

УДК 615.917 : 615.099 : 615.015.35

НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ 5-НТ2А- АНТАГОНИСТА ПРОИЗВОДНОГО ИМИДАЗОБЕНЗИМИДАЗОЛА

А.А.Спасов^{1,2}, Д.С.Яковлев^{1,2},
Д.В. Мальцев^{1,2}, М.В.Мирошников¹,
К.Т. Султанова¹, О.Н. Жуковская³,
В.А. Анисимова³, К.А. Нечаева¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет», Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

²Государственное бюджетное учреждение Волгоградский медицинский научный центр 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

³Южный Федеральный Университет Научно-исследовательский институт физической и органической химии, 344090, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В настоящем исследовании представлены результаты изучения нейротоксикологического профиля нового 5-НТ2А-антагониста, соединения I, с использованием методики многотестового наблюдения по «S.Irwin». Показатели тестов оценивали в параллельных группах, получавших вещество в дозах, начинающихся со средней эффективной (ЭД₅₀) и с кратным увеличением в 2, 5, 7,5 и 10 раз. В результате проведенного изучения выявлено, что для нейротоксических свойств соединения I характерна дозозависимая активность. Было установлено, что при введении животным соединения I в средней эффективной дозе - 10 мг/кг и дозах, превышающих эффективную в 2 и 5 раз нейротоксические изменения в поведении животных не наблюдаются и состояние животных соотносится с таковым контрольной группы. Наиболее значимые эффекты при введении изучаемого соединения развивались в высоких дозах, превышающих эффективную в 7,5 и 10 раз. Были определены границы минимальной токсической дозы (ТД_{мин}) для соединения I при пероральном введении: 50 мг/кг < ТД_{мин} ≤ 75 мг/кг.

Ключевые слова: нейротоксические исследования, методика многотестового наблюдения по «S.Irwin», производное имидазобензимидазола, соединение I, средняя эффективная доза, минимальная токсическая доза, дозозависимый эффект.

Введение. Как известно, 5-НТ2А-рецепторы вовлечены в формирование множества физиологических процессов, таких как транзиторные нарушения кровообращения, поведенческие реакции. Через них осуществляется регуляция состояния беспокойства, настроения, реакционной способности к психологическому стрессу, самоконтроля, мотивации и когнитивных функций [1]. Ранее было показано, что дигидрохлорид

9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил) имидазо [1,2-а] - соединение (I) [2] - обладает антагонистическим механизмом действия в отношении 5-НТ2А-рецепторов [3], и проявляет выраженные противомигренозные [4] и антиоксидантные действия [5], к тому же, было установлено, что соединение I проявляет анальгетические [6] и анксиолитические эффекты [7]. Эта информация говорит о высоком потенциале I при создании

Спасов Александр Алексеевич (Spasov Aleksandr Alekseyevich), заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, aspasov@mail.ru

Яковлев Дмитрий Сергеевич (Yakovlev Dmitriy Sergeevich), доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, д.м.н., dypharm@list.ru
Мальцев Дмитрий Васильевич (Maltsev Dmitriy Vasil'yevich), старший преподаватель кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, к.б.н., maltsevdmitriy@rambler.ru

Анисимова Вера Алексеевна (Anisimova Vera Alekseyevna), ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии ЮФУ, к.х.н., vaanisimova@sfnedu.ru

Жуковская Ольга Николаевна (Zhukovskaya Olga Nikolayevna), научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии ЮФУ, к.х.н., onzhukovskaya@sfnedu.ru

Мирошников Михаил Владимирович (Miroshnikov Mikhail Vladimirovich), аспирант кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, mihailmiroshnikov@mail.ru

Султанова Кира Тимуровна (Sultanova Kira Timurovna), преподаватель колледжа ВолгГМУ, sultanova.pharma@gmail.com

Нечаева Ксения Андреевна (Nechayeva Kseniya Andreyevna), студентка 4 курса медико-биологического факультета ВолгГМУ, owlscheeks@gmail.com

новых лекарственных средств многих фармакологических групп. В связи с этим особую значимость приобретает необходимость изучения нейротоксических эффектов от средней эффективной до сублетальной дозы. В рамках дальнейшего изучения и определения широты диапазона безопасного действия соединения I были исследованы его нейротоксические свойства, представленные в настоящей работе, с использованием многократного наблюдения по «S.Irwin» [8].

