

ПАВЛОВА АЛЛА ВИКТОРОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИРОДНЫХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ В
КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ
ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКИХ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Научный консультант:

Доктор биологических наук,
профессор

Толстикова Татьяна Генриховна

Официальные оппоненты:

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий

Куликов Александр Викторович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», сектор генетических коллекций нейропатологий, заведующий, лаборатория фармакогенетики депрессий, главный научный сотрудник

Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел нейрофармакологии имени академика РАМН С.В. Аничкова, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Московская область, г. Черноголовка

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», по адресу: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольберга

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://www.tnimc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Минакова Мария Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее 1% населения старше 60 лет (Deu A., De J.N., 2015), и признанное вторым по значимости нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера (Zhu Y. et al., 2020). На сегодняшний день насчитывается порядка 7-10 млн. людей, страдающих болезнью Паркинсона или паркинсоническим синдромом, и количество пациентов продолжает расти. Ожидается, что эта цифра к 2030 году увеличится вдвое из-за старения популяции.

Клиническая патология и диагностика БП обусловлены прогрессивной преждевременной смертью дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга. Дефицит дофаминергических нейронов приводит к нарушению двигательных функций, проявляющихся ригидностью, тремором, брадикинезией и нестабильностью позы, а также к развитию немоторных симптомов, включая когнитивные нарушения, психиатрические симптомы, нарушение сна, боль, утомляемость и др. На сегодняшний день одобренные методы лечения БП ориентированы на компенсационные подходы, направленные на устранение клинических симптомов, но не оказывающие этиотропного действия, и не способствуют устранению патогенетической причины развития БП (Wang X. et al., 2008). На текущий момент болезнь Паркинсона является неизлечимой, а применяемая современная фармакотерапия позволяет лишь улучшить качество жизни и временно затормозить прогрессирование болезни. Болезнь Паркинсона, как и многие хронические заболевания, часто сопровождается хронической болью, от которой страдает около 10% взрослого населения. Эта проблема представляет собой наибольшее социо-экономическое бремя любого патологического состояния с расчетными ежегодными затратами на ее решение в сотни миллиардов долларов. Несмотря на свою распространенность, современные методы лечения боли не обеспечивают адекватного снижения её продолжительности и/или степени ее облегчения. Таким образом, поиск новых эффективных противопаркинсонических и анальгетических препаратов остается на сегодняшний день одной из важных задач фармакологии. В данной работе использовали перспективный подход для получения новых лекарственных средств – разработку биологически активных соединений на основе природных монотерпеноидов. Опубликованные в литературе данные позволили выделить монотерпеноиды, химические структуры которых имеют высокий потенциал для дальнейшей разработки новых ЦНС-активных лекарственных средств. Для химической модификации выбрали экономически доступные монотерпеноиды: вербенон, изопулегол, миртеналь.

Степень разработанности. Монотерпеноиды широко распространены в природе, являясь основными компонентами эфирных масел растений. Многие нативные монотерпеноиды обладают широким спектром биологической активности и оказывают влияние одновременно на различные нейромедиаторные системы ЦНС. С одной стороны, это дает возможность для разработки лекарственных средств с мультитаргетным механизмом действия, а с другой, затрудняет достижение высокой селективности их действия, и может привести к развитию нежелательных побочных эффектов. Монотерпеновая функционализация (в частности, связанная с введением гетероатомов или получением гетероциклических монотерпеновых производных) может привести к значительному усилению биологической активности или повышению

селективности их действия. Этот перспективный путь, вероятно, является самым коротким в разработке новых ЦНС-активных препаратов.

В литературе опубликовано множество результатов исследований относительно влияния монотерпеноидов на ЦНС. Хорошо изучена противосудорожная активность многих монотерпеноидов: ментола (Zhang X.B. et al., 2008; Watt E.E. et al., 2008; Solomon V.R. et al., 2019), α -пинена (Felipe C.F.B. et al., 2019; Zamayad M. et al., 2019), изопулегола (Silva M.I. et al., 2009; Manayi A. et al., 2016), тимола (Garcia D.A. et al., 2008; Manayi A. et al., 2016), карвона (Goncalves J.C. et al., 2010; Costa D.A. et al., 2012) и др. Для некоторых монотерпеноидов описана способность предотвращать повреждения нейронов в различных фармакологических моделях оценки воздействия на структуры ЦНС (Lin Z.Z. et al., 2008; Liu R. et al., 2011; Melo M.S. et al., 2011; Porres-Martinez M. et al., 2016; Mahmoodi M. et al., 2019; Wang L. et al., 2019; Khoshnazar M. et al., 2020; Kong Y. et al., 2020). В настоящее время уделяется большое внимание изучению противопаркинсонической активности продуктов природного происхождения: растительным экстрактам, эфирным маслам и их компонентам. Исследования показывают, что монотерпеноиды, содержащиеся в эфирных маслах, обладают противопаркинсоническим действием в различных моделях *in vivo* и *in vitro* (Dey A., De J.N., 2015; Rao S.V. et al., 2016; Siddique E.H. et al., 2016; Issa M.E. et al., 2020).

Наиболее изученными монотерпеноидами, в том числе и в отношении анальгетической активности, являются каннабиноиды. Фармакологическая активность и механизмы действия фитоканнабиноидов (большинство из которых относятся к монотерпенам, содержащим ароматический фрагмент) достаточно подробно описаны в литературе (Lotsch J. et al., 2018; Amin M. R., Ali D.W., 2019). Изучение биологической активности фитоканнабиноидов и разработка лекарственных средств на их основе вызывает в последние годы большой интерес с точки зрения разработки эффективного анальгетического средства. Таким образом, разработка новых биологически активных соединений на основе природных монотерпеноидов является перспективным подходом для получения новых лекарственных средств. Имеющиеся опубликованные данные позволяют выделить монотерпеноиды, химические структуры которых имеют потенциал для разработки новых ЦНС-активных лекарственных средств, в нашем случае противопаркинсонических и анальгетических.

Цель работы: изучить фармакологическую активность производных монотерпеноидов для оценки перспективности их использования в качестве противопаркинсонических и анальгетических средств.

Задачи исследования

1. Провести фармакологические исследования новых кислородсодержащих производных *пара*-ментанового ряда с использованием стандартных моделей с целью выявления перспективного агента, обладающего противопаркинсонической активностью. Установить зависимость противопаркинсонической активности от химической структуры.
2. Изучить влияние перспективного агента – диола на нейромедиаторные системы головного мозга для оценки предположительного механизма действия.
3. Исследовать противопаркинсоническую активность диола при различных схемах (однократное и длительное) и дозах введения. Изучить влияние диола на жизненно важные органы и системы животных при длительном введении.

4. Определить возможные метаболиты диола, выбрать наиболее активный, оценить влияние метаболитов на дофаминовые нейроны головного мозга животных.

5. Провести фармакологический скрининг анальгетической активности в ряду впервые синтезированных производных монотерпеноидов и выбрать наиболее перспективные агенты для проведения дальнейших фармакологических исследований.

6. Оценить влияние выбранных агентов на опиоидные структуры ЦНС и зависимость механизма действия от структуры соединения.

7. Оценить влияние перспективных агентов на нейромедиаторные системы ЦНС, в том числе каннабиноидную.

8. Изучить наличие у перспективных агентов возможных побочных эффектов, характерных для большинства анальгетических средств (влияние на двигательную активность и слизистую оболочку желудка животных).

Научная новизна. В настоящей работе представлены результаты исследования впервые синтезированного кислородсодержащего производного ряда монотерпеноидов – диола, обладающего выраженной противопаркинсонической, противосудорожной и анальгетической активностью. Противопаркинсонические свойства диола, вероятно, обусловлены его дофаминомиметическими и холинолитическими свойствами, которые способствуют восстановлению баланса нейромедиаторов в ЦНС. Впервые показана зависимость противопаркинсонической активности изомеров и аналогов диола от химического строения. Впервые обнаружен активный метаболит диола – моноэпоксид диола, проявляющий выраженную противопаркинсоническую активность и показана его способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Установлено, что моноэпоксид диола стимулирует рост дофаминовых нейронов мозга животных с индуцированным паркинсоническим синдромом, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме.

Впервые в ряду соединений, сочетающих в своей химической структуре *пара*-ментановый и ароматический фрагменты, полученных путем взаимодействия (1*R*,2*R*,6*S*)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола и эпоксида вербенола с ароматическими альдегидами (группа 1), обнаружены два; в ряду аналогичных соединений, содержащих гетероароматические (фурановые и тиофеновые) заместители, синтезированные исходя из монотерпеноида изопулегола (группа 2), и в ряду соединений, сочетающих диазаадамantanовый и монотерпеноидный фрагменты (группа 3), обнаружены соединения, обладающие выраженной анальгетической активностью. Впервые показано, что положение метоксигруппы в фенильном кольце изомеров выбранных соединений 1-й группы оказывает решающее влияние на механизм анальгетического действия, вовлекая в анальгетический ответ различные рецепторы: каннабиноидные и опиоидные для другого. Впервые при изучении возможного механизма анальгетического действия выбранных соединений показано, что в анальгетический ответ данных агентов помимо каннабиноидной системы вовлечены и другие нейромедиаторные системы при участии НТЗ-серотониновых, α 2-адреналиновых и дофаминовых и мускариновых рецепторов ЦНС. Впервые показано, что перспективные соединения не угнетают двигательную активность животных и не оказывают раздражающего действия на слизистую желудка.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработка безопасных и эффективных противопаркинсонических и анальгетических средств является важной задачей фармакологии, решение которой позволит значительно улучшить качество жизни пациентов, страдающих болезнью Паркинсона или паркинсоническим синдромом. Выявлены новые соединения, полученные на основе природных соединений, проявляющие выраженную противопаркинсоническую и анальгетическую активность. Для соединения, обладающего противопаркинсонической активностью – диола, доказана эффективность в качестве противопаркинсонического агента при отсутствии серьезных побочных эффектов. В настоящее время диол проходит первый этап клинических испытаний в качестве противопаркинсонического агента. Полученные соединения, обладающие анальгетической активностью, можно рассматривать как перспективные для разработки нового класса высокоэффективных анальгетических средств, опосредующие механизмы действия через каннабиноидную систему и не оказывающие серьезных побочных эффектов, присущих используемым в терапевтической практике анальгетическим средствам.

Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований основана с учетом рекомендаций «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств», а также международных протоколов исследований. Все исследования *in vivo* были проведены на базе Лаборатории фармакологических исследований ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Большинство исследований при изучении влияния новых производных монотерпеноидов на ЦНС было проведено на моделях *in vivo*, что позволяет оценить их способность одновременно воздействовать на несколько нейромедиаторных систем ЦНС. Кроме того, учитывалось, что метаболиты кислородсодержащих производных монотерпенов, также могут обладать значительной биологической активностью. Исследования *in vivo* были выполнены на инбредных самцах мышей линии C57BL/6, аутбредных мышках сток CD-1 обоих полов, белых крысах стока Вистар обоих полов. Исследование включало в себя изучение *in vivo* фармакологической активности (противопаркинсонической, анальгетической, влияния на нейромедиаторные системы ЦНС, определение среднелетальной дозы и влияние на органы и системы животных) новых производных монотерпеноидов в условиях моделей и тестов, рекомендованных "Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств", а также международных протоколов исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. В результате скрининга новых производных *пара*-ментанового ряда выявлено соединение – диол, обладающее выраженной противопаркинсонической, противосудорожной и анальгетической активностью.
2. Установлена связь противопаркинсонического действия диола с его химической структурой.
3. Противопаркинсоническое действие диола обусловлено дофаминомиметическим и холинолитическим действием.
4. Активный метаболит диола – моноэпоксид оказывает стимулирующее действие на рост дофаминергических нейронов головного мозга.
5. Механизм действия производных монотерпеноидов, обладающих выраженной анальгетической активностью, частично опосредован через каннабиноидную систему.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается проведением достаточного количества исследований, использованием современных методов, которые соответствуют поставленным задачам проведенной работы. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы основаны на полученных в ходе исследований данных, продемонстрированных в приведенных таблицах и рисунках. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Основные результаты работы были представлены на 6-ом Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Украина, Крым, Судак, 2010г.), ежегодной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, Россия, 2010г.), международной научно-практической конференции «BIT's 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Tehnology» (Пекин, Китай, 2010г.), международной научно-практической конференции «Current topics in orgsnic chemistry» (Новосибирск, Россия, 2011г.), научно-практической конференции «Инновации в современной фармакологии» (Казань, Россия, 2012г.), 9-ом Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Украина, Крым, Судак, 2013г.).

Работа была поддержана грантами РФФИ: 12-03-31257 мол_а «Разработка методов селективной функционализации (1R,2R,6S)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола по метильным группам с целью изучения влияния заместителей на противопаркинсоническую активность», 12-04-31142 мол_а «Изучение фармакологической активности новых агентов монотерпенового ряда», 13-03-00206 А «Получение новых хиральных гетероциклических соединений на основе монотерпеноидов пара-ментанового ряда. Фундаментальные закономерности и синтетический потенциал», 15-03-01092 А «Азаадамантаны на основе монотерпеноидов: синтез и биологические свойства», 19-03-00071 А «Рациональный дизайн новых производных монотерпеноидов, обладающих противопаркинсонической активностью»; грантом ФЦП № 8726 «Поиск новых высокоэффективных анальгетических средств среди производных монотерпеноидов». Работа выполнена в рамках базовой программы V. 48 «Фундаментальные физико-химические исследования механизмов физиологических процессов и создание на их основе фармакологических веществ и лекарственных форм для лечения и профилактики социально значимых заболеваний» и программы СО РАН V.48.1.5. «Развитие современных подходов к фармакологическим исследованиям перспективных для медицины агентов, полученных на основе целенаправленного органического синтеза».

