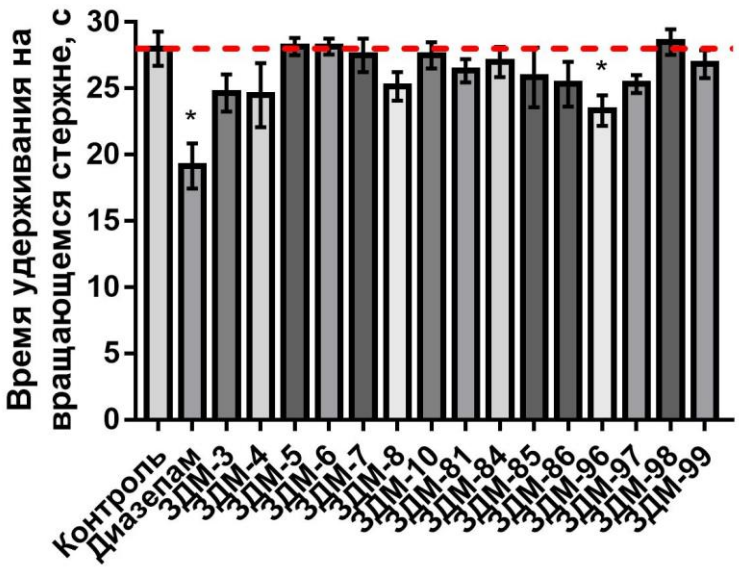
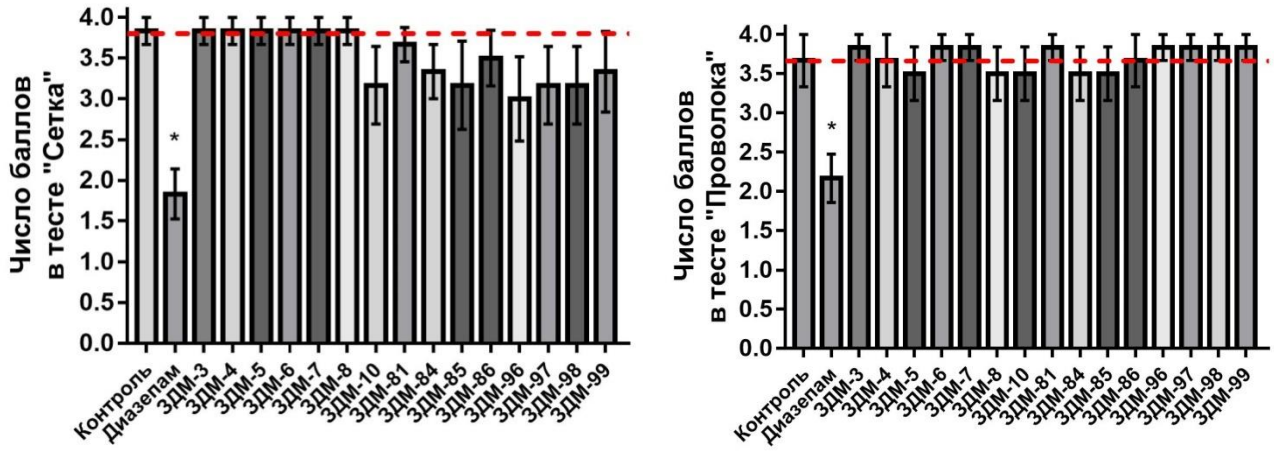


Рисунок 25 - Миорелаксирующее действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях теста «Ротарод», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

В тестах «Сетка» и «Проволока» для производного бензодиазепина – препарата сравнения диазепама – число баллов составило 1,8±0,30 и 2,1±0,30 против 3,8±0,16 и 3,6±0,33 балла в группе контроля, соответственно. Для 15 тестируемых соединений – производных хиноксалина – не было отмечено статистически достоверного различия с показателями контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии развития миорелаксирующего эффекта для данной группы соединений в условиях тестов «Сетка» и «Проволока» (Рисунок 26).



А **Б**

Рисунок 26 - Миорелаксирующее действие производных хиноксалина в дозе, эквимолярной препарату сравнения диазепаму (1 мг/кг), в условиях тестов «Сетка» (А) и «Проволока» (Б), мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна),пунктиром помечен уровень контрольных значений*

Таким образом, в результате изучения 15 производных хиноксалина на предмет наличия миорелаксирующих свойств было выявлено, что для соединений характерен различный уровень миорелаксации. Так, вещество ЗДМ-96 вызывало снижение мышечного тонуса грызунов в тесте «Ротарод», однако в других тестах достоверного влияния на исследуемый параметр обнаружено не было. Для остальных экспериментальных групп животных статистически значимой миорелаксирующей активности не было выявлено в условиях тестов «Сетка», «Проволока» и «Ротарод».

3.5. Зависимость анксиолитического эффекта производных хиноксалина от химической структуры

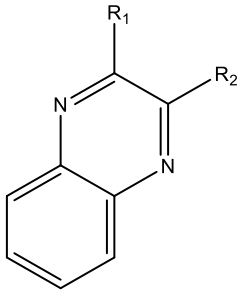
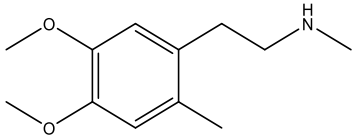
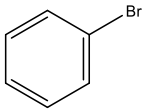
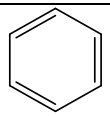
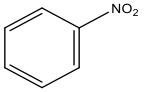
При сопоставлении результатов скрининговых исследований новых соединений на анксиолитическую активность были отмечены следующие закономерности. Производное хиноксалина ЗДМ-86, где в качестве R_1 заместителя выступает 2-метил(фенил-N,N-диметилпропан-2-амин), а R_2 - 3,4-дихлорфенил, не проявило искомой активности. Хотя по числу свешиваний и выходов в светлый рукав установки показатели соединения превосходят группу

контроля, статистически достоверных отличий обнаружено не было. Аналогичные результаты получены для ЗДМ-8 с индольным циклом в R_1 положении и 4-бромфенильном в R_2. В случае, когда первым заместителем выступал 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N,N-диметилпропан-2-амин, а вторым - метил (ЗДМ-6), 4-бромфенил (ЗДМ-7, ЗДМ-84), бензо[b][1,4]оксазин-3(4*H*)-он (ЗДМ-85), анксиолитическая активность соединений также не была обнаружена. Таким образом, наиболее перспективным для проявления противотревожной активности новых производных хиноксалина является присутствие в первом положении 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина, в то время как замещение R_1 на другие ведет к снижению искомой активности.

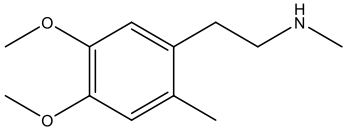
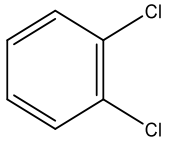
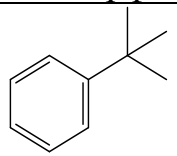
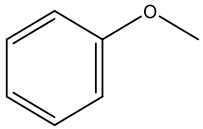
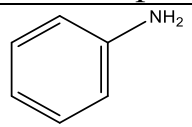
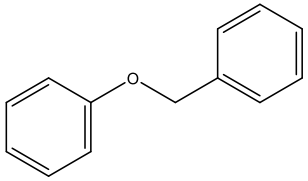
Среди производных с указанным заместителем в первом положении, присутствие 3,4-дихлорфенила в положении 2 хиноксалина (ЗДМ-10) ведет к снижению времени пребывания мышей в светлом рукаве установки ПКЛ относительно контроля, что может свидетельствовать об анксиогенном действии вещества. Замена двух атомов хлора в радикале R_2 соединения ЗДМ-10 на атом брома (ЗДМ-3), метоксигруппу (ЗДМ-96), аминогруппу (ЗДМ-97), бензилоксигруппу (ЗДМ-98) или 4-(4-нитрофенокси)фенильную группу (ЗДМ-99) приводила к соответствию показателей уровню контрольных значений. Животные под действием указанных соединений были малоактивны, не проявляли интереса к исследованию новых для них пространств, предпочитали оставаться в темных отсеках установки. Наличие во втором положении скаффолда фенильного (ЗДМ-4) или 4-*трет*-бутилфенильного (ЗДМ-81) радикала являлось фактором проявления анксиолитического эффекта соединений на уровне препарата сравнения диазепама ($p<0,05$). Можно отметить, что указанные радикалы достаточно неполярны и характеризуются более равномерным распределением электронной плотности, нежели их аналоги, содержащие в R_2 атомы с выраженной электроотрицательностью – азот, кислород, галогены. Эта особенность приводит к росту анксиолитического потенциала новых соединений. С другой стороны, соединение ЗДМ-5 содержит нитрогруппу в *пара*-положении фенильного радикала, и для него характерен противотревожный эффект на уровне

диазепама, хотя для ЗДМ-5 и не отмечена значимая достоверность различий с группой контроля. Таким образом, присутствие заместителя во втором положении, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью (за исключением *пара*-нитрофенилзамещённого), а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина в положении 1, положительно влияло на проявление противотревожной активности новых производных хиноксалина в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг. Зависимость структурных особенностей новых соединений и их анксиолитического эффекта представлена в Таблице 3.

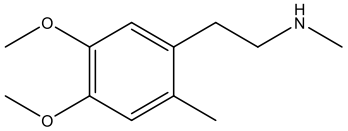
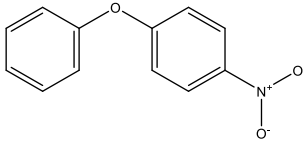
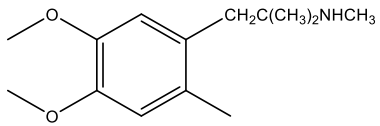
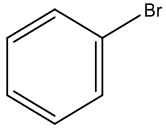
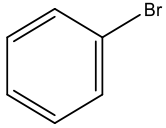
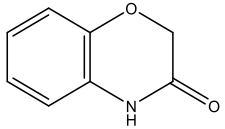
Таблица 3 - Химические структуры изучаемых производных хиноксалина (в дозах, эквимолярных препарату сравнения диазепаму 1 мг/кг, внутрижелудочное введение) и их влияние на показатели времени нахождения в открытом рукаве и количества выходов в открытый рукав в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом (в дозе 1 мг/кг, внутрижелудочное введение) (M±SEM)

№	Шифр	 хиноксалин		Кислотный остаток (nX)	Время нахождения в открытом рукаве (с)	Количество выходов в открытый рукав
		R_1	R_2			
1	ЗДМ-3	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин	 4-бромфенил	HBr	16,7±7,13	0,8±0,30
2	ЗДМ-4		 фенил	HBr	67,2±3,75*	2,4±0,50*
3	ЗДМ-5		 4-нитрофенил	$(COOH)_2$	59,5±8,72	2,0±0,68

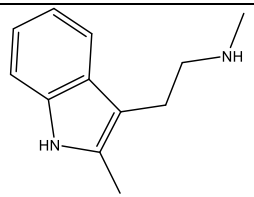
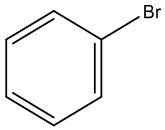
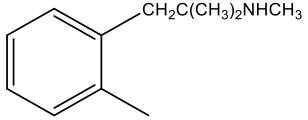
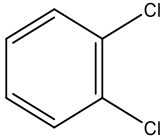
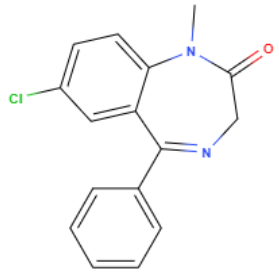
Продолжение таблицы 3

№	Шифр	R_1	R_2	Кислотный остаток (nX)	Время нахождения в открытом рукаве (с)	Количество выходов в открытый рукав
4	ЗДМ-10	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин	 3,4-дихлорфенил	HBr	1,3±0,88	0,2±0,20
5	ЗДМ-81		 4-*трет*-бутилфенил	HCl	76,8±9,06*	2,5±0,50*
6	ЗДМ-96		 4-метоксифенил	2HCl	32,8±21,52	2,0±0,81
7	ЗДМ-97		 4-аминофенил	2HCl	22,3±20,16	1,6±1,28
8	ЗДМ-98		 4-бензилоксифенил	-	13,8±11,11	0,8±0,65

Продолжение таблицы 3

№	Шифр	R_1	R_2	Кислотный остаток (nX)	Время нахождения в открытом рукаве (с)	Количество выходов в открытый рукав
9	ЗДМ-99	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин	 4-(4-нитрофенокси)фенил	-	13,7±10,07	1,5±1,02
10	ЗДМ-6	 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N,N-диметоксипропан-2-амин	CH_3 3-метил	HCl	15,2±10,60	0,5±0,34
11	ЗДМ-7		 4-бромфенил	HCl	13,8±7,58	0,8±0,30
12	ЗДМ-84		 4-бромфенил	-	21,3±10,68	0,6±0,33
13	ЗДМ-85		 бензо[b][1,4]оксазин-3(4H)-он	-	10,8±7,57	0,83±0,65

Окончание таблицы 3

№	Шифр	R_1	R_2	Кислотный остаток (nX)	Время нахождения в открытом рукаве (с)	Количество выходов в открытый рукав
14	ЗДМ-8	 2-метил-(1*H*-индол-3-ил)-N-метилэтан-1-амин	 4-бромфенил	-	13,5±8,63	1,6±0,98
15	ЗДМ-86	 2-метил(фенил-N,N-диметилпропан-2-амин)	 3,4-дихлорфенил	HBr	19,3±8,44	1,6±0,49
16	Диазепам	 7-хлоро-1-метил-5-фенил-1,3-дигидро-2H-1,4-бензодиазепин-2-он			69,1±7,20	3,2±0,60

Примечание: * - отличия от группы контроля статистически значимы ($p<0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с постобработкой критерием Данна).

3.6. Заключение

В ходе первичной оценки нейропсихотропного потенциала ряда новых производных хиноксалина под шифром ЗДМ на предмет анксиолитической, антидепрессивной, миорелаксирующей, психостимулирующей, психорелаксирующей активностей было отмечено, что для соединения ЗДМ-3 отмечена анксиогенная активность в ряде тестов, проявляющаяся в апатичном отношении животных к светлым и открытым пространствам, даже более выраженном, чем в группе контроля. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» обнаружено, что присутствие неполярного заместителя в R_2 положении либо *пара*-нитрофенила, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-аминав положении R_1, являлось структурной особенностью для новых производных хиноксалина с наиболее выраженной противотревожной активностью. Этим критериям соответствуют вещества ЗДМ-4, ЗДМ-5 и ЗДМ-81. Соединение ЗДМ-8 характеризуется некоторым психостимулирующим действием в условиях теста «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», не связанный с его противотревожным потенциалом. Эффект характеризуется повышением уровня горизонтальной и вертикальной двигательной активностей. Для соединений ЗДМ-6 и ЗДМ-7 отмечен умеренный антидепрессивный эффект в тесте «Подвешивание за хвост» без стимулирующего действия в условиях «Открытого поля», что позволяет исключить ложноположительный результат антидепрессивных свойств соединений в данном случае. Для большинства производных хиноксалина не выражена миорелаксирующая активность, исключая ЗДМ-96, понизивший среднее время удержания мышей на вращающемся стержне.

Исходя из изложенного, наиболее перспективными для дальнейшего изучения выступают анксиолитические свойства соединения ЗДМ-81, профиль противотревожного действия которого наиболее близок к препарату сравнения диазепаму в дозе 1 мг/кг, без присущего диазепаму миорелаксирующего и седативного действия.

ГЛАВА 4. АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81

4.1. Противотревожный эффект соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

С целью уточнения и детализации эффекта выявленного в результате скрининговых исследований соединения ЗДМ-81, а именно 2-(2-{[3-(4-*трет*-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорида, было проведено углубленное изучение его анксиолитических свойств с применением различных методик. На первом этапе необходимо было составить кривую зависимости искомого эффекта от дозы нового соединения и определить эффективную дозу. В эффективной дозе были проведены дальнейшие исследования анксиолитической активности ЗДМ-81, в том числе изучение зависимости эффекта от времени, прошедшего после введения препарата, на модели «Приподнятый крестообразный лабиринт». Согласно рекомендациям «Руководства по доклиническому изучению лекарственных средств» [Миронов и др., 2012], необходимо применение как минимум двух неконфликтных и одной конфликтной методик для подтверждения противотревожной активности новых соединений. Исходя из этого, был сформирован перечень тестов для проверки анксиолитических свойств ЗДМ-81: «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние животных» и «Конфликтная ситуация по Vogel».

4.1.1. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в зависимости от дозы

Для анализа зависимости транквилизирующего эффекта соединения ЗДМ-81 от дозы в сравнении с диазепамом, доза изучаемого соединения была рассчитана эквимолярно диазепаму. Ниже приведена таблица соответствия (Таблица 4).

Таблица 4 - Эквимолярное соотношение доз диазепама и соединения ЗДМ-81

	Диазепам	**ЗДМ-81**
Дозы, мг/кг	0,01	0,0175
	0,1	0,175
	1	**1,75**
	6	10,5
	10	17,5
	16	28
	20	35
	40	70

Для группы контроля время пребывания мышей в светлом рукаве установки ПКЛ составило в среднем 33,6±5,98 с. Введение животным препарата сравнения диазепама в дозах 1 и 6 мг/кг приводило к проявлению выраженного транквилизирующего действия по показателям числа и времени нахождения животных в светлых рукавах установки. В дозах 0,01-0,1 мг/кг диазепам не оказывал анксиолитического эффекта, показатели этих групп соответствуют контрольным значениям. В дозе 6 мг/кг и выше преимущественным эффектом диазепама на ЦНС экспериментальных мышей становится седативный и гипногенный. Животные этих групп были вялы и сонливы, в основном заходили в темные рукава ПКЛ и засыпали. В связи с нарастанием снотворного влияния диазепама на мышей, препарат не изучали в дозах свыше 10 мг/кг.

Соединение ЗДМ-81 в скрининговой дозе 1,75 мг/кг увеличивало время нахождения мышей в светлом рукаве до 76,8±9,06 с относительно контроля. При понижении дозы в 10 и 100 раз наблюдалось снижение параметра на 23 и 33% относительно скрининговой дозы, соответственно. Наиболее выраженный анксиолитический эффект соединения ЗДМ-81 зафиксирован в дозе 17,5 мг/кг, когда время нахождения грызунов в светлом рукаве ПКЛ составило в среднем 89,2±7,41 с. При дальнейшем повышении дозы в 16 (28 мг/кг), 20 (35 мг/кг) и 40

(70 мг/кг) раз от скрининговой (1,75 мг/кг) наблюдалось снижение эффекта на 11, 32 и 43% относительно показателей дозы 17,5 мг/кг, соответственно.

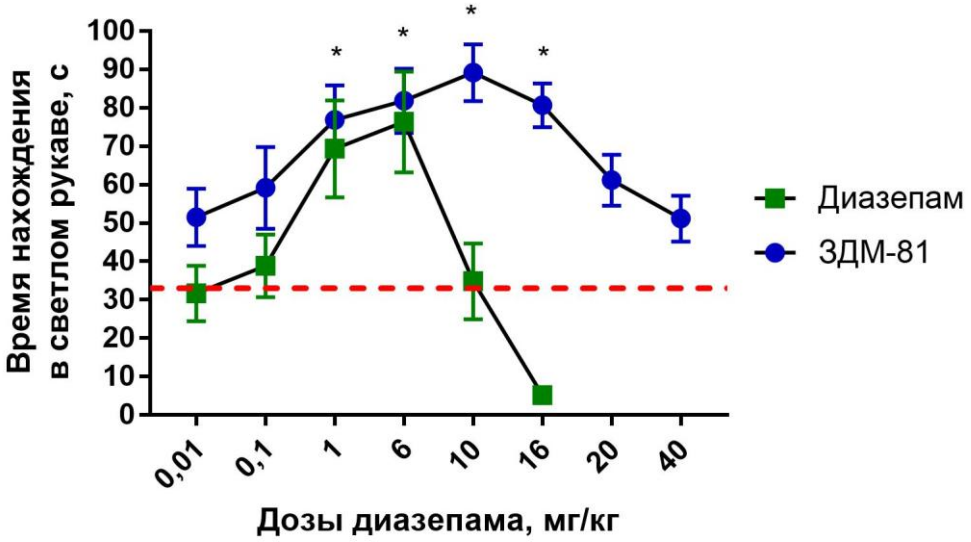
По показателю числа выходов животных в светлые рукава ПКЛ выявлено, что минимальные эффекты наблюдались в дозах 0,0175 и 70 мг/кг – 1,6±0,33 выхода в среднем. Мыши чаще пребывали в светлых рукавах при повышении дозы от 0,0175 до 17,5 мг/кг. До этой отметки наблюдается почти линейная зависимость, после чего в дозах от 28 до 70 мг/кг показатель идет на спад. В дозе 17,5 мг/кг животные посещали светлые рукава в среднем 3,6±0,66 раза (Рисунок 27).

Реактивность, или время выхода животных с центральной площадки установки, для диазепама находилась на уровне контроля в дозах 0,01-6 мг/кг. При повышении концентрации до 6 мг/кг и выше отмечалась общая заторможенность животных: время принятия решения о выходе с центральной площадки ПКЛ существенно росло. Это свидетельствует о развитии седации у мышей под действием диазепама в дозах 6-10 мг/кг.

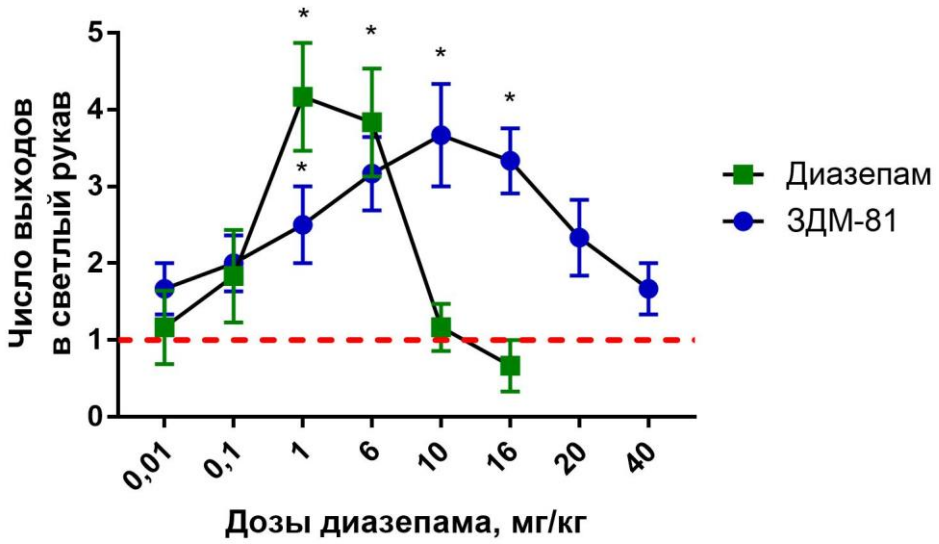
Реактивность мышей под действием соединения ЗДМ-81 приблизительно соответствовала контрольным значениям в диапазоне доз 0,0175-17,5 мг/кг. При дальнейшем повышении дозы было обнаружено, что время реактивности увеличивается. В дозе 70 мг/кг время выхода с центральной площадки составило 7,8±1,37 с, что втрое превышает контрольные значения (2,3±0,49). Возможно, это связано с седативным эффектом соединения ЗДМ-81 в высоких дозах.

Общее число переходов, как характеристика двигательной активности животных под влиянием исследуемого вещества, составило в группе контроля в среднем 3,8±0,70. Под влиянием диазепама в дозе 0,01 мг/кг показатель соответствовал контрольным значениям. При увеличении дозы до 0,1-6 мг/кг зафиксирован прирост двигательной активности животных, что обусловлено стимуляцией исследовательского интереса грызунов при подавлении их естественного страха перед открытыми площадками и падения с высоты под действием анксиолитических препаратов. Седативные и миорелаксирующие свойства производного бензодиазепина были выражены в диапазоне доз от 6 мг/кг

и более, в связи с чем число переходов мышей между рукавами установки снижалось.



А



Б

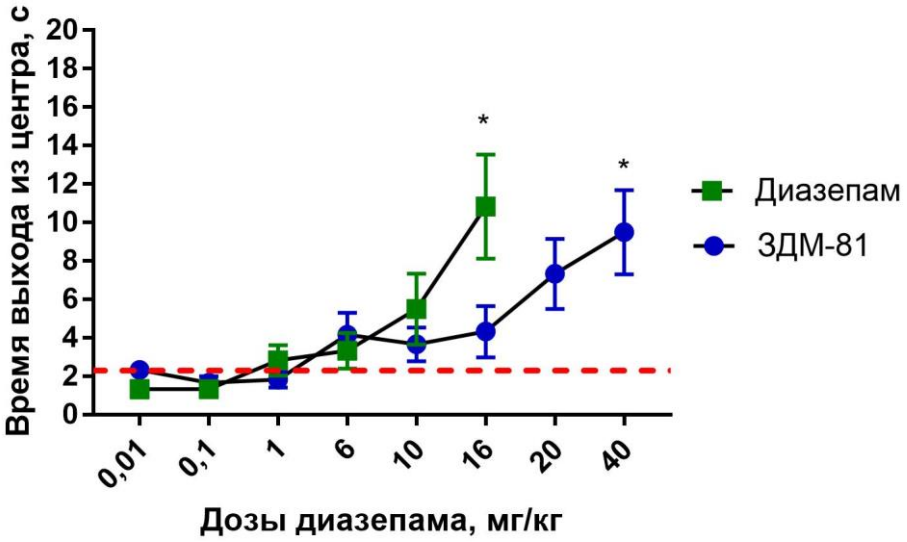
Рисунок 27 - Зависимость анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от выбранной дозы в диапазоне 0,0175-70 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки ПКЛ; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки ПКЛ*

В группах животных, получавших соединение ЗДМ-81 в дозах 0, 0175 и 0,175 мг/кг, число переходов оставалось на уровне контроля – 2,8±0,60 и 3,1±0,60, соответственно. В диапазоне доз 1,7-28 мг/кг наблюдалось повышение общей двигательной активности животных в тесте ПКЛ в 1,5-2 раза относительно контроля, что может быть связано со стимуляцией исследовательского интереса экспериментальных мышей под влиянием вещества с анксиолитическим эффектом. В дозах 35 и 70 мг/кг показатель возвращался на уровень контрольных значений.

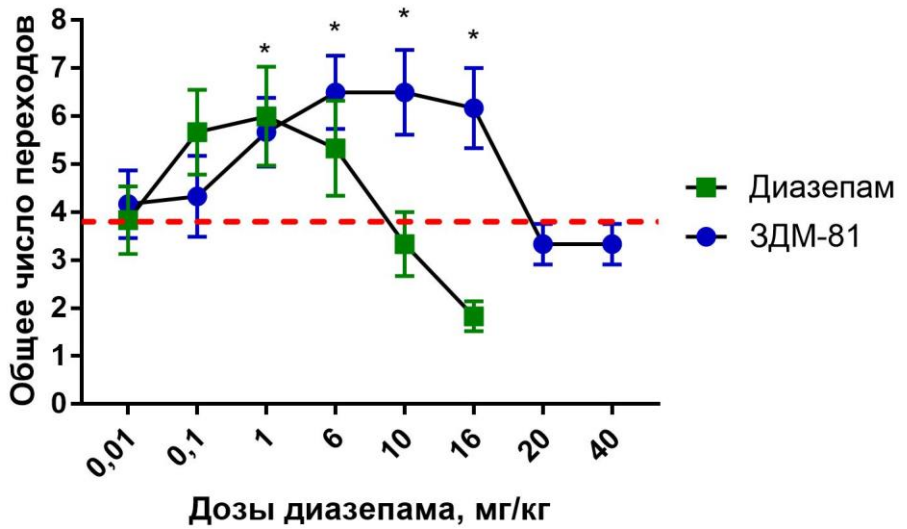
Число выглядываний животных в группе контроля составило 1,5±0,42, а под действием диазепама достигало максимума в дозе 1 мг/кг – 8,5±1,25 выглядываний. В дозах ниже 0,1 и свыше 6 мг/кг число выглядываний мышей соответствовало контрольной группе. Число выглядываний также росло при увеличении дозы соединения ЗДМ-81 с 0,0175 до 1,75 мг/кг от 1,5±0,22 до 7,1±0,87. В дозах 1,75-17,5 мг/кг эффект выходил на плато, после чего снижался в дозах 28-70 мг/кг. В дозах 0,017 и 70 мг/кг параметр соответствует контрольному уровню. В дозе 17,5 мг/кг число выглядываний росло более чем в 4 раза относительно группы контроля.

Число свешиваний в группе контроля составило 4,2±2,24. Для диазепама в дозе 1 мг/кг показатель был проявлен на уровне 10,2±1,79. Число свешиваний также росло при увеличении дозы ЗДМ-81 до 10,5 мг/кг, достигая максимума в дозе 17,5 мг/кг, после чего шло на спад. В пике число свешиваний животных со светлого рукава ПКЛ под действием соединения ЗДМ-81 было превышено более чем втрое относительно контроля (Рисунок 28, 29).

В результате проведенного исследования зависимости анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от выбранной дозы в диапазоне доз 0,017-70 мг/кг, эквимолярном диазепаму 0,01-40 мг/кг, в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», показано, что наиболее выраженный анксиолитический эффект наблюдался у животных под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг.