Цель работы - изучить нейротоксические свойства соединения I при пероральном введении половозрелым мышам-самцам.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на половозрелых мышах-самцах, массой от 18 до 22 г, в количестве 36 особей, из которых было сформировано 6 экспериментальных групп – 1 контрольная и 5 опытных. Эксперименты проводились в соответствии с нормативными Рекомендациями Комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздравсоцразвития России, Рекомендациями ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медикобиологических исследований с использованием животных (1985)». Вещество I вводили мышам перорально (металлическим зондом) в ранее изученной средней эффективной дозе - 10 мг/кг [9]. Исследование нейротоксикологического профиля соединения I проводилось по методу «S. Irwin» в модификации [10]. Под действием доз вещества у животных оценивали спектр изменений поведенческих реакций (настороженность, пассивность, агрессия, беспокойство, спонтанная двигательная активность), нервно-мышечных (судороги, парезы, тремор, реакции на раздражители) и вегетативных эффектов (размер зрачка, птоз верхнего века, уринации, дефекации, саливации, цвет кожи, частота дыхания, температура тела). Оценка параметра в норме приравнивалась к 4 баллам, а изменение параметра в среднем на 25% соответствовало изменению в 1 балл. Возрастные внешне наблюдаемые изменения по шкале от 4 до 8 баллов указывало на увеличение эффекта, а снижение – от 4 до 0 – на его угнетение. В шкале оценок токсического профиля препарата для признаков, в норме отсутствующих или в незначительной степени имеющих место, активность выражалась от 0 до 8 баллов (0 – отсутствие эффекта). Прогнозировали доклиническую степень безопасности и обозначали минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}). Статистическая обработка данных проводилась программой GraphPad Prism 5.0.

Результаты и обсуждение. У животных, получавших в средней эффективной дозе соединения I (10 мг/кг), не наблюдалось значимых изменений изучаемых показателей данного многопараметрового тестирования (табл. 1).

При исследовании I в дозе, превышающей среднюю эффективную в 2 раза, регистрируемые параметры, характеризующие поведенческие реакции и нервно-мышечную возбудимость, соответствовали установленной для данной тест-системы норме. Из показателей, описывающих вегетативный статус, через 1 час после введения субстанции у животных отмечалось развитие незначительной гипотермии. Остальные параметры, в сравнении с группой контроля, не изменились (диаграмма 1).

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

Наиболее выраженные нарушения функционально-поведенческого статуса наблюдались при введении более высоких доз. Так, при увеличении дозы до $7,5 \times \text{ЭД}_{50}$ (75 мг/кг) отмечалось изменение двигательной активности мышей. Животные становились более пассивными, меньше передвигались, в единичных случаях отмечалось снижение тонуса конечностей и расстройство походки.

Учитывая это, а также урежение частоты краткосрочного груминга и снижение реакции на прикосновение, можно предположить наличие угнетающего воздействия соединения в дозе 75 мг/кг на центральную нервную систему, в целом, проявляющееся в виде выраженной седации животных. Было отмечено, что при введении I, у мышей увеличивается латентность ноцицептивной реакции в сравнении с контрольными показателями. Со стороны вегетативной нервной системы отмечалось повышение частоты дыхательных движений и понижение температуры тела.

Обобщая полученные результаты можно сделать заключение (табл. 2) об отсутствии значимого нейротоксического влияния соединения I в средней эффективной дозе 10 мг/кг, а так же дозах, превышающих эффективную в 2 и 5 раз. С увеличением дозы до 75 мг/кг и выше у животных развивается выраженная седация, а также отмечается снижение болевой чувствительности. При этом стоит отметить, что при дальнейшем увеличении дозы до 10-кратно превышающей среднюю эффективную, у животных в остром периоде наблюдалась гибель. В течение последующего наблюдения за животными, получавшими I, после окончания многопараметрового тестирования, летальности зарегистрировано не было.