По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 19 полнотекстовых статей и одна обзорная в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций и входящих в международные базы данных (Scopus, Web of Science), получено 11 патентов РФ на изобретение.

Личное участие автора. Непосредственно соискателем разработана программа проведения комплекса фармакологических исследований, направленных на изучение фармакологической активности (противопаркинсонической, анальгетической, острой токсичности, оценки побочных эффектов и т.д.) новых соединений с использованием моделей *in vivo*,

проведены экспериментальные исследования *in vivo*, выполнены обработка, анализ, интерпретация, систематизация полученных результатов.

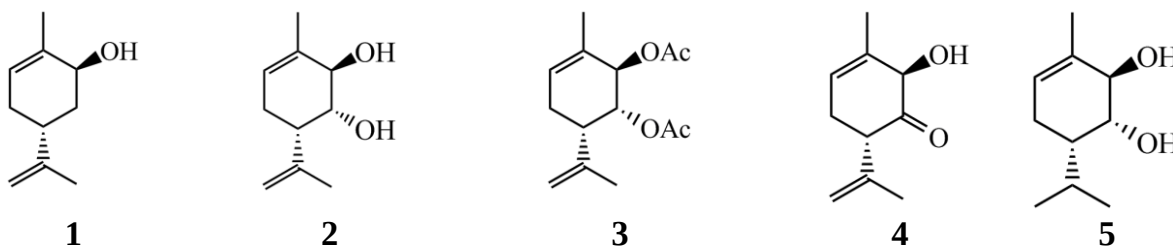
Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав (обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 276 странице машинописного текста, иллюстрирована 60 таблицами и 29 рисунками. Библиографические ссылки включают 426 источников, из которых 387 – публикации зарубежных авторов.

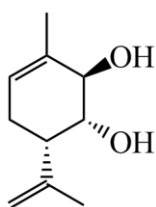
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

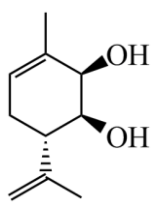
В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Описаны этиология и патогенез болезни Паркинсона и паркинсонического синдрома, болевого синдрома. Представлены данные о фармакотерапии данных патологий с учетом современных разработок. Описаны анальгетические, противосудорожные, противопаркинсонические, нейропротекторные свойства монотерпеноидов.

Вторая глава посвящена описанию материала и методов исследования. *Экспериментальные животные.* Эксперименты *in vivo* были проведены на 552 инбредных самцах мышей линии C57BL/6 массой тела 20-25 г., 1610 аутбредных мышках сток CD-1 обоих полов весом 20-25 г., 110 аутбредных крысах сток Вистар обоих полов массой тела 200-250 г. Животные получены из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН, где содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и гранулированному корму. После карантина животных рандомизировали по весу и разделяли на группы по 6–8 особей на клетку для мышей и по 6 особей на клетку для крыс. Работы с животными проводились в строгом соответствии с Приказом МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Правила надлежащей лабораторной практики» и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes) и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. *Исследуемые соединения.* Представленные для исследования соединения были синтезированы в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН (зав. лаб. – член-корр. РАН, д.х.н. Салахутдинов Н.Ф.). Синтез новых соединений (рисунок 1) был осуществлен исходя из распространенных в природе монотерпеноидов (–)-вербенона и (–)-изопулегола в соответствии с ранее разработанными методиками (Ardashov O.V. et al., 2007; Il'ina U.V. et al., 2007; Suslov E.V. et al., 2018).

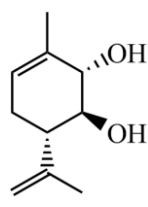




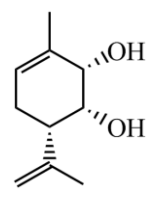
6



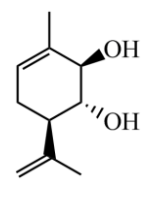
7



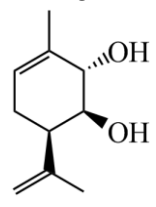
8



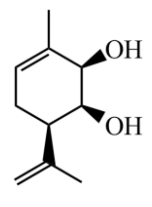
9



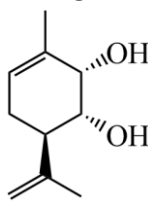
10



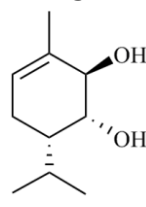
11



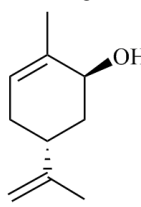
12



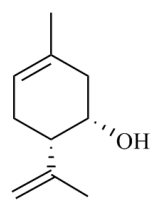
13



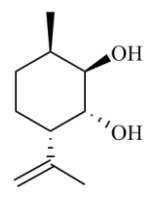
14



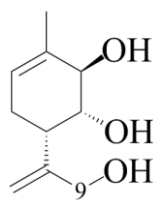
15



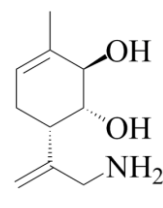
16



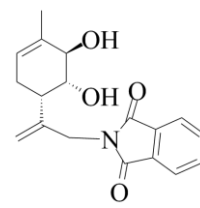
17



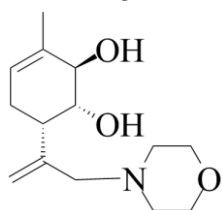
18



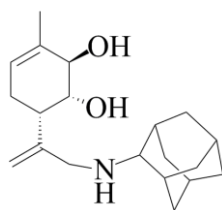
19



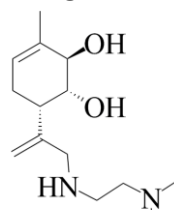
20



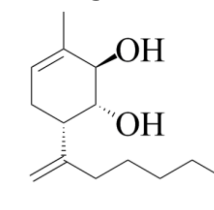
21



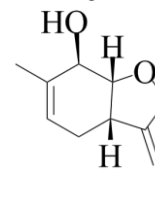
22



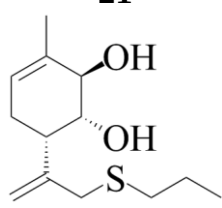
23



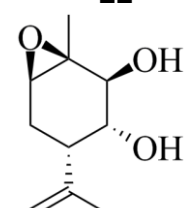
24



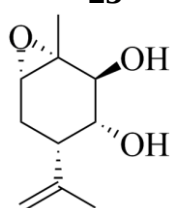
25



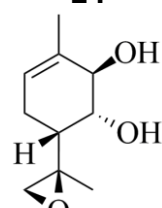
26



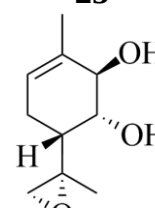
27



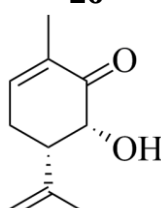
28



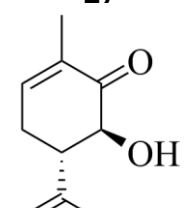
29



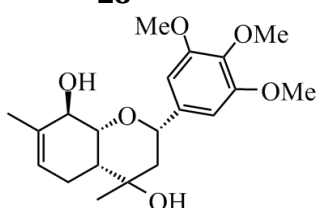
30



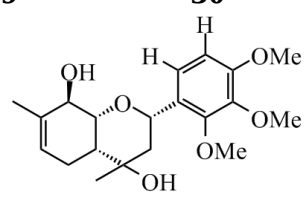
31



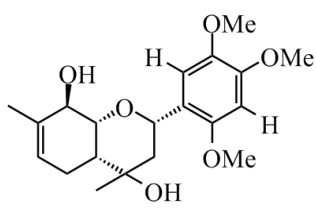
32



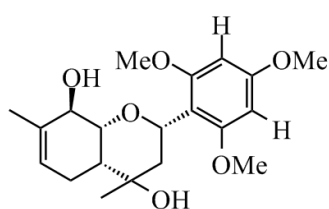
33



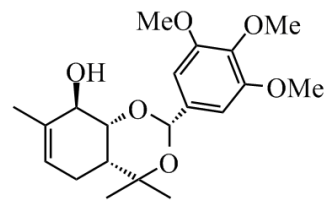
34



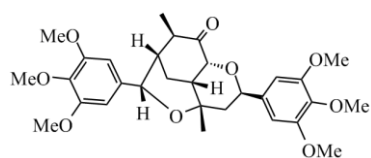
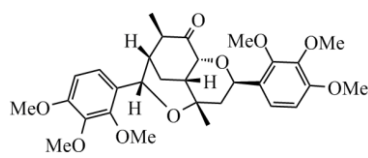
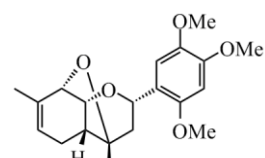
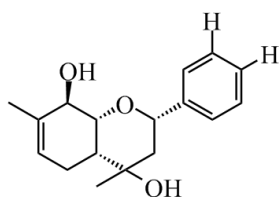
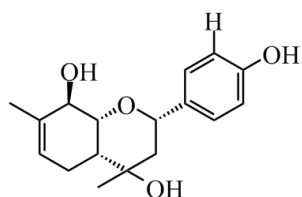
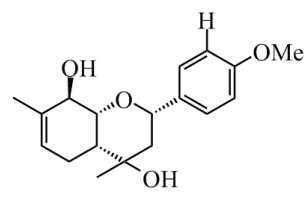
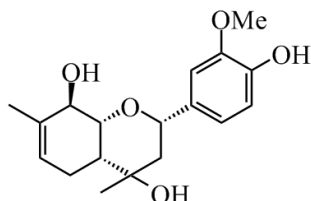
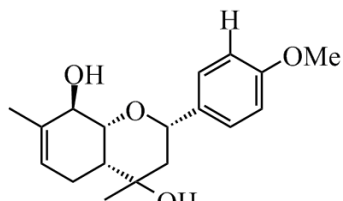
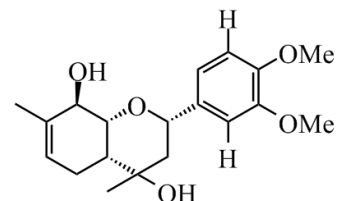
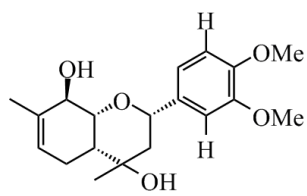
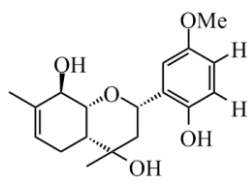
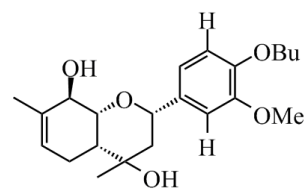
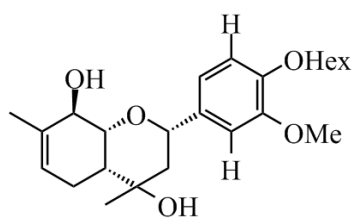
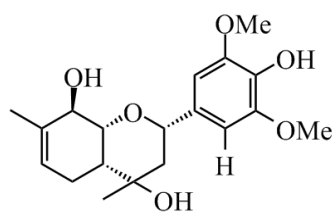
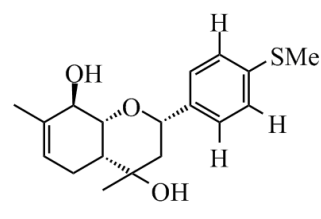
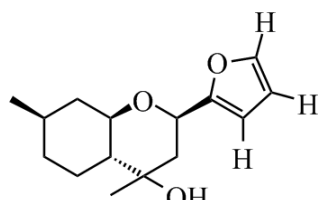
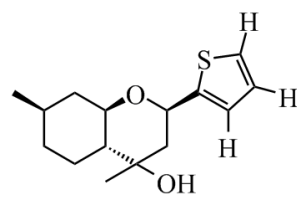
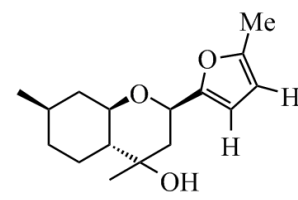
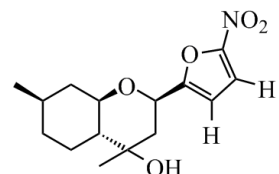
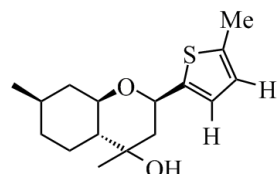
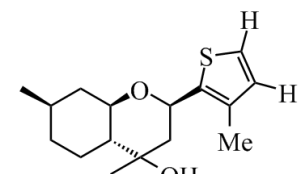
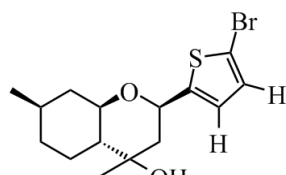
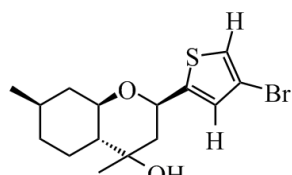
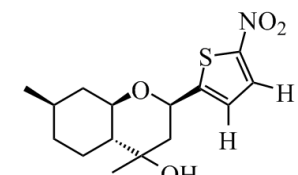
35