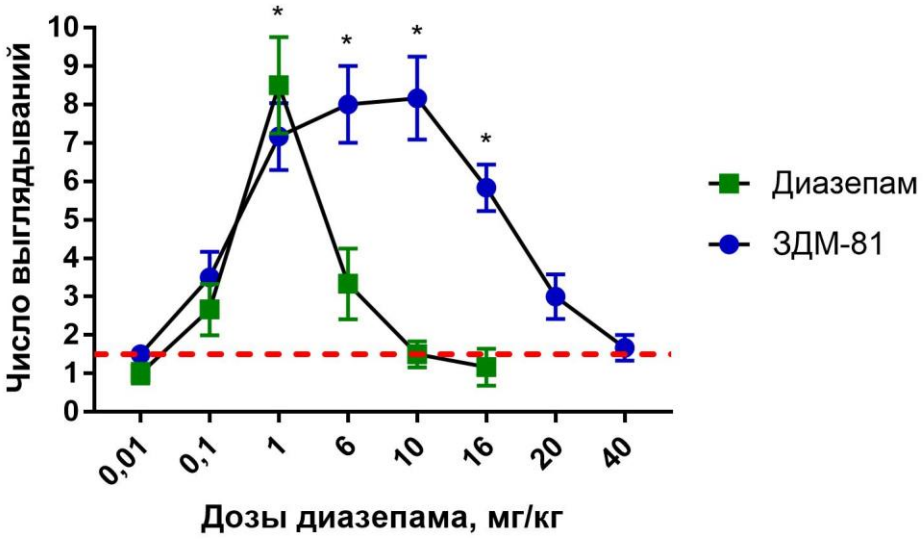


А

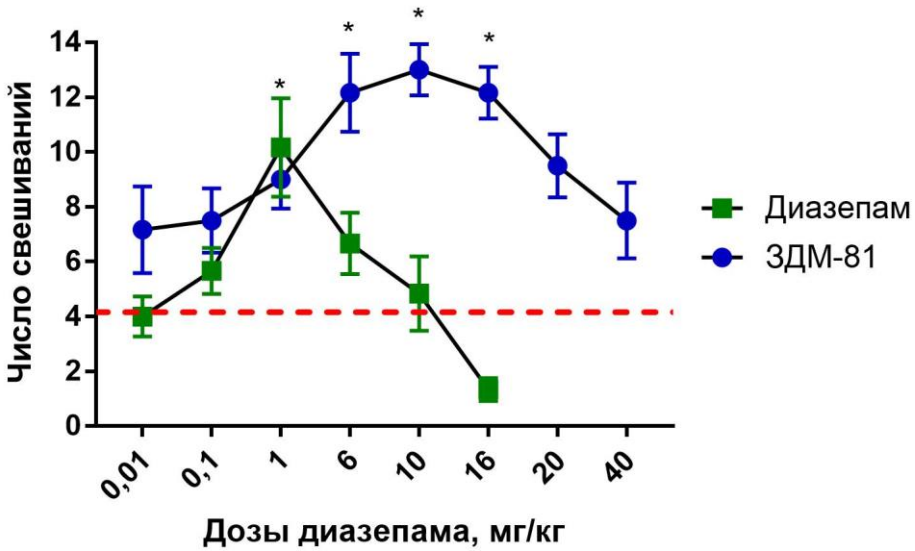


Б

Рисунок 28 - Зависимость анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от выбранной дозы в диапазоне 0, 0175-70 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время выхода животных из центра установки; Б – Общее число переходов животных*



А



Б

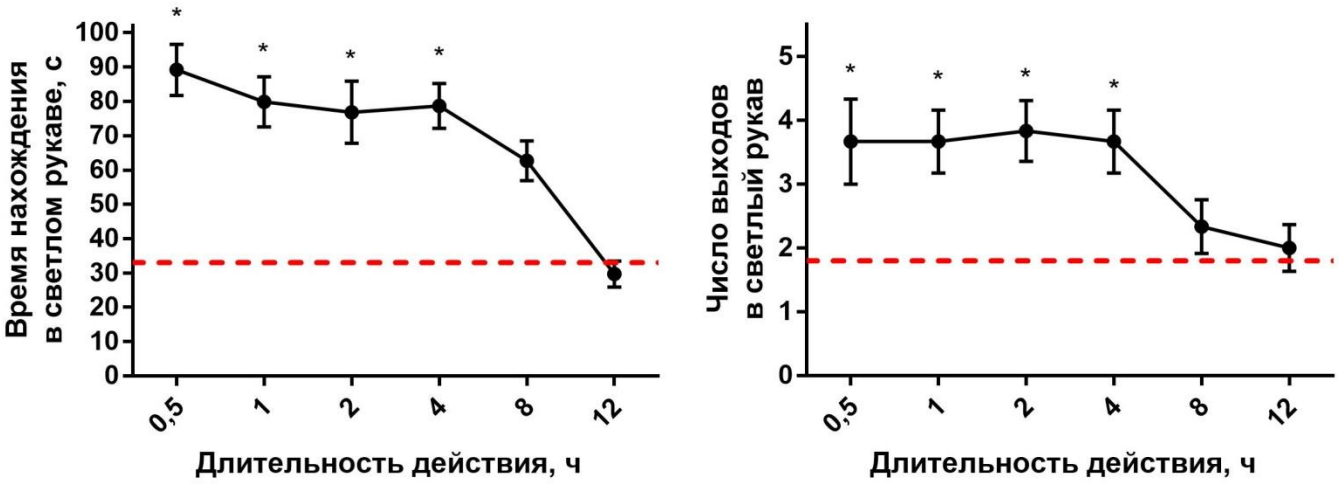
Рисунок 29 - Зависимость анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от выбранной дозы в диапазоне 0, 0175-70 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выглядываний; Б – Число свешиваний*

4.1.2. Длительность эффекта соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Для соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг было проведено исследование длительности анксиолитического действия в условиях теста

«Приподнятый крестообразный лабиринт». Во избежание эффекта габитуации для каждого временного промежутка использовались разные группы мышей.

В группе контроля животные выходили в светлые рукава ПКЛ в среднем 1,8±0,30 раза на время 33,7±5,98 с за период наблюдения. По показателям времени и числа выходов животных в открытые рукава установки ПКЛ под влиянием соединения ЗДМ-81 наблюдалось сохранение уровня противотревожного эффекта, зафиксированного через 30 минут после введения вещества, до 4 часов эксперимента, после чего снижалось на 8-ом часу и возвращалось к контрольным значениям через 12 часов после введения соединения. Через 30 минут после введения ЗДМ-81 животные в среднем на 63% больше времени проводили на открытых пространствах относительно контроля (Рисунок 30).



А **Б**

Рисунок 30 - Зависимость анксиолитического эффекта от времени введения для соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в промежутке времени от 0,5 до 12 ч в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки «Приподнятый крестообразный лабиринт»*

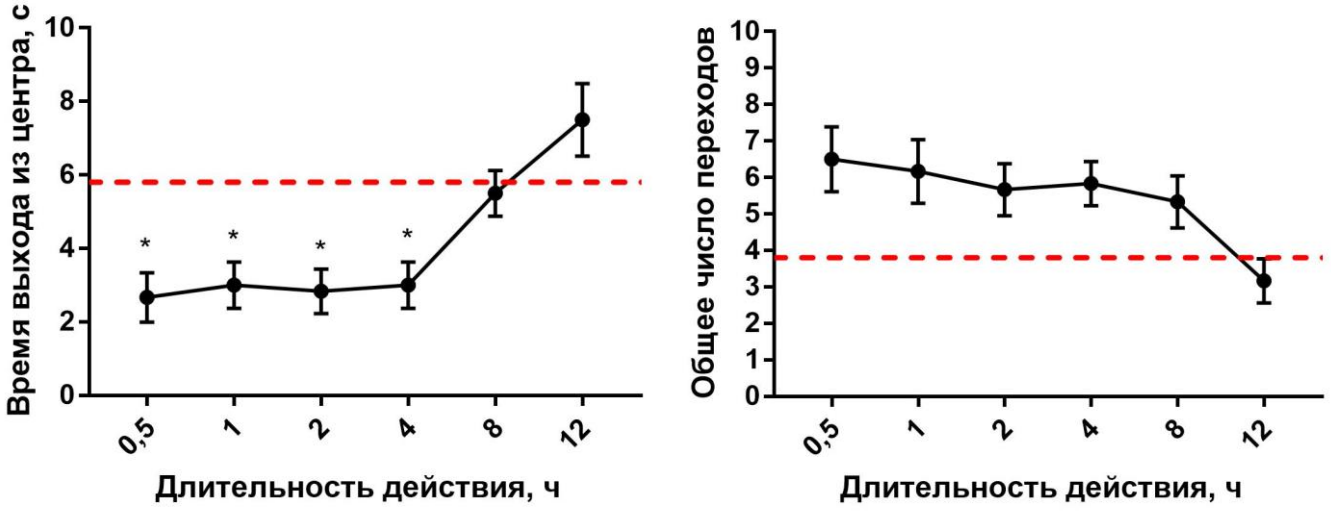
Реактивность, или время выхода мышей с центральной площадки ПКЛ, в группе контроля составила 5,8±0,74 с. Под влиянием ЗДМ-81 время реактивности снижалось на промежутке 0,5-4 ч приблизительно вдвое, что может

свидетельствовать о более быстром принятии животным первоначального решения и отсутствием заторможенности под действием экспериментального соединения. На 8-ом часу эксперимента время выхода мышей из центра установки сравнивалось с контрольными значениями и составляло 5,5±0,61 с. На 12 часу теста реактивность животных несколько падала по сравнению с контролем.

Общее число переходов животных в группе контроля составило 3,8±0,70. Параметр практически не менялся под действием вещества ЗДМ-81 от уровня 30 минут до 8 часов после введения, после чего снижалось до уровня контрольных значений у мышей в группе 12-ти часов. Повышенное число переходов в сравнении с контролем может характеризовать стимуляцию исследовательского рефлекса опытных грызунов под действием экспериментального соединения (Рисунок 31).

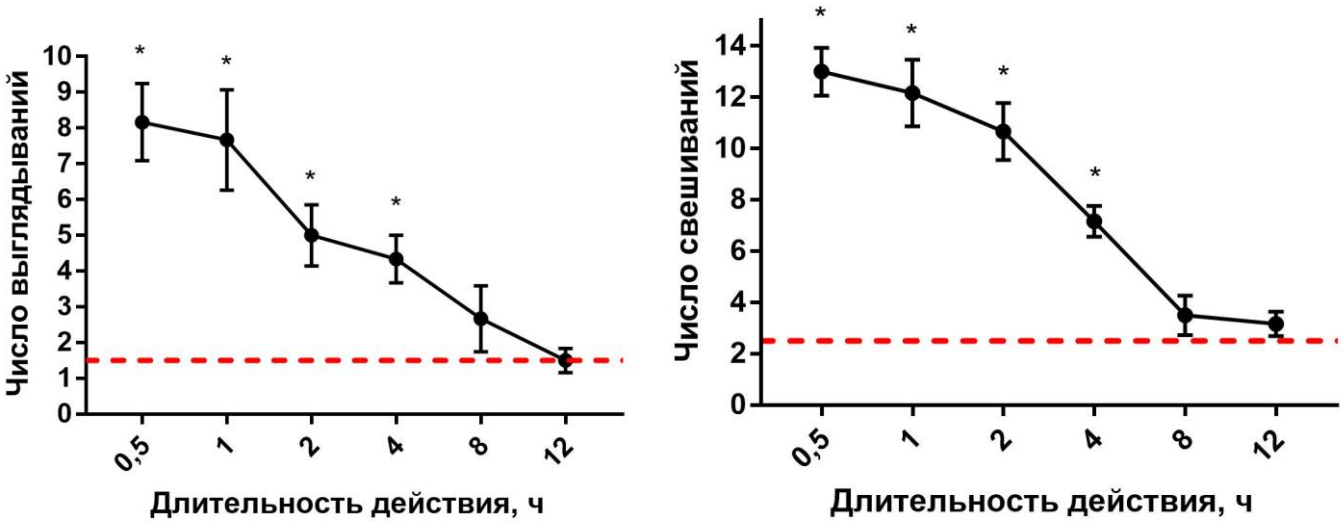
Число выглядываний в контрольной группе находилось на уровне 1,5±0,42. Наиболее выраженный рост числа выглядываний под действием соединения ЗДМ-81 наблюдался в промежутке 30 минут – 1 час после введения: 8,1±1,07 и 7,7±1,41, соответственно, что превышает контрольные значения в 5-6 раз. На 2-4 часу теста параметр заметно падал до 5,0±0,85 и 4,3±0,67, соответственно. К 12 часам теста показатель соответствовал контролю.

Число свешиваний в группе контроля составило в среднем 2,5±0,42. На отметке 30 минут – 1 час показатель рос в группе мышей, получавших субстанцию ЗДМ-81, в 5 раз относительно этого уровня – до 13,0±0,93 и 12,2±1,30, соответственно. Через 2 часа после введения соединения показатель превышал контроль уже в 4 раза – 10,7±1,11, а через 4 часа плавно убывал до 7,2±0,60. На 8-12 часах теста число свешиваний соответствовало контрольным значениям (Рисунок 32).



А **Б**

Рисунок 31 - Зависимость анксиолитического эффекта от времени введения для соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в промежутке времени от 0,5 до 12 ч в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Реактивность животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – Общее число переходов животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»*



А **Б**

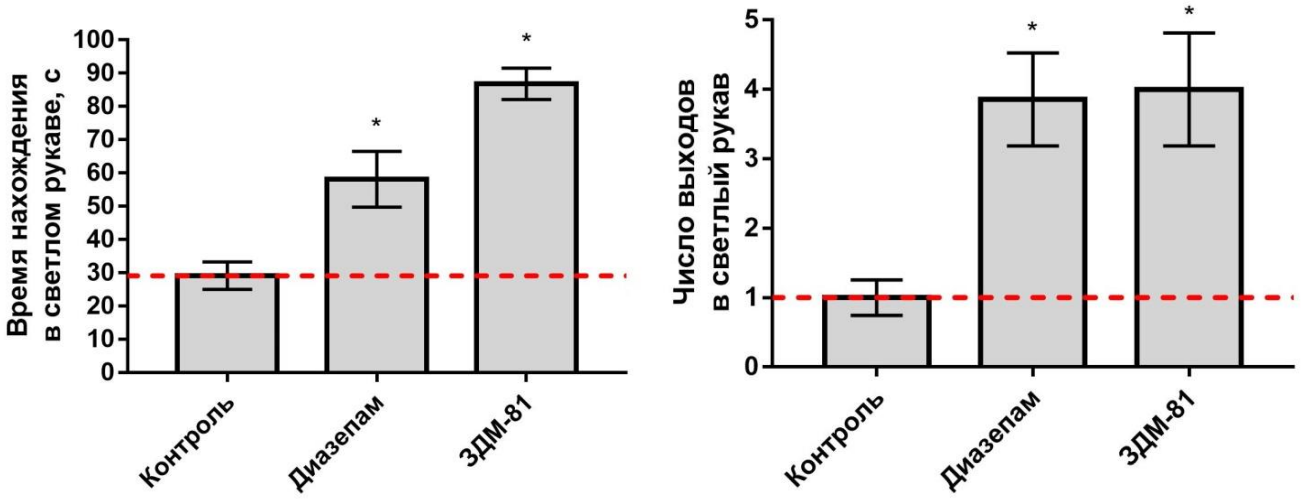
Рисунок 32 - Зависимость анксиолитического эффекта от времени введения для соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в промежутке времени от 0,5 до 12 ч в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с*

посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выглядываний; Б – Число свешиваний животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В результате проведенного исследования зависимости анксиолитического эффекта соединения ЗДМ-81 от времени введения выявлено, что наиболее выраженный анксиолитический эффект под влиянием субстанции наблюдался уже через 30 минут после введения мышам и оставался на том же уровне в течение 4-6 часов, после чего шел на спад. На отметке 12 часов после введения эффект соединения соответствовал контрольным значениям.

4.2. Анксиолитическая активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на крысах

Для подтверждения анксиолитической активности новых соединений необходимо испытание субстанции минимум на двух видах животных [Миронов и др., 2012]. С этой целью тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» был воспроизведен на нелинейных белых крысах-самцах. Время пребывания крыс в светлом рукаве установки ПКЛ в группе контроля составило 29,2±4,11 с, в группе препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг – 58,2±8,34 с. Проявленный в тесте анксиолитический эффект диазепама соответствует его фармакологической характеристике. Крысы под влиянием соединения ЗДМ-81 находились на открытых пространствах в среднем 86,8±4,72 с. Для группы соединения ЗДМ-81 показано статистически достоверное повышение указанного параметра в сравнении с контрольной группой. Число выходов животных в светлые рукава установки составило 1,0±0,25 в контрольной группе и 3,8±0,67 в группе диазепама. В группе соединения ЗДМ-81 число выходов крыс в открытые рукава ПКЛ составило 4,0±0,81. Для групп диазепама и соединения ЗДМ-81 отмечено значительное различие с контрольными значениями. Полученные данные свидетельствуют о развитии у экспериментальных животных выраженного противотревожного эффекта под действием изучаемого соединения (Рисунок 33).

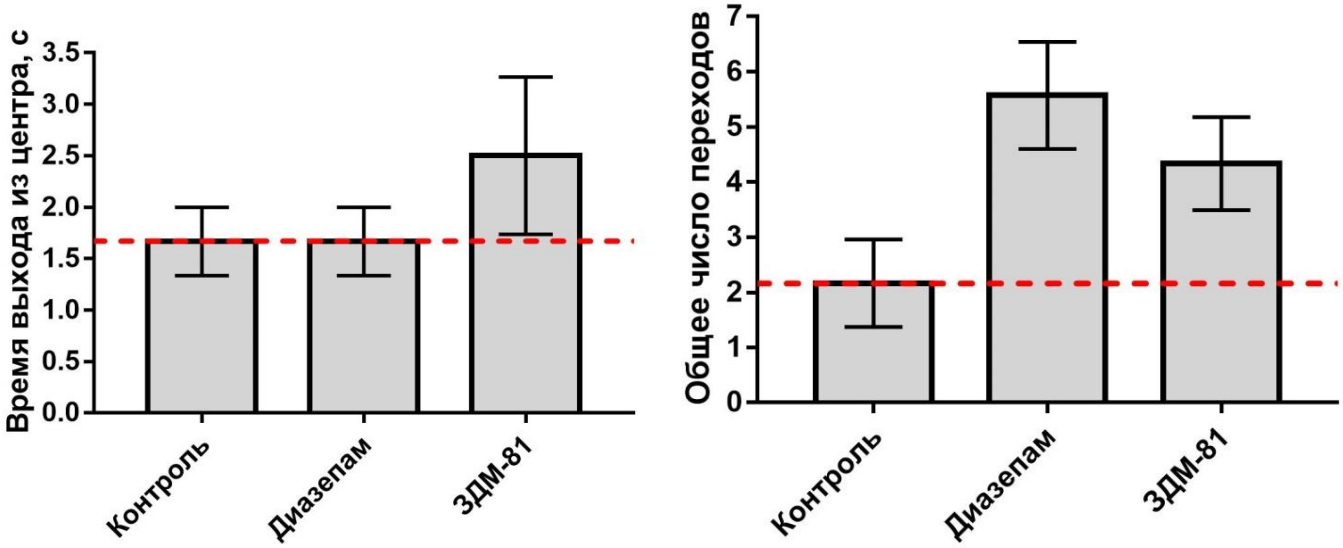


А **Б**

Рисунок 33 - Анксиолитическая активность соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», крысы, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки ПКЛ; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки ПКЛ*

Время выхода с центральной площадки установки ПКЛ, ассоциируемое с временем принятия животным первоначального решения о переходе в темный или светлый рукав, для диазепама находилось на уровне контрольных значений – 1,6±0,33 с. Под действием соединения ЗДМ-81 время реактивности было несколько повышено до 2,5±0,76 с, однако значимого различия с референсными группами зафиксировано не было, что может свидетельствовать об отсутствии заторможенности животных.

Общее число переходов животных между рукавами установки в группе контроля находилось на уровне 2,2±0,79. При введении крысам препарата сравнения диазепама показатель увеличивался до 5,5±0,97, а под влиянием соединения ЗДМ-81 - до 4,3±0,84. Не отмечено значимого различия между опытными группами и контрольной. Некоторое увеличение двигательной активности может являться следствием повышенного исследовательского интереса животных к неизученным пространствам, проявленным при анксиолитическом действии экспериментальных субстанций (Рисунок 34).

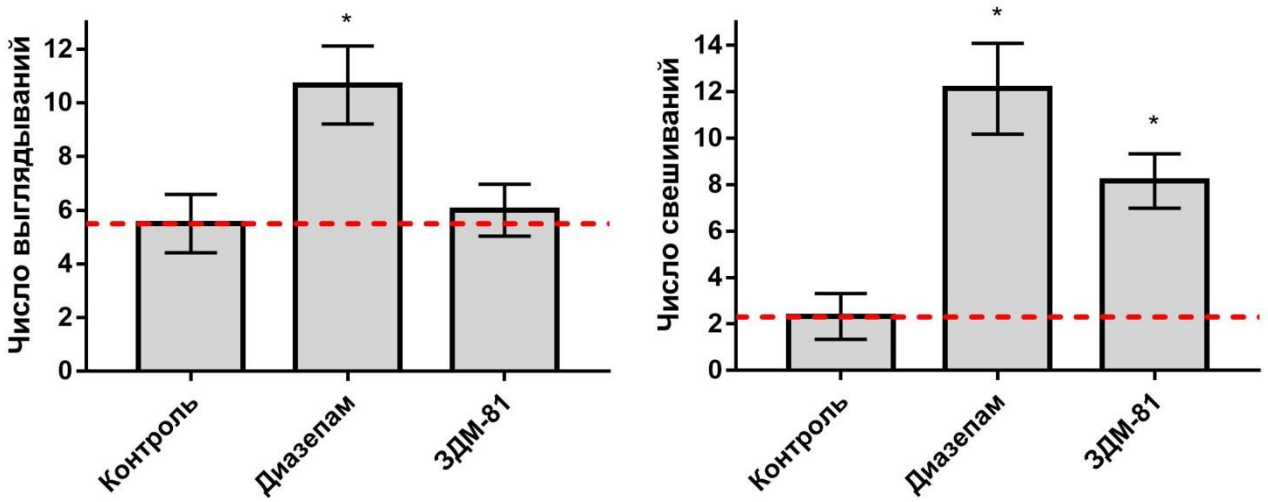


А **Б**

Рисунок 34 - Анксиолитическая активность соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», крысы, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Реактивность животных в тесте ПКЛ; Б – Общее число переходов животных в тесте ПКЛ*

Число выглядываний животных из темных рукавов установки ПКЛ в группе контроля составило 5,5±1,08. В группе диазепама число выглядываний значительно возросло и находилось на уровне 10,7±1,45. При введении крысам экспериментального соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг число выглядываний незначительно возрастало в сравнении с контрольными значениями и не достигало уровня препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг – 6,0±0,96.

Число свешиваний крыс со светлых рукавов установки ПКЛ в группе контроля составило 2,3±0,98, а в группе бензодиазепиновго анксиолитика диазепама – 12,1±1,95. Для соединения ЗДМ-81 изучаемый показатель находился на уровне 8,1±1,16. Для групп диазепама и соединения ЗДМ-81 показана достоверность различий данных с контрольными значениями. Общее повышение числа выглядываний и свешиваний под действием препарата сравнения в целом свидетельствует о снижении тревожности у животных указанной группы (Рисунок 35).

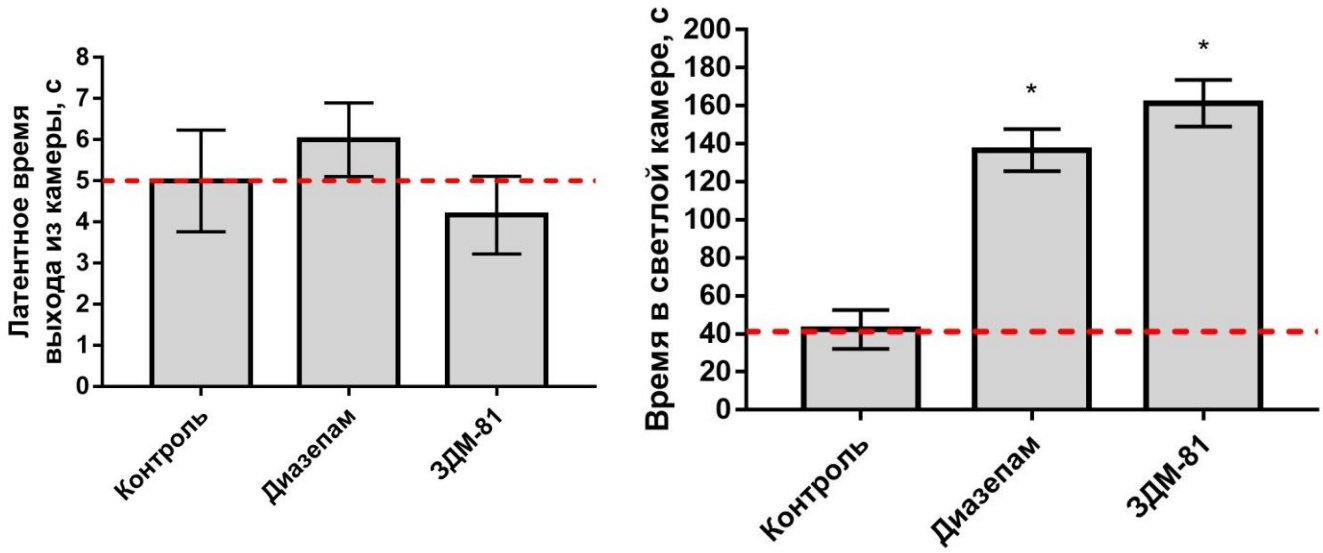


А **Б**

Рисунок 35 - Анксиолитическая активность соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», крысы, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание:* * - *отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выглядываний; Б – Число свешиваний животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»*

4.3. Атарактическая активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Темная/светлая камера»

Время первоначального принятия животным решения о переходе в другой отсек «Темной/светлой камеры» в контрольной группе составило 5,0±1,23 с, в группе диазепама - 6,0±0,89 с. Под влиянием ЗДМ-81 показатель составил 4,1±0,94 с, что свидетельствует об отсутствии заторможенности животных после введения им препарата сравнения или экспериментального соединения. Время пребывания в светлом отсеке ТСК, как основной показатель анксиолитической активности веществ в данном тесте, для диазепама зафиксирован на отметке 136,7±11,13 с, что втрое выше контрольных значений - 42,3±10,30 с. Для производного хиноксалина ЗДМ-81 время нахождения мышей в светлом отсеке установки составило 161,3±12,21 с в среднем, что даже несколько выше диазепама, но статистически незначительно (Рисунок 36).



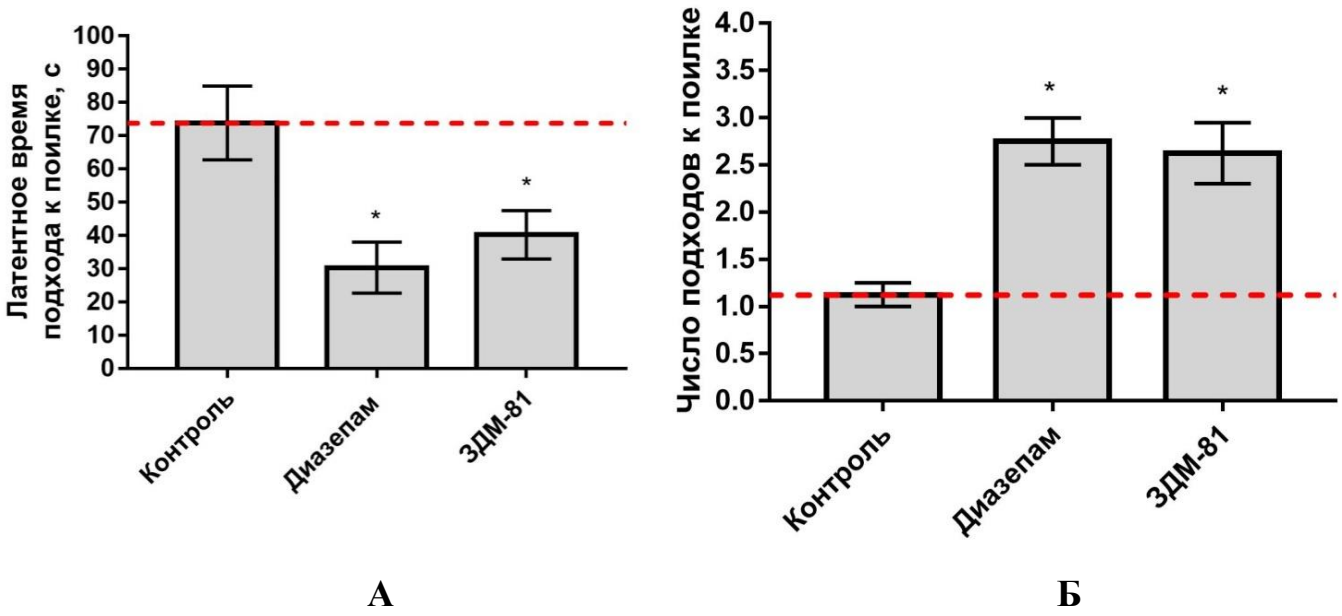
А **Б**

Рисунок 36 - Анксиолитический эффект соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Темная/светлая камера», в сравнении с диазепамом (1 мг/кг), мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Реактивность животных в тесте «Темная/светлая камера»; Б – Время, проведенное животными в светлой камере в тесте «Темная/светлая камера»*

4.4. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение крыс в тесте «Конфликтная ситуация по Vogel»

Основным анксиолитическим параметром теста «Конфликтная ситуация по Vogel» является число подходов животных к поилке после первого удара током – наказуемого взятия воды. В качестве дополнительного параметра было рассмотрено латентное время подхода крыс к поилке после первого удара током (с). Латентное время подхода в группе контроля составило 73,8±11,08 с, диазепама - 30,4±7,70 с, что в 2,5 раза ниже исходных значений и свидетельствует о высокой противотревожной активности препарата сравнения в данном тесте. Для ЗДМ-81 показатель находился на уровне 40,3±7,29 с, что также характеризуется статистически значимым по сравнению с контролем высоким анксиолитическим действием. Число подходов крыс к поилке в группе диазепама превышало контрольные показатели также в 2,5 раза - 2,8±0,25 против 1,1±0,12. В

группе соединения ЗДМ-81 уровень анксиолитического эффекта соответствовал уровню препарата сравнения - 2,6±0,32 (Рисунок 37).



А **Б**

Рисунок 37 - Анксиолитический эффект соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Конфликтная ситуация по Vogel», в сравнении с диазепамом (1 мг/кг), крысы, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p<0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Латентное время подхода животных к поилке в тесте «Конфликтная ситуация по Vogel»; Б – Число подходов животных к поилке в тесте «Конфликтная ситуация по Vogel»*

4.5. Противотревожная активность соединения ЗДМ-81 в тесте «Оценка тревожно-фобического состояния животных» на крысах

Основным показателем анксиолитической активности в условиях методики «Тревожно-фобическое состояние» на крысах является сумма баллов по всем девяти тестам, проводимым в ходе эксперимента. Диазепам в дозе 1 мг/кг проявил антифобическое действие, статистически значимо снизив уровень тревожности животных в среднем от 5,7±0,21 баллов в группе контроля до 2,6±0,45 баллов. Для экспериментального соединения ЗДМ-81 изучаемый параметр находился на уровне диазепама и составил 2,7±0,42 балла, что также значимо отличается от исходных значений и не уступает уровню препарата сравнения (Рисунок 38).