Выявленные изменения нейрофункционального статуса у мышей позволяют предварительно обозначить минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}) для соединения I при пероральном

Таблица 1

Влияние соединения I в исследуемых дозах на нейротоксические свойства мышей (в баллах, $M \pm m$)

Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время измерения, мин		
		0 (исход, до введения тестируемых образцов)	60	120
Поведенческая активность				
Груминг				
Норма	-	4	4	4
Растворитель	-	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	50	4,0±0,01	3,3±0,42	3,5±0,34
I	75	4,0±0,01	1,7±0,21*	1,5±0,22*
I	100	4,0±0,01	1,0±0,01*	1,0±0,01*
Спонтанная двигательная активность				
Норма	-	4	4	4
Растворитель	-	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	50	4,0±0,01	3,5±0,22*	3,5±0,22*
I	75	4,0±0,01	3,0±0,01*	3,0±0,26*
I	100	4,0±0,01	2,5±0,22*	2,7±0,21*
Нервно-мышечная возбудимость				
Расстройство походки				
Норма	-	0	0	0
Растворитель	-	0	0	0
I	10	0	0	0
I	20	0	0	0
I	50	0	0	0
I	75	0	2,8±0,31*	2,2±0,17*
I	100	0	2,0±0,01*	2,0±0,01*
Вегетативные эффекты				
Температура тела, оС				
Норма	-	4	4	4
Растворитель	-	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	10	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	20	4,0±0,01	4,0±0,01	4,0±0,01
I	50	4,0±0,01	3,5±0,22*	3,2±0,17*
I	75	4,0±0,01	2,2±0,17*	2,0±0,01*
I	100	4,0±0,01	2,0±0,01*	2,0±0,01*

Примечания: * – статистически значимо по отношению к контролю, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Даннета ($p < 0,05$).

введении: $50 \text{ мг/кг} < \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 75 \text{ мг/кг}$, а также охарактеризовать клиническую картину возможной передозировки I. Наиболее значимыми из симптомов являются: седация, снижение рефлекторных реакций на внешние раздражители; со стороны функционального состояния вегетативной нервной системы – повышение частоты дыхательных движений, гипотермия. Данная картина гибели и развитие сопутствующих эффектов совпадает с картиной гибели от интоксикации известными 5HT_{2A}-антагонистами, что может являться подтверждением механизма действия исследуемого соединения - I.

Заключение. В результате проведенного изучения нейротоксикологического профиля нового 5-НТ2А-антагониста, соединения I, с использованием методики многотестового наблюдения по «S.Irwin» выявлено, что нейротоксикологические свойства I зависят от его дозы. Так, в ходе проведенного исследования было установлено, что при введении животным соединения I в дозе, равной ED₅₀ – 10 мг/кг и дозах, превышающих эффективную в 2 и 5 раз нейротоксикологические изменения в поведении животных не наблюдались и состояние животных соотносилось с таковым контрольной группы. Наиболее значимые эффекты при введении изучаемого соединения развивались в высоких дозах, превышающих эффективную в 7,5 и 10 раз.