36



37

**38****39****40****41****42****43****44****45****46****47****48****49****50****51****52****53****54****55****56****57****58****59****60****61**

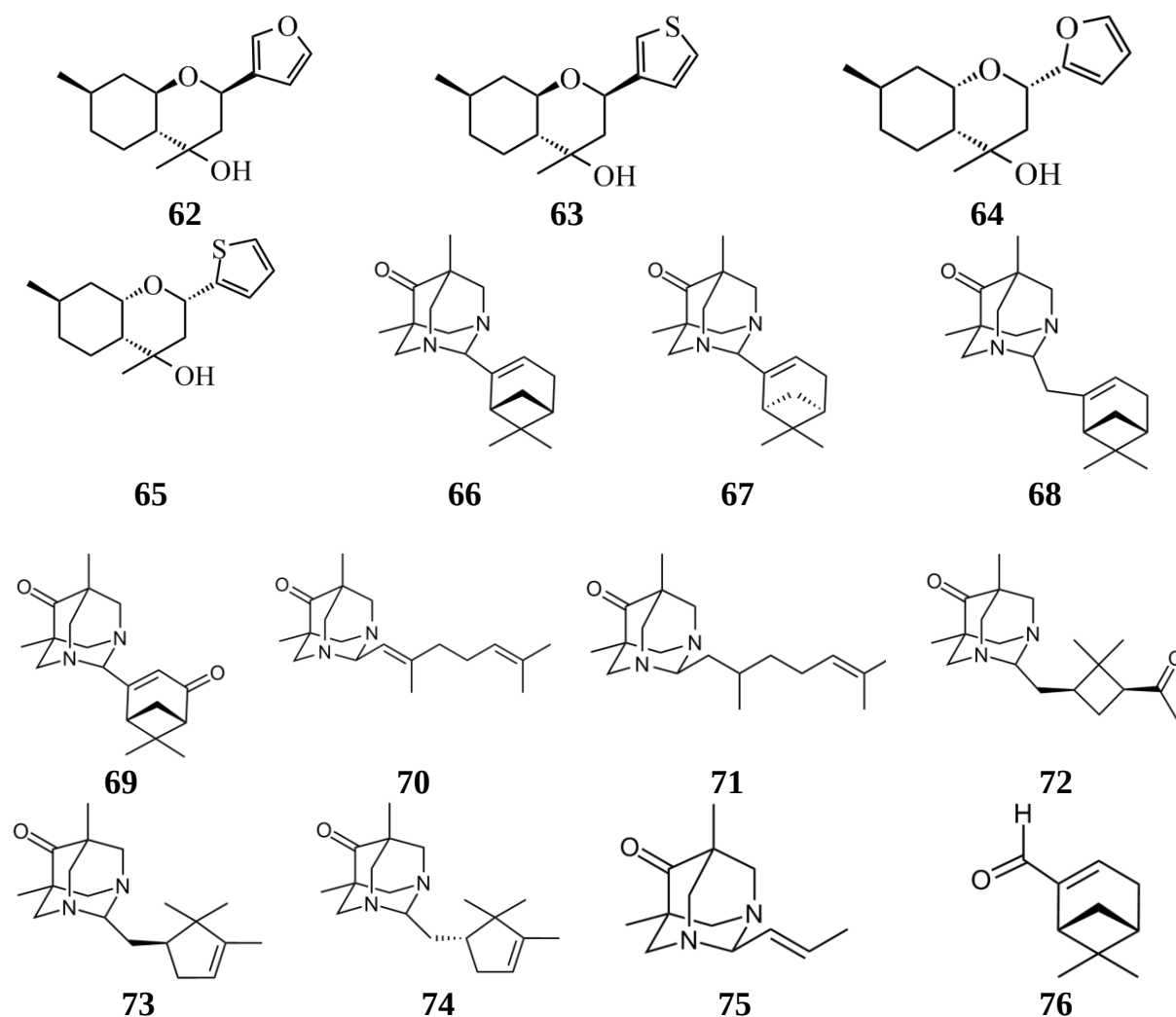


Рисунок 1 – Исследуемые соединения (1-76)

Исследуемые вещества растворяли в воде с каплей Твина-80 и вводили внутрижелудочно с помощью зонда в дозах, указанных для каждой модели далее (по 0,2 мл на 10г. массы тела мыши и по 0,2 мл на 100г. массы тела крысы). Контрольной группе животных вводили водно-твиновый раствор в тех же объемах внутрижелудочно.

Фармакологические модели и тесты. Тесты для оценки эффектов на центральную нервную систему проводили на аутбредных мышах сток CD-1. Тест «открытое поле» (Howard K. et al., 1997; Walsh, R.N., 1976) проводили с помощью автоматизированной фотосенсорной установки Tru Scan (Coulbourn, США). Исследуемые соединения вводили за 1 час до начала тестирования. Для оценки параметров двигательной-исследовательской активности животных помещали в центр установки хвостом к исследователю. В течение двух минут регистрировали основные параметры двигательной-исследовательской активности: *общая двигательная активность, время активности (с), неподвижный момент (с), дистанция движения (см), скорость движения (см/с), количество исследованных отверстий, время исследовательской активности (с), количество вертикальных стоек, число заглядываний в отверстия.*

«Коразоловую токсичность» вызывали введением коразола (90 мг/кг, *i.p.*) через 1 час после введения исследуемых соединений. Влияние на ГАМК_A-

рецепторы оценивали по проценту летальности животных в группе (Головина С.М., Андреева Н.И., 1986). «Никотиновую токсичность» вызывали инъекцией никотина (20 мг/кг, s.c.) через 1 час после введения исследуемого соединения и оценивали влияние на Н-холинорецепторы по проценту летальности животных в группе (Машковский М.Д. и др., 1983). «Ареколиновый тремор» вызывали введением М-холиномиметика ареколина (25 мг/кг, i.p.) через 1 час после введения исследуемого соединения. Эффективность исследуемых веществ оценивали по влиянию на продолжительность тремора (Ускова Н.В., Антелова Н.А., 1977). Взаимодействие с L-ДОФА (Лаврецкая Э.Ф., 1985) использовали для оценки влияния исследуемых веществ на дофаминергическую систему. L-ДОФА (200 мг/кг, i.p.) вводили через 1 час после введения исследуемых агентов. Эффект оценивали по способности исследуемых агентов оказывать влияние на параметры двигательной-исследовательской активности в модели «открытое поле». Тест «йохимбиновая токсичность» использовали для выявления адренергического компонента в фармакологической активности исследуемых агентов. (Lapin I.P., 1980). Йохимбин (40 мг/кг, i.p.) вводили через 1 час после введения исследуемых соединений. Эффект оценивали по количеству погибших животных в группе.

Оценка противопаркинсонической активности. Модель паркинсонического синдрома (ПС) у мышей и крыс, вызванного введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Jackson-Lewis V. and Przedborski S., 2007). МФТП вводили внутривентрикулярно мышам линии C57BL/6 в дозе 30 мг/кг или крысам в дозе 40 мг/кг за 15 мин до введения исследуемых веществ (Воронина Т.А. и др., 2000). Наблюдение экстрапирамидных нарушений начинали сразу же после введения нейротоксина и продолжали наблюдение в течение 2 часов. Эффективность исследуемых препаратов оценивали по способности ослаблять проявления ПС, вызванного введением МФТП: олигокинезии, ригидности и тремора, а также регистрировали наличие и выраженность слюнотечения и пилоэрекции. Оценку вызванной введением нейротоксина олигокинезии проводили в тесте «открытое поле» через 1,5 часа после инъекции МФТП, регистрируя параметры двигательной-исследовательской активности. Для количественной оценки ригидности использовали симптом «горбатости», выраженность которого зависит от мышечной ригидности и определяется по укорочению расстояния от шеи до основания хвоста за счет сгорбленности животного. Ригидность оценивали по бальной системе: 0 – отсутствие ригидности, 1 – укорочение расстояния менее чем на 3см, 2 – более чем на 3см. Тремор оценивали по выраженности в баллах: 0 – отсутствие тремора, 1 – локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап и хвоста, 2 – локальный среднеамплитудный тремор, 3 – генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор и по продолжительности. Пилоэрекцию (взъерошенность) оценивали в альтернативной форме по наличию или отсутствию у животного этого признака. Саливацию (слюноотделение) оценивали по размеру мокрого пятна на шее животного в баллах: 0 – отсутствие эффекта, 1 – до 0,5см, 2 – до 1см, 3 – до 2см. (Воронина Т.А. и др., 2000).

Проведено несколько серий экспериментов с использованием данной модели ПС: 1). Исследование противопаркинсонической активности при однократном введении нейротоксина МФТП. Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6. Индукцию ПС осуществляли путем внутривентрикулярного введения МФТП в дозе 30 мг/кг, группе контроля вводили физиологический раствор. Исследуемый агент в дозе 10 и 20 мг/кг вводили перорально через 15 минут после

воспроизведения модели ПС. Олигокинезию оценивали через 1,5 часа после инъекции МФТП по изменению параметров двигательной-исследовательской активности в тесте «открытое поле» (Миронов А.Н. и др., 2013).

2). Исследование противопаркинсонической активности при трехдневном введении нейротоксина МФТП. Эксперименты проводили на мышах-самцах линии C57BL/6. Индукцию ПС осуществляли путем внутрибрюшинного введения МФТП в дозе 30 мг/кг в течение трех дней. Агент в дозе 20 и 30 мг/кг вводили *per os* через 24 часа после последней инъекции МФТП. Олигокинезию оценивали через 1,5 часа после введения исследуемого соединения по изменению параметров двигательной-исследовательской активности в тесте «открытое поле» (Миронов А.Н. и др., 2013).

3). Исследование противопаркинсонической активности агента при десятидневном введении нейротоксина МФТП. Индукцию ПС осуществляли введением мышам-самцам линии C57BL/6 нейротоксина МФТП в дозе 25 мг/кг в течение 10 дней. Исследуемое вещество в дозе 20 мг/кг вводили перорально ежедневно через 4 часа после инъекции нейротоксина, препарат сравнения леводопу вводили в дозе 20 мг/кг. Использовали четыре группы мышей по 10 шт: 1-я (контроль I) группа – животные, которым вводили физ. раствор, 2-я (контроль II) – животные, получавшие инъекцию МФТП внутрибрюшинно ежедневно, 3-я и 4-я группы – животные, которым вводили исследуемое соединение и препарат сравнения соответственно, на фоне индуцированного ПС. Оценивали выживаемость животных в каждой группе, изменение параметров двигательной активности выживших животных регистрировали на установке Tru Scan (США) (Миронов А.Н. и др., 2013).

4). Исследование противопаркинсонической активности агента при хроническом (30 дней) введении нейротоксина МФТП. (Миронов А.Н. и др., 2013). Индукцию ПС осуществляли внутрибрюшинным введением нейротоксина МФТП крысам-самцам стока Вистар в дозе 40 мг/кг ежедневно в течение 30 дней. Агент в дозе 20 мг/кг вводили перорально ежедневно через 4 часа после инъекции нейротоксина, препарат сравнения леводопу в дозе 20 мг/кг – ежедневно через 4 часа после индукции ПС. Использовали 6 групп крыс по 10 шт: 1-я (контроль I) группа – интактные животные; 2-я (контроль II) – животные, получавшие инъекцию МФТП внутрибрюшинно ежедневно; 3-я – животные, получавшие исследуемый агент на фоне индуцированного ПС; 4-я – животные, получавшие исследуемый агент ежедневно; 5-я – животные, получавшие в качестве лечения индуцированного ПС эталон сравнения леводопы; 6-я – животные, получавшие только леводопу ежедневно. Оценку олигокинезии проводили на 31 день от начала эксперимента, регистрируя параметры двигательной-исследовательской активности в тесте «открытое поле».

5). Исследование противопаркинсонической активности агента согласно международному протоколу при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (Jackson-Lewis V., Przedborski S., 2007). Противопаркинсоническую активность оценивали на модели Паркинсонического синдрома, индуцированного четырехкратным внутрибрюшинным введением нейротоксина МФТП самцам мышей линии C57BL/6 в дозе 20 мг/кг через каждые 2 часа в течение 8 часов. Исследуемые агенты в дозе 20 мг/кг вводили через 24 часа после четвертой инъекции нейротоксина. Влияние агентов оценивали через 2 часа после введения исследуемых агентов по способности устранять проявления олигокинезии в тесте «открытое поле» в течение 2 мин с помощью установки TruScan.

Модель каталепсии, вызванной трифтазином. Для создания выраженных экстрапирамидных нарушений трифтазин вводили аутобредным крысам-самцам

внутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг через 30 минут после введения исследуемого агента. Катаlepsию оценивают через 30, 60, 120 и 180 мин после введения трифтазина по Morpurgo (Morpurgo C., 1964; Миронов А.Н. и др., 2013). Модель катаlepsии, вызванной галоперидолом (Ossowska K. et al., 1998). Для создания выраженных экстрапирамидных нарушений галоперидол вводили аутбредным крысам-самцам внутрибрюшинно в дозе 1,5 мг/кг одновременно с исследуемым агентом. Катаlepsию оценивали через 60, 120 и 180 мин после введения галоперидола с использованием параллельных перекладин. «Ареколиновый тремор» (Миронов А.Н. и др., 2013). Ареколин вводили белым беспородным мышам подкожно в дозе 25 мг/кг через 20 мин после введения исследуемого агента, регистрировали латентный период и продолжительность тремора в секундах.