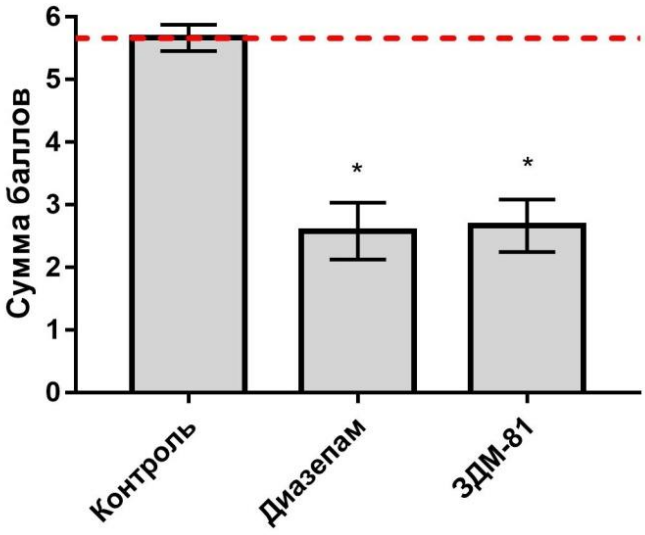


Рисунок 38 - Сумма баллов в тесте «Тревожно-фобическое состояние» соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в сравнении с диазепамом (1 мг/кг), крысы, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

Можно отметить, что по показателям пячения в «Открытом поле» - спонтанного и индуцированного при виде животным руки экспериментатора – а также спонтанной вокализации, затаивания и прижимания ушей, статистически значимых различий между группами диазепама и соединения ЗДМ-81 не было обнаружено. Это может свидетельствовать о наличии атарактического действия нового соединения, близкого по природе к препарату сравнения диазепаму.

4.6. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Открытое поле»

Для нового производного хиноксалина не отмечено значимого влияния на число пересеченных мышами квадрантов, отмеченных на дне «Открытого поля», как и для препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг.

Небольшое повышение уровня горизонтальной двигательной активности мышей может быть обусловлено возросшей общей активностью животных и их исследовательским интересом в отношении новых пространств. Для животных было характерно свободное передвижение в пределах «Открытого поля», мыши не стремились находиться на периферии, пересекали центральный квадрант

установки, что свидетельствует об отсутствии тревожного поведения животных под действием диазепама или соединения ЗДМ-81.

Вертикальная двигательная активность у животных, не подвергшихся воздействию препаратов, в группе контроля составила 4,8±0,94, в то время как под действием диазепама животные совершали вертикальные стойки в 2,5 раза чаще – до 13,8±1,30 раз. Для группы соединения ЗДМ-81 число вертикальных стоек составило 13,8±1,64, что соответствует уровню препарата сравнения (Рисунок 39).

По сравнению с диазепамом в дозе 1 мг/кг, соединение ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг характеризуется немного более выраженным анксиолитическим действием по параметру числа выходов мышей в центр освещенного «Открытого поля». В группе контроля параметр зафиксирован на отметке 1,6±0,42. В группе препарата сравнения животные совершали в среднем 5,6±0,88 выходов в центр, в то время как под влиянием ЗДМ-81 – 6,5±0,88. Таким образом, после введения мышам ЗДМ-81 животные в среднем выходили в центр установки в 4 раза чаще, чем в группе контроля ($p<0,05$).

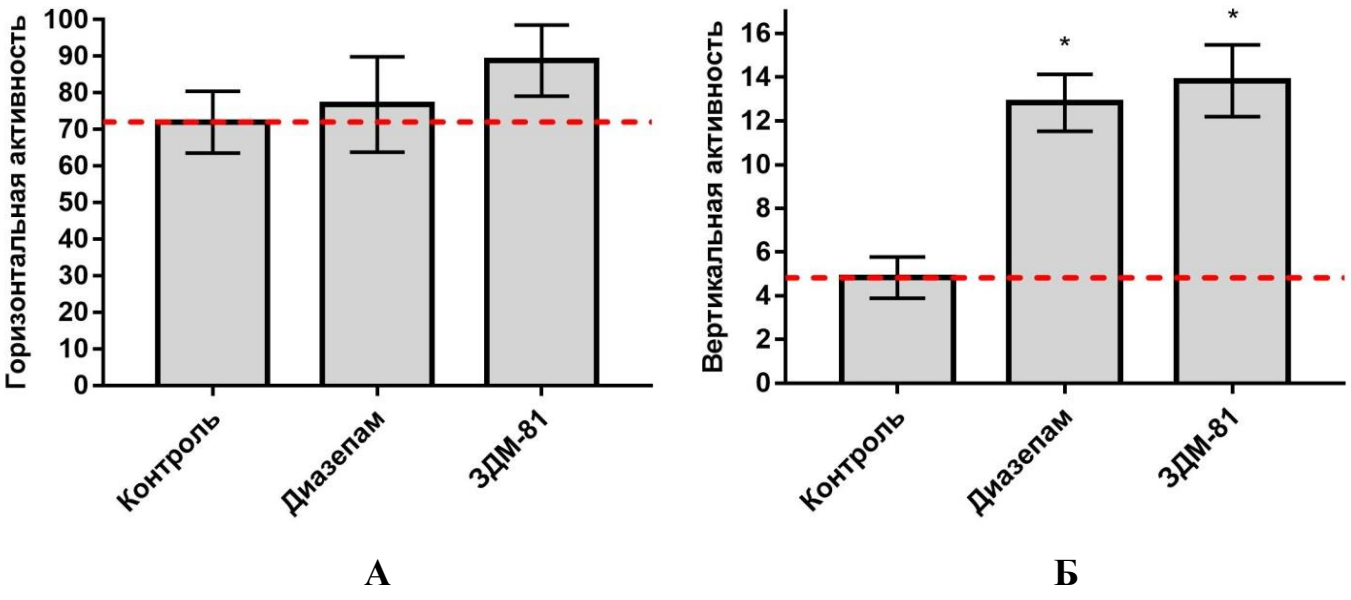
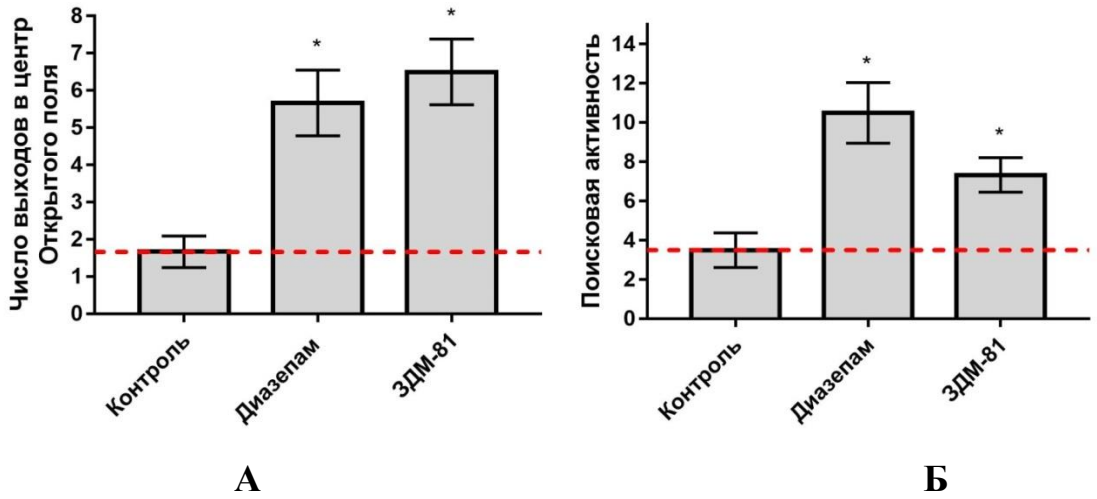


Рисунок 39 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг на поведение мышей в тесте «Открытое поле» в сравнении с диазепамом (1 мг/кг), внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с*

посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Горизонтальная активность (число квадрантов); Б – Вертикальная активность (число стоек)

Число обследованных отверстий в группе контроля соответствовало уровню 3,5±0,88 норок в среднем. По параметру исследовательской активности было обнаружено значимое различие между экспериментальными группами: для диазепама наблюдалось увеличение числа обследованных отверстий до 10,5±1,54, для ЗДМ-81 – до 7,3±0,88, что в 3 и в 2 раза превышает контрольные значения, соответственно (Рисунок 40).



А **Б**

Рисунок 40 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг на поведение мышей в тесте «Открытое поле» в сравнении с диазепамом (1 мг/кг), внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Число выходов животных в центр «Открытого поля»; Б – Поисковая активность (число обследованных норок на дне установки)*

4.7. Заключение

По результатам проведенного углубленного изучения анксиолитических свойств производного хиноксалина, соединения под шифром ЗДМ-81, было выявлено, что эффективной дозой анксиолитического эффекта вещества является 17,5 мг/кг. Действие субстанции достаточно отчетливо выражено уже через 30 минут после внутрижелудочного введения мышам и сохраняется на том же уровне в течение 4-6 часов. Через 12 часов после введения соединения время и число выходов животных в открытые рукава установки ПКЛ приближается к

контрольным значениям. Противотревожная активность ЗДМ-81 была проверена с применением тестов «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние» и конфликтной методики «Конфликтная ситуация по Vogel». Во всех указанных экспериментах анксиолитический эффект ЗДМ-81 не уступает препарату сравнения диазепаму в эффективной дозе 1 мг/кг. Для соединения ЗДМ-81 также отмечено отсутствие значимого влияния на профиль двигательной активности грызунов, а также стимуляция исследовательского рефлекса животных в тесте «Открытое поле».

ГЛАВА 5. НЕЙРОПСИХОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО ХИНОКСАЛИНА - СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81

В рамках изучения дополнительных нейротропных эффектов соединенияс анксиолитической активностью ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг были изучены его антифобические, антидепрессивные, анальгетические, противосудорожные свойства, а также оценена степень влияния на мышечный тонус животных. Для решения поставленной задачи были выбраны методики «Закапывания шариков», «Принудительного плавания по Porsolt», «Отдергивания хвоста», «Горячей пластины», «Максимального электрошока», «Коразоловых судорог», «Сетка», «Проволока» и «Ротарод».

5.1. Влияние соединения ЗДМ-81 на поведение мышей в тесте «Закапывание шариков»

Как известно, тест «Закапывания шариков» применяется для оценки антикомпульсивного действия соединений. Методика основана на компульсивном закапывании животными блестящих шариков в опилки в течение 30 минут тестирования. В группе контроля число закопанных как минимум на две трети шариков составило в среднем 8,8±1,16 штук, в то время как в группе диазепама в дозе 1 мг/кг – 2,2±0,30, что в 4 раза меньше, чем в контрольной группе. В группе экспериментального соединения ЗДМ-81 показатель составил 2,6±0,33 штуки, что статистически достоверно отличается от значений контрольной группы, как и в группе препарата сравнения диазепама. Таким образом, можно сделать вывод о наличии у соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг антикомпульсивных свойств. Полученные данные представляли интерес для изучения антикомпульсивного эффекта соединения ЗДМ-81 в более широком диапазоне доз. С этой целью тест был повторен для доз соединения ЗДМ-81, вдвое превышающих и вдвое меньших, чем эффективная для проявления анксиолитической активности – 17,5 мг/кг. В дозе, вдвое меньшей, чем эффективная, - 8,75 мг/кг, мыши в среднем закапывали 4,3±0,55 шариков в условиях теста, что значимо отличается от контроля, однако не достигает значений группы 17,5 мг/кг. При введении животным соединения ЗДМ-81 в дозе 35 мг/кг, вдвое превышающей эффективную 17,5 мг/кг, число

закопанных шариков составило 0,5±0,22. В то же время, следует принять во внимание седативный эффект соединения ЗДМ-81 в указанной дозе. В связи с этим понижение показателя ниже группы препарата сравнения диазепама является следствием сопутствующих эффектов соединения ЗДМ-81 в дозе 35 мг/кг, отличных от антикомпульсивного (Рисунок 41).

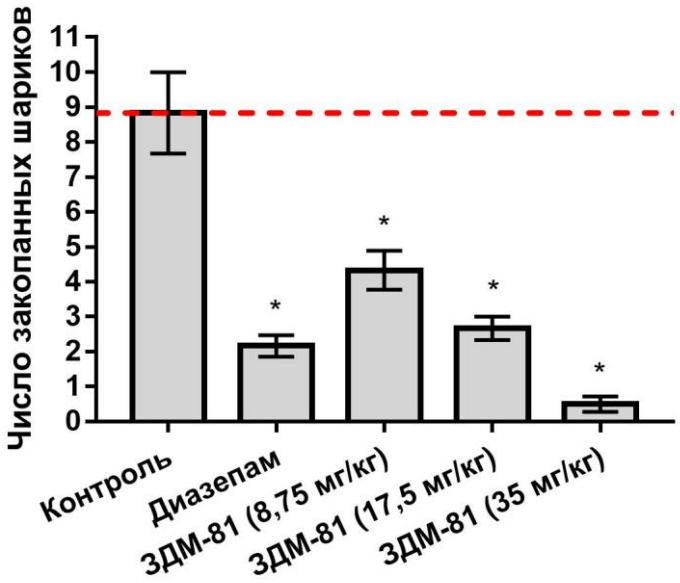


Рисунок 41 - Антикомпульсивное действие ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, а также в дозах 8,75 мг/кг и 35 мг/кг, в условиях теста «Закапывание шариков», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p<0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

5.2. Антидепрессивная активность соединения ЗДМ-81

Для оценки антидепрессивного эффекта соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе для проявления анксиолитического эффекта 17,5 мг/кг был изучен искомый эффект на моделях поиска новых средств с антидепрессантным эффектом - «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание по Porsolt». В качестве препаратов сравнения выступили классические трициклические антидепрессанты амитриптилин и имипрамин в дозах 10 и 8 мг/кг, соответственно.

5.2.1. Антидепрессивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Подвешивание за хвост»

Для оценки результатов данного теста было использовано общее время замираний («фризинга») животных за 6 минут тестирования. В группе контроля время замираний составило в среднем 154,2±12,11 с, в группе амитриптилина (10 мг/кг) – 35,0±9,83 с, имипрамина (8 мг/кг) – 44,2±6,36 с. Для групп препаратов сравнения отмечено статистически значимое снижение времени замираний животных, выраженное в снижении показателя относительно контроля в 4,4 и 3,5 раза, соответственно. В группе соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг параметр составил в среднем 92,8±11,85 с, что не характеризуется статистически значимыми различиями с контрольной группой. Стоит отметить, что в результате скрининговых исследований антидепрессивной активности соединения ЗДМ-81 в дозе 18 мг/кг, эквимолярной амитриптилину в дозе 10 мг/кг, в условиях теста «Подвешивание за хвост», время замираний мышей в указанной группе составило в среднем 102,0±10,88 с, что также можно характеризовать как отсутствие искомого эффекта (Рисунок 42).

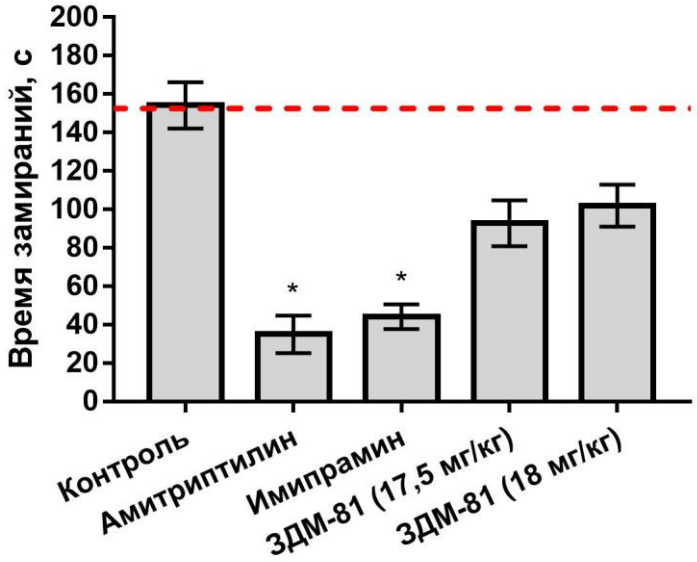


Рисунок 42 - Антидепрессивное действие ЗДМ-81 в дозах 17,5 и 18 мг/кг в сравнении с амитриптилином (10 мг/кг) и имипрамином (8 мг/кг) в условиях теста «Подвешивание за хвост», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM).
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю*

(p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений

5.2.2. Антидепрессивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Принудительное плавание по Porsolt»

Основным параметром оценки антидепрессивного действия соединения в данной методике является время замираний или «фризинга» животных на 4 последних минутах тестирования из общего времени эксперимента - 6 минут. Время фризинга в контрольной группе мышей составило 117,5±14,60 с, в группах классических трициклических антидепрессантов амитриптилина (10 мг/кг) и имипрамина (8 мг/кг) – 45,3±6,20 и 33,6±2,72 с, соответственно. Для групп препаратов сравнения отмечено статистически значимое снижение продолжительности замираний животных, выраженное в снижении времени «фризинга» относительно контроля в 2,6 и 3,5 раза, соответственно. Для исследуемого соединения ЗДМ-81 показатель составил 63,3±10,15 с, что несколько ниже контрольных значений, однако для группы вещества ЗДМ-81 не отмечено значимых различий с контролем, а уровень его эффекта не достигает уровня препаратов сравнения (Рисунок 43).

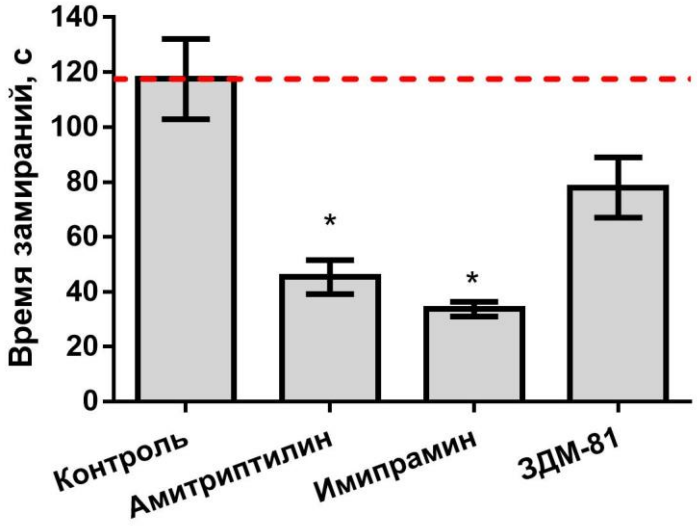


Рисунок 43 - Антидепрессивное действие ЗДМ-81 (17,5 мг/кг) в сравнении с амитриптилином (10 мг/кг) и имипрамином (8 мг/кг) в условиях теста «Принудительное плавание по Porsolt», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

5.2.3. Заключение

По результатам проведенного исследования отмечен антикомпульсивный потенциал экспериментального соединения ЗДМ-81 в тесте «Закапывания шариков», не уступающий диазепаму в дозе 1 мг/кг. Не зафиксировано антидепрессивных свойств соединения ЗДМ-81 в тесте «Принудительного плавания по Porsolt» и «Подвешивания за хвост» по сравнению с классическими трициклическими антидепрессантами амитриптилином и имипрамином в дозах 10 и 8 мг/кг, соответственно.

5.3. Анальгетическая активность соединения ЗДМ-81

Для оценки обезболивающего потенциала соединения ЗДМ-81 были выбраны классические методики поиска новых соединений с анальгетическими свойствами – тесты «Отдергивания хвоста» и «Горячей пластины». В качестве препарата сравнения выступил опиоидный анальгетик буторфанол в дозе 1 мг/кг. Экспериментальные соединения изучены при внутрибрюшинном введении, согласно фармакокинетике буторфанола, и за 60 минут до проведения тестирования.

5.3.1 Анальгетические свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Отдергивания хвоста»

В тесте «Отдергивания хвоста» латентное время реакции в группе контроля составило 3,6±0,29 с, в группе буторфанола в дозе 1 мг/кг – 5,2±0,16 с, что выше контрольных значений в 1,4 раза. Для группы вещества ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг мыши в среднем отдергивали хвост за 4,7±0,62 с. Для препарата сравнения буторфанола показано значимое различие с контролем, для соединения ЗДМ-81 в данном тесте анальгетических свойств отмечено не было, а уровень его эффекта соответствует контрольным значениям. Анальгетические свойства изучаемого соединения в условиях данного теста были проверены в более широком диапазоне доз: в дозе 8,75 мг/кг время отдергивания хвоста составило 3,8±0,31 с, что соответствует контрольным параметрам. В дозе 35 мг/кг показатель составил 4,1±0,27 с, что несколько выше контрольных значений, однако статистически незначимо (Рисунок 44).

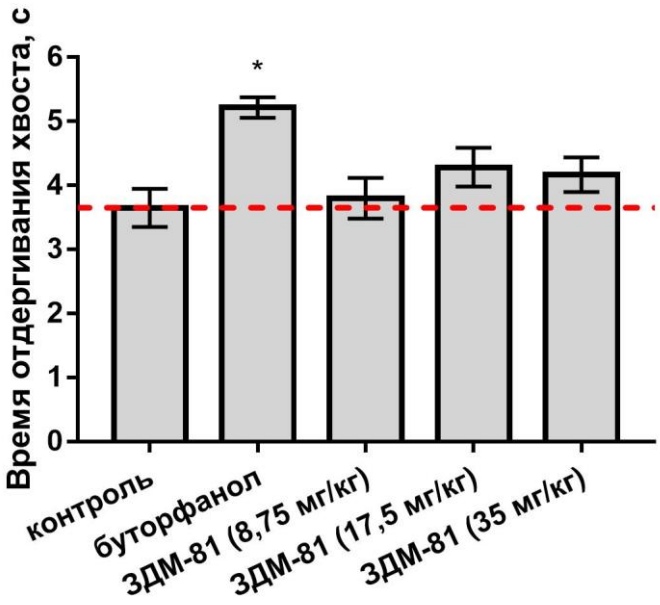


Рисунок 44 - Анальгетическое действие соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в сравнении с буторфанолом (1 мг/кг) в условиях теста «Отдергивание хвоста», мыши, внутрибрюшинное введение (M±SEM). *Примечание:* * *- отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

5.3.2 Анальгетические свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Горячая пластина»

Среднее латентное время полизывания задней лапы в группе контроля составило 6,6±0,46 с, в то время как в группе буторфанола в дозе 1 мг/кг - 20,2±0,58 с, что втрое выше контрольных значений. В группе соединения ЗДМ-81 показатель составил 10,5±0,99 с, что не достигает уровня препарата сравнения буторфанола, однако достоверно отличается от контроля. Для субстанции ЗДМ-81 отмечен умеренный супраспинальный анальгетический эффект в тесте «Горячая пластина». В более широком диапазоне доз эффект соединения ЗДМ-81 в меньшей дозе 8,75 мг/кг в условиях проведенного теста составил 8,1±0,79 с, что приближается к контрольному уровню. В дозе 35 мг/кг, превышающей вдвое эффективную дозу для проявления анксиолитической активности 17,5 мг/кг, уровень эффекта составил 9,3±0,95. Статистически значимого различия с контролем для этих экспериментальных групп не было обнаружено (Рисунок 45).

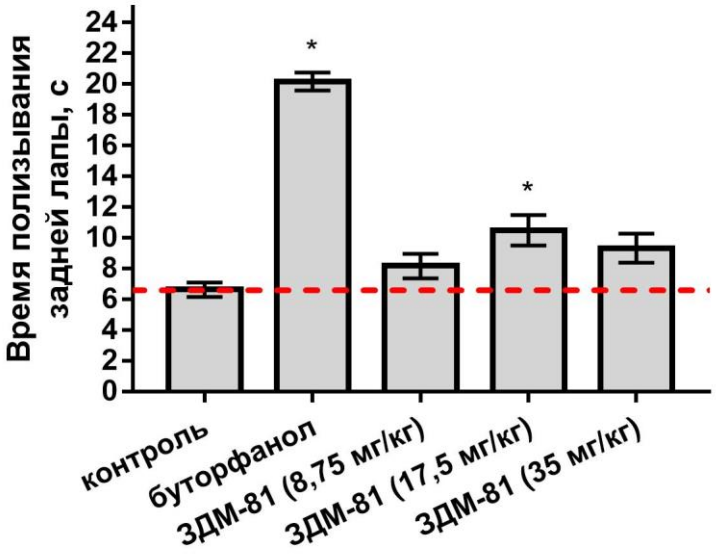


Рисунок 45 - Анальгетическое действие соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в сравнении с буторфанолом (1 мг/кг) в условиях теста «Горячая пластина», мыши, внутрибрюшинное введение (M±SEM). *Примечание:* * - *отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

5.3.3. Заключение

При изучении анальгетических свойств соединения ЗДМ-81 показано, что для него характерны супраспинальные механизмы антиноцицептивного эффекта в тесте «Горячая пластина» в сравнении с буторфанолом в дозе 1 мг/кг, в то время как в тесте «Отдергивания хвоста» уровень эффекта ЗДМ-81 соответствовал контрольным значениям. Возможно, указанный эффект связан не с анальгетическими, а с анксиолитическими свойствами вещества.

5.4. Противосудорожная активность соединения ЗДМ-81

Антиконвульсивные свойства нового производного хиноксалина соединения ЗДМ-81 были оценены с применением различных методик. Тест «Максимального электрошока» является моделью первично-генерализованной эпилепсии, моделирующей «большие» судорожные припадки. Наибольшую активность в данном тесте проявляют соединения, модулирующие или блокирующие потенциал-зависимые натриевые каналы. Методика «Коразоловых судорог» основана на ГАМК-ергическом воздействии на ЦНС новых соединения и известных препаратов, моделирующем «малые припадки». В качестве

препаратов сравнения выступили вальпроевая кислота в дозе 240 мг/кг и диазепам в дозе 2 мг/кг.

5.4.1. Антиконвульсивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Максимальный электрошок»

Число животных, выживших после корнеальной электростимуляции, в группе контроля составило 1 из 6 особей в группе. Препарат сравнения вальпроевая кислота в дозе 240 мг/кг повысил выживаемость до 5 животных из 6 особей в группе. Аналогичные результаты были получены для экспериментального соединения ЗДМ-81: число незащищенных животных под действием соединения ЗДМ-81 составило 1 из 6 особей в группе. Таким образом, производное хиноксалина ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в тесте «Максимального электрошока» на мышах проявляет антиконвульсивный эффект на уровне препарата сравнения вальпроевой кислоты в дозе 240 мг/кг (Таблица 5).

Таблица 5 - Противосудорожная активность соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в тесте «Максимальный электрошок» в сравнении с вальпроевой кислотой в дозе 240 мг/кг, M±SEM, мыши**,** внутрибрюшинное введение.
Примечание: - литературные данные [Жмуренко и др., 2018]*

	Летальность, %
Контроль	83,3 (5/6)
Вальпроевая кислота (240 мг/кг)*	16,6 (1/6)
ЗДМ-81 (17,5 мг/кг)	16,6 (1/6)

5.4.2. Антиконвульсивные свойства соединения ЗДМ-81 в тесте «Коразоловые судороги»

За время тестирования в группе препарата сравнения диазепама в дозе 2 мг/кг судорожных припадков мышей не было зафиксировано. Летальность животных в группе диазепама составила 0%. Это может быть объяснено прямым ГАМК-ергическим действием известного производного бензодиазепина – диазепама. В группе контроля латентное время возникновения судорожного приступа составило в среднем 74,5±14,22 с, в группе соединения ЗДМ-81 показатель был несколько увеличен в пределах статистической погрешности.

Летальность мышей в группах контроля и ЗДМ-81 составила 83,3%, что позволяет сделать вывод об отсутствии выраженного противосудорожного действия соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в тесте «Коразоловые судороги» на мышах (Таблица 6).

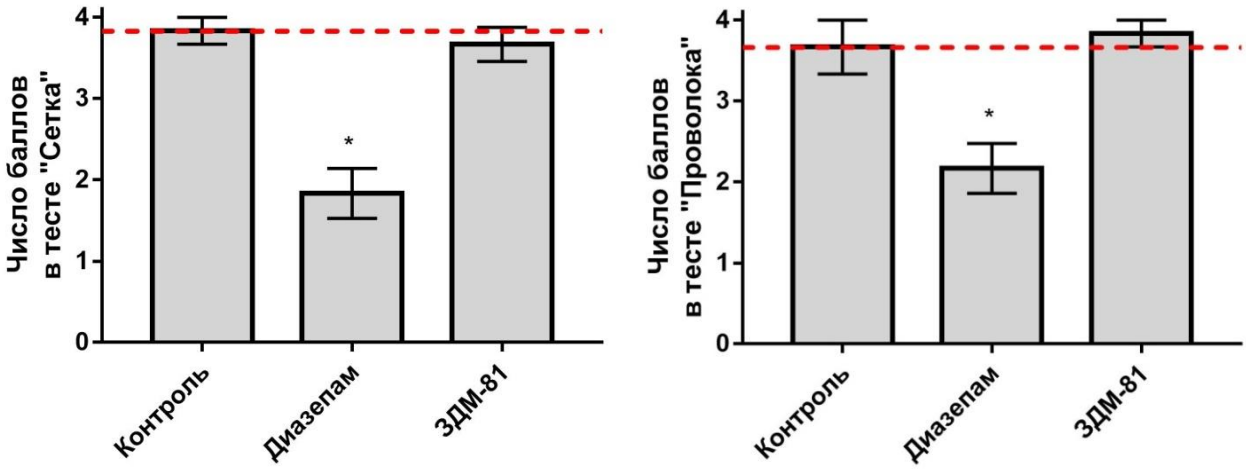
Таблица 6 - Противосудорожная активность соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг) в тесте «Коразоловые судороги» в сравнении с диазепамом (2 мг/кг), M±SEM, мыши**,** внутрибрюшинное введение.

	Латентное время возникновения судорог, с	Летальность, %
Контроль	74,5±14,22	83,3 (5/6)
Диазепам (2 мг/кг)	-	0
ЗДМ-81 (17,5 мг/кг)	90,0±13,42	83,3 (5/6)

5.5. Исследование миорелаксирующих свойств соединения ЗДМ-81

Число баллов в тесте «Сетка» в группе контроля составило 3,8±0,16, для диазепама в дозе 1 мг/кг – 1,8±0,30. Показано статистически достоверное снижение мышечного тонуса животных от группы контроля к диазепаму, что характерно для производных бензодиазепина. Число баллов для группы соединения ЗДМ-81 составило 3,6±0,21, что находится на уровне контрольных значений.

В тесте «Проволока» число баллов составило 3,6±0,33 для контроля и 2,1±0,30 для диазепама. Сохраняются миорелаксирующие свойства препарата сравнения, показанные в первом тесте. Для экспериментального соединения параметр был на уровне 3,8±0,33, что соответствует контрольным значениям. Не отмечено влияния производного хиноксалина ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг на мышечный тонус грызунов в условиях тестов «Сетка» и «Проволока» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг (Рисунок 46).