Так, при введении дозы $7,5 \times \text{ЭД}_{50}$ у исследуемых животных наблюдалась значительная седация, сопровождаемая снижением нервно-мышечного возбуждения – угнетения практически всех реакций, нарушением походки и снижением тонуса конечностей. Было зарегистрировано изменение вегетативных реакций, а именно снижения температуры тела и повышения частоты сердечных сокращений. Полученная информация дает основание определить границы минимальной токсической дозы (ТД_{мин}) для соединения I при пероральном введении: $50 \text{ мг/кг} < \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 75 \text{ мг/кг}$. При введении дозы $10 \times \text{ЭД}_{50}$ у исследуемых животных регистрировалась смертность – 16,6 % (1 животное). Картина гибели и развитие сопутствующих эффектов совпадает с картиной гибели от интоксикации известными 5HT_{2A}-антагонистами, чем еще раз подтверждается ранее правильно определенный механизм действия. Соединение I, обладая большим перечнем эффектов, среди которых наибольший интерес представляют его поведенческие реакции, а именно развитие анксиолитического, анальгетического и антидепрессивного эффектов, обусловленные его антагонистическим действием на 5-НТ2А-рецепторы, с большой долей вероятности является низкотоксичным веществом, перспективным для углубленного доклинического изучения.

Таблица 2

Дозозависимая динамика изменения параметров функционально-поведенческого статуса мышей при однократном пероральном введении соединения I

Тестируемые параметры	Соединение - I				
	ЭД ₅₀	2×ЭД ₅₀	5×ЭД ₅₀	7,5×ЭД ₅₀	10×ЭД ₅₀
Поведенческие реакции					
Пассивность	-	-	-	↑	↑
Груминг	-	-	-	↓	↓
Спонтанная двиг. акт-ть	-	-	↓	↓	↓
Нервно-мышечная возбудимость					
Реакция на прикосновение	-	-	-	↓	↓
Реакция на боль	-	-	-	↓	↓
Реакция на стук	-	-	-	-	↓
Расстройство походки	-	-	-	↑	↑
Тонус конечностей	-	-	-	-(↓)	-
Вегетативные эффекты					
Температура	-	-(↓)	-(↓)	↓	↓
ЧДД	-	-	-	↑	↑