Определение содержания дофамина в стриатуме с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Клодт П.М. и др., 2005). На льду быстро выделяли стриатум у предварительно декапетированных животных, который замораживали в жидком азоте и хранили при -60°C до биохимического определения. Выделенный образец ткани взвешивали и гомогенизировали на холоду в стеклянном гомогенизаторе в смеси 0,4 М HClO_4 + 0,01% Na_2EDTA с добавлением внутреннего стандарта, в качестве которого использовали 3,4-дигидроксибензиламин. Объем гомогенизирующего буфера каждый раз подбирали индивидуально в зависимости от веса ткани ($\times 10$). Затем гомогенат центрифугировали 15 мин при 15000 об/мин и 4°C . Растворы стандартов ДА и дигидроксибензиламина были приготовлены в концентрации 1 нг/20 мкл в 0,4 М HClO_4 . Приготовленные пробы и растворы стандартов хранились при -60°C . Определение проводили на хроматографе Waters-460 с электрохимическим детектором LC4. Напряжение на рабочем электроде составляло +0,70 V, электрод сравнения – Ag/AgCl. Образец пробы объемом 20 мкл наносили на колонку размером 150x4,6 мм, заполненную обращено-фазовым сорбентом (Licrosorb, C18) и защищенную предколонкой (30x4,6 мм, C18). В качестве элюирующего раствора использовали буфер с 4% метанолом (на 500 мл буфера: 6,53 г дигидрофосфата калия, 150 мг октансульфоновой кислоты, 250 мкл 0,2 М Na_2EDTA , 20 мл метанола), pH = 3,34. Скорость потока составляла 1 мл/мин. На полученных хроматограммах вычисляли высоты пиков относительно внутренних и внешних стандартов рассчитывали концентрацию ДА в ткани (нг/г ткани).

Определение нахождения исследуемых веществ в плазме крови и головном мозге животных. Исследуемые соединения вводили внутрижелудочно аутбредным крысам сток Вистар в дозе 1200 мг/кг. Через 1 час у наркотизированных с помощью тиопентала натрия (30 мг/кг, i.p.) животных забирали кровь в вакуумные пробирки путем трансторакальной пункции сердца. Далее животных подвергали эвтаназии и извлекали головной мозг. После забора крови выделяли плазму путем центрифугирования (15 мин. при 3000 об/мин). Головной мозг гомогенизировали в 60% этаноле и отфильтровывали. После осаждения белка в плазме и гомогенате головного мозга с помощью метанола и экстракции этилацетатом, определяли содержание исследуемых веществ с помощью гелий-хроматографии с масспектрометрической детекцией (ГХ\МС).

Оценка нейроресторационных свойств исследуемых веществ. Наркотизированным с помощью эфира самцам мышей линии C57BL/6 вводили

нейротоксин МФТП (20 мг/кг каждые 2 часа в течение 8 часов, *i.p.*). Исследуемое соединение вводили внутривентрикулярно через 24 часа после последней инъекции нейротоксином МФТП в дозе 20 и 5 мг/кг. Далее исследуемое соединение вводили аналогично в течение 14 дней в режиме 5 дней в неделю (всего 15 доз). Через 7 дней после последнего введения исследуемого вещества мышью перфузировали транскраниально с помощью фосфатно-солевого буфера, затем 4% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере в соответствии с методическими рекомендациями (Gage G.J., 2012). Далее извлеченный головной мозг заключали в парафиновые блоки, делали срезы с использованием комплекса MICROM («Карл Цейс» Германия). Фиксированный и заключенный в парафин ГМ был разрезан на секции толщиной 5 мкм, каждый 5-й срез брали для проведения тирозингидроксилаза-иммуногистохимии. Срезы депарафинизировали с последующим извлечением цитратного антигена. Эндогенная пероксидаза была инактивирована получасовой инкубацией с 3% H_2O_2 . Далее срезы были окрашены по стандартным методикам (Penttinen A.M. et al., 2016; Saarenmaa T. et al., 2017) наборами ABC и DAB (Vector Laboratories, Калифорния, США) в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные секции были сканированы с помощью автоматического сканера (3D Histech, Будапешт, Венгрия), и изображения были преобразованы в 16-битную шкалу серого цвета. Сигнал от кортикального окрашивания был использован для измерения неспецифического окрашивания фона. Интегрированные оптические плотности в изображениях были измерены в ImageJ (NIH) и разделены на площади в пикселях.

Оценка влияния длительного введения исследуемого агента на жизненно важные органы и системы (30 дней). Самцы крыс линии Вистар были рандомизированы по группам: 1-я (контроль I) группа – животные, получавшие физ. раствор; 2-я (контроль II) – животные, получавшие инъекцию МФТП внутривентрикулярно ежедневно; 3-я – животные, получавшие исследуемый агент на фоне индуцированного ПС; 4-я – животные, получавшие исследуемый агент ежедневно; 5-я – животные, получавшие в качестве лечения индуцированного ПС эталон сравнения леводопу; 6-я – животные, получавшие только леводопу ежедневно. Нейротоксин вводили внутривентрикулярно в дозе 40 мг/кг, диол и референс препарат (леводопа) - в дозе 20 мг/кг *per os*. На 30-й день от начала эксперимента была взята периферическая кровь для общего анализа из сосудов хвоста. Гематологические показатели периферической крови, взятой из хвоста животных, определяли на гемоанализаторе «Medonic» SA 530 (Швеция). Для биохимического анализа была забрана кровь из шейных сосудов. Биохимические показатели крови: активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание малонового диальдегида (МДА) и общего белка определяли с использованием стандартных диагностических наборов фирмы «Ольвекс-диагностикум» на фотометре - 5010 «Boehringer Mannheim» (Германия). Воздействие агентов на сердечно-сосудистую систему оценивали при внутривентрикулярном введении в дозе 5 мг/кг крысам по изменению артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС). Регистрацию показателей вели на протяжении часа после введения агентов. Показатели регистрировали с помощью прибора фирмы «Coulbourn instruments» (США) (Хабриев Р.У., 2005).

Гистологическое исследование. Полученный для морфологического исследования материал (легкие, сердце, печень и почки) подвергали гистологической

обработке на комплексе MICROM («Карл Цейс» Германия) по стандартной методике (Р. Лилли, 1969).

«Уксусные корчи» (УК) вызывали внутрибрюшинным введением уксусной кислоты (0,75% из расчета 0,1 мл/10 г веса тела мыши, затем в течение 3-х мин через 5 мин после введения кислоты регистрировали количество вызванных корчей (Koster R et al., 1959; Morozova E.A. et al., 2008). Процент ингибирования рассчитывали по формуле: $\% \text{ ингибирования} = 100\% * (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$, где K – среднее количество корчей в группе. В тесте «Горячая пластина» (ГП) животных помещали на медную пластину, нагретую до $54 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$, ограниченную цилиндром из оргстекла (15 см × 15 см), и фиксировали латентное время болевой реакции – облизывание задней лапы или подпрыгивание (Eddy N.B., Leimbach D., 1953).

Для определения участия нейромедиаторных систем центральной нервной системы в механизмах анальгетической активности исследуемых соединений в модели «уксусные корчи» вводили следующие антагонисты: налоксон (1 мг/кг, *i.p.*) (Lewanowitsch T. et al., 2006), ондансетрон (0,5 мг/кг, *i.p.*) (Sari M.H.M. et al., 2014), кетансерин тартрат (0,3 мг/кг, *i.p.*) (Sari M.H.M. et al., 2014), галоперидол (1 мг/кг, *i.p.*) (Naidu P.S. et al., 2003), R(+)-SCH-23390 (0,05 мг/кг, *i.p.*) (Sari M.H.M. et al., 2014), сульпирид (5 мг/кг, *i.p.*) (Sari M.H.M. et al., 2014), йохимбин (1 мг/кг, *i.p.*) (Kaur R. et al., 2005), бикикуллин (1 мг/кг, *i.p.*) (Filho A.W. et al., 2008) вводили за 15 мин до введения исследуемых агентов; римонабант (10 мг/кг, *i.p.*) вводили за 10 мин до введения агентов (Booker L. et al., 2009); скополамин (2,5 мг/кг, *i.p.*) вводили за 5 мин до введения исследуемых агентов (Serrano I. et al., 1992). *Исследование противовоспалительной активности* проводили на модели воспаления, вызванного введением раствора формалина (3%, по 0,05 мл) в апоневроз стопы животного (Тринус Ф. Н. и др., 1974). Процент воспаления рассчитывали по формуле: $100 \% * (M_{\text{лв}} - M_{\text{лб/в}}) / M_{\text{лб/в}}$, где $M_{\text{лв}}$ – масса лапы с воспалением, $M_{\text{лб/в}}$ – масса лапы без воспаления. *Повреждающее действие исследуемых соединений на слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки* изучали на белых крысах линии Вистар массой 200-250 г. по стандартной методике (Marazzi-Uberti E., Turba C., 1961). Животным в течение 3 дней ежедневно вводили исследуемые агенты внутривентрально в дозе 30 мг/кг (суммарная доза 90 мг/кг), препарат сравнения индометацин натрия вводили аналогичным способом в дозе 20 мг/кг (суммарная доза 60 мг/кг). На 4-е сутки животных подвергали эвтаназии, извлекали желудки, рассекли по малой кривизне, с помощью дистиллированной воды промыли и визуально оценивали состояние слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, обращая внимание на наличие складчатости, эрозий, изъязвлений и цвет слизистой оболочки.

Статистическую обработку данных вели с помощью компьютерной программы Statistica 7.0, достоверность определяли по t-критерию Стьюдента, непараметрическому U-критерию Манна-Уитни, критерию Фишера.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных в исследовании результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее по результатам проведенного первичного скрининга на противосудорожную активность среди производных параментанового ряда (1-5) (Tolstikova T.G. et al., 2009) было обнаружено соединение 2 (рисунок 2), которое в

дозе 10 мг/кг полностью блокирует развитие судорог, вызванных введением коразола, и значительно снижает процент гибели животных в тесте «никотиновая токсичность». Выявлена связь «структура-активность» и определено, что важным условием для проявления исследуемым агентом **2** противосудорожной активности в тестах «коразоловая» и «никотиновая токсичность» является наличие двойной связи в 8,9-положении.

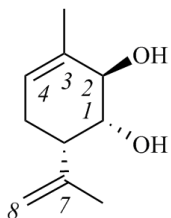


Рисунок 2 -
Диол

Исследуемые соединения **1-5** (10 мг/кг, *per os*) не оказывают достоверного влияния на двигательную-исследовательскую активность мышей. Для дальнейшего изучения фармакологической активности было выбрано соединение **2** - **диол** (рисунок 2), проявившее выраженную противосудорожную активность в обоих скрининговых тестах и не оказывающее негативного влияния на двигательную-исследовательскую активность, оцениваемую в открытом поле.

При исследовании острой токсичности показано, что введение диола в дозе 1000 мг/кг не привело к гибели животных, общее действие выражалось в незначительном угнетении двигательной активности. Введение диола в дозе 3000 мг/кг вызвало гибель 50% животных в группе в течение первых суток, остальные животные на протяжении эксперимента (14 сут) выжили. Абсолютно-смертельная доза (LD_{100}) составила 5000 мг/кг. Таким образом, по результатам проведенного эксперимента была рассчитана средняя смертельная доза (LD_{50}) для однократного внутрижелудочного способа введения, которая составила 4250 мг/кг.

Для изучения влияния диола на дофаминергические системы головного мозга использовали L-3,4-дигидрооксифенилаланин (L-ДОФА), введение которого провоцирует возникновение морфо-химических сдвигов в двигательных структурах экстрапирамидной системы головного мозга и, как следствие, приводит к нарушению двигательной активности животных. (Сергутина А.В., Герштейн Л.М., 2004). В эксперименте установлено, что диол (10 мг/кг) проявляет однонаправленное с L-ДОФА действие на дофаминергическую систему головного мозга, усиливая угнетающее действия предшественника дофамина (таблица 1), что проявилось в достоверном уменьшении показателей двигательной активности животных. Диол, оказывая потенцирующее действие на дофаминергическую систему головного мозга, скорее всего, обладает дофаминиметическими свойствами.

Таблица 1 – Влияние диола на эффекты L-ДОФА (мыши сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	$106,2 \pm 2,4$ ***	$13,8 \pm 2,4$ ***	$375,0 \pm 43,1$ ***	$3,1 \pm 0,4$ ***	$2,8 \pm 0,0$ ***	$13,2 \pm 1,6$ ***
L-ДОФА	$21,0 \pm 2,4$	$99,0 \pm 2,4$	$34,2 \pm 5,4$	$0,28 \pm 0,05$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
L-ДОФА + диол	$13,0 \pm 1,8$ *	$107,0 \pm 1,8$ *	$19,2 \pm 2,4$ *	$0,14 \pm 0,02$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Примечание: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой L-ДОФА.

Также ранее уже было показано, что диол, вероятно, проявляет холинолитические свойства (Толстикова Т.Г. и др., 2009). Учитывая тот факт, что основные нейротрансмиттерные нарушения при болезни Паркинсона - это дефицит синтеза дофамина, который влечет за собой избыточное продуцирование нейромедиатора ацетилхолина и глутамата и недостаточный синтез норадреналина и серотонина (Михайлузова О.И., Кутапов В.А., 2015; Thomas B. et al., 2018), решено было изучить противопаркинсонические свойства диола, проявляющего однонаправленное с L-ДОФА действие в отношении дофаминергической системы и угнетающее в отношении холинергической.