А **Б**

Рисунок 46 - Миорелаксирующее действие соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в сравнении с диазепамом (1 мг/кг) в условиях тестов «Сетка» (А) и «Проволока» (Б), мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

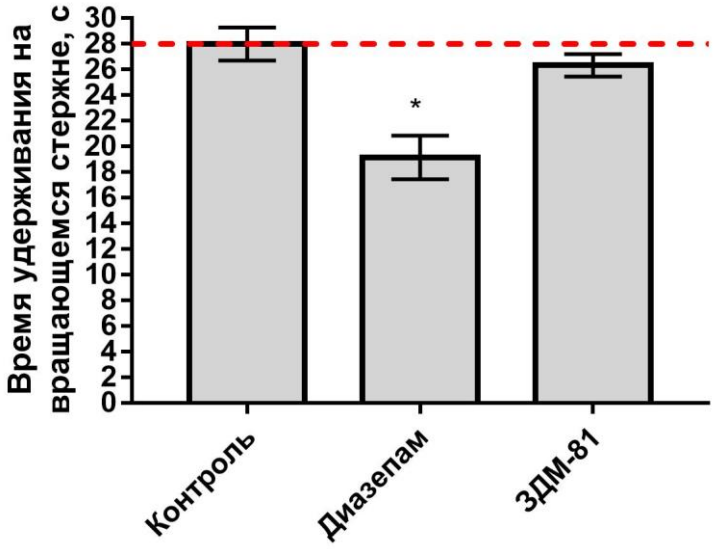


Рисунок 47 - Миорелаксирующее действие соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в сравнении с диазепамом (1 мг/кг) в условиях теста «Ротарод», мыши, внутрижелудочное введение (M±SEM). *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

В тесте «Ротарод» время удерживания животных на вращающемся стержне в группе контроля составило 28,0±1,29 с. Для диазепама в дозе 1 мг/кг отмечен мышечно-расслабляющий эффект: статистически значимое различие между группой препарата сравнения (19,2±1,70 с) и контроля. В группе соединения

ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг показатель составил 26,3±0,88 с, что не достигает уровня препарата сравнения и соответствует контрольным значениям. Для ЗДМ-81 не отмечено миорелаксирующих свойств по времени удерживания животных на вращающемся стержне в тесте «Ротарод» (Рисунок 47).

5.6. Заключение

Было отмечено противосудорожное действие соединения ЗДМ-81 в тесте «Максимальный электрошок» в сравнении с контролем, выражающееся в снижении летальности животных после получения электростимуляции. Не отмечено антиконвульсивного эффекта для соединения ЗДМ-81 в тесте «Коразоловые судороги» в сравнении с диазепамом в дозе 2 мг/кг. Не зафиксировано влияния соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус мышей в тестах «Сетка», «Проволока» и «Ротарод» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, что позволяет сделать вывод об отсутствии миорелаксирующего эффекта исследуемого соединения.

ГЛАВА 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 С ОСНОВНЫМИ АГОНИСТАМИ И АНТАГОНИСТАМИ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ

6.1. Взаимодействие соединения ЗДМ-81 с лигандами нейромедиаторных систем *in vivo*

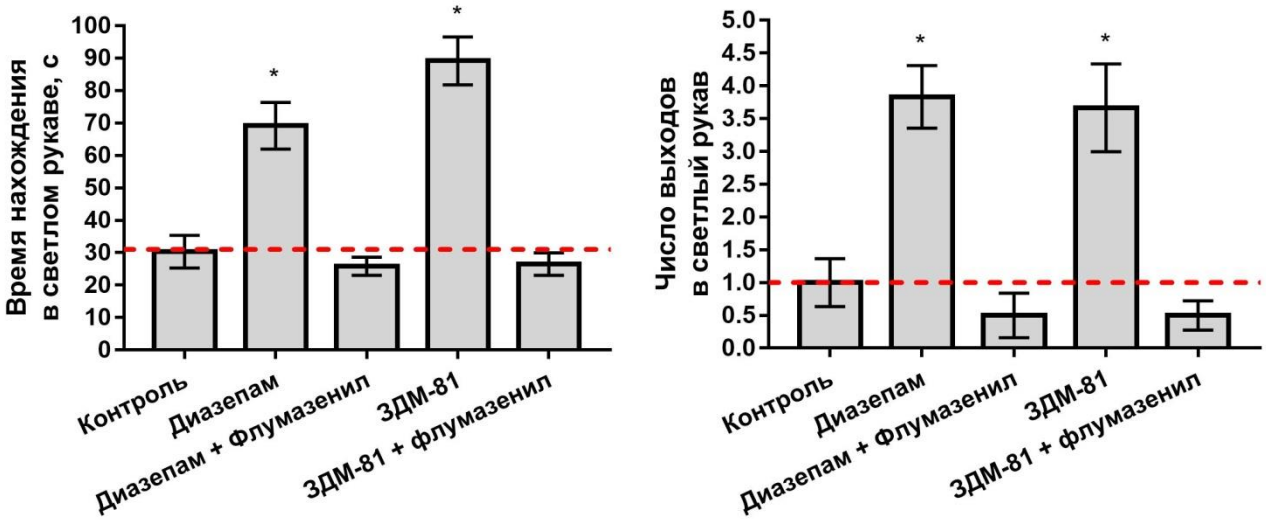
Были изучены взаимодействия соединения ЗДМ-81 с некоторыми нейромедиаторными системами ЦНС с применением методик *in vivo*, позволяющих оценить интеракцию соединения с холинергической (тест взаимодействия с никотином и влияние на ареколиновый тремор), дофаминергической (влияние на галоперидоловую каталепсию и апоморфиновую стереотипию), адренергической (влияние на клофелиновую и резерпиновую гипотермию), ГАМК-ергической (тест взаимодействия с флумазенилом и влияние на судорожные эффекты пикротоксина), серотонинергической системами (5-гидрокситриптофановый гиперкинез), а также изучение возможной МАО-ингибирующей активности соединения (тест взаимодействия с L-ДОФА).

6.1.1. Влияние флумазенила на эффекты соединения ЗДМ-81 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Время пребывания мышей в светлом рукаве ПКЛ в группе контроля составило 30,3±5,01 с, в группе диазепама в дозе 1 мг/кг – 69,2±7,20 с. Под действием флумазенила (1 мг/кг, в/б) эффекты диазепама были снижены до уровня контрольных значений – 25,8±2,76 с. В группе экспериментального соединения ЗДМ-81 наблюдались аналогичные закономерности: под влиянием флумазенила среднее время пребывания животных на открытых пространствах составило 26,5±3,42 с, в то время как исходное значение для экспериментального соединения находилось на уровне 89,2±7,41 с. Для групп диазепама и субстанции ЗДМ-81 показана достоверность различий с группой контроля, в то время как под действием флумазенила эффекты вещества ЗДМ-81 и диазепама соответствовали уровню активности группы контроля.

По числу выходов животных в светлые рукава лабиринта выявлено, что в контрольной группе – 1,0±0,36 – показатель был гораздо ниже, чем в группе

диазепама – 3,8±0,47. В группе вещества ЗДМ-81, аналогично диазепаму, показатель составил 3,6±0,66. Под действием флумазенила блокировались как эффекты диазепама – до 0,5±0,34, таки соединения ЗДМ-81 – 0,5±0,22. Полученные данные позволяют сделать вывод о некотором ГАМК-ергическом влиянии изучаемого экспериментального соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в сравнении с бензодиазепиновым анксиолитиком диазепамом в дозе 1 мг/кг (Рисунок 48).



А **Б**

Рисунок 48 - Влияние флумазенила в дозе 1 мг/кг, внутрибрюшинное введение, на проявление анксиолитической активности диазепама в дозе 1 мг/кг и соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт», мыши, M±SEM.
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к контролю ($p<0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна), пунктиром помечен уровень контрольных значений. А – Время пребывания животных в открытых рукавах установки ПКЛ; Б – Число выходов животных в открытые рукава установки ПКЛ*

6.1.2. Действие соединения ЗДМ-81 на 5-гидрокситриптофановый гиперкинез

В группе мышей, получавших 5-гидрокситриптофан внутрибрюшинно в дозе 300 мг/кг, число встряхиваний головой составило в среднем 9,7±1,08 на 10-й минуте наблюдения. Через 20 минут после введения 5-ГТФ показатель оставался на том же уровне - 9,2±0,74, а к 30-й минуте снизился до 6,2±1,35. Еще через 10 минут, на 40 минуте эксперимента число встряхиваний головой составило 1,6±0,33, а к 50-60 минуте теста - 0,3±0,21. Таким образом, 5-HT_{2A}-активирующее действие 5-ГТФ наблюдалось на наиболее высоком уровне до 20 минуты теста, после чего уменьшалось в 1,5 раза на 30-й минуте и плавно убывало на протяжении оставшегося времени тестирования. Под действием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг показатель был на более высоком уровне, чем в исходной группе: на 10-й минуте теста число встряхиваний головой составило 13,7±0,95, на 20-й - 13,7±1,05, а на 30-й - 12,5±2,21, что свидетельствует о потенцировании эффекта агониста серотониновых рецепторов 5-ГТФ под влиянием экспериментального соединения. К 40 минуте тестирования показатель наблюдался на уровне 10,0± 0,57, что гораздо больше, чем в референсной группе 5-ГТФ - 1,6±0,33. К концу наблюдения, на 50-60 минуте, параметр составил 5,6±0,88 - 5,6±0,66, что, в сравнении с исходными значениями, позволяет предположить пролонгирование присущих 5-ГТФ эффектов в условиях данного теста. По результатам проведенного исследования можно предположить потенцирование эффектов 5-ГТФ в дозе 300 мг/кг под действием соединения с анксиолитической активностью ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг на протяжении всего периода наблюдения (60 минут), а также пролонгирование действия 5-НТ2А-агониста 5-ГТФ на временном промежутке 40-60 минут наблюдения в тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез». Сводные данные о проведенном эксперименте приведены на Рисунке 49.

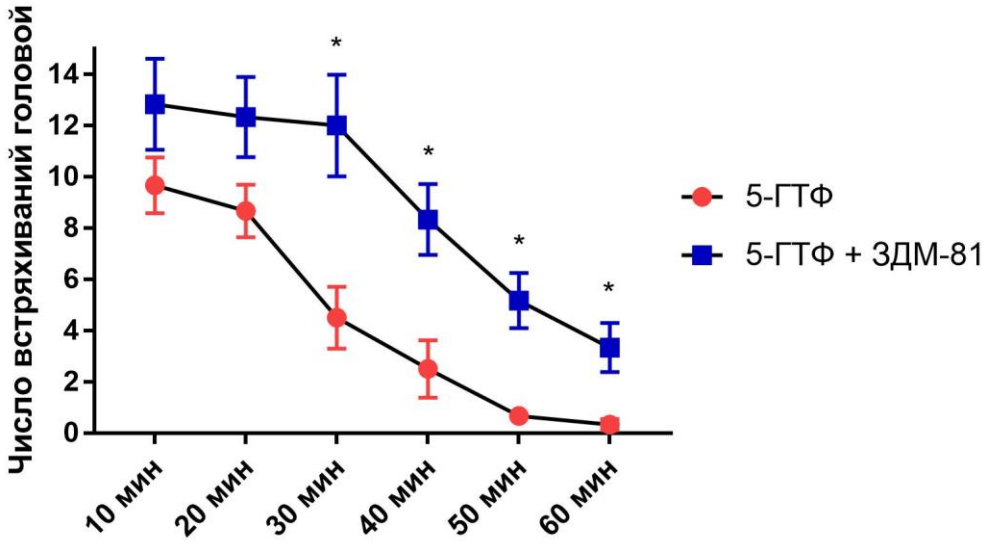


Рисунок 49 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на выраженность гиперкинезии, вызванной 5-гидрокситриптофаном (5-ГТФ) в дозе 300 мг/кг, внутрибрюшинное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе 5-ГТФ (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), пунктиром помечен уровень контрольных значений*

6.1.3. Каталептогенные свойства галоперидола при введении соединения ЗДМ-81

Галоперидол является типичным антипсихотическим препаратом, механизм действия которого связан с блокированием D_2-дофаминергических рецепторов ЦНС. Под его влиянием выраженность стереотипии крыс через 15 минут после введения галоперидола в дозе 3 мг/кг соответствовала 2,6±0,21 баллам, в то время как в группе крыс, которым вводили дополнительно субстанцию ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг, показатель составил 2,3±0,21 балла. Через 30 минут теста уровень эффекта галоперидола не изменился, а в группе соединения ЗДМ-81 стал равен 2,5±0,22 баллам. Каталепсия под влиянием галоперидола стала выраженнее к 45-й минуте эксперимента – 2,8±0,16 балла, в параллельной группе, получавшей экспериментальное соединение ЗДМ-81 в данной временной точке величина эффекта была равна 2,2±0,30 балла. Через час тестирования в группе галоперидола был зарегистрирован максимальный балл по расчетной шкале – 3,0±0,01 балл, в группе соединения ЗДМ-81 уровень каталепсии упал до 2,2±0,30 баллов, что достоверно отличается от референсной группы. Через 2 часа после

введения крысам соединений, уровень эффекта галоперидола был вдвое выше, чем вещества под шифром ЗДМ-81: 2,6±0,21 балла против 1,33±0,33 в опытной группе. По результатам проведенного тестирования было отмечено, что соединение ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг характеризуется антагонистическим взаимодействием с галоперидолом в дозе 3 мг/кг после 60 минут введения препаратов опытным крысам. Полученные данные могут свидетельствовать о некотором дофаминергическом действии изучаемой экспериментальной субстанции в тесте каталепсии, вызванной галоперидолом (Рисунок 50).

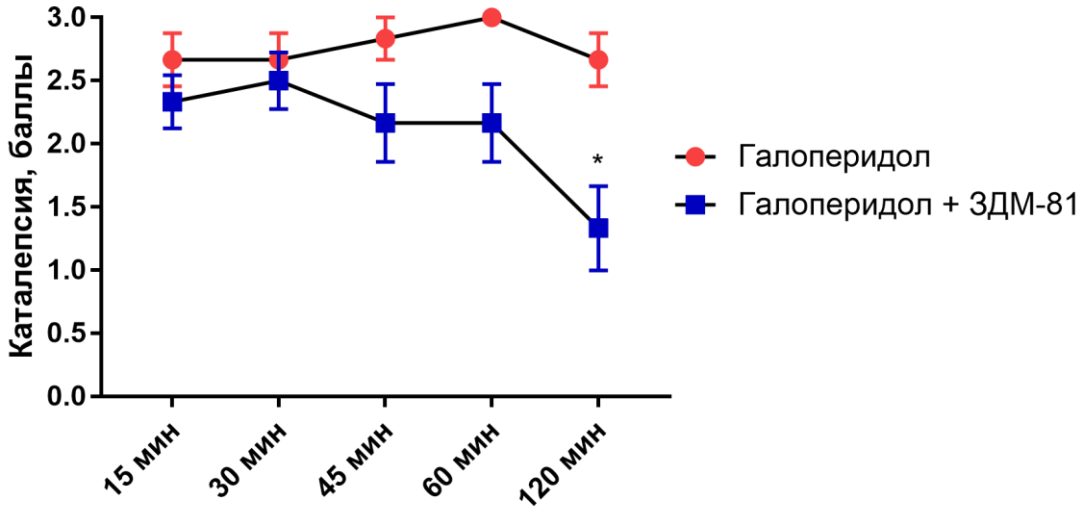


Рисунок 50 - Изменение каталептогенного эффекта галоперидола в дозе 3 мг/кг, внутрибрюшинное введение, при введении соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, крысы, M±SEM.
*Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе галоперидола (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)*

6.1.4. Свойства соединения ЗДМ-81 в тесте с ареколином

Для выявления центрального М-холинергического действия экспериментального соединения ЗДМ-81 был проведен тест взаимодействия с центральным холиномиметиком ареколином в дозе 15 мг/кг. Исследовали влияние соединения на латентный период, а также на длительность индуцированного ареколином судорожного приступа. В группе ареколина латентное время возникновения судорог составило 68,3±3,41 с, а под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг показатель был несколько увеличен до

74,3±4,59 с, однако статистической значимости различий между экспериментальными группами не было зафиксировано. Длительность судорожного приступа в группе ареколина составила в среднем 450,8±34,08 с, тогда какв группе экспериментального соединения – 437,7±37,8 с. По результатам проведенного исследования можно сделать вывод об отсутствии влияния соединения ЗДМ-81 в эффективной для проявления анксиолитической активности дозе 17,5 мг/кг влияния на центральные М-холинорецепторы (Рисунок 51).

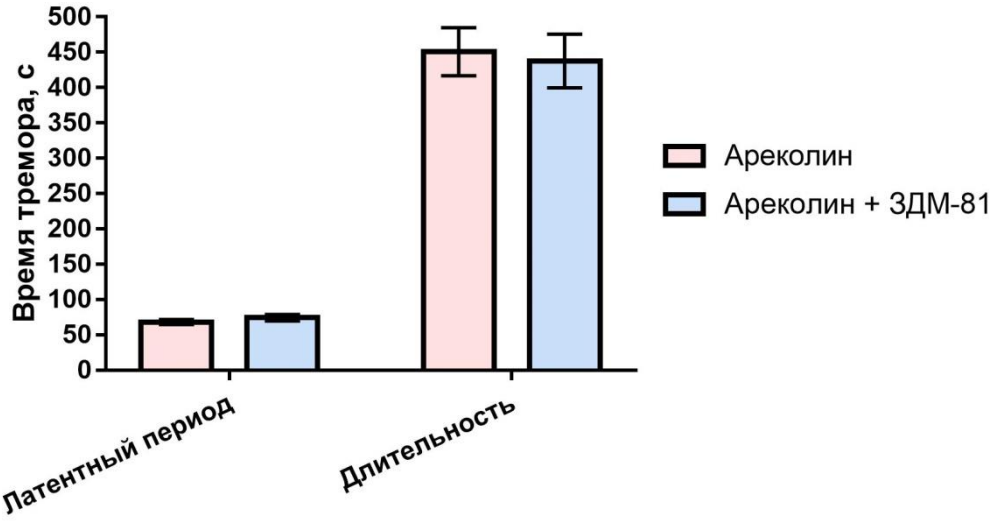


Рисунок 51 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на выраженность ареколинового тремора (15 мг/кг, внутрибрюшинное введение), мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе ареколина (p<0,05, t-критерий Стьюдента)*

6.1.5. Влияние соединения ЗДМ-81 на эффекты L-ДОФА

По результатам проведенного исследования установлено, что введение L-ДОФА в дозе 500 мг/кг приводило к появлению двигательной стереотипии мышей. На 30-й минуте наблюдения выраженность стереотипии составила 2,3±0,21 балла, на 60-й – 1,6±0,33, и на 90-й – 1,3±0,21 балла. При введении мышам L-ДОФА в низкой дозе – 100 мг/кг – степень стереотипии мышей была значительно ниже и практически не наблюдалась – 0,2±0,16 балла на протяжении всего времени теста. При совместном введении мышам L-ДОФА в дозе 100 мг/кг и соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг исследуемый параметр – величина

стереотипии – был повышен незначительно относительно группы L-ДОФА в малой дозе: 0,3±0,21 через 30 и 60 минут тестирования. Через 90 минут эксперимента величина двигательного беспокойства мышей соответствовала значениям L-ДОФА в дозе 100 мг/кг и составляла 0,2±0,16 балла. Соединение ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг на 30-60 минуте теста незначительно потенцировало эффект малых доз L-ДОФА. На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение ЗДМ-81 не проявляет статистически значимого МАО-ингибирующего влияния, основанного на потенцировании эффектов L-ДОФА в малых дозах (Рисунок 52).

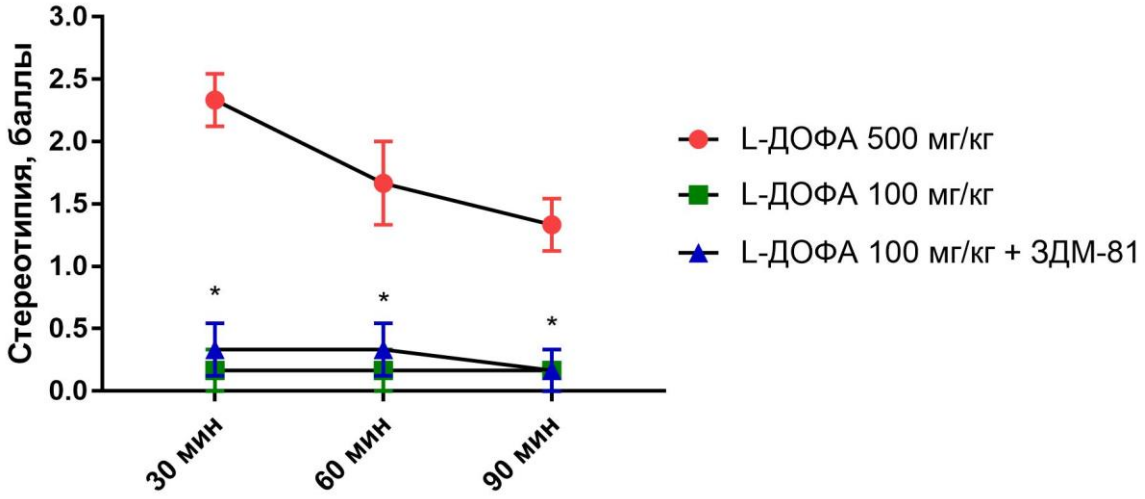


Рисунок 52 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на эффекты L-ДОФА в дозе 100 мг/кг, внутрибрюшинное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе L-ДОФА в дозе 500 мг/кг (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна)*

6.1.6. Эффект никотина при введении соединения ЗДМ-81

В ходе проведенного исследования в группе мышей, получавших никотин в дозе 2 мг/кг, наблюдалось развитие тремора, связанное с усилением нервно-мышечной нейропередачи. Судорог мышей в указанной группе зафиксировано не было. В группе животных, получавших никотин в высокой дозе 4 мг/кг, помимо тремора, были зарегистрированы судорожные припадки в 100% случаев. Введение мышам дополнительно соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг не

приводило к изменениям эффекта никотина как в дозе 2 мг/кг, так и в дозе 4 мг/кг. В группе животных, получавших никотин в малой дозе и соединение ЗДМ-81, был зафиксирован тремор грызунов без явлений судорожных припадков. При получении животными большой дозы никотина – 4 мг/кг – и экспериментальной субстанции ЗДМ-81, дополнительно к явлениям тремора наблюдали и судороги. Таким образом, для изучаемого соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг не отмечено влияния на Н-холинергические рецепторы ЦНС грызунов в сравнении с никотином в малых – 2 мг/кг – и высоких – 4 мг/кг – дозах. Сводные данные о проведенном тестировании приведены в Таблице 7.

Таблица 7 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на выраженность эффектов низкой пороговой дозы никотина (2 мг/кг, внутрибрюшинное введение) и высокой дозы никотина (4 мг/кг, внутрибрюшинное введение), мыши, M±SEM

Параметр	Контроль (никотин 2 мг/кг)	Контроль (никотин 4 мг/кг)	ЗДМ-81 + никотин 2 мг/кг	ЗДМ-81 + никотин 4 мг/кг
Количество животных, у которых возник тремор (%)	100	100	100	100
Количество животных, у которых возникли судороги (%)	0	100	0	100

6.1.7. Действие соединения ЗДМ-81 на выраженность апоморфиновой стереотипии крыс

Известно, что апоморфин в дозе 0,1 мг/кг способен вызывать стереотипное поведение животных, обусловленное активацией пресинаптических дофаминовых рецепторов. На 30-й минуте тестирования число баллов в группе апоморфина составило 1,6±0,33 и сохранялось на том же уровне до 60-й минуты, на 90-й минуте – убывало до 1,5±0,42 балла и на 120-й минуте – уже до 0,8±0,30 баллов. Под влиянием соединения ЗДМ-81 была снижена выраженность стереотипного поведения животных: зарегистрировано 1,3±0,21 балла стереотипии через полчаса теста, 1,2±0,30 балла через час эксперимента, 0,8±0,30 баллов через полтора часа и 0,5±0,22 балла к концу тестирования, на 120-й минуте. Таким образом, в ходе

проведения эксперимента зарегистрировано снижение выраженности обусловленной апоморфином стереотипии под влиянием соединения ЗДМ-81, однако достоверного различия между экспериментальными группами обнаружено не было. Исходя из изложенного, можно сделать вывод об отсутствии влияния соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг на пресинаптические дофаминергические рецепторы в сравнении с апоморфином в дозе 0,1 мг/кг (Рисунок 53).

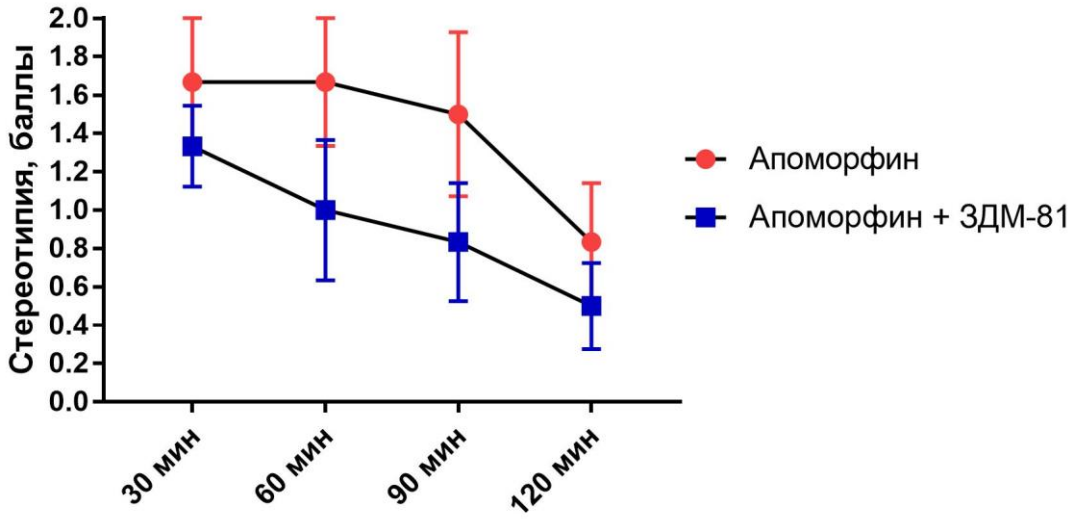


Рисунок 53 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на выраженность стереотипного поведения крыс, вызванного апоморфином в дозе 0,1 мг/кг, внутрибрюшинное введение, крысы, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе апоморфина (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)*

6.1.8. Влияние соединения ЗДМ-81 на эффекты пикротоксина

Антагонистическое взаимодействие пикротоксина с рецепторами ГАМК лежит в основе характерной для него способности вызывать у экспериментальных животных тремор и повторяющиеся клонические судороги. Число судорожных приступов в группе мышей, получавших пикротоксин в дозе 2,5 мг/кг, составило 10,7±3,32 эпизода, в то время как в группе мышей, получавших пикротоксин и соединение ЗДМ-81, количество судорожных эпизодов было снижено до 7,0±2,67, что незначительно отличается от показателей группы пикротоксина. Латентное время возникновения тремора в группе пикротоксина составило 330,2±27,56 с, а в группе соединения ЗДМ-81 – 358,5±26,69 с, что находится на том же уровне, что и

исходные значения. По показателю латентного времени развития судорожных припадков в группе животных, которым вводили только пикротоксин, и в группе крыс, получавших пикротоксин и соединение ЗДМ-81, зарегистрирован приблизительно равный временной промежуток: 350,7±34,96 с и 396,3±35,81 с, соответственно. Согласно данным, полученным в ходе проведенного эксперимента, можно сделать вывод об отсутствии взаимодействия с рецепторами γ-аминомасляной кислоты для изучаемого соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг в условиях взаимодействия с пикротоксином в дозе 2,5 мг/кг (Рисунок 54).

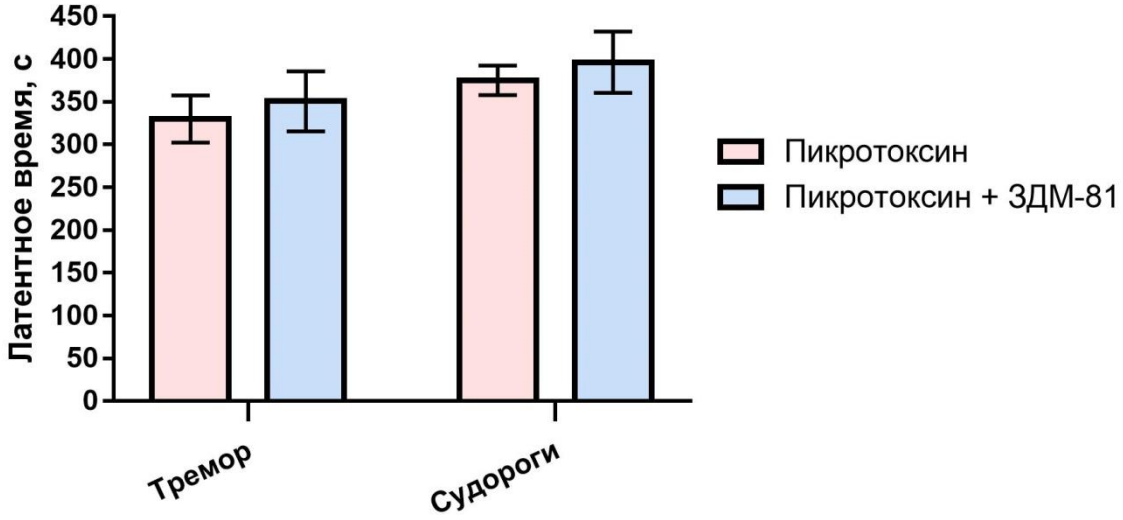


Рисунок 54 - Влияние соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, на эффекты пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг, внутрибрюшинное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе пикротоксина (p<0,05, t-критерий Стьюдента)*

6.1.9. Гипотермическое действие клофелина при введении соединения ЗДМ-81

Ректальная температура интактных мышей составила 37,3±0,25 ℃ и оставалась примерно на том же уровне до конца эксперимента, составив 36,5±0,24 ℃ на 120-й минуте теста. В группе мышей, которым вводили клофелин в дозе 0,1 мг/кг ректальная температура падала на 30-й минуте эксперимента до 35,6±0,20 и оставалась на том же уровне до 120-й минуты. Под действием изучаемого соединения в группе мышей, получавших соединение ЗДМ-81 и клофелин,

величина ректальной темпратуры животных приблизительно соответствовало данным группы клофелина. Через 30 минут после введения животным соединения ЗДМ-81 совместно с клофелином уровень ректальной температуры составил 35,5±0,44 °С, через час – 35,8±0,47 °С, через 1,5 часа – 35,8±0,36 °С и через 2 часа – 35,7±0,16 °С. Начиная с 30 минуты теста наблюдалось достоверное различие между группами клофелина и соединения ЗДМ-81 с контрольными значениями. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимого влияния экспериментального соединения на α_2-адренорецепторы в сравнении с клофелином в дозе 0,1 мг/кг (Рисунок 55).