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

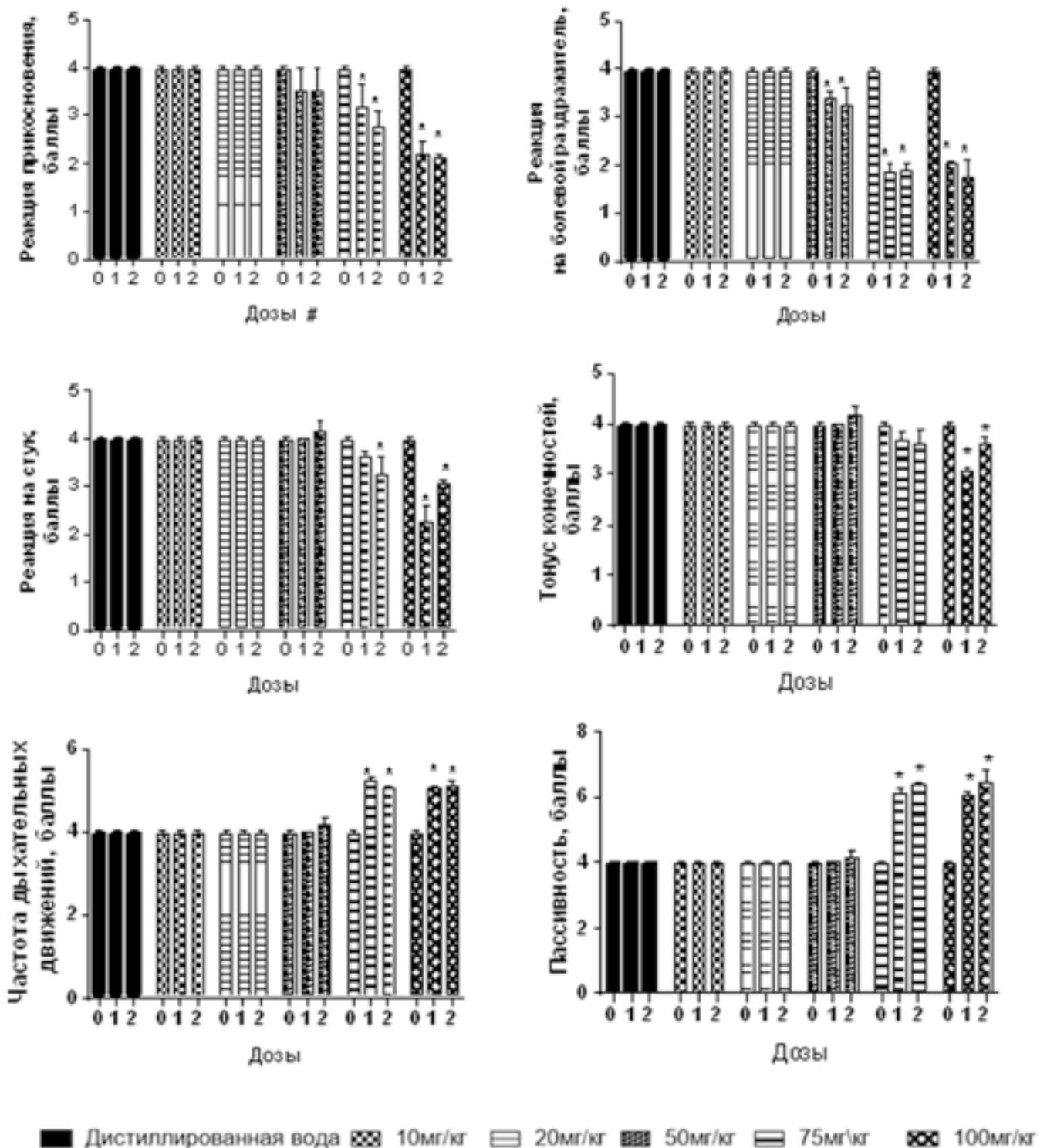


Диаграмма 1. Влияние соединения I в исследовательских дозах на нейротоксические свойства мышей (в баллах, M±m)

Примечания: 0 - исходные данные, полученные до введения вещества; 1 - значения, полученные через 1 час после введения вещества; 2 - значения, полученные через 2 часа после введения вещества. * - статистически значимо по отношению к контролю, критерий Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Даннета ($p < 0,05$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сласов А. А. и др. Производные имидазо [1, 2-а] бензимидазола как антагонисты 5-HT₂-рецепторов // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – №. 4. – С. 440-447.
2. Сласов А. А., Анисимова В. А., Яковлев Д. С., Петров В. И., Минкин В. И. Средства, проявляющие свойства антагонистов серотониновых 5-HT_{2A}-рецепторов // Патент России №2465901. 2012. Бюл. Изобретений. №23.
3. Мальцев Д. В. и др. Структурно-функциональная зависимость производных бензимидазола и индола в развитии

- 5-HT_{2A}-эргического действия // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №. S. – С. 78-79.
4. Морковина Я. В. и др. Адренергическая и серотонинергическая активность нового соединения с антимигренозными свойствами // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2017. – №. 1 (53).
5. Яковлев Д. С. и др. Влияние 5-HT_{2A}-антагонистов на кровоток в сосудах каротидной системы в условиях повышенного уровня серотонина // Бюллетень экспериментальной биологии

- и медицины. – 2014. – Т. 157. – №. 3. – С. 328-330.
6. Мальцев Д. В. и др. Изучение анальгетической активности соединения с 5-HT_{2A}-антагонистической активностью РУ-476 // Современные наукоемкие технологии. – 2013. – №. 9. – С. 56-57.
7. Морковина Я. В., Мальцев Д. В., Яковлев Д. С. Изучение токсичности и антисеротониновых свойств соединений РУ-31 и РУ-476 // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. – 2015. – С. 328-329.
8. Irwin S. Determination of variability in drug

- response / S. Irwin // Psychosomatics. – 1964. – Vol. 5. – P. 174-179.
9. Яковлев Д. С. и др. Мишень-ориентированный подход к разработке лекарственных средств для лечения мигрени // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – №. 5s. – С. 278-278.
10. Ковалев Д. Г., Бугаева Л. И., Озеров А. А. Нейротоксикологический профиль новых производных аденина, обладающих противовирусной активностью // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – №. 2.