Исследование противопаркинсонической активности диола при однократном и трехдневном введении МФТП. В эксперименте с однократным введением нейротоксина диол в дозе 10 мг/кг достоверно увеличил показатели общей двигательной активности и времени движения животных, а также оказал достоверное положительное влияние на исследовательскую активность мышей, увеличивая количество исследованных отверстий (таблица 2). Введение диола в дозе 20 мг/кг оказало положительное влияние на все параметры двигательной-исследовательской активности животных, восстанавливая показатели до уровня животных контрольной группы (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние диола на двигательную-исследовательскую активность мышей при однократном введении МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	82,0±1,9 **	66,6±2,3 ***	309,3±7,9 ***	2,5±0,1 ***	4,7±0,9	11,6±1,4* *
МФТП	59,0±3,8	39,8±5,8	171,4±37,0	1,3±0,3	5,0±1,6	4,9±0,9
МФТП+диол 10 мг/кг	77,2±5,0 **	57,0±5,3*	257,3±29,5	2,1±0,2	5,8±1,8	7,7±1,1*
МФТП+диол 20 мг/кг	80,7±4,0 **	59,0±4,0 **	276,5±24,0 **	2,3±0,2**	8,5±2,0*	7,6±1,7*

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Трехкратное введение МФТП усиливает повреждение дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга (Serra P.A. et al., 2008), что позволяет смоделировать *in vivo* поздние стадии паркинсонического синдрома. Исследование противопаркинсонической активности диола на модели паркинсонического синдрома, вызванного трехдневным введением нейротоксина МФТП, показало, что диол в дозе 20 мг/кг проявляет достоверную противопаркинсоническую активность, восстанавливая показатели двигательной-исследовательской активности у животных (таблица 3). Увеличение дозы до 30 мг/кг не привело к усилению диолом противопаркинсонической активности (таблица 3). Исходя из полученных данных, дальнейшие исследования фармакологической активности диола были проведены для дозы 20 мг/кг.

Помимо восстанавливающего влияния на двигательную-исследовательскую активность животных с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом, диол полностью устранил проявления саливации, в 5 раз снизил процент животных

с развившейся пилоэрекции, а также выраженность тремора и проявления ригидности, вызванные введением МФТП.

Таблица 3 – Влияние диола на двигательную-исследовательскую активность мышей после трехдневного введения МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	88,1 $\pm$ 2,4 ***	70,2 $\pm$ 3,6 ***	361,6 $\pm$ 2,4 ***	2,9 $\pm$ 0,3 **	15,0 $\pm$ 3,9	7,8 $\pm$ 1,1 ***
МФТП	43,4 $\pm$ 4,7	55,5 $\pm$ 6,0	264,5 $\pm$ 34,8	2,2 $\pm$ 0,3	12,2 $\pm$ 2,0	1,8 $\pm$ 0,6
МФТП+диол 20 мг/кг	81,9 $\pm$ 3,7 ***	70,1 $\pm$ 3,9 **	351,8 $\pm$ 26,4 **	2,9 $\pm$ 0,2 **	11,1 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 1,0 ***
МФТП+диол 30 мг/кг	81,8 $\pm$ 2,6 **	66,8 $\pm$ 3,7*	335,5 $\pm$ 8,9 *	2,7 $\pm$ 0,2	13,0 $\pm$ 1,7	3,8 $\pm$ 0,6*

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Для определения влияния абсолютной конфигурации (Eliel E.L. et al., 1994) на проявление диолом противопаркинсонической активности были синтезированы 8 его оптических изомеров (соединения **6-13**) (рисунок 1), и изучена их противопаркинсоническая активность на модели паркинсонического синдрома, вызванного однократным введением нейротоксина МФТП.

Наиболее выраженную противопаркинсоническую активность проявляет соединение **6** (таблица 4), которое составляет 85% диола. Изменение конфигурации гидроксигруппы в 5-ом положении с R на S (переход к соединению **7**) привело к полному исчезновению проявления противопаркинсонической активности (таблица 5). Соединение **9** с измененной конфигурацией гидроксигруппы в 6-ом положении усугубило проявления олигокинезии, вызванной введением нейротоксина МФТП (таблица 6). Соединение **8** с измененными положениями обеих гидроксигрупп, а также соединение **10** с измененной конфигурацией изопропенильной группы не оказали влияния на двигательную-исследовательскую активность животных с индуцированным ПС (таблица 6). Одновременное изменение конфигурации гидроксигрупп и изопропенильной группы на противоположные при переходе к соединению **11**, которое составляет 15% соединения диола, привело к исчезновению противопаркинсонической активности (таблица 4). Расположение изопропенильной группы не играет значимой роли в проявлении исследуемыми соединениями противопаркинсонической активности.

Проявление противопаркинсонической активности диолом в тесте с нейротоксином МФТП зависит от его абсолютной конфигурации, а именно от определенного взаиморасположения гидроксид- и изопропенильной группы. Таким образом, перспективным для дальнейших исследований является соединение **2** (диол), состоящее из наиболее активного стереоизомера **6** (85%) и неактивного изомера **11** (15%). Данная оптическая чистота соответствует таковой коммерчески доступного исходного вещества (-)-вербенон, что делает получение диола (85:15) наиболее фармакоэкономичным.

Таблица 4 – Противопаркинсоническая активность оптических изомеров диола (6, 11) на модели ПС, вызванного однократным введением МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	84,1 $\pm$ 1,9 ***	58,3 $\pm$ 3,9 ***	276,8 $\pm$ 27,8 **	2,3 $\pm$ 0,2 **	15,6 $\pm$ 3,3	6,5 $\pm$ 1,3 ***
МФТП	50,6 $\pm$ 8,1	27,8 $\pm$ 4,8	107,8 $\pm$ 20,6	0,9 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,9
МФТП+6	78,6 $\pm$ 5,0 **	64,0 $\pm$ 5,5 ***	332,6 $\pm$ 39,6 ***	2,7 $\pm$ 0,3 ***	13,1 $\pm$ 2,5 ***	3,2 $\pm$ 0,9
МФТП+11	57,9 $\pm$ 6,0	34,9 $\pm$ 4,3	147,8 $\pm$ 20,3	1,13 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 0,9

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Таблица 5 – Противопаркинсоническая активность оптических изомеров диола (7, 13) на модели ПС, вызванного однократным введением МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	79,1 $\pm$ 1,3 ***	68,3 $\pm$ 3,5 ***	286,8 $\pm$ 22,4 **	2,5 $\pm$ 0,3 **	14,8 $\pm$ 3,2 **	6,8 $\pm$ 1,2 ***
МФТП	71,8 $\pm$ 6,4	47,9 $\pm$ 4,5	218,1 $\pm$ 26,2	1,8 $\pm$ 0,2	8,9 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 0,5
МФТП+7	64,9 $\pm$ 8,7	45,5 $\pm$ 8,2	212,4 $\pm$ 48,7	1,7 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 1,3
МФТП+13	80,2 $\pm$ 6,2*	55,6 $\pm$ 6,9	245,9 $\pm$ 34,6*	1,2 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 3,6**	3,11 $\pm$ 0,6*

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Таблица 6 – Противопаркинсоническая активность оптических изомеров диола (8, 9, 10, 12) на модели ПС, вызванного однократным введением МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	83,0 $\pm$ 2,4 ***	75,9 $\pm$ 1,2***	417,1 $\pm$ 21,2**	3,43 $\pm$ 0,2**	17,6 $\pm$ 5,4	5,4 $\pm$ 1,0
МФТП	69,9 $\pm$ 4,7	46,8 $\pm$ 4,4	211,8 $\pm$ 29,1	1,7 $\pm$ 0,3	11,3 $\pm$ 3,8	6,3 $\pm$ 1,8
МФТП+8	77,4 $\pm$ 8,2	55,7 $\pm$ 7,4	253,3 $\pm$ 38,1	2,1 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 1,6	10,3 $\pm$ 1,0
МФТП+9	28,5 $\pm$ 10,1*	15,0 $\pm$ 5,4 ***	55,9 $\pm$ 20,9***	0,4 $\pm$ 0,2**	0,9 $\pm$ 0,6*	1,7 $\pm$ 0,6*
МФТП+10	65,5 $\pm$ 8,8	46,9 $\pm$ 6,0	158,8 $\pm$ 32,7	1,3 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 1,4	4,7 $\pm$ 2,1
МФТП+12	82,4 $\pm$ 5,8	56,6 $\pm$ 6,2	257,7 $\pm$ 36,6	2,1 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 2,0	7,9 $\pm$ 1,6

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Для подтверждения противопаркинсонической активности был проведен эксперимент согласно международному протоколу, опубликованному в Nature Protocols (Jackson-Lewis V., Przedborski S., 2007), в котором указано, что только хроническое введение нейротоксина МФТП (четырёхкратное в течение 8 часов с интервалом в 2 часа) способно вызвать снижение дофамина в стриатуме головного мозга на 40% – 90%, в зависимости от дозы введения нейротоксина (14 мг/кг – 20 мг/кг, соответственно). Результаты эксперимента показали, что диол в дозе 20 мг/кг и при данной схеме эксперимента достоверно улучшал показатели двигательной активности: скорость движения, пройденное животным расстояние, а также исследовательской активности, выраженной в увеличении числа исследованных отверстий и количества вертикальных стоек (таблица 7). Таким образом, и на этой модели паркинсонического синдрома диол в дозе 20 мг/кг показал выраженный противопаркинсонический эффект.

Таблица 7 – Влияние диола (20 мг/кг) на двигательную-исследовательскую активность мышей с индуцированным паркинсоническим синдромом при четырёхкратном введении МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Время активности (с)	Неподвижный момент (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	73,3 ± 2,3 **	90,0 ± 1,4 **	556,7 ± 9,6 **	4,6 ± 0,2 **	4,1 ± 1,0 *	24,9 ± 3,3 **
МФТП	89,3 ± 1,8	64,1 ± 4,1	286,6 ± 36,5	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,6	8,5 ± 2,2
МФТП+диол 20 мг/кг	80,5 ± 3,9	74,8 ± 6,4 *	439,6 ± 32,9 **	3,6 ± 0,3 **	6,5 ± 1,6*	14,8 ± 3,4 *

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с группой МФТП.

Далее проведены стандартные тесты для изучения противопаркинсонической активности, рекомендованные руководством по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ (Миронов А.Н. и др., 2013). В экспериментах установили, что диол (20 мг/кг) уменьшает выраженность каталепсии, вызванной введением трифтазина, у животных и замедляет ее развитие, в то время как препарат сравнения леводопа лишь пролонгирует ее развитие, но не оказывает влияния на выраженность каталепсии (рисунок 3). Введение 20 мг/кг диола на фоне каталепсии, вызванной введением галоперидола, привело к значительному снижению общей продолжительности каталепсии у крыс и практически полному предотвращению ее развития, снижая количество животных с развившейся каталепсией (рисунок 4 и 5).

В результате дефицита дофамина в ходе развития БП снижается эффективность тормозных дофаминергических влияний и при этом возрастает активность холинергических и глутаматергических воздействий (Федорова Н.В. и др., 2001; Savitt J.M. et al., 2006). Поэтому важно оценить влияние диола на холинергическую систему головного мозга. В тесте с М-холиномиметиком ареколином диол в дозе 20 мг/кг проявил холиномиметические свойства, уменьшая продолжительность судорог, вызванных введением ареколина (рисунок 6). В тесте «никотиновой токсичности» диол в дозе 20 мг/кг уменьшал процент

летальности животных, вызванной введением Н-холиномиметика никотина в 2,2 раза (таблица 8), что говорит о проявлении диолом Н-холинолитических свойств. Таким образом, диол одновременно обладает дофаминомиметическими и холинолитическими свойствами, поэтому его использование, вероятно, позволяет корректировать нейромедиаторный дисбаланс, возникающий при развитии болезни Паркинсона.