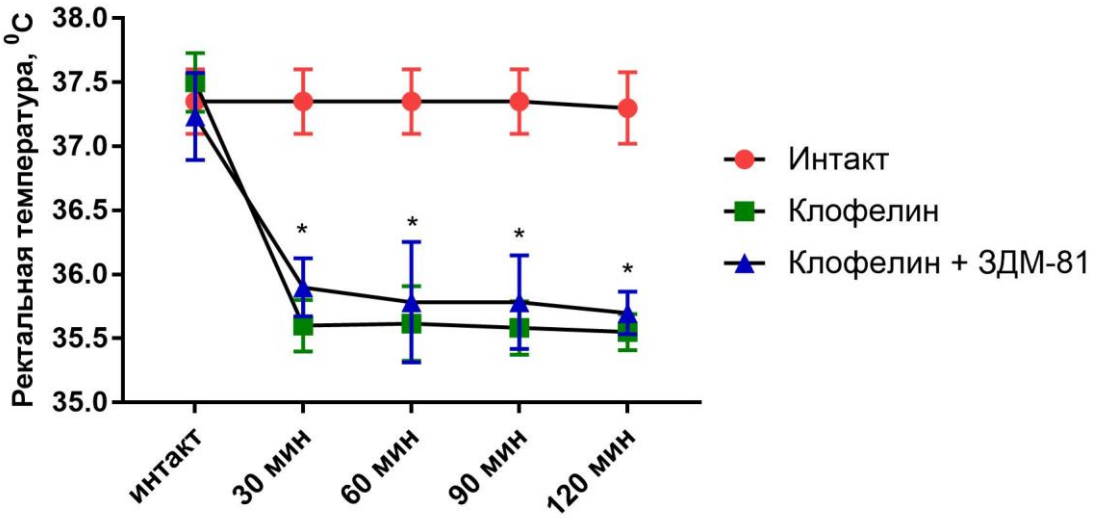


Рисунок 55 - Изменение гипотермического эффекта клофелина в дозе 0,1 мг/кг, внутрибрюшинное введение, при введении соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание:* * - *отличия статистически значимы по отношению к группе интактного контроля (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна)*

6.1.10. Действие соединения ЗДМ-81 в тесте «Резерпиновая гипотермия»

В группе интактного контроля величина ректальной температуры мышей составила 37,3±0,25. В группе мышей, получавших резерпин в дозе 2,5 мг/кг – 37,2±0,22,а в опытной, получавшей, помимо резерпина, изучаемое соединение ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг – 37,3±0,18. Через 4 часа наблюдений параметр в контрольной группе остался на том же уровне – 37,1±0,26. В группе резерпина температура в среднем снизилась – 35,8±0,41. Аналогичные показатели

зарегистрированы в группе соединения ЗДМ-81 – 35,9±0,19. В конце эксперимента ректальная температура мышей группы контроля не была изменена, а в опытных группах оставалась на уровне 35,6±0,34 и 35,7±0,23, соответственно. Таким образом, для экспериментального соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг не было показано изменения гипотермического эффекта симпатолитика резерпина. Величина ректальной температуры опытных мышей под действием изучаемой субстанции соответствовала значениям группы резерпина (Рисунок 56).

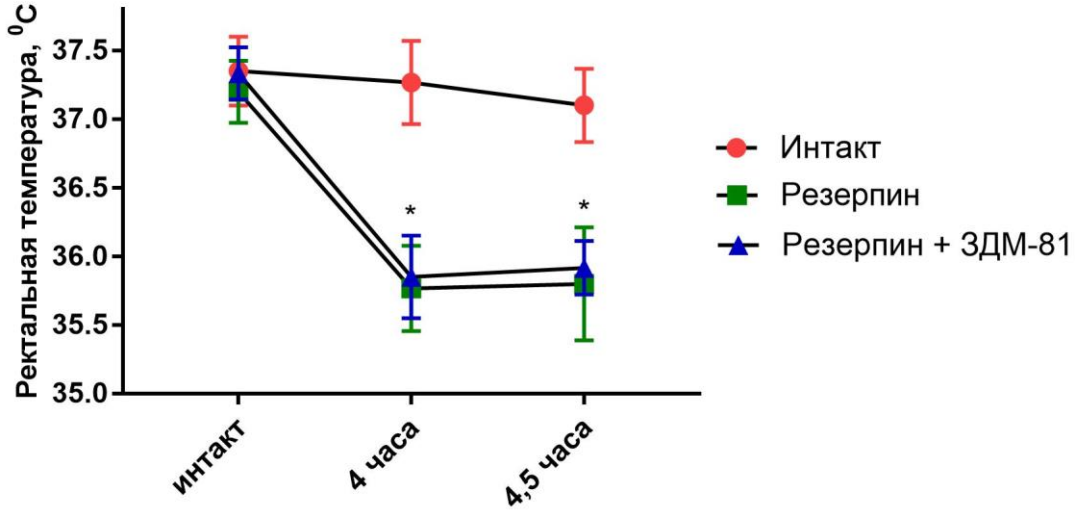


Рисунок 56 - Изменение гипотермических эффектов резерпина в дозе 2,5 мг/кг при введении соединения ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к группе интактного контроля (p<0,05, критерий Краскелла-Уоллиса с посттестом Данна)*

6.2. Заключение

По результатам проведенного исследования взаимодействия соединения ЗДМ-81 с основными агонистами и антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo* было показано, что для экспериментальной субстанции характерно влияние на серотонинергическую, ГАМК-ергическую и дофаминергическую системы.

В тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез» зарегистрировано не только потенцирование эффектов 5-ГТФ, но и пролонгирование их: после 40-й минуты наблюдения в группе 5-гидрокситриптофана число встряхиваний мышами

головой убывало, в то время как в опытной группе параметр был выражен отчетливо. Основываясь на полученных данных, можно предположить наличие 5-HT_{2A}-серотонинегического действия соединения ЗДМ-81.

В тесте взаимодействия с антагонистом бензодиазепиновых рецепторов флумазенилом показано блокирование указанным антагонистом как препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг, так и экспериментальной субстанции ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», что может свидетельствовать о связи между реализацией эффекта соединения ЗДМ-81 и бензодиазепинового рецептора.

В тесте «Каталепсии, вызванной галоперидолом» на 45-120 минутах наблюдения зафиксировано снижение уровня каталепсии крыс под действием соединения ЗДМ-81. Во временном промежутке 60-120 минут для параметров групп галоперидола и соединения ЗДМ-81 показано значимое различие. В то же время, в тесте взаимодействия с апоморфином соединение ЗДМ-81 не проявило активности. Можно предположить некоторое влияние изучаемой субстанции на D_2-дофаминергическую систему, что требует дальнейшего изучения и уточнения.

В тесте взаимодействия с пикротоксином не показано значимого изменения эффектов пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг. Принимая во внимание ранее проведенное исследование взаимодействия с флумазенилом, можно предположить отсутствие прямого ГАМК-миметического действия изучаемого соединения и возможное влияние на рецепторный комплекс ГАМК путем аллостерической модуляции.

Изучаемое вещество потенцировало эффекты L-ДОФА в малых дозах на промежутке наблюдения 30-60 минут, однако значимого различия с группой мышей, получавших L-ДОФА в больших дозах, обнаружено не было. Введение соединения ЗДМ-81 не приводило к изменениям центральных М-холинергических эффектов ареколина, а также Н-холинергических судорожных эффектов никотина, что может свидетельствовать об отсутствии влияния соединения ЗДМ-81 на холинергическую нейропередачу.

В тестах клофелиновой и резерпиновой гипотермий под влиянием соединения ЗДМ-81 уровень ректальной температуры мышей не был изменен относительно групп животных, получавших индукторы гипотермии. Согласно полученным данным, действие субстанции ЗДМ-81 может быть охарактеризовано как не связанное с работой α_2-адренорецепторов и косвенных адреноблокирующих систем.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81 НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ

Для проведения фармакокинетических исследований кандидата в лекарственные средства необходимо применение высокочувствительного, специфичного и селективного метода количественного определения биологически активных веществ в биологических жидкостях, который должен отличаться точностью и воспроизводимостью, а также позволять производить исследования на малых объемах проб [Смирнова Л.А. и др., 2019]. На сегодняшний день методом, наиболее полно соответствующим поставленным задачам, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [Смирнова Л.А. и др., 2013]. В качестве препаратов сравнения для соединения ЗДМ-81 в условиях указанной методики были применены трициклические антидепрессанты амитриптилин в дозе 10 мг/кг и имипрамин в дозе 8 мг/кг, а также селективный ингибитор обратного захвата серотонина – флуоксетин в дозе 15 мг/кг. Для моделирования тревожно-депрессивного состояния животных линии C57BL/6 была использована методика хронического непредсказуемого легкого стресса (unpredictable chronic mild stress, UCMS).

Времена удерживания пиков, соответствующих изучаемым катехоламинам представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Времена удерживания стандартных растворов изучаемых катехоламинов на хроматограмме

Катехоламин	Время удерживания, мин
Норадреналин	3
Дофамин	4,2
Серотонин	7,6
ДОФУК	14,8
5-ОИУК	26

Содержание катехоламинов представлено на хроматограммах (Рис. 57-63).

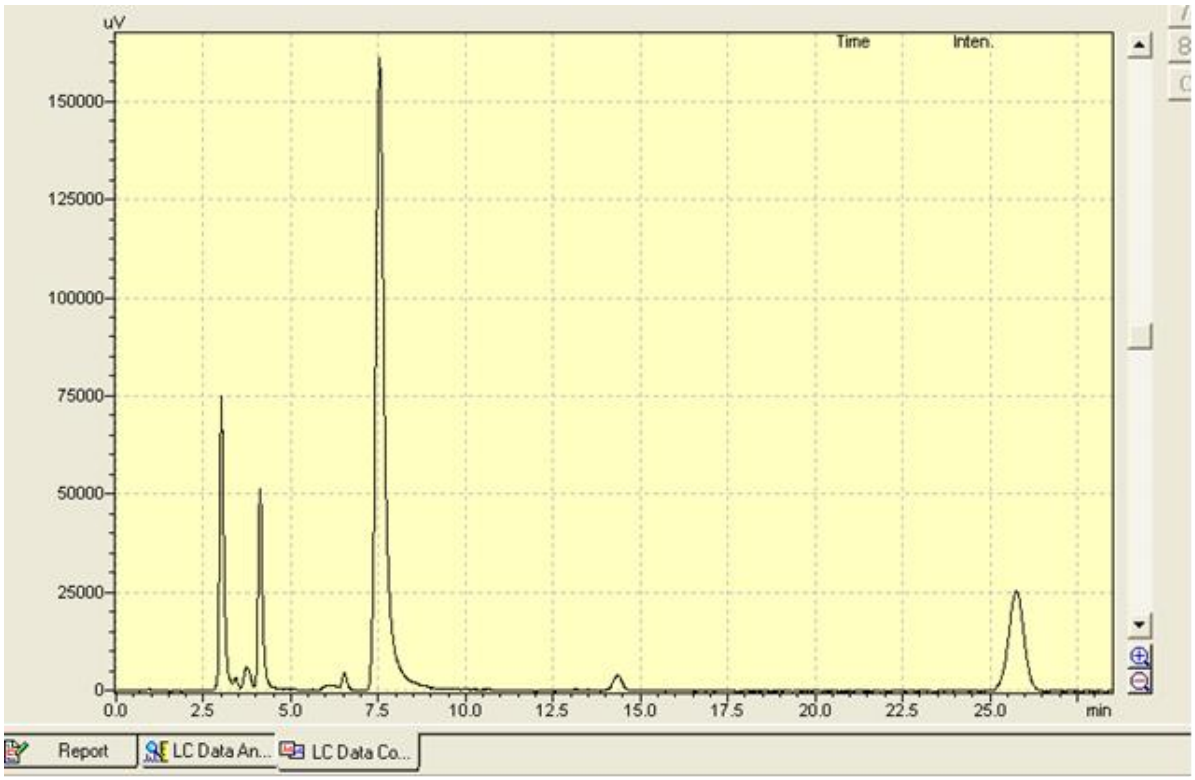


Рисунок 57 - Хроматограмма стандартных растворов норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК.

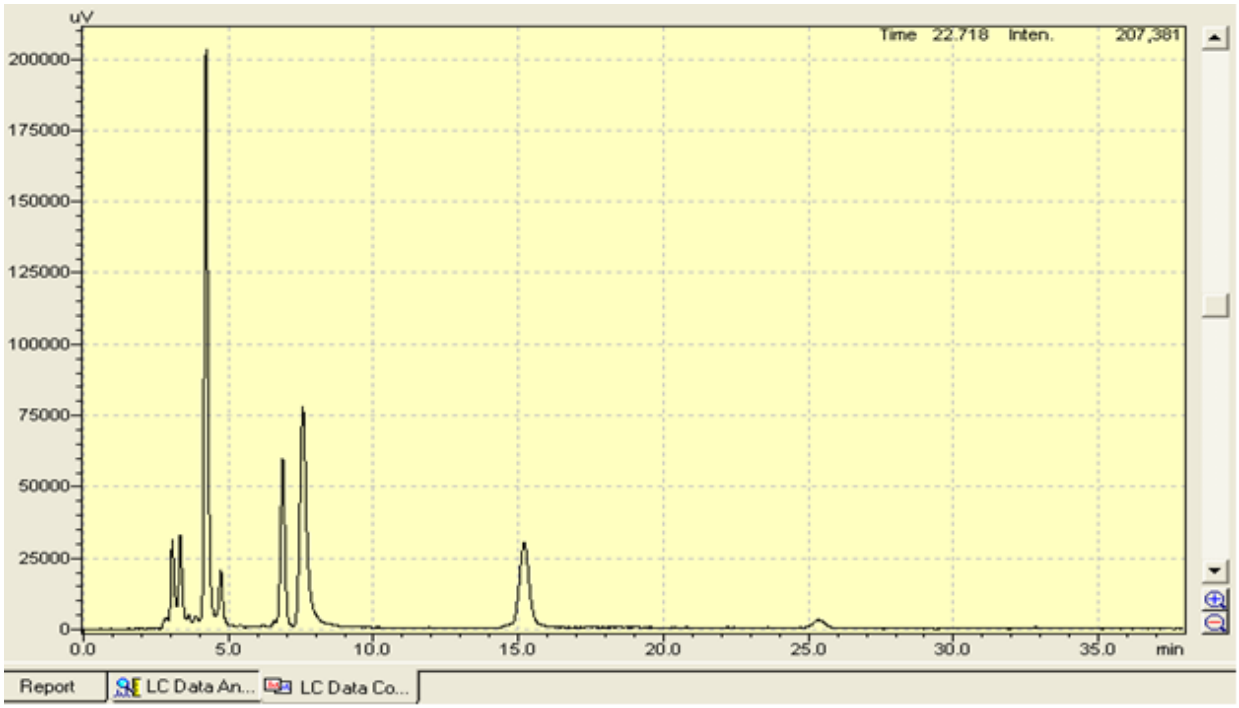


Рисунок 58 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге интактных животных

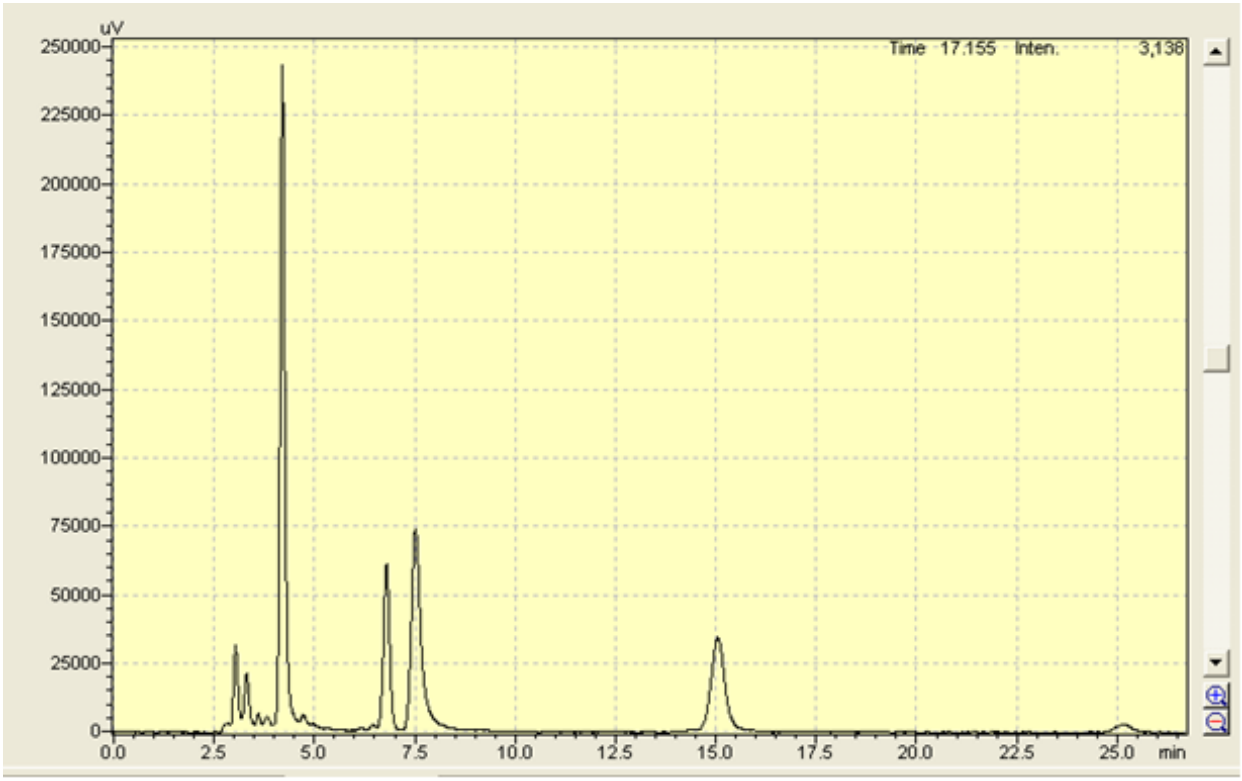


Рисунок 59 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге животных, подвергшихся процедуре UCMS

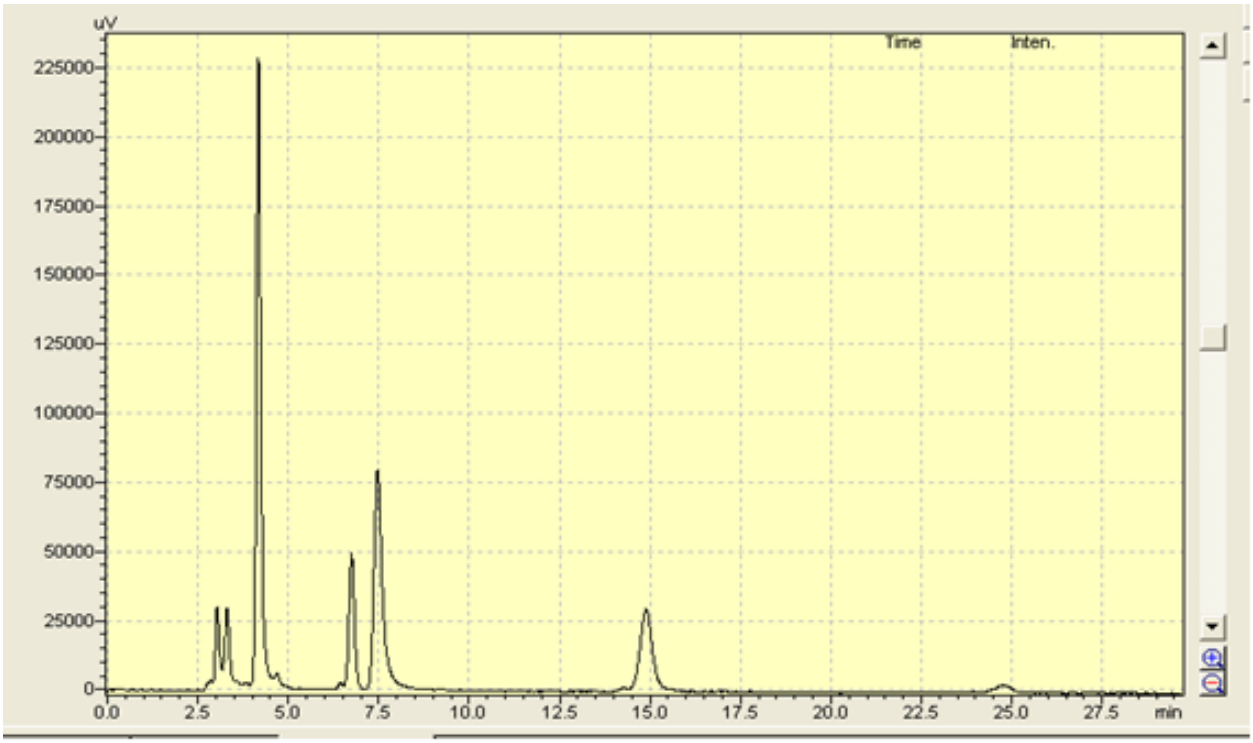


Рисунок 60 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге животных, подвергшихся процедуре UCMS на фоне введения амитриптилина

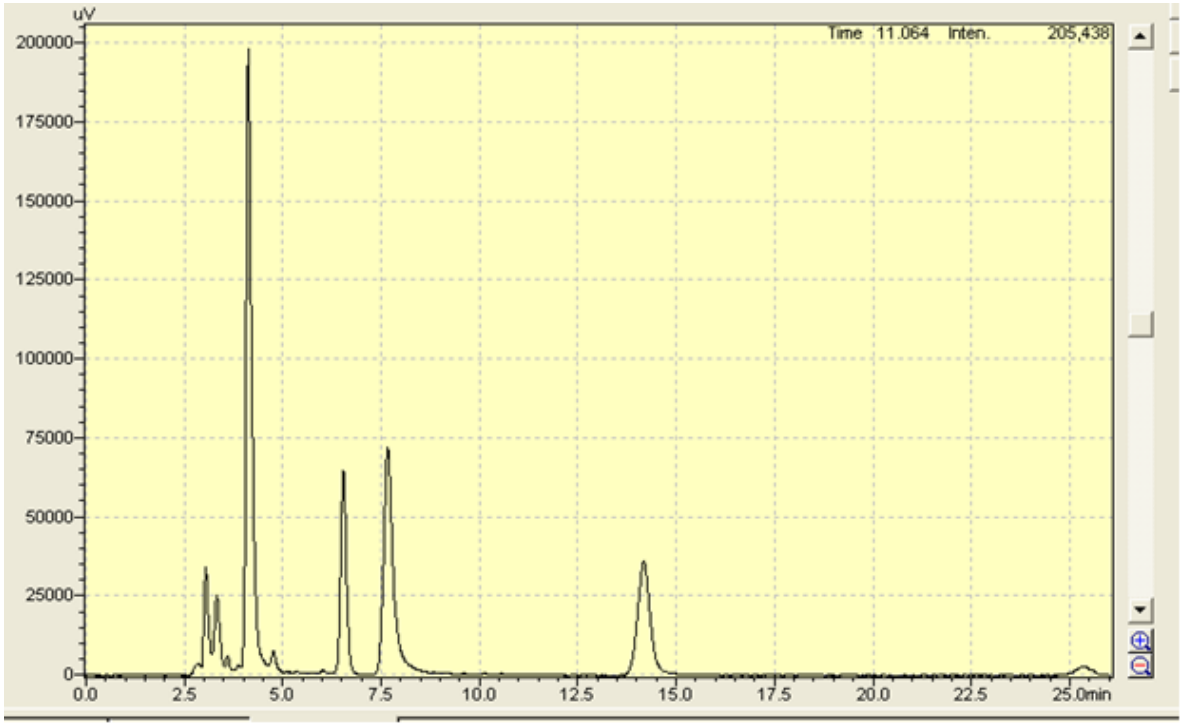


Рисунок 61 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге животных, подвергшихся процедуре UCMS на фоне введения флуоксетина

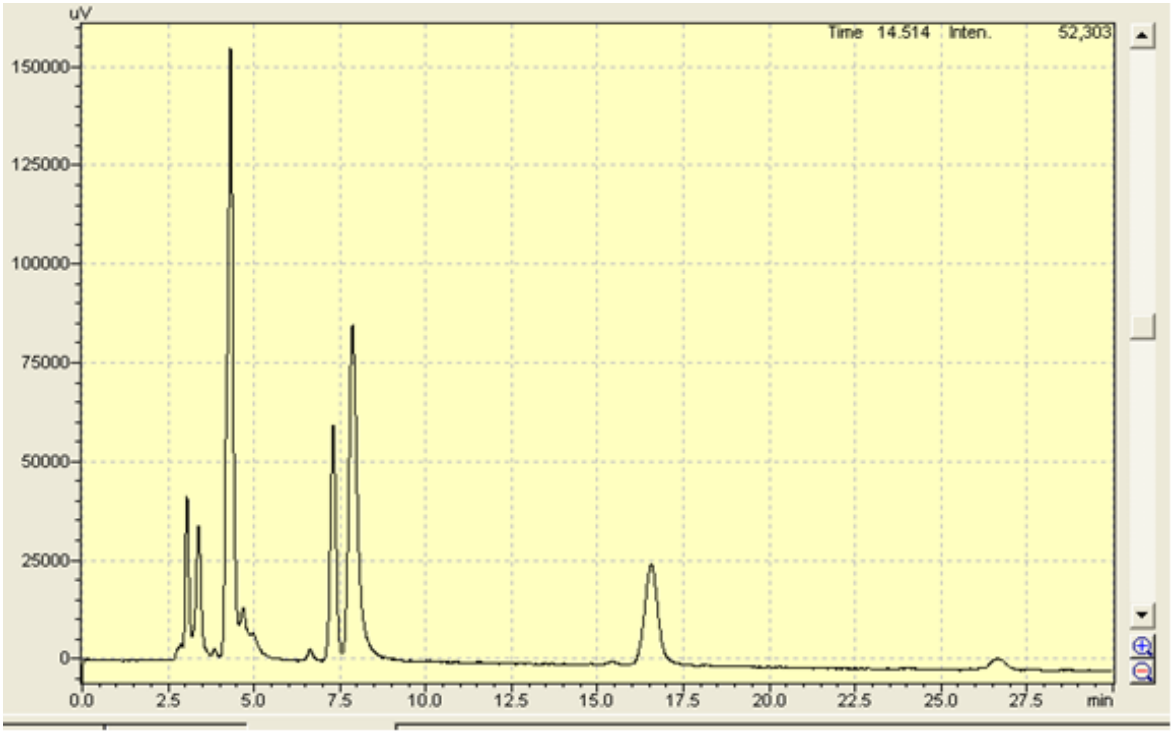


Рисунок 62 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге животных, подвергшихся процедуре UCMS на фоне введения имипрамина

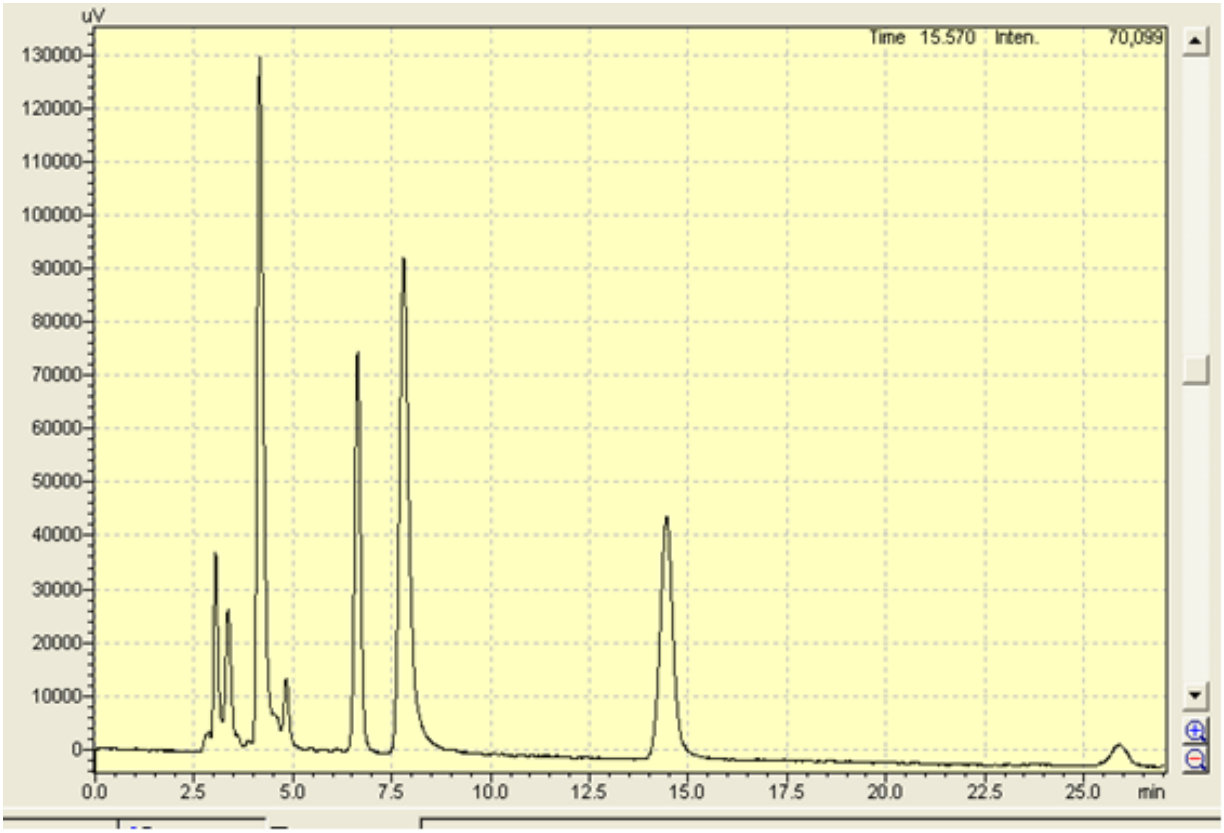


Рисунок 63 - Содержание норадреналина, дофамина, серотонина, ДОФУК и 5-ОИУК в мозге животных, подвергшихся процедуре UCMS на фоне введения ЗДМ-81

Концентрация норадреналина в головном мозге мышей группы интактного контроля составила в среднем 124,5±5,74 нг/мл. В группе мышей под влиянием хронического непредсказуемого легкого стресса (UCMS) уровень норадреналина был понижен до 72,8±1,60 нг/мл. Содержание серотонина также было снижено в группе UCMS в сравнении с интактным контролем: 318,6±2,65 нг/мл против 551,8±11,76 нг/мл, соответственно. Снижение концентрации серотонина и норадреналина в головном мозге мышей, подвергшихся процедуре UCMS, возможно, обусловлено хронической стрессированностью животных и истощением пресинаптических везикулярных запасов моноаминов. Под действием амитриптилина в дозе 10 мг/кг и флуоксетина в дозе 15 мг/кг, а также экспериментального соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг уровень норадреналина незначительно отличался от группы негативного контроля (UCMS), и составлял 74,5±3,38 нг/мл и 78,2±2,74 нг/мл, соответственно. В группе мышей, получавших имипрамин в дозе 8 мг/кг, концентрация норадреналина в биологических пробах

мозга практически возвращалась к уровню исходных значений и составляла 104,5±5,74 нг/мл, достоверно отличаясь от группы UCMS и незначимо отличаясь от группы исходного контроля. Наиболее выраженное адренергическое действие в условиях данного теста проявил имипрамин в дозе 8 мг/кг (Рисунок 64).