REFERENCES:

1. Spasov A.A. etc. Derivatives, imidazo [1, 2a]benzimidazole as antagonists of 5-HT_{2A}- receptors. Patent of Russia №2465901, 2012, 42, 4, p. 440-447.
2. Spasov A.A., Anisimova V.A., Yakovlev D.S., Petrov V.I., Minkin, V.I. Agents exhibiting properties of antagonist of serotonin 5-HT_{2A}-receptors. Patent of Russia №2465901, 2012 (in Russian).
3. Maltsev D.V. et al. Structural and functional dependence of the derivatives of benzimidazole and indole in the development of 5-HT_{2A}-ergic activity.

- Vestnik of Volgograd State Medical University, 2014, p. 78-79 (in Russian).
4. Morkovin J.V. et al. Adrenergic and serotonergic activity of new compounds with antimigraine properties. Volgograd scientific medical journal, 2017, 1 (in Russian).
5. Yakovlev D.S. et al. The effect of 5-HT_{2A} antagonists on blood flow in the vessels of the carotid system in the conditions of increased level of serotonin. Bulletin of experimental biology and medicine, 2014, 157, p. 328-330 (in

- Russian).
6. Maltsev D.V. et al. Study of analgesic activity of a compound with 5-HT_{2A}-antagonistic activity of RU-4Modern high technologies, 2013, 9, p. 56-57 (in Russian).
7. Morkovina Ya.V., Maltsev D.V., Yakovlev D.S. The study of toxicity and antiserotonin properties of compounds RU-31 and RU-4Actual problems of experimental and clinical medicine, 2015, p. 328-329 (in Russian).
8. Irwin S. Determination of variability in

- drug response. Psychosomatics, 1964, 5, p. 174-179.
9. Yakovlev D.S. et al. Target-oriented approach to the development of medicines for the treatment of migraine. Experimental and clinical pharmacology, 2018, 81, p. 278-278.
10. Kovalev D.G., Bugaeva L.I., Ozerov A.A. The neurotoxicological profile of new derivatives of adenine possessing antiviral activity. Saratov journal of medical scientific research, 2010, 6 (in Russian).

A.A. Spasov^{1,2}, D.S. Yakovlev^{1,2}, D.V. Maltsev^{1,2}, M.V. Miroshnikov¹, K.T. Sultanova¹, O.N. Zhukovskaya³, V.A. Anisimova³, K.A. Nechaeva¹

NEUROTOXICOLOGICAL PROFILE OF 5-HT_{2A}-ANTAGONIST OF IMIDAZOBENZIMIDAZOLE DERIVATIVE

¹Volgograd State Medical University, RF Ministry of Health, 400131, Volgograd, Russian Federation

²Volgograd Medical Research Center, 400131, Volgograd, Russian Federation

³Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, 344006, Rostov-on-Don, Russian Federation

The article presents the results of a study of the neurotoxicological profile of a new 5-HT_{2A}-antagonist (compound I) using the method of multi-test observation by «S. Irwin». The test parameters were evaluated in parallel groups, receiving the compound in doses beginning with the average effective dose (ED₅₀) and with a multiple increase of 2, 5, 7.5 and 10 times.

The study revealed that the neurotoxicological properties of compound I are characterized by dose-dependent activity. It has been shown that neurotoxicological changes in the behavior of the animals did not occur with the administration of compound I at average effective dose of 10 mg / kg and doses, exceeding the effective by 2 and 5 times; the animals welfare corresponds to that of the control group. The most significant effects by the administration of the studied compound developed in high doses, exceeding the effective by 7.5 and 10 times. The limits of the minimum toxic dose (TD_{min}) for compound I by oral administration has been found to be 50 mg / kg <TD_{min} ≤ 75 mg / kg.

Keywords: neurotoxicity research, the method of multi-test observation according to «S. Irwin», imidazobenzimidazole derivative, compound I, average effective dose, minimal toxic dose, dose-dependent effect.

Переработанный материал поступил в редакцию 19.12.2018 г.