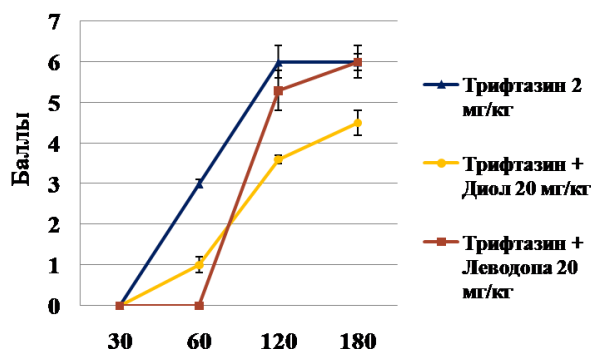


Рисунок 3 – Влияние диола на продолжительность каталепсии, вызванной трифтазином (крысы стока Вистар, n=8)

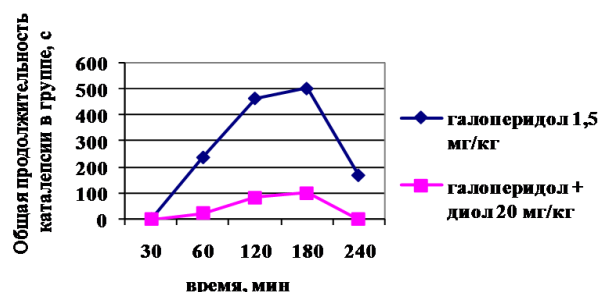


Рисунок 4 – Влияние диола на продолжительность каталепсии, вызванной галоперидолом (крысы стока Вистар, n=8)

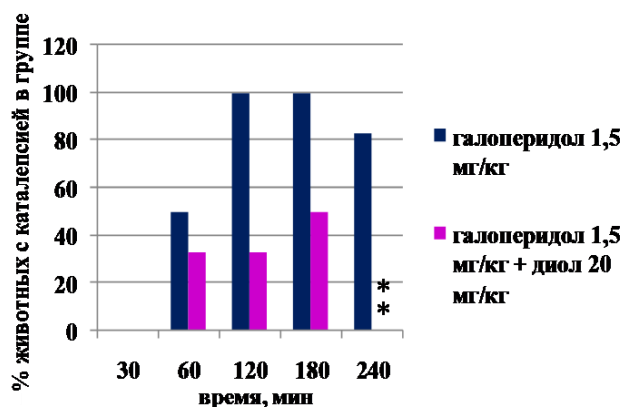


Рисунок 5 – Процент каталептических животных в группе (крысы стока Вистар, n=8)

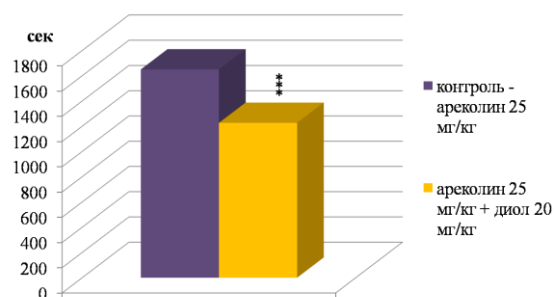


Рисунок 6 – Влияние диола на продолжительность ареколинового тремора (мыши сток CD-1, n=8). ***p<0,001 по сравнению с группой ареколина

Для исследования влияния диола на адренергическую систему головного мозга проведен тест взаимодействия исследуемого агента с α_2 -адреноблокатором йохимбином (Larin I.P., 1980). Установлено, что диол (20 мг/кг) увеличил процент смертности животных, вызванной введением йохимбина (таблица 9). Как известно, рецепторная блокада антагонистами α_2 -адренорецепторов повышает способность нейронов к стимуляции и высвобождению норадреналина (Freedman J.E., Aghajanian G.K., 1984; Scheinin H. et al., 1988), за счет чего и осуществляется токсический эффект йохимбина. Усиление токсического действия йохимбина диолом может свидетельствовать об отсутствии активации исследуемым соединением α_2 -адренорецепторов и проявлении противопаркинсонической активности, непосредственным действием на дофаминергическую систему ЦНС.

Таблица 8 – Влияние диола на летальность животных в тесте «никотиновая токсичность» (мыши сток CD-1, n=8)

Гибель животных в %	
Контроль - никотин	Никотин + диол 20 мг/кг
62,5	25 **

Примечание: **p<0,01 по сравнению с группой контроля.

Таблица 9 – Влияние диола на токсический эффект йохимбина (мыши сток CD-1, n=8)

Гибель животных в %	
Контроль - йохимбин	Йохимбин + диол 20 мг/кг
37,5	75 **

Примечание: **p<0,01 по сравнению с группой контроля.

вводили нейротоксин МФТП ежедневно в течение 10 дней в дозе 20 мг/кг внутрибрюшинно. Диол и препарат сравнения леводопа также вводили ежедневно внутривентрикулярно в дозе 20 мг/кг через 1 час после введения нейротоксина МФТП. Оценивали процент смертности животных в группах. Результаты эксперимента показали, что диол достоверно уменьшил летальность животных, вызванную хроническим введением нейротоксина МФТП, тогда как препарат сравнения леводопа не оказал значимого эффекта (таблица 10). Таким образом, введение исследуемого агента на фоне длительного введения нейротоксина МФТП значительно снижает смертность животных, что еще раз подтверждает наличие выраженной противопаркинсонической активности.

Таблица 10 – Исследование противопаркинсонической активности диола при десятидневном введении МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8)

	Контроль	МФТП	МФТП + диол 20 мг/кг	МФТП + леводопа 20 мг/кг
Летальность, %	0**	60	10*	20

Примечание: *p<0,05; **p<0,01 по сравнению с группой МФТП.

Для определения профилактического действия диола в отношении развития паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина МФТП, животным вводили исследуемый агент в течение 10 дней в дозе 20 мг/кг, а на 11 сутки индуцировали ПС введением нейротоксина МФТП. Результаты показали, что введение диола за 24 часа и более до индуцирования ПС не оказывает влияния на показатели двигательной-исследовательской активности животных (таблица 11), что указывает на лечебный эффект диола при развившемся экспериментальном паркинсоническом синдроме, нежели о нейропротекторном действии в моделях с нейротоксином МФТП. Поэтому применение исследуемого агента в качестве профилактического нейропротекторного средства является нецелесообразным.

Результаты проведенных экспериментов подтвердили, что диол обладает именно противопаркинсонической активностью, и в механизме его действия, вероятно, участвуют дофаминергические и холинергические нейромедиаторные системы головного мозга.

Развитие паркинсонического синдрома может заканчиваться летальным исходом, поэтому критерий выживаемости является одним из существенных показателей динамики развития заболевания (Лукьянова Л.Д. и др., 2007). Для определения влияния диола на смертность животных, вызванную массовой гибелью дофаминергических нейронов мышам

Таблица 11 – Влияние предварительного введения диола (20 мг/кг) на двигательную исследовательскую активность животных с индуцированным ПС (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Общая двигательная активность (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	80,3±2,5 ***	69,7±2,4 ***	347,5±20,5 **	3,0±0,2**	14,6±1,8 **	4,6±0,9 ***
МФТП	50,6±8,1	27,8±4,8	107,8±20,6	0,9±0,2	2,6±0,8	2,8±0,9
МФТП+диол	47,4±7,9	32,4±9,5	106,8±23,6	0,8±0,2	2,0±1,3	1,9±0,8

Примечание: **P<0,01; ***P<0,001 по сравнению с группой МФТП.

Продолжительность противопаркинсонического действия диола изучена в длительном эксперименте (30 дней), в котором крысам ежедневно вводили нейротоксин МФТП (40 мг/кг, *i.p.*), моделируя паркинсонический синдром, и, в качестве лечения, диол или препарат сравнения Леводопу (ежедневно). На 30-й день эксперимента оценивали параметры двигательной исследовательской активности животных в установке Tru Scan. Результаты эксперимента показали, что диол проявляет более выраженную противопаркинсоническую активность, чем препарат сравнения леводопы, снимая проявления олигокинезии, вызванной введением нейротоксина МФТП (таблица 12), что является очень ценным критерием эффективности применения диола в качестве противопаркинсонического средства, учитывая хроническое течение болезни Паркинсона.

Таблица 12 – Противопаркинсоническая активность диола (20 мг/кг) на модели ПС, в длительном (30 дней) эксперименте (самцы крыс стока Вистар, n=8) (M±m)

Группа	Общая двигательная активность (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость движения (см/с)	Число заглядываний в отверстия	Количество вертикальных вставаний
Контроль	81,5±2,2	77,3±3,3	424,8±28,5	3,5±0,2	10,1±0,7	6,5±1,3
МФТП	66,4±5,8 *	52,4±7,7 **	264,6±50,0 **	2,16±0,4*	6,5±2,0	1,5±0,7 **
МФТП+диол 20мг/кг	77,2±4,0 #	68,0±3,5 #	360,3±29,4 ##	2,94±2,0 #	9,2±1,2	2,4±0,7
МФТП+Леводопы 20 мг/кг	73,4±4,1 #	63,2±5,2 #	320,9±33,6 #	1,6±0,3#	7,1±1,7	2,0±0,9
Диол 20 мг/кг	72,9±3,2 *	65,1±3,2	343,1±23,6	2,8±0,2	8,6±1,7	1,9±0,5 **
Леводопы 20 мг/кг	72,7±3,5 *	62,4±3,6 *	329,7±24,7 *	2,7±0,2	8,7±1,8	1,7±0,5 **

Примечание: * P < 0,05; ** P<0,01 по сравнению контрольной группой; # P < 0,05; ##P<0,01 по сравнению с группой МФТП.

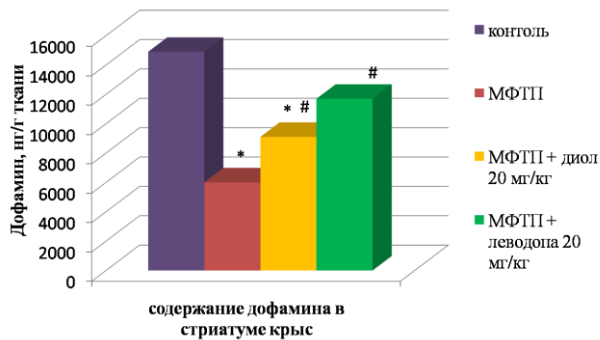


Рисунок 7 – Содержание дофамина в стриатуме (самцы крыс стока Вистар, n=8). * $p<0,05$ по сравнению с контролем; # $p<0,05$ по сравнению с группой МФТП

препарату сравнения леводопе, ослабляя действие нейротоксина и увеличивая содержание дофамина в стриатуме головного мозга крыс (рисунок 7).

Изучение возможного негативного влияния исследуемого агента на живой организм было проведено в длительном эксперименте при пероральном введении диола в дозе 20 мг/кг в течение 30 дней. В результате эксперимента показано, что диол, аналогично препарату сравнения леводопе, не оказывает влияния на количество потребляемой пищи и воды, набор массы тела крысами, состояние кожного и шерстяного покрова, слизистые оболочки глаз и ротовой полости. Также введение диола в дозе 20 мг/кг не оказывает влияния на температуру тела животных, показатели артериального давления и кардиограмму.

Достоверных различий по показателям периферической крови (число эритроцитов, лейкоцитов, гематокрит, концентрация гемоглобина и относительное содержание эозинофилов, нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов) животных, не обнаружено. При исследовании биохимических показателей крови обнаружено достоверное, по сравнению с контрольной группой, повышение активности щелочной фосфатазы у животных, которое по литературным данным является физиологической нормой (Даренская Н.Г. и др., 2004). Уровень других показателей (АЛТ, АСТ, МДА и общий белок) у животных после введения исследуемых веществ достоверно не отличался от таковых в контроле.

При гистологическом исследовании сердца, печени и почек животных, которые получали ежедневно диол в дозе 20 мг/кг в течение 30 дней, отклонений в строении органов и тканей обнаружено не было.

По результатам экспериментов можно заключить, что диол (20 мг/кг), аналогично препарату сравнения леводопе, не оказывает токсического действия на жизненно важные органы и системы, что дает возможность предположить отсутствие выраженных побочных эффектов, присущих исследуемому агенту.

Таким образом, нами было впервые продемонстрировано, что внутрижелудочное введение диола в дозе 20 мг/кг эффективно устраняет проявления экспериментального паркинсонизма во всех основных моделях болезни Паркинсона *in vivo* и не оказывает ощутимого негативного влияния на организм животных даже при длительном использовании, что делает перспективным дальнейшее изучение этого соединения в качестве противопаркинсонического средства.

В рамках совместных проектов СО РАН были проведены исследования по определению содержания дофамина в стриатуме головного мозга крыс при моделировании хронического паркинсонического синдрома. Результаты эксперимента показали, что диол в дозе 20 мг/кг при ежедневном введении на фоне постоянно моделируемого паркинсонического синдрома путем введения (30 дней) нейротоксина МФТП действует аналогично

Исследование анальгетической активности диола показало, что данный агент в дозе 10 мг/кг проявил селективную анальгетическую активность только в тесте на висцеральную боль, достоверно уменьшая количество корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты (таблица 13). Аналогичная активность сохраняется и при снижении дозы исследуемого агента до 1 мг/кг (таблица 13).

Таблица 13 – Анальгетическая активность диола (мышы сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

Доза	Горячая пластина (с)		Уксусные корчи (кол-во)	
	Контроль	Диол	Контроль	Диол
10 мг/кг	21,4 $\pm$ 1,2	15,8 $\pm$ 2,8	12,8 $\pm$ 0,7	8,3 $\pm$ 1,3**
1 мг/кг	20,5 $\pm$ 2,7	16,4 $\pm$ 2,0	9,0 $\pm$ 0,9	5,3 $\pm$ 1,3*

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с группой контроля.

Таким образом, диол помимо противопаркинсонических свойств обладает анальгетической активностью в тесте «уксусные корчи», что позволит значительно уменьшить

сопутствующую симптоматику заболевания у людей, страдающих БП или паркинсоническим синдромом.

Как было установлено ранее, абсолютная конфигурация оказывает решающее влияние на проявление диолом противопаркинсонической активности. В структурной формуле диола содержится две двойные связи и две гидроксигруппы. Следующим шагом в изучении связи структура-активность явилось исследование влияния четырех функциональных групп, содержащихся в молекуле диола (две гидроксигруппы и две двойные связи), на проявление им противопаркинсонической активности. Были синтезированы соединения **14-17**, у которых отсутствует одна из функциональных групп (рисунок 1), и изучено их противопаркинсоническое действие при пероральном введении в дозе 20 мг/кг на модели паркинсонического синдрома, вызванного четырехкратным введением нейротоксина МФТП.