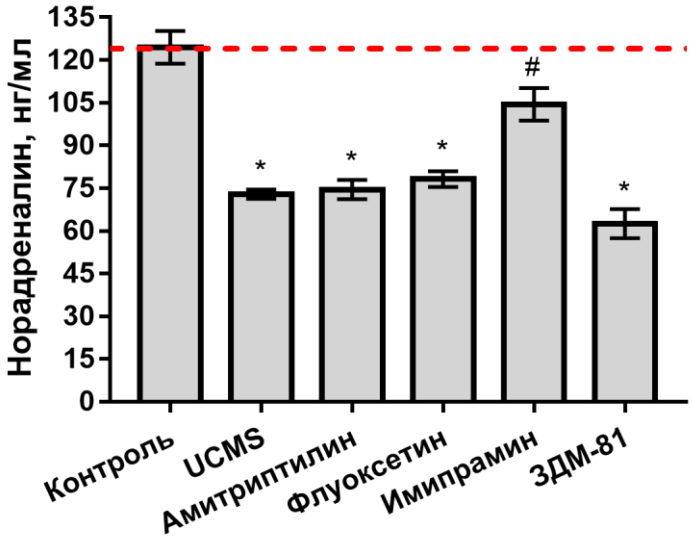


Рисунок 64 - Соотношение концентраций, нг/мл, норадреналина в головном мозге мышей под влиянием амитриптилина (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # - отличия статистически значимы по отношению к негативному контролю («UCMS»), p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений*

По параметру содержания дофамина в головном мозге мышей концентрация биологически активного вещества в пробах группы интактного контроля составила 1448,0±52,59 нг/мл, в то время как в группе UCMS – 1168,0±32,75 нг/мл, что достоверно различается с контрольными показателями. Можно предположить снижение нейрональных запасов дофамина аналогично норадреналину и серотонину ввиду длительного стресса, либо компенсацию недостатка норадреналина путем его синтеза из дофаминовых везикулярных депо. Для всех опытных групп отмечено значительное снижение концентрации дофамина относительно интактной контрольной группы. После введения мышам амитриптилина в дозе 10 мг/кг зарегистрировано снижение содержания дофамина

до 993,5±32,36 нг/мл, а при введении имипрамина в дозе 8 мг/кг – до 1063,0±89,26 нг/мл. Наиболее выраженное снижение содержания дофамина наблюдалось под влиянием флуоксетина в дозе 15 мг/кг и составило 782,5±16,72 нг/мл. Под влиянием исследуемого соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг величина содержания дофамина в головном мозге мышей находилась на уровне 1017,0±66,07 нг/мл, что соответствует значениям группы негативного контроля (Рисунок 65).

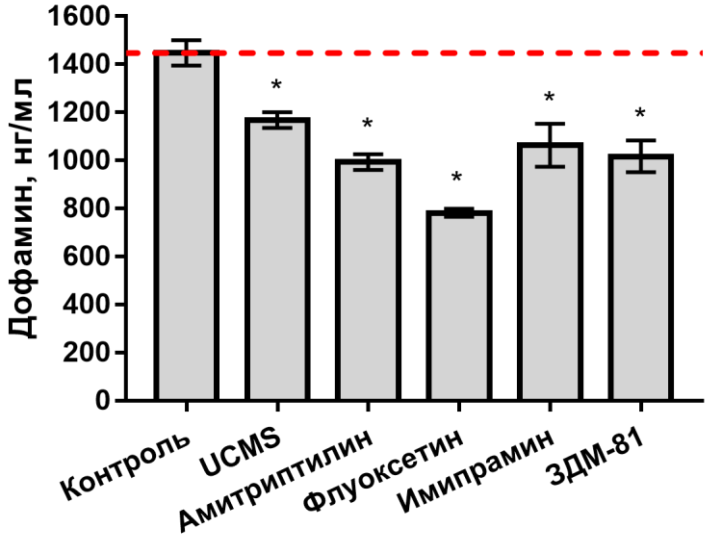


Рисунок 65 - Соотношение концентраций, нг/мл, дофамина в головном мозге мышей под влиянием амитриптилина (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # -отличия статистически значимы по отношению к негативному контролю («UCMS»), p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений*

Концентрация серотонина в гомогенатах под действием UCMS составила в среднем 318,6±2,65 нг/мл, в группе интактного контроля – 551,8±11,76 нг/мл. Наиболее выраженное серотонинергическое действие было зафиксировано под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг - 524,9±17,25 нг/мл, что находится на уровне интактных контрольных значений. Под влиянием амитриптилина в дозе 10 мг/кг и флуоксетина в дозе 15 мг/кг показатель возрос относительно группы UCMS до 451,8±11,76 нг/мл и 434,2±12,27 нг/мл, соответственно, что

существенно отличается от показателей группы UCMS. Несколько менее выраженное действие оказало введение имипрамина в дозе 8 мг/кг: содержание серотонина в головном мозге мышей составило 346,2±6,66 нг/мл. В условиях проведенного исследования имипрамин оказал более выраженное норадренергическое, чем серотонинергическое действие (Рисунок 66).

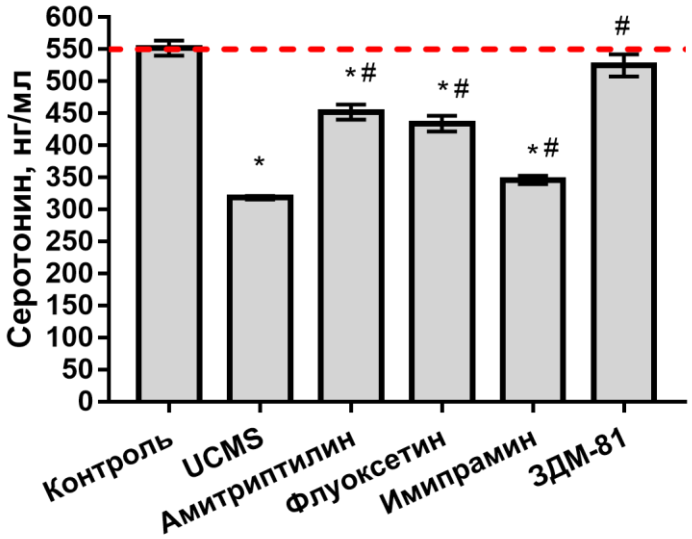


Рисунок 66**.** Соотношение концентраций, нг/мл, серотонина в головном мозге мышей под влиянием амитриптилина (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # - отличия статистически значимы по отношению к негативному контролю («UCMS»), p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений.*

Содержание диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), метаболита дофамина, в группе интактного контроля составило 852,5±60,33 нг/мл. В группе негативного контроля, подвергнутой процедуре UCMS и не получавшей препаратов, уровень ДОФУК падал до 719,0±24,01, что, однако, незначительно отличается от группы интактного контроля. В группе животных, получавших экспериментальное соединение ЗДМ-81, было зафиксировано наиболее значительное повышение концентрации ДОФУК в гомогенатах, в то же время, находящееся в пределах статистической ошибки в сравнении с группой интактного контроля, однако достоверно повышенное относительно группы

UCMS. Введение животным имипрамина в дозе 8 мг/кг являлось причиной снижения показателя до 608,8±18,79 нг/мл. Под влиянием амитриптилина в дозе 10 мг/кг и флуоксетина в дозе 15 мг/кг достоверных изменений уровня дофамина в сравнении с интактным контролем не было зарегистрировано: содержание медиатора составило 888,7±54,99 нг/мл и 854,0±32,45 нг/мл, соответственно.

Можно отметить, что соотношение ДОФУК/дофамин в биологических пробах группы интактного контроля составило 0,58, в группе негативного контроля – 0,61, что находится приблизительно на одном уровне. В группе мышей, получавших имипрамин в дозе 8 мг/кг, коэффициент составил 0,57, что также соответствует значениям интактного контроля, и позволяет сделать вывод об общей закономерности метаболизма дофамина в указанных группах: при понижении концентрации дофамина снижается и уровень его метаболита ДОФУК по причине недостатка субстрата. В группе мышей, получавших амитриптилин в дозе 10 мг/кг, коэффициент составил 0,89, для группы флуоксетина (15 мг/кг) – 1,09, для группы соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг) показатель составил 0,94, что свидетельствует о пониженном относительном содержании дофамина. Возможно, биохимическое превращение дофамина в данных случаях идет по другому метаболическому пути, с образованием иных продуктов, отличных от ДОФУК, что требует более подробного изучения. В то же время, полученные результаты могут быть обусловлены временем тестирования – 30 минут после внутрижелудочного введения мышам препаратов. В таком случае, зарегистрированные данные обусловлены факторами всасываемости образцов лекарственных препаратов, их распределения *in vivo*, а также индивидуальных ферментных систем, участвующих в биотрансформации, и скорости превращения ими лекарственных средств. Стоит предположить, что некоторое количество эндогенного дофамина может являться субстратом для синтеза норадреналина, депо которого истощаются при длительном стрессе или воздействии депрессирующих факторов, которым может являться процедура хронического непредсказуемого легкого стресса (Рисунок 67).

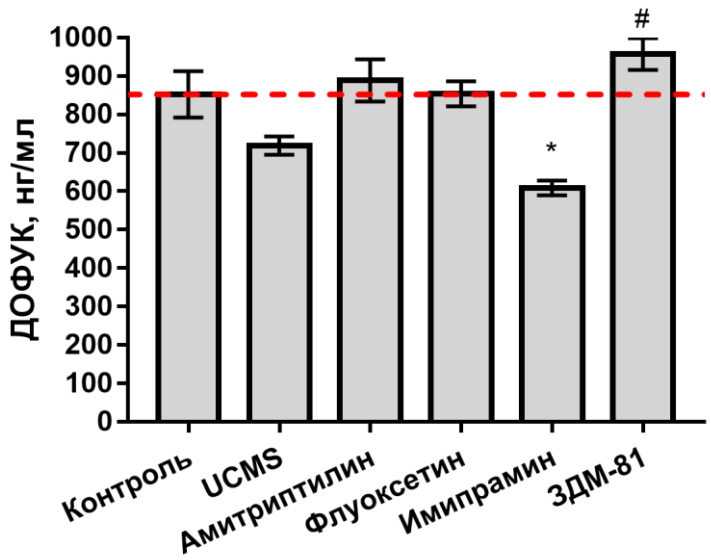


Рисунок 67. Соотношение концентраций, нг/мл, ДОФУК в головном мозге мышей под влиянием амитриптилина (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # - отличия статистически значимы по отношению к негативному контролю («UCMS»), p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений.*

Содержание метаболита серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, в гомогенатах мышей группы интактного контроля составило 71,8±2,89 нг/мл. Для всех экспериментальных групп отмечено снижение концентрации 5-ОИУК относительно интактного контроля. В группе UCMS показатель находился на уровне 48,4±3,40 нг/мл, что соответствует уровню значений, зарегистрированному для флуоксетина в дозе 15 мг/кг – 47,9±3,33 нг/мл. Под влиянием исследуемого соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг концентрация 5-ОИУК составила 58,2±1,74 нг/мл. Для групп амитриптилина, флуоксетина и соединения ЗДМ-81 отмечено значительное различие с исходными значениями. Менее выраженно от показателей группы животных интактного контроля отличались параметры групп амитриптилина и имипрамина - 59,5±4,43 нг/мл и 59,6±4,22 нг/мл, соответственно.

По показателю соотношения концентрация 5-ОИУК/серотонин можно отметить, что коэффициент для группы интактного контроля составил 0,13, в то

время как для группы негативного контроля – 0,15. В группе амитриптилина соотношение было равно 0,13, флуоксетина - 0,11, имипрамина - 0,17 и соединения ЗДМ-81 - 0,11. Общие закономерности биохимических превращений серотонина не существенно отличаются от таковых группы интактного контроля. Можно отметить, что профиль метаболизма 5-ОИУК/серотонин для изучаемого соединения ЗДМ-81 наиболее близок к показателям флуоксетина, также как и для соотношения ДОФУК/дофамин наиболее близким по значению препаратом для изучаемого соединения является также флуоксетин, введенный мышам в дозе 15 мг/кг (Рисунок 68).

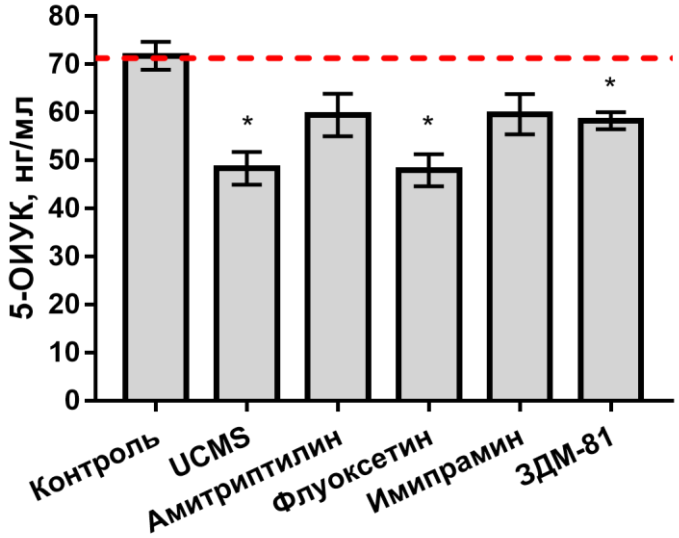


Рисунок 68. Соотношение концентраций, нг/мл, 5-ОИУК в головном мозге мышей под влиянием амитриптилина (10 мг/кг), флуоксетина (15 мг/кг), имипрамина (8 мг/кг) и соединения ЗДМ-81 (17,5 мг/кг), определенное методом ВЭЖХ, внутрижелудочное введение, мыши, M±SEM. *Примечание: * - отличия статистически значимы по отношению к интактному контролю («Контроль»), # -отличия статистически значимы по отношению кнегативному контролю («UCMS»), p<0,05, one-way ANOVA с посттестом Даннета, пунктиром помечен уровень интактных контрольных значений.*

Заключение

Проведено исследование влияния некоторых трициклических антидепрессантов – амитриптилина в дозе 10 мг/кг и имипрамина в дозе 8 мг/кг, а также селективного ингибитора обратного захвата серотонина – флуоксетина в дозе 15 мг/кг, и изучаемого соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг - на содержание основных моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей линии

C57BL/6. Было показано, что для экспериментального соединения ЗДМ-81 характерно серотонинергическое действие. Более того, соотношения метаболизма ДОФУК/дофамин и 5-ОИУК/серотонин для исследуемого соединения наиболее близки к параметрам флуоксетина, вводимого мышам в дозе 15 мг/кг. Снижение содержания серотонина и норадреналина в головном мозге мышей, подвергшихся процедуре UCMS, возможно, обусловлено хронической стрессированностью животных и истощением пресинаптических везикулярных запасов моноаминов. Уменьшение концентрации дофамина в ряде экспериментальных групп может быть связано с использованием некоторого количества эндогенного дофамина в качестве субстрата для синтеза норадреналина, депо которого истощаются при длительном стрессе или воздействии депрессирующих факторов, которым может являться процедура хронического непредсказуемого легкого стресса.

ГЛАВА 8. ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ ЗДМ-81

8.1 Определение острой токсичности соединения ЗДМ-81

При изучении острой токсичности на нелинейных мышах-самцах однократное введение (в/ж) соединения ЗДМ-81 в дозе 2100 мг/кг вызывало гибель всех животных в группе. Введение вещества в дозе 1900 мг/кг приводило к летальному исходу в 75% случаев, а в дозе 1650 мг/кг - 66%. При введении животным вещества в дозе 1200 мг/кг наблюдали летальный исход у 33% животных. Введение мышам экспериментального соединения ЗДМ-81 в дозах 1000 мг/кг, 750 мг/кг и 500 мг/кг не приводило к гибели животных. Согласно полученным данным, была построена линейная зависимость и рассчитан показатель LD_{50} на уровне 1539,6 мг/кг (Рисунок 69).

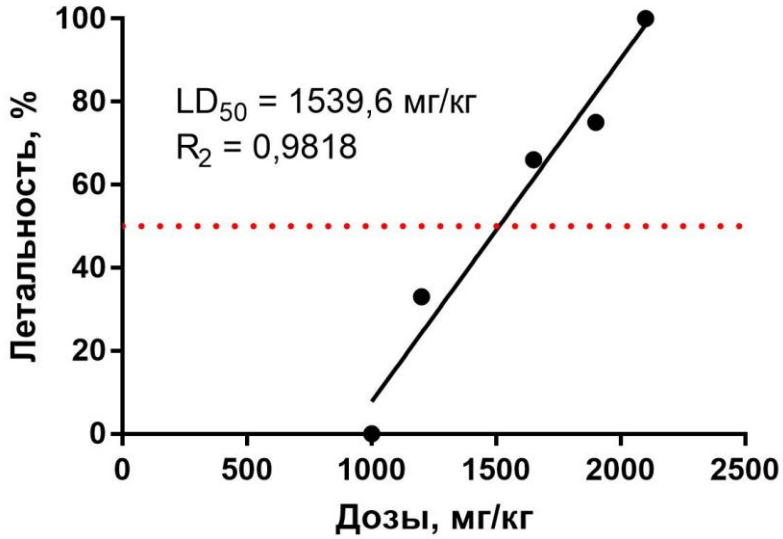


Рисунок 69 - Зависимость показателя летальности от дозы исследуемого вещества ЗДМ-81

Величина дозы исследуемого соединения, введение которой является причиной гибели 50% животных, подтверждает, что изучаемое соединение ЗДМ-81 в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 и с учетом классификации токсичности по И.В.Березовской и И.В.Саноцкого, может быть отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам. В ходе проведенного исследования была получена величина LD_{50} исследуемого соединения,

представленная в Таблице 9, в сравнении с диазепамом. Исходя из представленных расчетов границ LD_{50}, можно заключить, что соединение ЗДМ-81 является менее токсичным, чем препарат сравнения диазепам.

Таблица 9 - Острая токсичность диазепама и соединения ЗДМ-81 при однократном внутрижелудочном введении, мыши

	LD_{50}мг/кг
Диазепам	700[1]
ЗДМ-81	1539,6

8.2. Нейротоксические эффекты соединения ЗДМ-81 при введении различных доз изучаемого вещества в многопараметровом нейротоксикологическом тесте по S.Irwin

Субстанцию ЗДМ-81 вводили мышам внутрижелудочно (металлическим зондом) в ранее изученной дозе – 17,5 мг/кг, а также в 10-, 50- и 80- кратных дозах – 175, 875 и 1400 мг/кг, соответственно. У животных, получавших соединение ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг, не наблюдалось значимых изменений изучаемых показателей данного многопараметрового тестирования. При повышении дозы соединения ЗДМ-81 в 10, 50 и 80 раз наблюдалась незначительная вокализация животных на 60-й минуте тестирования. В группе животных, получавших соединение ЗДМ-81 в дозе 1400 мг/кг, вокализация регистрировалась и на 120-й минуте теста. В аналогичных с вокализацией объемах была повышена и настороженность животных в тех же временных промежутках. Склонность животных к стереотипному поведению была зафиксирована при введении мышам соединения ЗДМ-81 в дозе 1400 мг/кг на 60-й и 120-й минуте наблюдений. При повышении дозы изучаемого вещества в 50 раз, на 60-й минуте зарегистрировано некоторое повышение беспокойства грызунов. В аналогичное время в группе мышей, получавших 80-кратную дозу субстанции ЗДМ-81, беспокойство усилилось и оставалось на том же уровне до конца эксперимента. Уровень спонтанной двигательной активности животных был несколько снижен относительно контроля при введении животным соединения ЗДМ-81 в дозе 1400

[1] Значение LD_{50} препарата сравнения диазепама было получено из литературного источника INCHEM http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim181.htm

мг/кг на 60-й минуте и прогрессировало к 120-й минуте. Наблюдалось временное снижение актов груминга животных на протяжении эксперимента. Агрессивности животных ни в одной из изученных доз соединения ЗДМ-81 зарегистрировано не было (Таблица 10).

Реакция животных на прикосновение, боль и стук была более выраженной по сравнению с контролем в группах мышей, получавших исследуемую субстанцию в дозах 175, 875 и 1400 мг/кг на временном промежутке 60-120 минут тестирования. Наиболее отчетливо проявилась реакция животных на боль через 2 часа после введения им вещества ЗДМ-81 в максимальной дозе. Для этого параметра отмечена достоверность различий с контролем. В максимальной дозе также был отмечен тремор, подергивания и судорожные приступы у животных, которым вводили соединение ЗДМ-81 в дозе 1400 мг/кг. При введении изучаемого вещества в высоких дозах также были отмечены незначительные расстройства походки животных и легкая дискоординация. Тонус конечностей животных при введении им вещества ЗДМ-81 в дозах 875 и 1400 мг/кг был повышен до 4,3±0,33 и 4,7±0,33 баллов, соответственно (Таблица 11).

Изменений вегетативных эффектов у животных под действием исследуемого вещества в указанном диапазоне доз практически не наблюдалось, за исключением максимальной дозы субстанции 1400 мг/кг. В этой дозе на протяжении эксперимента наблюдалось увеличение числа уринаций животных, небольшой спад ректальной температуры тела, легкий цианоз ушей и хвоста, а также снижение частоты дыхательных движений (Таблица 12).

Таблица 10 - Регистрация общефармакологических эффектов при введении мышам различных доз изучаемого вещества ЗДМ-81 в диапазоне 17,5-1400 мг/кг в многопараметровом нейротоксикологическом тесте по S.Irwin, M±SEM

Тестируемые параметры	Норма, баллы	**Доза изучаемого соединения ЗДМ-81, мг/кг**														
		Контроль			17,5 (ED_{50})			175 (ED_{50} x 10)			875 (ED_{50} x 50)			1400 (ED_{50} x 80)		
		исход	60	120	исход	60	120	исход	60	120	исход	60	120	исход	60	120
Поведенческие реакции																
Вокализация	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	0,3±0,33	н	н	0,3±0,33	н	н	0,3±0,33	0,3±0,33
Настороженность	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	4,3±0,33	н	н	4,3±0,33	н	н	4,3±0,33	4,3±0,33
Пассивность	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Стереотипия	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	0,6±0,33	0,6±0,33
Беспокойство	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	0,3±0,21	н	н	1,0±0,57	1,0±0,57
Агрессия	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Груминг	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	3,7±0,33	н	н	3,7±0,33	н	н	3,3±0,33	3,3±0,33
Спонтанная двигательная активность	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	3,0±0,57	3,3±0,33

*Примечание: * - отличия достоверны в сравнении с контролем, one-way ANOVA с посттестом Даннета, p<0,05. н – значение соответствует норме.*

Таблица 11 - Регистрация общефармакологических эффектов при введении мышам различных доз изучаемого вещества ЗДМ-81 в диапазоне 17,5-1400 мг/кг в многопараметровом нейротоксикологическом тесте по S.Irwin, M±SEM

Тестируемые параметры	Норма, баллы	**Доза изучаемого соединения ЗДМ-81, мг/кг**														
		Контроль			17,5 (ED_{50})			175 (ED_{50} x 10)			875 (ED_{50} x 50)			1400 (ED_{50} x 80)		
		исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120
Нервно-мышечная возбудимость																
Реакция на прикосновение	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	4,6± 0,33	4,3± 0,33	н	4,6± 0,33	4,6± 0,33	н	5,0± 0,01	5,0± 0,01
Реакция на боль	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	4,6± 0,33	4,3± 0,33	н	4,6± 0,33	4,6± 0,33	н	5,3± 0,33 *	5,3± 0,33 *
Реакция на стук	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	4,6± 0,33	4,3± 0,33	н	4,6± 0,33	4,6± 0,33	н	5,0± 0,01	5,0± 0,01
Тремор	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	1,0± 0,57	1,0± 0,57
Подергивание	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	1,0± 0,57	1,0± 0,57
Судороги	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	1,0± 0,57	1,0± 0,57
Расстройство походки	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	0,3± 0,33	н	н	0,3± 0,33	0,3± 0,33
Тонус конечностей	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	4,3± 0,33	н	н	4,7± 0,33 *	4,3± 0,33 *

*Примечание: * - отличия достоверны в сравнении с контролем, one-way ANOVA с посттестом Даннета, p<0,05. н – значение соответствует норме.*

Таблица 12 - Регистрация общефармакологических эффектов при введении мышам различных доз изучаемого вещества ЗДМ-81 в диапазоне 17,5-1400 мг/кг в многопараметровом нейротоксикологическом тесте по S.Irwin, M±SEM

Тестируемые параметры	Норма, баллы	**Доза изучаемого соединения ЗДМ-81, мг/кг**														
		Контроль			17,5 (ED_{50})			175 (ED_{50} x 10)			875 (ED_{50} x 50)			1400 (ED_{50} x 80)		
		исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120	исх од	60	120
Вегетативные эффекты																
Птоз/экзофтальм	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Размер зрачка	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Саливация	0,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Уринация	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	4,7±0,33*	4,7±0,33*
Дефекация	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
Температура	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	3,3±0,33	3,3±0,33
Цвет кожи	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	3,3±0,33	3,3±0,33
ЧДД	4,0±0,01	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	3,0±0,57	3,0±0,57

*Примечание: * - отличия достоверны в сравнении с контролем, one-way ANOVA с посттестом Даннета, p<0,05.*
н – значение соответствует норме.

8.3. Оценка основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения ЗДМ-81 по показателям ADMET

Соединение ЗДМ-81 было исследовано с помощью 5 наиболее распространенных интернет-сервисов ADMET. Были спрогнозированы и оценены основные фармакокинетические и токсикологические показатели нового соединения с анксиолитической активностью. Сводные данные консенсусного прогноза приведены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты прогноза ADMET показателей соединения ЗДМ-81

Показатель	**Результат прогноза**
Абсорбция в ЖКТ	96%
Связывание с белками плазмы	90%
Проницаемость через ГЭБ	низкая
Растворимость в воде	низкая
Объем распределения	равномерный (0,335)
Класс острой токсичности	4
Показатель острой токсичности	766-1315 мг/кг
Канцерогенность	нет
Иммунотоксичность	нет
Мутагенность	нет
Цитотоксичность	нет
Кожное раздражение	нет
Ингибитор CYP3A4	да
Ингибитор CYP2D6	да
Ингибитор CYP2C9	да
Ингибитор CYP2C19	да

Согласно полученным результатам исследования, соединение ЗДМ-81 характеризуется хорошей всасываемостью в ЖКТ и достаточно невысокой степенью связывания с белками плазмы крови. По прогнозу, около 10% вещества, попавшего в системный кровоток, обусловливает его фармакологические эффекты. Соединение характеризуется невысокой степенью проницаемости через гематоэнцефалический барьер и практически не задерживается как в твердых тканях организма, так и в белковой фракции крови, о чем свидетельствуют средние значения объема распределения (0,335). Прогнозируемый показатель острой токсичности оказался ниже, чем полученный экспериментальным путем. Для соединения ЗДМ-81 не характерна мутагенность, иммунотоксичность и канцерогенность. Для действия вещества ЗДМ-81 не характерно раздражение

кожи. Метаболизм соединения происходит с вовлечением цитохромов CYP3A4, CYP2C19 и CYP2C9, а также, вероятно, и CYP2D6.

8.4. Заключение

В результате предварительного изучения острой токсичности соединения ЗДМ-81 на одном виде животного – мышей-самцов, величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) при внутрижелудочном введении составляет 1539,6 мг/кг и превосходит по безопасности аналогичный показатель препарата сравнения диазепама. По уровню острой токсичности ЗДМ-81 относятся к 3 классу токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976].

Для ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S. Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающие таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Преходящие изменения наблюдаются в 50-кратной дозе – 875 мг/кг на 60-й минуте теста, которые возвращаются к нормальных значениям через 2 часа после введения препарата. Указанные нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных нарушений у животных под действием соединения ЗДМ-81 в дозе, превышающей эффективную для проявления анксиолитической активности в 80 раз, вероятнее всего обусловлены близостью указанной дозы к средней летальной, вычисленной ранее – 1539,6 мг/кг.

По результатам ADMET-анализа, для соединения характерна хорошая всасываемость в ЖКТ, низкая степень связывания с белками плазмы крови и невысокая степень прохождения через ГЭБ. Соединение малотоксично как по показателям органотоксичности, так и острой токсичности. Согласно данным прогноза, метаболизм соединения происходит с вовлечением цитохромов CYP3A4, CYP2C19 и CYP2C9, а также, вероятно, и CYP2D6.

ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка лекарственных средств, действующих на ЦНС, занимает больше времени, чем других классов препаратов [Kaitlin, 2014, Gribkoff et al., 2017]. На протяжении последних 50 лет фармацевтическими компаниями был поддержан ряд исследований по открытию новых анксиолитических препаратов, а также изучению эффектов ГАМК-ергических, моноаминергических, глутаматергических, эндоканнабиноидных и нейропептидергических агентов животных и человека [Griebel et al., 2013]. Менее 10% перспективных нейротропных лекарственных кандидатов, выявленных в доклинических исследованиях, выходят на клинические испытания и фармацевтический рынок. В то же время, клинические испытания многих новых АФС были прекращены по разным причинам [Mandrioli et al., 2015]. От 50 до 60% препаратов отклонены по причине низкой эффективности, в то время как на низкую безопасность приходится 20-30% неудач [McArthur, 2017]. Низкий уровень успеха дорогостоящих клинических испытаний соединений привел к сокращению программ открытия и разработки лекарств для ЦНС крупными фармацевтическими компаниями вдвое с 2009 по 2014 год. В свою очередь, небольшие научные центры разработки лекарств, ориентированные на неврологические и психиатрические заболевания, значительно расширились в последние годы [Nutt et al., 2014; Yokley et al., 2017].

Бензодиазепины, такие как хлордиазепоксид и диазепам, являются эталонными анксиолитиками на протяжении многих лет. Механизм действия этих препаратов связан с аллостерической модуляцией специфических подтипов ГАМК-рецепторов и замедлением нейротрансмиссии ЦНС. Бензодиазепины эффективны при лечении обострений ГТР, социофобии и панических атак, но их эффективность при других тревожных состояниях ограничена [Blanchard et al., 2008; Baldwin et al., 2009]. Кроме того, длительное применение бензодиазепинов затруднено из-за возникновения побочных эффектов, в том числе седативного эффекта, нарушения памяти, толерантности и склонности к зависимости [Hoffman et al., 2008]. Бензодиазепины играют важную роль в лечении некоторых

тревожных расстройств, однако эти агенты также обычно используются в качестве препаратов второй линии или в качестве дополнения из-за проблем с переносимостью и склонностью к злоупотреблению. Преимущество этих агентов заключается в быстром начале действия, что позволяет использовать их на ранних этапах курса лечения, до проявления эффективности совместно применяемых СИОЗС/СИОЗСН. Данные, подтверждающие долгосрочную эффективность бензодиазепинов, более ограничены. Исследования показали, что совместное введение клоназепама с сертралином при лечении панического расстройства привело к значительно большей доле пациентов с положительной динамикой в группе сертралин/клоназепам в конце первой недели, но не по итогам всего исследования [Goddard et al., 2001].