Результаты эксперимента (таблица 14) показали, что удаление 7,8-двойной связи при переходе к соединению **14**, а также удаление гидроксигруппы в первом положении при переходе к карвеолу **15** привело к полной потере соединениями **14** и **15** способности проявлять противопаркинсоническую активность. Удаление гидроксигруппы во втором положении (при переходе к соединению **16**) и 3,4-двойной связи (при переходе к соединению **17**) привело к исчезновению влияния на развитие олигокинезии, вызванной введением нейротоксина МФТП, и оказало положительное влияние на исследовательскую активность животных (таблица 14), достоверно увеличивая количество исследуемых отверстий и вертикальных стоек, а также времени исследования (до таковых значений у животных контрольной группы).

Таким образом, наличие в структурной формуле диола всех четырех функциональных групп (две гидрокси- и две двойные связи) имеет решающее значение для проявления им противопаркинсонической активности.

Для исследования противопаркинсонической активности производных диола был синтезирован ряд производных диола (**18-26**), модифицируемых по С-9 положению, вводя различные заместители (рисунок 1) и не внося изменения в основную молекулу, оставляя все четыре функциональные группы (две двойные связи и две гидроксигруппы), важные для проявления диолом противопаркинсонической активности.

Таблица 14 – Изучение противопаркинсонической активности соединений **14-17** (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	43,4 $\pm$ 2,1	76,6 $\pm$ 2,1	397,6 $\pm$ 13,2	3,3 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 1,5	15,0 $\pm$ 1,6
МФТП	55,4 $\pm$ 4,2**	69,6 $\pm$ 4,6	299,1 $\pm$ 28,6**	2,5 $\pm$ 0,2**	4,5 $\pm$ 0,5**	7,3 $\pm$ 1,6**
МФТП+14	53,5 $\pm$ 2,4	66,5 $\pm$ 2,4	309,0 $\pm$ 17,1	2,5 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 1,5
МФТП+15	53,2 $\pm$ 2,6	66,8 $\pm$ 3,6	313,1 $\pm$ 2,4	2,6 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 2,4
МФТП+16	49,6 $\pm$ 2,3	72,8 $\pm$ 4,3	351,3 $\pm$ 24,6	2,8 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 1,2##	14,6 $\pm$ 1,6#
МФТП+17	52,0 $\pm$ 2,4	68,0 $\pm$ 2,4	308,0 $\pm$ 17,2	2,5 $\pm$ 0,1	8,6 $\pm$ 1,0##	12,1 $\pm$ 0,9#

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ по сравнению с группой МФТП.

Введение дополнительной гидроксигруппы в молекулу диола при переходе к триолу **18** привело к полному исчезновению противопаркинсонической активности (таблица 16). Переход к фталамиду **20** привел к усилению развития олигокинезии у животных и достоверному угнетению исследовательской реакции, а именно уменьшению числа заглядываний в отверстия (таблица 15). Введение аминогруппы при переходе к соединению **19** привело к исчезновению противопаркинсонической активности у диола и еще большему уменьшению времени исследовательской реакции (таблица 15). Введение в молекулу морфолинового заместителя при переходе к соединению **21** привело к проявлению тенденции к усилению развития олигокинезии у животных, а также достоверному угнетению исследовательской реакции и уменьшению числа заглядываний в отверстия (таблица 15). Производное 2-адамантиламина - соединение **22** оказало достоверный угнетающий эффект на все параметры двигательной активности животных, усиливая токсическое действие нейротоксина МФТП (таблица 15). Другое азотсодержащее соединение **23** (производное 1,1-диметилэтилендиамина) достоверно, по сравнению с группой МФТП, увеличило скорость движения и дистанцию, пройденную животными, но не оказало влияния на исследовательскую реакцию (таблица 16). Введение бутилового заместителя при переходе к соединению **24** привело к положительному достоверному по сравнению с группой МФТП влиянию на параметры двигательной активности животных, увеличивая скорость движения и пройденную дистанцию, а также усилило вертикальную активность, но не оказало влияния на количество исследуемых животными отверстий (таблица 15). Гетероциклический аналог триола **18** – соединение **25** не оказало влияния на параметры двигательной активности, но уменьшило количество исследованных отверстий (таблица 15). Выраженную противопаркинсоническую активность проявило производное пропантиола (таблица 16).

Исследование противопаркинсонической активности производных диола показало, что введение заместителей, содержащих гетероатомы в С-9 положении, привело к полной потере проявления полученными соединениями противопаркинсонической активности, или частичной для соединений **18** и **23**, а введение в молекулу диола алифатического или тииоалифатического заместителя

позволило сохранить проявление исследуемыми соединениями выраженных противопаркинсонических свойств.

Таблица 15 – Противопаркинсоническая активность производных диола (19-22, 24, 25) при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	47,6±2,6	72,4±2,6	372,1±27,2	3,1±0,2	10,5±0,8	4,1±0,9
МФТП	63,8±3,2**	56,2±3,2**	241,1±20,7**	2,0±0,2**	8,1±1,0	4,8±0,9
МФТП+19	66,5±7,1	53,5±7,1	248,6±36,8	2,0±0,3	5,5±1,0**	5,0±1,2
МФТП+20	61,7±4,4	58,3±4,4	280,0±32,4	2,3±0,3	8,3±1,3	6,6±2,0
МФТП+21	71,5±6,8	48,5±6,7	215,3±34,5	1,7±0,3	5,8±1,1**	3,3±1,3
МФТП+22	85,2±9,0#	34,8±9,0#	149,7±42,8**	1,2±0,4	5,5±1,5**	3,0±1,2
МФТП+24	56,8±2,7	63,2±2,6	335,2±29,5#	2,7±0,3#	6,4±1,7*	10,1±2,6*
МФТП+25	73,4±6,5	46,6±6,5	214,0±38,5	1,7±0,3	4,8±1,0*** #	4,5±1,7

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем; # $P < 0,05$ по сравнению с группой МФТП.

Таблица 16 – Противопаркинсоническая активность производных диола (18, 23, 26) при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	51,9±2,3	68,1±2,3	337,5±16,5	2,8±0,1	7,0±1,0	4,8±0,8
МФТП	93,9±7,9 ***	26,1±8,0 ***	106,0±37,0 ***	0,8±0,3 ***	1,3±0,5**	1,1±1,8***
МФТП+18	80,0±1,2	37,2±10,7	182,1±55,2	1,5±0,5	5,8±1,9*	2,0±0,5*
Контроль	53,1±5,1	66,9±5,1	343,7±43,7	2,8±0,4	7,0±1,9	6,0±1,0
МФТП	82,7±6,2**	37,3±6,2**	145,0±26,8**	1,2±0,2**	1,4±0,4*	0,6±0,4***
МФТП+23	68,8±3,3	51,2±3,3	225,0±20,9#	1,8±0,2#	2,8±0,7*	2,2±0,7**
МФТП+26	58,6±3,5 ##	61,4±3,5 ##	317,6±26,6 ###	2,6±0,2 ###	4,5±0,3 ###	8,3±1,5###

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем; # $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой МФТП.

Эпоксиды диола. Одной из важных задач доклинических испытаний является изучение метаболизма химических соединений и активности полученных метаболитов в отношении интересующих параметров исследования. С помощью метода хромато-масс-спектрометрии в плазме крови и головном мозге крыс помимо диола были обнаружены два возможных минорных метаболита (~ 1 % от содержания диола в пробах). Первый из метаболитов является одним из изомерных моноэпоксидов **27-30**, а второй - ранее синтезированным кетоспиртом **31**. Для

установления точного строения первого метаболита были синтезированы все 4 изомерных моноэпоксида **27-30** (рисунок 1). Нами была изучена противопаркинсоническая активность и метаболита **27**, и трех изомерных моноэпоксидов **28-30**, а также второго метаболита **31** и его стереоизомера **32**. Введение транс-эпоксида **27** (20 мг/кг) привело к практически полному восстановлению показателей двигательной активности животных, а также к достоверному увеличению количества вертикальных стоек (таблица 17). В отличие от транс-эпоксида **27**, цис-изомер **28** не оказал влияния на олигокинезию, вызванную введением МФТП (таблица 17) и уменьшил число заглядываний в отверстия. Эпоксид **29** не проявил противопаркинсоническую активность (таблица 18), а его изомерный эпоксид **30** достоверно увеличил показатели как двигательной, так и исследовательской активности у животных с индуцированным паркинсонизмом (таблица 18). Полученные результаты показали, что химическая конфигурация моноэпоксидов также играет решающую роль в проявлении ими противопаркинсонической активности.

Таблица 17 – Противопаркинсоническая активность эпоксилов диола (**27**, **28**) при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	47,6±2,6	72,4±2,6	372,1±27,2	3,1±0,2	10,5±0,8	4,1±0,9
МФТП	63,8±3,2*	56,2±3,2*	341,1±20,7*	2,0±0,2*	8,1±1,0	4,8±0,9
МФТП+27	50,1±1,9#	69,9±1,9##	354,7±18,2##	2,9±0,2##	7,9±1,0	11,5±1,6***##
МФТП+28	62,4±7,0*	57,6±7,0*	270,3±43,6	2,2±0,4	4,6±1,5**	4,8±1,5

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ по сравнению с группой МФТП.

Таблица 18 – Противопаркинсоническая активность эпоксилов диола (**29**, **30**) при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) (M±m)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	45,7±3,3	74,3±3,3	445,6±24,7	3,7±0,2	7,3±1,5	14,8±1,8
МФТП	60,1±7,9	59,9±7,9	288,1±41,0**	2,3±0,3**	3,1±0,6 *	9,3±1,8 *
МФТП+29	51,0±3,1	69,0±3,1	374,0±33,7	3,1±0,3	6,8±0,8 ##	8,4±1,7 *
МФТП+30	44,6±2,2	73,4±2,2	422,2±20,8##	3,5±0,2 ##	8,4±1,1 ##	16,5±2,2 #

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ по сравнению с группой МФТП.

Исследование противопаркинсонической активности изомеров **31** и **32** показало, что введение обоих изомеров приводит к усугублению двигательных нарушений у животных (таблица 19) в условиях экспериментального

паркинсонизма, вызванного системным введением нейротоксина МФТП, поэтому эти соединения исключили из дальнейших исследований.

Снижение дозы моноэпоксида **27** до 5 мг/кг также достоверно восстанавливало показатели двигательной-исследовательской активности животных с индуцированным паркинсонизмом (таблица 20). Для соединения **27** была определена острая токсичность, которая составляет более 1000 мг/кг.

Таблица 19 – Противопаркинсоническая активность эпоксидов диола (**31**, **32**) при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий
Контроль	61,9 $\pm$ 4,5	58,1 $\pm$ 4,5	285,8 $\pm$ 32,8	2,3 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 1,1
МФТП	81,3 $\pm$ 4,7**	38,7 $\pm$ 4,7**	163,1 $\pm$ 24,1**	1,3 $\pm$ 0,2 **	2,8 $\pm$ 0,7
МФТП + 31	96,5 $\pm$ 2,3***##	23,3 $\pm$ 2,7***#	88,8 $\pm$ 2,6***#	0,7 $\pm$ 0,1***#	0,0 $\pm$ 0,0**##
Контроль	49,8 $\pm$ 3,6	70,2 $\pm$ 3,6	361,6 $\pm$ 32,4	2,9 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 1,1
МФТП	73,2 $\pm$ 4,4**	46,8 $\pm$ 4,4**	211,8 $\pm$ 29,1**	1,7 $\pm$ 0,3**	6,3 $\pm$ 1,8
МФТП + 32	98,5 $\pm$ 10,1*##	21,5 $\pm$ 10,1*##	84,8 $\pm$ 42,4*##	0,7 $\pm$ 0,3***##	3,1 $\pm$ 1,7

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ по сравнению с группой МФТП.

Таблица 20 – Противопаркинсоническая активность моноэпоксида диола **27** в дозе 5 мг/кг при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (самцы мышей линии C57BL/6, n=8) ($M \pm m$)

Группа	Неподвижный момент (с)	Время активности (с)	Дистанция (см)	Скорость (см/с)	Кол-во исследованных отверстий	Кол-во вертикальных стоек
Контроль	35,3 $\pm$ 2,1	84,6 $\pm$ 2,1	527,8 $\pm$ 31,6	4,3 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,8	12,4 $\pm$ 1,4
МФТП	93,6 $\pm$ 8,1 ***	26,4 $\pm$ 8,1 ***	108,7 $\pm$ 41,1 ***	0,9 $\pm$ 0,3 ***	2,2 $\pm$ 1,1 **	0,5 $\pm$ 0,4 ***
МФТП + 27	65,9 $\pm$ 6,9 *** #	54,1 $\pm$ 6,9 *** #	240,8 $\pm$ 36,9 *** #	2,0 $\pm$ 0,31 *** #	4,8 $\pm$ 1,2	3,2 $\pm$ 1,1 *** #

Примечание: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой; # $P < 0,05$ по сравнению с группой МФТП.

Способность эпоксида **27** проникать через ГЭБ определена путем анализа содержания данного соединения в плазме крови и головном мозге крыс через 1,5 ч после внутрижелудочного введения соединения **27** в дозе 10 мг/кг. Соединение **27** было обнаружено как в плазме крови (5,3 мкг/мл), так и в гомогенате головного мозга крыс (3,5 мкг/г). Эти данные показывают, что моноэпоксид диола **27** циркулирует в кровотоке продолжительное время и легко проникает через ГЭБ. Интересно отметить, что ранее нами было обнаружено небольшое количество

моноэпоксида в плазме крови животных и после введения диола, что указывает на то, что соединение **27** действительно является метаболитом диола.