Терапевтические ограничения, присущие бензодиазепиновым анксиолитикам, привели к поиску соединений, химически не связанных с бензодиазепинами, с более специфичным терапевтическим действием и со сглаженными нежелательными эффектами. В результате были разработаны новые соединения для преимущественного связывания со специфическими подтипами $ГАМК_A$-рецепторов, для сочетания предпочтительной аффинности и внутренней активности в отношении этих рецепторов или для демонстрации низкой эффективности в отношении каждого подтипа $ГАМК_A$-рецепторов [Rudolph et al., 2011]. Комплексная программа доклинических исследований показала обнадеживающие результаты и привела к клиническим исследованиям частичных агонистов рецепторов $ГАМК_A$ или агонистов субъединиц α_2 или α_3 $ГАМК_A$ рецептора для лечения ГТР.

Помимо ГАМК-ергической системы, выделены основные направления исследований по открытию анксиолитических препаратов. В связи с успехом селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) в качестве противотревожных средств, серотониновая система привлекла большое внимание и составляет более половины всех доклинических исследований новых анксиолитических препаратов [Griebel et al., 2013]. Нейропептиды, в частности кортикотропин-рилизинг-фактор (CRF), холецистокинин (CCK) и тахикинины,

также интенсивно изучались и составляют приблизительно 33% исследований. Кроме того, к 2012 году увеличилось количество доклинических исследований противотревожных средств, действующих на глутаматную и эндоканнабиноидную системы (рисунок 70).

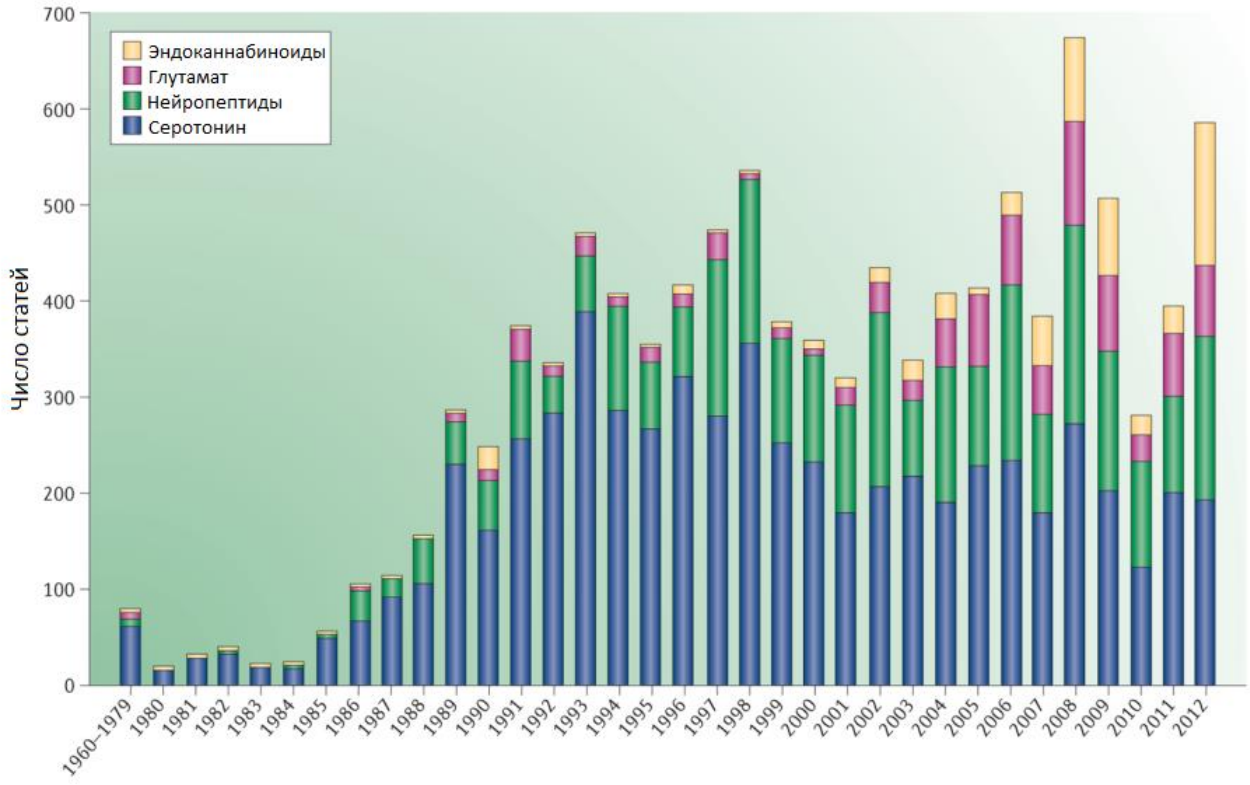


Рисунок 70 - Количество исследований по различным направлениям поиска новых анксиолитических средств в 1960-2012 гг [*перевод иллюстрации с Griebel & Holmes, 2013*]

Ввиду положительного соотношения пользы и риска селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (СИОЗСН) рекомендуются в качестве препаратов первого ряда для лечения тревожных заболеваний. Следует помнить о том, что начало анксиолитического эффекта этих антидепрессантов характеризуется латентным периодом от 2 до 4 недель (в некоторых случаях до 6 недель). Также может возникнуть повышенная возбудимость или усиление тревожных симптомов в течение первых 2 недель приема препаратов. Снижение начальной дозы антидепрессантов может уменьшить эти побочные эффекты. Обзор исследований с участием пациентов с депрессией показал, что СИОЗСН могут хуже переноситься, чем СИОЗС [Cipriani et al., 2009]. Однако, согласно

клиническому опыту, переносимость может различаться у разных пациентов, и также возможно, пациент может испытывать меньше побочных эффектов при переходе с СИОЗС на СИОЗСН [Bandelow et al., 2022].

Некоторые СИОЗС и СИОЗСН являются ингибиторами ферментов цитохрома P_{450} и, следовательно, могут взаимодействовать с другими психофармакологическими препаратами [Muscatello et al., 2012]. После прекращения лечения СИОЗС могут возникнуть реакции отмены. Однако они гораздо менее часты и тяжелы, чем реакции отмены, наблюдаемые после прекращения лечения бензодиазепинами. Эти побочные реакции могут возникать чаще при приеме пароксетина, чем при приеме сертралина или флуоксетина [Stahl et al., 1997].

Трициклические антидепрессанты и ингибиторы моноаминоксидазы достаточно эффективны при тревожных расстройствах, но обычно используются в качестве терапии второй линии из-за проблем с переносимостью и безопасностью. Противосудорожные препараты, включая габапентин и прегабалин, характеризуются неоднозначными данными, подтверждающими эффективность лишь при некоторых тревожных расстройствах [Murrough et al., 2015]. В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова (Москва, Россия) был разработан фабомотизол (Афобазол^{TM}) – производное бензимидазола, характеризующееся анксиолитическим эффектом, сходным с диазепамом, но без присущих последнему седативного и других побочных явлений [Середенин С.Б., Воронина Т.А., 2009; Капица И.Г. и др., 2019].

На современном этапе азотсодержащие гетероциклы представляют особый интерес для разработки новых препаратов или потенциальных лекарственных молекул [Deepika et al., 2011; Ahmad et al., 2017; Kalaria et al., 2018; Kerru et al., 2020; Heravi et al., 2020]. Хиноксалиновый скаффолд, образованный слиянием двух ароматических колец, бензола и пиразина, является одним из гетероциклов, которому уделяется наибольшее внимание [Montana et al. 2021]. Простота химического синтеза и широкий спектр биологических активностей позволяет позиционировать хиноксалиновый скаффолд как перспективный с точки зрения

синтеза на его основе активных фармацевтических субстанций для лечения и профилактики ряда заболеваний.

На кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ ранее создана база для проведения исследований нейропсихотропного действия новых рядов соединений различных химических классов – меркаптобензимидазолов, диазепино[1,2-α]бензимидазолов, циклопентаазуления бромидов, имидазопиразинов, тиазолов, триазолодиазепинов, бифенилов и многих других [Спасов и др., 2020; Maltsev et al., 2021a; Maltsev et al., 2021b]. Настоящая работа является первичным исследованием нейропсихотропной активности нового ряда ранее неисследованных производных хиноксалина с целью оценки перспективности работы в данном направлении, поиска высокоактивных соединений, а также возможного формирования практических рекомендаций по оптимизации существующих структур с учетом полученных экспериментальных данных.

На первом этапе исследования был проведен поиск новых высокоактивных нейропсихотропных средств среди 15 новых производных хиноксалина. Для решения поставленной задачи были выбраны тесты для поиска веществ: с анксиолитической активностью с применением методики «Приподнятый крестообразный лабиринт», с антидепрессивными свойствами в тесте «Подвешивания за хвост», а также с седативным эффектом в тесте «Открытое поле». На этом этапе были также изучены миорелаксирующие свойства новых соединений в тестах «Ротарод», «Сетка» и «Проволока». С целью проведения скрининга новых соединений на анксиолитическую активность и седативные свойства их доза была рассчитана эквимолярно препарату сравнения диазепаму в дозе 1 мг/кг. Для поиска веществ с антидепрессивным действием доза соединений была эквимолярна препарату сравнения амитриптилину в дозе 10 мг/кг [Спасов и др., 2020].

Основными показателями проявления анксиолитической активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» стали время, проведенное животными в открытых рукавах установки и количество выходов в них. Исследуемые

соединения проявили различный уровень противотревожного действия. Так, в результате проведенного исследования было показано, что для соединений ЗДМ-4 и ЗДМ-81 характерно анксиолитическое действие на уровне препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг. Под действием соединений ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-8, ЗДМ-84, ЗДМ-85, ЗДМ-86, ЗДМ-97, ЗДМ-98 и ЗДМ-99 время пребывания мышей в светлых рукавах установки оставалось на уровне контрольных значений или было снижено относительно него. Это может являться следствием развития седации у животных, а также свидетельствовать об отсутствии выраженного анксиолитического эффекта указанных соединений. Соединения ЗДМ-3 и ЗДМ-10 в данном тесте проявили эффект, близкий к анксиогенному.

При выявлении зависимости активности новых соединений от их структуры были отмечены следующие закономерности. Производное хиноксалина ЗДМ-86, где в качестве R_1 заместителя выступает 2-метил(фенил-N,N-диметилпропан-2-амин), а R_2 - 3,4-дихлорфенила, не проявило анксиолитической активности. Хотя по показателям числа свешиваний и выходов в светлый рукав установки показатели соединения превосходят группу контроля, статистически достоверных отличий обнаружено не было. Аналогичные результаты получены для ЗДМ-8 с индольным циклом в R_1 положении и 4-бромфенилом в R_2. В случае, когда первым заместителем выступал 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N,2-диметоксипропан-2-амин, а вторым - метил (ЗДМ-6), 4-бромфенил (ЗДМ-7, ЗДМ-84), бензо[b][1,4]оксазин-3(4H)-он (ЗДМ-85), анксиолитическая активность соединений также не была обнаружена. Таким образом, наиболее перспективным для проявления противотревожной активности новых производных хиноксалина является присутствие в R_1 положении 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина, в то время как замещение этого радикала на другие ведет к снижению искомой активности.

Среди производных с указанным заместителем в первом положении, присутствие 3,4-дихлорфенила в положении 2 (ЗДМ-10) ведет к снижению времени пребывания мышей в светлом рукаве установки ПКЛ относительно контроля, что может свидетельствовать об анксиогенном действии вещества.

Замена двух атомов хлора в радикале R_2 соединения ЗДМ-10 на атом брома (ЗДМ-3), метоксигруппу (ЗДМ-96), аминогруппу (ЗДМ-97), бензилоксигруппу (ЗДМ-98) или 4-(4-нитрофенокси)фенильную группу (ЗДМ-99) возвращала показатели на уровень контрольных значений. Животные под действием указанных соединений были малоактивны, не проявляли интереса к исследованию новых для них пространств, предпочитали оставаться в темных отсеках установки. Наличие в R_2 положении скаффолда фенильного радикала (ЗДМ-4) или 4-*трет*-бутилфенила (ЗДМ-81) являлось фактором проявления анксиолитического эффекта соединений на уровне препарата сравнения диазепама. Можно отметить, что указанные радикалы достаточно неполярны и характеризуются более равномерным распределением электронной плотности, нежели их аналоги, содержащие в R_2 атомы с выраженной электроотрицательностью – азот, кислород, галогены. Эта особенность приводит к росту анксиолитического потенциала новых соединений. С другой стороны, соединение ЗДМ-5 содержит нитрогруппу в *пара*-положении фенильного радикала, и для него характерен противотревожный эффект, близкий к уровню диазепама, хотя для ЗДМ-5 и не отмечена значимая достоверность различий с группой контроля.

Таким образом, присутствие заместителя во втором положении, не содержащего элементы с выраженной электроотрицательностью, (за исключением *пара*-нитрофенилзамещённого), а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина в положении 1, положительно влияло на проявление противотревожной активности новых производных хиноксалина в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг.

Было также проведено исследование активности производных хиноксалина в тесте «Открытое поле». Для соединения ЗДМ-3 отмечено значимое подавление двигательной активности животных, что может быть связано с его анксиогенным потенциалом, описанным в результатах теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Аналогичная закономерность, но без значимых различий, наблюдается для соединений ЗДМ-5, ЗДМ-85, ЗДМ-97 и ЗДМ-99 – мыши под влиянием этих

соединений совершали меньше передвижений по «Открытому полю» по сравнению с контролем. После введения животным соединений под шифром ЗДМ-4, ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-10, ЗДМ-81, ЗДМ-84, ЗДМ-86, ЗДМ-96 и ЗДМ-98 показатели горизонтальной двигательной активности соответствовали уровню контрольных значений. Соединение ЗДМ-8 статистически значимо повышало уровень двигательной активности мышей в сравнении с контролем ($p<0,05$). Для этого соединения отмечена возможная психостимулирующая активность.

В результате первичной оценки нейропсихотропного действия новых соединений было показано, что для экспериментальных соединений не характерно антидепрессивное действие в тесте «Подвешивания за хвост». В условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» при введении мышам изучаемых веществ наблюдался анксиолитический эффект, выраженный в увеличенном времени пребываний животных в светлых рукавах установки, а также более частыми заходами мышей на освещенные участки лабиринта. Число выходов в центр «Открытого поля», а также увеличенное число обследованных норок в условиях указанного теста в сравнении с контрольной группой соответствует выявленной атарактической активности экспериментальных субстанций. Не было отмечено миорелаксирующего действия для изученного ряда соединений в тестах «Ротарод», «Сетка» и «Проволока». Исходя из изложенного, был сделан вывод о перспективности изучения противотревожной активности среди производных хиноксалина, а именно соединения, проявившего наиболее выраженную активность - 2-(2-{[3-(4-трет-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорида под шифром ЗДМ-81.

На втором этапе исследования была подтверждена противотревожная активность соединения ЗДМ-81. Был оценен психорелаксирующий потенциал соединения ЗДМ-81 в зависимости от дозы и времени его введения мышам в условиях методики «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом. По результатам проведенного углубленного изучения анксиолитических свойств соединения под шифром ЗДМ-81, было выявлено, что

наиболее эффективной дозой для проявления анксиолитического эффекта вещества является 17,5 мг/кг. Действие субстанции достаточно отчетливо выражено через 30 минут после внутрижелудочного введения мышам и сохраняется на том же уровне в течение 4-6 часов, после чего идет на спад: через 12 часов после введения соединения животным в условиях методики «Приподнятый крестообразный лабиринт» время и число выходов животных в открытые рукава установки приближается к контрольным значениям.

Согласно «Рекомендациям по доклиническому изучению лекарственных средств» [Миронов, 2012], необходимо как минимум три теста для подтверждения анксиолитического действия новых соединений, один из которых должен содержать конфликтную парадигму. Для решения поставленной задачи был сформирован перечень тестов для проверки анксиолитических свойств ЗДМ-81: «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние животных» и «Конфликтная ситуация по Vogel». Были проведены дополнительные исследования свойств нового соединения в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» на крысах, поскольку необходимо оценить атарактический потенциал вещества как минимум на двух видах животных. Во всех указанных экспериментах анксиолитический эффект ЗДМ-81 не уступает препарату сравнения диазепаму в эффективной дозе 1 мг/кг. Для соединения ЗДМ-81 также отмечено отсутствие значимого влияния на профиль двигательной активности грызунов, а также стимуляция исследовательского рефлекса животных в тесте «Открытое поле».

На следующем этапе была оценена способность соединения ЗДМ-81 влиять на иные виды нейропсихотропной активности *in vivo*. Для реализации поставленной задачи были оценены антикомпульсивный, миорелаксирующий, антидепрессивный, анальгетический и противосудорожный эффекты соединения.

На основании проведенного исследования было установлено, что для соединения с анксиолитической активностью ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг характерен спектр нейропсихотропных эффектов. Отмечен антикомпульсивный потенциал экспериментального соединения в тесте

«Закапывания шариков», не уступающий диазепаму в дозе 1 мг/кг. Не зафиксировано антидепрессивных свойств соединения в тесте «Принудительного плавания по Porsolt» по сравнению с классическими трициклическими антидепрессантами амитриптилином и имипрамином в дозах 10 и 8 мг/кг, соответственно. Аналогичные закономерности отмечены для соединения ЗДМ-81 и в тесте «Подвешивания за хвост».

При изучении анальгетических свойств ЗДМ-81 показано, что для соединения характерны супраспинальные механизмы антиноцицептивного эффекта в тесте «Горячая пластина» в сравнении с буторфанолом в дозе 1 мг/кг, в то время как в тесте «Отдергивания хвоста» уровень эффекта ЗДМ-81 соответствовал контрольным значениям. Зарегистрировано противосудорожное действие производного хиноксалина в тесте «Максимальный электрошок» в сравнении с вальпроевой кислотой в дозе 240 мг/кг, выражающееся в снижении летальности животных после получения электростимуляции. Не отмечено антиконвульсивного эффекта для соединения ЗДМ-81 в тесте «Коразоловые судороги» в сравнении с диазепамом в дозе 2 мг/кг. Не зафиксировано влияния соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус мышей в тестах «Сетка», «Проволока» и «Ротарод» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, что позволяет сделать вывод об отсутствии миорелаксирующего эффекта исследуемого соединения.

По результатам исследования взаимодействия соединения ЗДМ-81 с основными лигандами нейромедиаторных систем *in vivo* было показано, что для экспериментальной субстанции характерно влияние на серотонинергическую, ГАМК-ергическую и дофаминергическую системы.

В тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез» зарегистрировано пролонгирование эффектов 5-ГТФ: после 40-й минуты наблюдения в группе 5-гидрокситриптофана число встряхиваний мышами головой убывало, в то время как в опытной группе параметр был выражен отчетливо. Основываясь на полученных данных, можно предположить наличие 5-HT_{2A}-серотонинегического действия соединения ЗДМ-81.

В тесте взаимодействия с антагонистом бензодиазепиновых рецепторов флумазенилом показано блокирование указанным антагонистом как препарата сравнения диазепама в дозе 1 мг/кг, так и экспериментальной субстанции ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», что может свидетельствовать о связи между реализацией эффекта соединения ЗДМ-81 и бензодиазепинового рецептора.

В тесте «Каталепсии, вызванной галоперидолом» на 45-120 минутах наблюдения зафиксировано снижение уровня каталепсии крыс под действием соединения ЗДМ-81. В то же время, в тесте взаимодействия с апоморфином соединение ЗДМ-81 не проявило активности. Можно предположить некоторое влияние изучаемой субстанции на D_2-дофаминергическую систему, что требует дальнейшего изучения и уточнения.

В тесте взаимодействия с пикротоксином не показано значимого изменения эффектов пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг. Принимая во внимание ранее проведенное исследование взаимодействия с флумазенилом, можно предположить отсутствие прямого ГАМК-миметического действия изучаемого соединения и возможное влияние на рецепторный комплекс ГАМК путем аллостерической модуляции. Сводные данные о взаимодействии соединения ЗДМ-81 с нейромедиаторными лигандами ЦНС *in vivo* представлены в Таблице 14.

По результатам изучения влияния введения соединения ЗДМ-81 на содержание основных моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей линии C57BL/6 методом ВЭЖХ было показано, что для экспериментального соединения ЗДМ-81 характерно серотонинергическое действие, что согласуется с данными, полученными в ходе фармакологического анализа действия вещества в тесте с 5-гидрокситриптофаном. Более того, соотношения метаболизма ДОФУК/дофамин и 5-ОИУК/серотонин для исследуемого соединения наиболее близки к параметрам флуоксетина, вводимого мышам в дозе 15 мг/кг.

На последнем этапе была исследована острая токсичность соединения ЗДМ-81 на мышах, а также его возможные нейротоксикологические эффекты в

тесте по S.Irwin. В результате предварительного изучения острой токсичности соединения ЗДМ-81 на одном виде животного – мышах-самцах, величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) при внутрижелудочном введении составляет 1539,6 мг/кг и превосходит по безопасности аналогичный показатель препарата сравнения диазепама (700 мг/кг). По уровню острой токсичности ЗДМ-81 относятся к 3 классу токсичности [Спасов А.А. и др., 2021].

Таблица 14 - Взаимодействие соединения ЗДМ-81 с различными агонистами и антагонистами медиаторных систем ЦНС in vivo

Регистрируемый параметр	Зарегистрированный эффект
Холинергическая система	
Тремор и судороги, обусловленные никотином	отсутствие
Ареколиновый тремор	отсутствие
Адренергическая система	
Клофелиновая гипотермия	отсутствие
Резерпиновая гипотермия	отсутствие
Дофаминергическая система	
Галоперидоловая каталепсия	↓
Апоморфиновая стереотипия	отсутствие
Стереотипия, обусловленная L-ДОФА	отсутствие
Серотонинергическая система	
5-гидрокситриптофановый гиперкинез	↑
ГАМК-ергическая система	
Пикротоксиновые судороги	отсутствие
Флумазенил	↓

Примечание: ↑ - усиление эффекта; ↓ - ослабление эффекта.

Для ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S.Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающие таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Изменения наблюдаются в 50-

кратной дозе – 875 мг/кг на 60-й минуте теста, которые возвращаются к нормальных значениям через 2 часа после введения препарата. Указанные нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных нарушений у животных под действием соединения ЗДМ-81 в дозе, превышающей эффективную для проявления анксиолитической активности в 80 раз, вероятнее всего обусловлены близостью указанной дозы к средней летальной, вычисленной ранее – 1539,6 мг/кг.

Таким образом, в ходе проведенного исследования были изучены анксиолитические, антидепрессивные и седативные свойства нового ряда производных C^2,C^3-хиноксалина. Показано, что введение соединения под шифром ЗДМ-81 приводит к проявлению анксиолитического эффекта *in vivo* в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние животных» и «Конфликтная ситуация по Vogel», не уступающего препарату сравнения диазепаму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные хиноксалина являются перспективным химическим классом веществ, проявляющих анксиолитическую активность. При первичном поиске веществ с транквилизирующей активностью в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» 15 изученных соединений под шифрами ЗДМ-3, ЗДМ-4, ЗДМ-5, ЗДМ-6, ЗДМ-7, ЗДМ-8, ЗДМ-10, ЗДМ-81, ЗДМ-84, ЗДМ-85, ЗДМ-86, ЗДМ-96, ЗДМ-97, ЗДМ-98 и ЗДМ-99 проявили различный уровень анксиолитического эффекта.

Наиболее значимую атарактическую активность, не уступающую препарату сравнения диазепаму, зарегистрировали под влиянием соединений ЗДМ-4 и ЗДМ-81. Активные соединения характеризуются высоким сходством их химической структуры, но у соединения ЗДМ-81 в положении 4 фенильного радикала (R_2) находится *трет*-бутильный радикал, в то время как в структуре соединения ЗДМ-4 в указанном положении находится атом водорода. В дополнение к указанным различиям, субстанции отличаются солевым остатком – гидробромид и гидрохлорид для ЗДМ-4 и ЗДМ-81, соответственно. Указанные радикалы достаточно неполярны и характеризуются более равномерным распределением электронной плотности, нежели их аналоги, содержащие в R_2 атомы с выраженной электроотрицательностью – азот, кислород, галогены. Эта особенность приводит к росту анксиолитического потенциала новых соединений.

Таким образом, присутствие заместителя во втором положении, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью (за исключением *пара*-нитрофенилзамещённого), а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина в положении 1, положительно влияло на проявление противотревожной активности новых производных хиноксалина в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг. Введение остальных 13 соединений не повлекло за собой проявление выраженного анксиолитического действия, сопоставимого с диазепамом. Для проведения углубленного изучения транквилизирующей активности было выбрано соединение ЗДМ-81.

При изучении анксиолитического действия соединения ЗДМ-81 в зависимости от дозы и от времени введения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» было показано, что наиболее эффективной дозой для проявления анксиолитического эффекта вещества является 17,5 мг/кг. Действие субстанции достаточно отчетливо выражено через 30 минут после внутрижелудочного введения мышам и сохраняется на том же уровне в течение 4-6 часов, после чего идет на спад: и приближается к контрольным значениям через 12 часов после введения. Противотревожная активность ЗДМ-81 была проверена с применением тестов «Темная/светлая камера», «Открытое поле», «Тревожно-фобическое состояние» и конфликтной методики «Конфликтная ситуация по Vogel». Во всех указанных экспериментах анксиолитический эффект ЗДМ-81 не уступает препарату сравнения диазепаму в эффективной дозе 1 мг/кг.

Были оценены дополнительные нейропсихотропные эффекты соединения ЗДМ-81 *in vivo* - антикомпульсивный, миорелаксирующий, антидепрессивный, анальгетический и противосудорожный эффекты соединения. Показано, что для соединения с анксиолитической активностью ЗДМ-81 в эффективной дозе 17,5 мг/кг отмечен антикомпульсивный потенциал в тесте «Закапывания шариков», противосудорожное действие в тесте «Максимальный электрошок», супраспинальные механизмы антиноцицептивного эффекта в тесте «Горячая пластина». Не зафиксировано влияния соединения ЗДМ-81 на мышечный тонус мышей в тестах «Сетка», «Проволока» и «Ротарод» в сравнении с диазепамом в дозе 1 мг/кг, что позволяет сделать вывод об отсутствии миорелаксирующего эффекта изучаемого соединения.

Нейрофармакологический анализ *in vivo* возможных механизмов действия соединения ЗДМ-81 выполняли путем определения влияния изучаемого соединения на эффекты стимуляторов и блокаторов основных нейромедиаторных систем головного мозга. Было показано, что для экспериментальной субстанции характерно влияние на серотонинергическую, ГАМК-ергическую и дофаминергическую системы:

1. В тесте «5-гидрокситриптофановый гиперкинез» зарегистрировано пролонгирование эффектов 5-ГТФ под влиянием соединения ЗДМ-81.

2. Флумазенил блокировал анксиолитические эффекты соединения ЗДМ-81 в условиях методики «Приподнятый крестообразный лабиринт»

3. Введение животным соединения ЗДМ-81 уменьшало проявление галоперидоловой каталепсии.

Нейрохимический анализ влияния соединения ЗДМ-81 на содержание моноаминов и их метаболитов определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Соотношения метаболизма ДОФУК/дофамин и 5-ОИУК/серотонин для исследуемого соединения, вычисленные по результатам проведенной методики ВЭЖХ, наиболее близки к параметрам флуоксетина, вводимого мышам в дозе 15 мг/кг.

Изучение лекарственной безопасности соединения ЗДМ-81 выполняли в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» - ч. 1, (Москва, 2012) с применением адекватных моделей и методов. При изучении острой токсичности вещества ЗДМ-81 установлено, что величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) соединения при внутрижелудочном введении мышам составляет 1539,6 мг/кг и превосходит по безопасности аналогичный показатель препарата сравнения диазепама (700 мг/кг). По уровню острой токсичности ЗДМ-81 относятся к 3 классу токсичности [ГОСТ 12.1.007–76, 1976]. Для ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S.Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающие таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных функций у животных под действием соединения ЗДМ-81 в дозе 1400 мг/кг, вероятнее всего, обусловлены близостью указанной дозы к средней летальной, вычисленной ранее – 1539,6 мг/кг.

В результате исследования был проведен поиск новых высокоактивных нейропсихотропных соединения среди нового ряда производных хиноксалина и было найдено соединение с анксиолитической активностью под шифром ЗДМ-81. Доказана выраженная анксиолитическая активность данного вещества, не

уступающая диазепаму по ряду тестов. Предполагается возможный моноаминовый механизм реализации эффекта нового соединения с противотревожными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Новый ряд химических производных C^2,C^3-хиноксалина является перспективной группой соединений для поиска веществ, проявляющих анксиолитическую активность.

2. Важным фактором проявления противотревожной активности новых соединений является наличие во втором положении хиноксалинового скаффолда заместителя, не содержащего элементы с отчетливой электроотрицательностью, за исключением пара-нитрофенилзамещённого, а также 2-метил-(4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амина в положении 1.

3. Соединение под шифром ЗДМ-81, 2-(2-{[3-(4-*трет*-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид, характеризуется наиболее высокой анксиолитической активностью, превосходящей препарат сравнения диазепам.

4. Для соединения ЗДМ-81 не отмечено антидепрессивного действия в условиях методик «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание по Porsolt».

5. В тесте «Максимальный электрошок» процент летальности животных был снижен на 67% под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг по сравнению с контролем и соответствовал уровню вальпроевой кислоты в дозе 240 мг/кг.

6. В тесте «Горячая пластина» под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг отмечен антиноцицептивный эффект, выраженный в удлинении латентного периода полизывания задней лапы мышей на 20% относительно контроля и уступающий уровню бутофанола в дозе 1 мг/кг в 2,5 раза.

7. Соединение ЗДМ-81 увеличивало гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном, анксиолитический эффект соединения устранялся флумазенилом, а каталептогенные эффекты галоперидола были ослаблены.

8. По результатам проведенного исследования содержания моноаминов и их метаболитов в головном мозге мышей показано, что концентрация серотонина в

пробах была повышена на 40% по сравнению с группой контроля под влиянием соединения ЗДМ-81 в дозе 17,5 мг/кг.

9. Величина среднесмертельной дозы (LD_{50}) соединения ЗДМ-81 при внутрижелудочном введении мышам составляет 1539,6 мг/кг. Соединение относится к 3 классу токсичности.

10. По результатам ADMET-анализа, для соединения характерна хорошая всасываемость в ЖКТ, низкая токсичность, низкая степень связывания с белками плазмы крови и низкая степень прохождения через ГЭБ.

11. Для соединения ЗДМ-81 не характерно изменение функционально-поведенческого статуса животных, изученного по методу S.Irwin в дозе 17,5 мг/кг и превышающие таковую в 10 раз – 175 мг/кг. Нарушения поведенческих, вегетативных и нервно-мышечных функций у животных под действием соединения ЗДМ-81 наблюдаются в дозе 1400 мг/кг.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Синтез и поиск веществ с нейропсихотропной активностью среди новых производных хиноксалинового скаффолда является перспективным направлением.

2. Соединение ЗДМ-81 - 2-(2-{[3-(4-*трет*-бутилфенил)хиноксалин-2-ил]метил}-4,5-диметоксифенил)-N-метилэтан-1-амин гидрохлорид - проявляющее широкий спектр фармакологических свойств – анксиолитической, антидепрессивной и анальгетической активностей, является перспективной субстанцией для дальнейшего расширенного доклинического изучения ее нейропсихотропных эффектов.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-НТ-R – серотониновый рецептор

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан

АФС – активная фармакологическая субстанция

ГАМК - γ-Аминомасляная кислота

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

D-рецептор – дофаминовые рецепторы

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин

МАО – моноаминоксидаза

ОП – установка «Открытое поле»

ПКЛ – установка «Приподнятый крестообразный лабиринт»

ТСК – установка «Темная-светлая камера»

ТФС – тест «Оценка тревожно-фобического состояния животных»

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агацарская, Я. В. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1(69). – С. 120-124.

2. Андреева, Н. И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ [Текст] / Н. И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.

3. Александровский, Ю. А. Социогенные психические расстройства / Ю. А. Александровский // Российский психиатрический журнал. – 2014. – № 3. – С. 19-23.

4. Арзамасцев, Е. В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е. В. Арзамасцев, И. В. Березовская, О. Л. Верстакова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 2012. – С. 13-24.

5. Арушанян, Э. Б. Сравнительная оценка эпифизарного мелатонина и бензодиазепиновых анксиолитиков / Э. Б. Арушанян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75. – № 3. – С. 35-40.

6. Багметова, В. В. Изучение острой токсичности цитрокарда - нового производного фенибута с кардио- и нейропротекторным действием / В. В. Багметова, Л. И. Бугаева, И. Н. Тюренков, Е. А. Кузубова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2017. - № 1 (61). - С. 33-35.

7. Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - Л.: Медицина, 1963. - 148 с.

8. Бугаева, Л. И. Исследование острой токсичности бромантана / Л. И. Бугаева, В. Е. Веровский, И. Н. Иежица, А. А. Спасов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63. – № 1. – С. 57-61.

9. Бугаева, Л. И. и др. Нейротоксикологические свойства препарата "бендазол" // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 2(42). – С. 83-86.

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. Воронина, Т. А. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств / Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Т. Л. Гарибова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. - 2012. - Т. 1. – С. 264-275.

12. Жмуренко, Л. А. Синтез и противосудорожная активность производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридинов / Л. А. Жмуренко, Т. А. Воронина, С. А. Литвинова, Л. Н. Неробкова, И. О. Гайдуков, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева // Химико-фармацевтический журнал. - 2018. - № 52 (1). - С. 19-28.

13. Капица, И. Г. Коррекция афобазолом тревоги при моделировании аутизма / И. Г. Капица, Е. А. Иванова, Т. А. Воронина, А. П. Калинина, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82. - № 10. – С. 3-7.

14. Ковалев, Д. Г. и др. Нейрохимический механизм антидепрессивного действия нового производного аденина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73. – № 12. – С. 13-16.

15. Коновалова, Д.С. Количесвтенное определение флавоноидов в траве пиретрума девичьего / Д. С. Коновалова, Д. А. Коновалов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сборник научных трудов / Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2011. – С. 117-118.

16. Лебедев, А. А. Антагонист рецепторов кортиколиберина астрессин снимает тревожнофобические состояния у крыс, выращенных в социальной изоляции / А. А. Лебедев, А. Г. Пшеничная, Е. Р. Бычков // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2016. - Т. 14. - № 4.- С. 24-29.

17. Мальцев, Д. В. и др. Анализ взаимодействия производного диазепино[1,2-а]бензимидазола соединения ДАБ-21 с основными лигандами нейромедиаторных систем // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 1(77). – С. 131-136.

18. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев [и др.] - 2012. – 944 с.

19. Островская, Р. У. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств / Р. У. Островская, К. С. Раевский, Т. А. Воронина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А. Н. Миронова. – Ч. 1 – 2012. – Т. 1. – С. 251-263.

20. 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. Н. Тюренков, Л. И. Бугаева, В. В. Багметова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 3. – С. 13.

21. Полковникова, Ю. А. Возможности создания пролонгированных лекарственных форм афобазола / Ю. А. Полковникова, Э. Ф. Степанова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т. 13. – № 4 (99). – С. 190-193.

22. Середенин, С. Б. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола / С. Б. Середенин, М. В. Воронин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72. – № 1. – С. 3-11.

23. Середенин, С. Б. Современная фармакотерапия эмоционально-стрессовых расстройств / С. Б. Середенин, Т. А. Воронина // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8. - № 3. – С. 32-40.

24. Смирнова, Л. А. и др. Особенности пробоподготовки для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения малорастворимых соединений // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2013. - № 2 (38). - С. 14-16.

25. Смирнова, Л. А. и др. Разработка метода количественного определения нового производного гамма-аминомасляной кислоты в биологических пробах // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2013. – №. 2(38). – С. 17-19.

26. Смирнова, Л. А. и др. Разработка методики количественного определения производного ГАМК салифена // Химико-фармацевтический журнал. - 2019. - Т. 53. - № 11. - С. 62-64.

27. Спасов, А. А. Анксиолитическая Активность Производных 11Н-2,3,4,5-Тетрагидро[1,3]Диазепино[1,2-А]Бензимидазола И 2-Меркаптобензимидазола / А. А. Спасов, О. Н. Жуковская, Д. В. Мальцев, М. В. Мирошников, М. О. Скрипка, К. Т. Султанова, А. С. Морковник // Биоорганическая химия. - 2020. - Т. 46. - № 1. - С. 92-100.

28. Спасов, А. А. и др. Анксиолитический потенциал нового ряда производных диазепинобензимидазола // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3(67). – С. 19-23.

29. Спасов, А. А. Антидепрессивная активность и потенциальные механизмы действия производного диазепинобензимидазола ДАБ-19 / А. А. Спасов, Д. В. Мальцев, М. В. Мирошников, А. С. Таран, Б. Р. Нурмагомедова, М. О. Скрипка, Т. А. Кузьменко, А. С. Морковник, Л. Н. Диваева // Экспериментальная и клиническая фармакология. - Т. 83. - № 4. – 2020. - с. 31-36.

30. Спасов, А. А. Антидепрессивная активность и потенциальные механизмы действия производного диазепинобензимидазола ДАБ-19 / А. А. Спасов, Д. В. Мальцев, М. В. Мирошников, А. С. Таран, Б. Р. Нурмагомедова, М. О. Скрипка, Т. А. Кузьменко, А. С. Морковник, Л. Н, Диваева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83. - №.4. – С. 31-36.

31. Спасов, А. А. Оценка острой токсичности нового производного бензимидазола с антитромбогенными свойствами / А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, Д. В. Мальцев, М. В. Мирошников, В. С. Сиротенко, К. Т. Султанова, К. А. Гайдукова, М. О. Скрипка // Токсикологический вестник. – 2021. - Т. 1. – 52-57.

32. Спасов, А. А. и др. Нейротоксикологические свойства соединения РУ-891 с антитромбогенной активностью // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2019 - №3(71). – С. 116-119.

33. Султанова, К. Т. и др. Анксиолитические свойства соединения РУ-31 / Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. - №3(67). – С. 28-32.

34. Трегубова, И. А. и др. Мнемотропная и анксиолитическая активность мексидола и эноксифола // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2015. – № 4. – С. 10.

35. Тюренков, И. Н. Роль ГАМК-рецепторов в развитии патологических процессов / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74. – № 2. – С. 47-52.

36. Шабанов, П. Д. Влияние фенамина на поведенческие компоненты обсессивнокомпульсивного и аддиктивного игрового поведения в тесте закапывания шариков у крыс / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, Н. Д. Якушина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14. – №. 3. – С. 46-52.

37. Шабанов, П. Д. Моделирование обсессивно-компульсивного и аддиктивного игрового поведения у крыс введением фенамина в тесте закапывания шариков / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, Н. Д. Якушина // Наркология. - 2017.- Т. 16. - № 1. - С. 32-38.

38. Шабанов, П. Д. Экспериментальное исследование нового анксиолитика транквиридина / П. Д. Шабанов, А. И. Морозов, А. А. Лебедев // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2016. - Т. 15. - № 2. - С. 5-14.

39. Abu-Hashem, A. A., Gouda M. A., Badria F. A. Synthesis of some new pyrimido [2′, 1′: 2, 3] thiazolo [4, 5-b] quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents // European journal of medicinal chemistry. – 2010. – Т. 45. – №. 5. – С. 1976-1981.

40. Abul-Khair, H. et al. Synthesis and Evaluation of Some New (1, 2, 4) Triazolo (4, 3-a) Quinoxalin-4 (5H)-one Derivatives as AMPA Receptor Antagonists // Journal of Heterocyclic Chemistry. – 2013. – Т. 50. – №. 5. – С. 1202-1208.

41. Aguirre, G. et al. Quinoxaline N, N′-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of Trypanosoma cruzi. Structure–activity relationships // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2004. – Т. 14. – №. 14. – С. 3835-3839.

42. Ahmad, I. et al. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents // MedChemComm. – 2017. – Т. 8. – №. 5. – С. 871-885.

43. Ajani, O. O. Present status of quinoxaline motifs: Excellent pathfinders in therapeutic medicine // European journal of medicinal chemistry. – 2014. – Т. 85. – С. 688-715.

44. Ammar, Y. A. et al. Some reactions with quinoxaline-2,3-dicarboxylic acid anhydride: Novel synthesis of thieno[2,3-d]pyrimidines and pyrrolo[3,4-b]quinoxalines as antimicrobial agents. – 2002.

45. Antonik, L. M. et al. Complex of polyvinylpyrrolidone and 2,3-bis-(hydroxymethyl)quinoxaline 1,4-di-Noxide (dioxydinum) and it using as antibacterial complex with prolonged effect : пат. RU2304589C1 Россия. – 2007.

46. Blanchard, R. J. et al. Introduction to the handbook on fear and anxiety // Handbook of Behavioral Neuroscience. – 2008. – Т. 17. – С. 3-7.

47. Baldwin, D. S., Ajel K. I., Garner M. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder // Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment. – 2009. – С. 453-467.

48. Balfour Jr, H. H. Antiviral drugs // New England Journal of Medicine. – 1999. – Т. 340. – №. 16. – С. 1255-1268.

49. Bandelow, B., Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century // Dialogues in clinical neuroscience. – 2022.

50. Bandelow, B., Michaelis S., Wedekind D. Treatment of anxiety disorders // Dialogues in clinical neuroscience. – 2022.

51. Banerjee, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals // Nucleic acids research. – 2018. – Т. 46. – №. W1. – С. W257-W263.

52. Bangalore, R. et al. Metal complexes with anticancer activity : заяв. пат. 12378356 США. – 2010.

53. Barea, C. et al. New amide derivatives of quinoxaline 1, 4-di-N-oxide with leishmanicidal and antiplasmodial activities // Molecules. – 2013. – Т. 18. – №. 4. – С. 4718-4727.

54. Benedini, F., et al. Derivatives of alpha2-adrenergic receptor agonist : пат. US2008318965A1 США. – 2008.

55. Bhatt, S. et al. Anxiolytic-like effect of (4-benzylpiperazin-1-yl)(3-methoxyquinoxalin-2-yl)methanone (6g) in experimental mouse models of anxiety // Indian Journal of Pharmacology. – 2013. – Т. 45. – №. 3. – С. 248.

56. Botturi, A. et al. The role and the effect of magnesium in mental disorders: a systematic review // Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 6. – С. 1661.

57. Boese, R. et al. Indolo[2,3-b]-,Indeno[1,2-b]- and Indeno[2,1-b]pyrido[2,3-f]quinoxaline-3-carboxylic acids and esters, processes for their preparation and their use as antiviral, antibiotic and antitumor agents : пат. EP2128160A1 США. – 2009.

58. Bui, M. H. T. et al. Pyrazolo-pyrimidin-amino-cycloalkyl compounds and their therapeutic uses : пат. 11046699 США. – 2021.

59. Burguete, A. et al. Synthesis and biological evaluation of new quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-inflammatory agents // Chemical biology & drug design. – 2011. – Т. 77. – №. 4. – С. 255-267.

60. Campiani, G. et al. Pyrroloquinoxaline derivatives as high-affinity and selective 5-HT3 receptor agonists: synthesis, further structure− activity relationships, and biological studies // Journal of medicinal chemistry. – 1999. – Т. 42. – №. 21. – С. 4362-4379.

61. Capaldi, C. et al. Novel compounds : пат. US2017/342056 A1 США. - 2017.

62. Carta, A. et al. Chemistry, biological properties and SAR analysis of quinoxalinones // Mini reviews in medicinal chemistry. – 2006. – Т. 6. – №. 11. – С. 1179-1200.

63. Carta, A., Corona P., Loriga M. Quinoxaline 1, 4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities // Current medicinal chemistry. – 2005. – Т. 12. – №. 19. – С. 2259-2272.

64. Cheng, F. et al. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. – 2012.

65. Christensen, M. K. et al. The cost of mental disorders: a systematic review // Epidemiology and psychiatric sciences. – 2020. – Т. 29.

66. Cinelli, M. A. et al. First Contact: 7-Phenyl-2-Aminoquinolines, Potent and Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors That Target an Isoform-Specific Aspartate // Journal of medicinal chemistry. – 2020. – Т. 63. – №. 9. – С. 4528-4554.

67. Cipriani, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis // The lancet. – 2009. – Т. 373. – №. 9665. – С. 746-758.

68. Cirrincione, G., Diana, P. Isoindolo-quinoxaline derivatives having antitumor activity, process for their production and their use. – 2008.

69. Claus, E. et al. Chinoxalin derivatives and use thereof for treating malignant and benign tumour illnesses : пат. EP2241557A1 США. - 2010.

70. Cox, B., Potkonjak, D. The effect of ambient temperature on the actions of tremorine on body temperature and on the concentration of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and acetylcholine in rat brain // British Journal of Pharmacology and Chemotherapy. – 1967. – Т. 31. – №. 2. – С. 356.

71. Croft, S. L., Coombs, G. H. Leishmaniasis–current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs // Trends in parasitology. – 2003. – Т. 19. – №. 11. – С. 502-508.

72. Curry, S. L., Cogar, S. M., Cook, J. L. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: a review // Journal of the American Animal Hospital Association. – 2005. – Т. 41. – №. 5. – С. 298-309.

73. Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-13.

74. D'Amour, F. E. et al. A method for determining loss of pain sensation // J Pharmacol Exp Ther. – 1941. – Т. 72. – №. 1. – С. 74-9.

75. Deepika, Y. et al. Biological activity of quinoxaline derivatives // International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research. – 2011. – Т. 1. – №. 3. – С. 33-46.

76. Deleuze-Masquefa, C. et al. Imidazol [1, 2-α] quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers : пат. 8378098 США. – 2013.

77. Deng, L. P. Pyrazolo N-substituted dehydronorcantharidin imide derivative as well as synthesis method, activity test method and application thereof. – 2010.

78. Dong, J. et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database // Journal of cheminformatics. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-11.

79. Doran, C. M., Kinchin I. A review of the economic impact of mental illness // Australian Health Review. – 2017. – Т. 43. – №. 1. – С. 43-48.

80. Fairchild, A. L., Bayer, R. HIV surveillance, public health, and clinical medicine—Will the walls come tumbling down? // New England Journal of Medicine. – 2011. – Т. 365. – №. 8. – С. 685-687.

81. Field, A. K., Biron, K. K. "The end of innocence" revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs // Clinical microbiology reviews. – 1994. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-13.

82. Fioravanti, B., Vanderah, T. W. The ORL-1 receptor system: are there opportunities for antagonists in pain therapy? // Current topics in medicinal chemistry. – 2008. – Т. 8. – №. 16. – С. 1442-1451.

83. Fournier, P. A. et al. Design and synthesis of potent, isoxazole-containing renin inhibitors // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – Т. 22. – №. 8. – С. 2670-2674.

84. Gai, Y., Or Y. S., Wang Z. Quinoxaline-containing compounds as hepatitis C virus inhibitors : пат. 8324155 США. – 2012.

85. Goddard, A. W. et al. Early coadministration of clonazepam with sertraline for panic disorder // Archives of General Psychiatry. – 2001. – Т. 58. – №. 7. – С. 681-686.

86. Goehring, R.R. et al. Substituted-quinoxaline-typepiperidine compounds and the uses thereof : пат. EP2433937A1 США. – 2012.

87. Gong, Y-D. et al. Novel 3-chloro-5-substitutedquinoxaline-2-amine derivatives and pharmaceutically acceptable salt thereof, method for preparation, therapeutic agent for inflammatory disease induced by SPC activity containing 3-chloro-5substituted-quinoxaline-2-amine derivatives as an effective ingredient : пат. WO2009041789A2 США. – 2009.

88. González, M., Cerecetto, H. Quinoxaline derivatives: a patent review (2006–present) // Expert opinion on therapeutic patents. – 2012. – Т. 22. – №. 11. – С. 1289-1302.

89. Gresele, P., Momi, S. Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders // Cardiovascular drug reviews. – 2006. – Т. 24. – №. 2. – С. 148-168.

90. Gribkoff, V. K., Kaczmarek, L. K. The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes // Neuropharmacology. – 2017. – Т. 120. – С. 11-19.

91. Griebel, G., Holmes ,A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery // Nature reviews Drug discovery. – 2013. – Т. 12. – №. 9. – С. 667-687.

92. Guirado A. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-alkoxy-6,9-dichloro[1,2, 4]triazolo[4,3-a] quinoxalines as inhibitors of TNF-α and IL-6 //European journal of medicinal chemistry. – 2012. – Т. 54. – С. 87-94.

93. Gust, R. et al. Octahedral metal (III) polypyridyl complexes and their use in prevention and treatment of cancer // Eur. Pat. Appl. EP. – 2009. – Т. 2. – №. 072. – С. 521.

94. Harper, S. et al. Macrocyclic quinoxaline compounds as HCV NS3 protease inhibitors : пат. CA2731177A1. - 2010.

95. Heravi, M. M., Zadsirjan, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview // RSC advances. – 2020. – Т. 10. – №. 72. – С. 44247-44311.

96. Hoffman, E. J., Mathew, S. J. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies // Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and

Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine. – 2008. – Т. 75. – №. 3. – С. 248-262.

97. Husain, A., Madhesia, D. Recent advances in pharmacological activities of quinoxaline derivatives // J. Pharm. Res. – 2011. – Т. 4. – №. 3. – С. 924-929.

98. Jacobsen, E. J. et al. Piperazine imidazo [1, 5-a] quinoxaline ureas as high-affinity GABAA ligands of dual functionality // Journal of medicinal chemistry. – 1999. – Т. 42. – №. 7. – С. 1123-1144.

99. Kaitlin, K. I. CNS drugs take longer to develop, have lower success rates, than other drugs // Tufts CSDD Impact Reports. – 2014. – Т. 16. – С. 1-4.

100. Kalaria, P. N., Karad, S. C., Raval, D. K. A review on diverse heterocyclic compounds as the privileged scaffolds in antimalarial drug discovery // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Т. 158. – С. 917-936.

101. Kang, I. J. et al. Isatin-β-thiosemicarbazones as potent herpes simplex virus inhibitors // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 7. – С. 1948-1952.

102. Kasserra, C.E. et al. Substituted diaminopyrimidyl compounds, compositions thereof, and methods of treatment therewith : пат. WO2016/205304 A1 США. – 2016.

103. Kerru, N. et al. A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications // Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 8. – С. 1909.

104. Kers, I. et al. Phenethyl nicotinamides, a novel class of NaV1. 7 channel blockers: Structure and activity relationship // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – Т. 22. – №. 19. – С. 6108-6115.

105. Kitchen, I., Crowder, M. Assessment of the hot-plate antinociceptive test in mice A new method for the statistical treatment of graded data // Journal of pharmacological methods. – 1985. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-7.

106. Klein, S. M. et al. Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model–a comparison of two common wire hanging methods with two different results // Journal of neuroscience methods. – 2012. – Т. 203. – №. 2. – С. 292-297.

107. Koonin, E. V., Senkevich, T. G., Dolja, V. V. The ancient Virus World and evolution of cells // Biology direct. – 2006. – Т. 1. – №. 1. – С. 1-27.

108. Kulkarni, N. V. et al. Transition metal complexes of thiosemicarbazones with quinoxaline hub: an emphasis on antidiabetic property // Medicinal Chemistry Research. – 2012. – Т. 21. – №. 5. – С. 663-671.

109. Kurhe, Y. V. et al. Anti-anxiety effect of a novel 5-HT3 receptor antagonist N-(benzo [d] thiazol-2-yl)-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide (6k) using battery tests for anxiety in mice // Indian Journal of Pharmacology. – 2014. – Т. 46. – №. 1. – С. 100.

110. Kurhe, Y. et al. Effect of (4a) a novel 5-HT3 receptor antagonist on chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice: an approach using behavioral tests battery // Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. – 2015. – Т. 26. – №. 1. – С. 25-33.

111. Li, W. et al. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G2/M cell-cycle arrest and apoptosis // Cancer science. – 2010. – Т. 101. – №. 5. – С. 1226-1233.

112. Lin, P. et al. Pyrrolidine-derived beta 3 adrenergic receptor agonists : пат. WO2010/129326 A1. - 2010.

113. Lumbroso, H. et al. A dipole-moment study of substituted pyrazines and quinoxalines // Journal of Molecular Structure. – 1980. – Т. 68. – С. 293-305.

114. Mahesh, R. et al. Discovery of new anti-depressants from structurally novel 5-HT3 receptor antagonists: design, synthesis and pharmacological evaluation of 3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamides // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 4. – С. 1253-1256.

115. Malamas, M. S. et al. Aryl and heteroaryl fused imidazo[1,5-a] pyrazines as inhibitors of phosphodiesterase 10 : пат. US2009143367A1 США. – 2009.

116. Malamas, M. S. et al. Substituted imidazo[1,5-a]quinoxalines as inhibitors of phosphodiesterase 10 : пат. TW201111383A. – 2011.

117. Maltsev, D. V. et al. (a) Searching for new anxiolytic agents among derivatives of 11-dialkylaminoethyl-2,3,4,5-tetrahydrodiazepino[1 2-a]benzimidazole // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Т. 161. – С. 105792.

118. Maltsev, D. V. et al. (b) Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel 2,3,4,5-tetrahydro[1,3]diazepino[1,2-a]benzimidazole Derivatives as Promising Anxiolytic and Analgesic Agents // Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 19. – С. 6049.

119. Mandrioli, R., Mercolini, L. Discontinued anxiolytic drugs (2009–2014) // Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2015. – Т. 24. – №. 4. – С. 557-573.

120. Markgraf, J. H., Katt, R. J. Strained heterocyclic systems. VI. Basicities of some quinoxalines // The Journal of Organic Chemistry. – 1972. – Т. 37. – №. 5. – С. 717-718.

121. McArthur, R. A. Aligning physiology with psychology: Translational neuroscience in neuropsychiatric drug discovery // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2017. – Т. 76. – С. 4-21.

122. McCormich, K. D. et al. 3,4-dihydro-1,4-benzoxazine, 3,4-dihydro-1,4-benzothiazine and 1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline derivatives as alpha2C adrenoreceptor agonists : пат. WO2008100463A1. - 2008.

123. McClellan, A. L. Tables of experimental dipole moments. Volume 1 W. H. Freeman; San Francisco: 1963.

124. McKay, D.J. et al. Renin inhibitors : пат. WO2010/114978 A1. - 2010.

125. Miller, W.H. et al. Antibacterial Agents: пат. US2007244091A1 США. – 2007.

126. Montana, M. et al. Quinoxaline Moiety: A Potential Scaffold against Mycobacterium tuberculosis //Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 16. – С. 4742.

127. Montana, M. et al. Quinoxaline derivatives as antiviral agents: a systematic review // Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 12. – С. 2784.

128. Montana, M. et al. Antitumoral activity of quinoxaline derivatives: A systematic review // European journal of medicinal chemistry. – 2019. – Т. 163. – С. 136-147.

129. Morrow, B. J. et al. Fused [1,2,4]thiadiazine derivatives which act as kat inhibitors of the myst family : пат. – 2020.

130. Mueller, R. et al. Substituted benzoxazinones as potent positive allosteric AMPA receptor modulators: part II // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 13. – С. 3927-3930.

131. Murrough, J. W. et al. Emerging drugs for the treatment of anxiety // Expert opinion on emerging drugs. – 2015. – Т. 20. – №. 3. – С. 393-406.

132. Muscatello, M. R. et al. Clinically relevant drug interactions in anxiety disorders // Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. – 2012. – Т. 27. – №. 3. – С. 239-253.

133. Natarajan, A. et al. Quinoxaline compounds and uses thereof : пат. WO2012071414A2. – 2012.

134. Nutt, D. J., Attridge J. CNS drug development in Europe—past progress and future challenges // Neurobiology of Disease. – 2014. – Т. 61. – С. 6-20.

135. Olejnik, O. et al. Composition containing alpha-2-adrenergic agonist component : пат. JP2008231122A Япония. – 2008.

136. Oohara, N. et al. Antitumor agent : пат. WO2011129365A1. – 2011.

137. Papa, P. et al. ; пат. US 2015/175557 A1. - 2015.

138. Patidar, A. K. et al. Exploring potential of quinoxaline moiety // International Journal of PharmTech Research. – 2011. – Т. 3. – №. 1. – С. 386-392.

139. Pereira, J. A. et al. Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of the Art review // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2015. – Т. 97. – С. 664-672.

140. Peteet J. R. COVID-19 anxiety // Journal of religion and health. – 2020. – Т. 59. – №. 5. – С. 2203-2204.

141. Pires, D. E. V., Blundell, T. L., Ascher, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures // Journal of medicinal chemistry. – 2015. – Т. 58. – №. 9. – С. 4066-4072.

142. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M. L. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments // Nature. – 1977. – Т. 266. – №. 5604. – С. 730-732.

143. Potschka, H. et al. LU 73068, a new non-NMDA and glycine/NMDA receptor antagonist: pharmacological characterization and comparison with NBQX and L-

701,324 in the kindling model of epilepsy // British journal of pharmacology. – 1998. – T. 125. – №. 6. – C. 1258-1266.

144. Pranzatelli, M. R. et al. Brainstem serotonergic hyperinnervation modifies behavioral supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in the rat // Developmental Brain Research. – 1989. – T. 50. – №. 1. – C. 89-99.

145. Pruitt, J. R. et al. Discovery of 1-(2-Aminomethylphenyl)-3-trifluoromethyl-N-[3-fluoro-2‘-(aminosulfonyl)[1,1‘-biphenyl)]-4-yl]-1H-pyrazole-5-carboxyamide (DPC602), a Potent, Selective, and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitor // Journal of medicinal chemistry. – 2003. – T. 46. – №. 25. – C. 5298-5315.

146. Qaisi, A. M. M. et al. Quinoline and pyridoquinoxaline derivatives as antibacterial agents // Eur. Pat. Appl. – 2006.

147. Quigley, H.A. Glaucoma // The Lancet. – 2011. - T. 377. – №. 9774. – C. 1367-1377.

148. Rehm, J., Shield, K. D. Global burden of disease and the impact of mental and addictive disorders // Current psychiatry reports. – 2019. – T. 21. – №. 2. – C. 1-7.

149. Roux, S., Sablé, E., Porsolt, R. D. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function // Current Protocols in Pharmacology. – 2004. – T. 27. – №. 1. – C. 10.10. 1-10.10. 23.

150. Rudolph, U., Knoflach, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes // Nature reviews Drug discovery. – 2011. – T. 10. – №. 9. – C. 685-697.

151. Stahl, M. M. S. et al. Withdrawal reactions with selective serotonin re-uptake inhibitors as reported to the WHO system // European journal of clinical pharmacology. – 1997. – T. 53. – №. 3. – C. 163-169.

152. Steru, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice // Psychopharmacology. – 1985. – T. 85. – №. 3. – C. 367-370.

153. Shastry, R. et al. Anxiolytic activity of aqueous extract of Camellia sinensis in rats // Indian Journal of Pharmacology. – 2016. – T. 48. – №. 6. – C. 681.

154. Sher, L. COVID-19, anxiety, sleep disturbances and suicide // Sleep medicine. – 2020. – Т. 70. – С. 124.

155. Sugiyama, T. et al. Quinoxaline compound or salt thereof and industrial bactericidal composition : пат. JP5352255B2. – 2011.

156. Tadesse, D. et al. Phosphorus-substituted quinoxaline-type piperidine compounds and uses thereof : пат. EP2654751B1. - 2012.

157. Takano, Y. et al. Synthesis and AMPA receptor antagonistic activity of a novel class of quinoxalinecarboxylic acid with a substituted phenyl group at the C-7 position // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2003. – Т. 13. – №. 20. – С. 3521-3525.

158. Tariq, S., Somakala, K., Amir, M. Quinoxaline: An insight into the recent pharmacological advances // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Т. 143. – С. 542-557.

159. Thibaut, F. Anxiety disorders: a review of current literature // Dialogues in clinical neuroscience. – 2022.

160. Tintori, C. et al. Docking, 3D-QSAR studies and in silico ADME prediction on c-Src tyrosine kinase inhibitors // European journal of medicinal chemistry. – 2009. – Т. 44. – №. 3. – С. 990-1000.

161. Torres, E. et al. New 1, 4-di-N-oxide-quinoxaline-2-ylmethylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 12. – С. 3699-3703.

162. Venable, J. D. Quinoxaline compounds. MXPA06003578AA; 2006

163. Vicente, E. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline-2-carbonitrile 1, 4-di-N-oxide derivatives // Molecules. – 2008. – Т. 13. – №. 1. – С. 69-77.

164. Vogel, J. R., Beer, B., Clody, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents // Psychopharmacologia. – 1971. – Т. 21. – №. 1. – С. 1-7.

165. Wagle S., Adhikari A. V., Kumari N. S. Synthesis of some new 4-styryltetrazolo[1,5-a]quinoxaline and 1-substituted-4-styryl[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxaline derivatives as potent anticonvulsants // European journal of medicinal chemistry. – 2009. – Т. 44. – №. 3. – С. 1135-1143.

166. Wheeler, L. A., Woldemussie, E., Lai, R. K. Methods for treating retinal diseases. // US2006089361A1. - 2006.

167. Xiang, Y. F. et al. Anti-herpes simplex virus efficacies of 2-aminobenzamide derivatives as novel HSP90 inhibitors // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2012. – Т. 22. – №. 14. – С. 4703-4706.

168. Yokley, B. H., Hartman, M., Slusher, B. S. Role of academic drug discovery in the quest for new CNS therapeutics // ACS chemical neuroscience. – 2017. – Т. 8. – №. 3. – С. 429-431.

169. You, L. et al. Synthesis and evaluation of quinoxaline derivatives as potential influenza NS1A protein inhibitors // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 10. – С. 3007-3011.

170. Zubenko, A. A. et al. New route to bioactive 2-(hetero)arylethylamines via nucleophilic ring opening in fused 7-acyl-2,3-dihydroazepines // Mendeleev Communications. – 2020. – Т. 30. – №. 1. – С. 28-30.