В Лаборатории молекулярной нейронауки Института биотехнологии города Хельсинки были исследованы свойства моноэпоксида **27**, оказывающие влияние на выживаемость культивируемых эмбриональных дофаминовых нейронов (Sidorova Y.A. et al., 2019). Эпоксид **27** способствовал выживанию тирозингидроксилаза (ТГ)-положительных нейронов в зависимости от дозы его применения. Так, в лунках планшета, обработанных эпоксидом диола **27** в дозах 0,1 мкМ и 1 мкМ, количество ТГ-положительных нейронов было в 2,1 и в 2,3 раза больше, чем в контрольных.

Также было изучено влияние соединения **27** на выживаемость ТН-позитивных нейронов в культурах клеток среднего мозга, обработанных 6-гидроксидопамином (6-OHDA) (Sidorova Y.A. et al., 2019). Результаты исследования показали, что исследуемое соединение **27** защищает культивируемые клетки дофаминергические нейроны от 6-OHDA-индуцированной дегенерации. Кроме того, было исследовано влияние эпоксида диола **27** на выживание ГАМК-продуцирующих нейронов, содержащихся в значительном количестве в структурах среднего мозга (Gaven F. et al., 2014), и показано, что эпоксид диола **27** не оказал влияния на выживаемость данных нейронов в экспериментах *in vitro* (Sidorova Y.A. et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что свойства эпоксида диола **27** увеличивать выживаемость клеток в условиях *in vitro* проявляется в отношении клеток нейронального происхождения, в частности, дофаминовых нейронов.

Учитывая положительное влияние соединения **27** на выживаемость дофаминовых нейронов в экспериментах *in vitro*, было решено оценить способность соединения **27** к ресторации в отношении дофаминовых нейронов черной субстанции головного мозга в экспериментах *in vivo* с использованием МФТП-индуцированной модели паркинсонического синдрома. Тела нигростриальных дофаминовых нейронов располагаются в черной субстанции, в то время как их аксоны проецируются на стриатум. В ходе совместного с Лабораторией молекулярной нейронауки Института биотехнологии города Хельсинки эксперимента была определена плотность ТГ-положительных аксонов в стриатуме и количество ТГ-положительных клеток в черной субстанции. После индуцирования паркинсонического синдрома парентеральным введением нейротоксина МФТП (20 мг/кг, *i.p.*, 4-кратно) животным в качестве лечения вводили эпоксид диола **27** в дозах 5 и 20 мг/кг *per os* через 24 часа после последней инъекции нейротоксина МФТП в течение 3 недель (ежедневно 5 дней в неделю). Через 30 дней после индуцирования паркинсонического синдрома плотность ТН-позитивных волокон в полосатом теле головного мозга снизилась в 2 раза по сравнению с контролем. У животных, получавших в качестве лечения соединение **27** в дозах 5 и 20 мг/кг, достоверно увеличилась плотность ТН-положительных волокон по сравнению с таковыми у животных с индуцированным паркинсонизмом. В то же время, введение эпоксида диола **27** не оказало влияния на количество ТН-положительных нейронов в черной субстанции.

Таким образом, исследуемое соединение стимулирует рост дофаминовых нейронов, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме, что, вероятно, повысит содержание дофамина в полосатом теле и будет способствовать облегчению симптомов болезни Паркинсона.

Анальгетическая активность новых производных монотерпенового ряда

Как описано выше, обнаруженное нами новое соединение - диол, помимо противопаркинсонической активности, проявляет еще и анальгетические свойства в тесте «уксусные корчи». Опираясь на литературные данные о присущей многим эфирным маслам и входящим в их состав монотерпеноидам анальгетической активности (Tchimene M.K. et al., 2013; Premkumar L., 2014), было принято решение о синтезе ряда новых монотерпеноидов исходя из природных соединений для оценки их анальгетической активности.

Таблица 21 – Анальгетическая активность соединений **33-40** (самцы мышей сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

	Количество уксусных корчей		Время на горячей пластине (с)	
	Контроль	Соединение (%)	Контроль	Соединение (%)
33	10,1 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 1,9	12,3 $\pm$ 1,7	13,1 $\pm$ 1,2
34	10,9 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,6 (74)***	10,5 $\pm$ 1,8	11,8 $\pm$ 1,2
35	10,1 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 1,5	12,3 $\pm$ 1,7	15,4 $\pm$ 1,2
36	13,9 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 1,0	11,9 $\pm$ 1,3	13,3 $\pm$ 2,4
37	14,4 $\pm$ 0,9	12,6 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 0,9	14,3 $\pm$ 1,0
38	12,6 $\pm$ 1,3	6,3 $\pm$ 1,6 (50)**	12,3 $\pm$ 0,9	14,6 $\pm$ 2,0
39	10,1 $\pm$ 0,7	7,8 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 1,7	13,4 $\pm$ 1,9
40	10,9 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,9 (65)***	10,5 $\pm$ 1,8	18,1 $\pm$ 1,9 (72)***

Примечание: % ингибирования = $100\% \cdot (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля.

Первыми были синтезированы гетероциклические соединения с различными типами остовов путем взаимодействия (1R,2R,6S)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола и эпоксида вербенола с ароматическими альдегидами, содержащими три метокси-группы (**33-40**) (рисунок 1).

Результаты скрининга показали, что соединения **34**, **38** и **40** в дозе 10 мг/кг проявляют выраженную анальгетическую активность, значительно уменьшая количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты (таблица 21). Наибольшую эффективность в этом тесте проявило соединение **34**, введение которого привело к тому, что у 2/3 животных в группе корчи не развивались вовсе (в контрольной группе корчи наблюдались у всех мышей). В то же время, достоверной анальгетической активностью в тесте «горячая пластинка» из исследованных соединений обладает только трициклическое соединение **40** (таблица 21).

Интересно, что анальгетическая активность обнаружена у соединений разных структурных типов с различным расположением метокси-групп в ароматическом кольце, что подтверждает перспективность дальнейшего поиска новых анальгетиков среди соединений, сочетающих монотерпеновый и ароматический фрагменты.

Соединения следующего ряда так же синтезированы на основе диола и сочетают в своей химической структуре *пара*-ментановый и ароматический фрагменты. Полученные вещества имеют различия только среди заместителей в ароматическом кольце, а гексагидро-2H-хроменовый остов остается неизменным (рисунок 1). Соединение **41**, имеющее фенильный заместитель, проявило выраженную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи», но не оказало достоверного влияния на латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 22). Соединения **42** и **43**, содержащие гидрокси- и метокси-заместитель в ароматическом кольце, соответственно, не проявили

анальгетическую активность в обоих тестах (таблица 22). Изомеры **44** и **45**, имеющие одновременно и гидрокси-, и метокси-группу в ароматическом кольце, оказали достоверный анальгетический эффект как в тесте химического, так и в тесте термического раздражения (таблица 22).

Таблица 22 – Анальгетическая активность соединений **41-52** (самцы мышей сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

	Количество укусных корчей		Время на горячей пластине (с)	
	Контроль	Соединение (%)	Контроль	Соединение (%)
41	10,4 ± 1,2	3,9 ± 0,8 (63)***	9,5 ± 1,2	7,8 ± 0,5
42	10,4 ± 1,2	9,8 ± 1,3	9,5 ± 1,2	10,6 ± 1,3
43	11,1 ± 0,6	9,9 ± 0,6	14,4 ± 1,7	13,0 ± 1,9
44	9,1 ± 0,7	5,7 ± 1,3 (37)**	19,3 ± 3,8	32,0 ± 1,8 (66)**
45	10,9 ± 0,9	4,0 ± 1,2 (63)***	10,5 ± 1,8	17,5 ± 1,9 (67)**
46	10,9 ± 0,9	7,5 ± 1,5	10,5 ± 1,8	13,5 ± 2,0
47	13,2 ± 0,6	7,6 ± 0,6 (42)***	12,9 ± 1,0	15,0 ± 1,5
48	15,6 ± 0,9	10,1 ± 0,8 (35)***	9,0 ± 0,9	13,5 ± 1,4 (50)**
49	11,8 ± 0,5	10,4 ± 0,5	16,1 ± 1,9	14,6 ± 0,8
50	13,9 ± 0,6	9,9 ± 0,6 (29)***	19,5 ± 2,2	20,3 ± 2,0
51	13,9 ± 1,0	11,4 ± 0,5 (18)**	11,9 ± 1,3	16,1 ± 2,4
52	15,6 ± 0,9	12,3 ± 0,6 (21)**	9,0 ± 0,9	12,6 ± 1,5

Примечание: % ингибирования = $100\% \cdot (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

ароматическом кольце, достоверно снизило количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, но не проявило анальгетического эффекта в тесте «горячая пластина» (таблица 22). Таким образом, необходимым условием для проявления выраженной анальгетической активности в обоих скрининговых тестах является наличие одновременно и гидрокси-, и метокси-группы в ароматическом кольце. Перемещение гидрокси-группы из четвертого положения во второе при переходе от **44** к соединению **48** не оказало влияния на проявление выраженной анальгетической активности в обоих тестах (таблица 22). Замена гидрокси-группы в соединении **44** на бутокси-заместитель при переходе к соединению **49** привело к полному исчезновению проявления анальгетической активности в скрининговых тестах (таблица 22). Соединение **50** с гексилокси-заместителем в аромокольце проявило достоверную анальгетическую активность только в тесте химического раздражения «уксусные корчи» (таблица 22). Добавление еще одной метокси-группы к соединению **44** при переходе к соединению **51** привело к снижению анальгетического эффекта в тесте «уксусные корчи» и нивелированию анальгетической активности в тесте «горячая пластина» (таблица 22). Серосодержащее соединение **52** достоверно уменьшало количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, но не оказало влияния на латентное время болевой реакции в тесте «горячая пластина» (таблица 22).

Большая часть протестированных соединений с гексагидро-2Н-хроменовым остовом (**41, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52**) в дозе 10 мг/кг проявили достоверную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи». Соединения **44, 45, 48**, содержащие метокси- и гидрокси-группы в различных положениях ароматического кольца, кроме того, достоверно увеличили время нахождения животных на горячей

Замена гидрокси- на метокси-группу в соединениях **44** и **45** при переходе к соединению **46** привела к нивелированию достоверного анальгетического эффекта в обоих скрининговых тестах (таблица 22). Соединение **47**, имеющее две гидроксигруппы в

пластине, что делает их перспективными для дальнейших фармакологических исследований.

Таблица 23 – Анальгетическая активность соединений **53-65** (самцы мышей сток CD-1, n=8) (M±m)

	Количество укусных корчей		Время на горячей пластине (с)	
	Контроль	Соединение (%)	Контроль	Соединение (%)
53	11,1±0,6	9,8±1,3	14,4±1,7	19,9±2,5
54	9,6±0,9	4,3±1,1 (55)**	9,8±0,8	13,1±1,2 (34)*
(4R)-54	8,9±0,7	5,6±0,8 (37)*	11,5±1,1	15,1±2,0
55	9,8±0,5	8,1±1,2	13,3±1,4	16,0±2,2
(4S)-56	11,1±0,7	4,8±1,2 (57)***	12,1±1,3	15,1±1,2
(4R)-56	11,1±0,7	6,4±1,5 (42)*	12,1±1,3	17,9±2,3
57	10,9±0,5	6,6±0,5 (39)***	18,4±2,1	17,4±2,4
58	10,9±0,5	7,0±0,6 (36)***	18,4±2,1	12,8±1,7
(4R)-59	10,0±0,7	7,4±0,6 (26)*	13,4±1,8	20,3±3,8
(4S)-59	10,0±0,7	6,6±1,4	13,4±1,8	14,5±2,3
60	9,6±0,9	3,6±1,5 (63)**	9,8±0,8	13,6±1,7
61	11,1±0,7	7,5±1,2 (32)*	12,1±1,3	14,5±1,6
62	7,9±1,1	7,3±0,9	19,4±2,7	13,9±1,0
63	7,9±1,1	8,9±0,9	19,4±2,7	10,5±2,0 (-46)**
64	8,4±1,5	5,3±1,7	14,0±1,2	17,5±2,1
65	8,1±0,5	7,6±1,1	13,4±1,6	11,5±0,9

Примечание: % ингибирования = 100% * (K_{контроль} - K_{опыт}) / K_{контроль}; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; # 0,05 < P < 0,1 по сравнению с группой контроля.

горячей пластине (таблица 23). Не проявило анальгетическую активность и соединение **55**, имеющее метильный заместитель в пятом положении (таблица 23). В то же время, замена метильной группы на нитро-группу при переходе к соединению **56** привела к достоверному снижению количества корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, при этом эффективны оказались оба диастереомера ((4S)-**56** и (4R)-**56**) (таблица 23).

В отличие от соединения **53**, его серосодержащий аналог **54** проявил выраженную анальгетическую активность в обоих тестах, достоверно снижая количество корчей в тесте «уксусные корчи» и увеличивая латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 23). Стоит отметить, что индивидуальный (4R)-**54** стереоизомер оказался менее эффективным, чем изначальная смесь (4R)- и (4S)-изомеров в соотношении 5:1 (**54**), и проявил достоверную анальгетическую активность только в тесте «уксусные корчи», показав лишь тенденцию к увеличению продолжительности латентного времени нахождения животных на горячей пластине (таблица 23).

Следующим был синтезирован ряд аналогичных соединений, содержащих гетероароматические (фурановые и тиофеновые) заместители, исходя из монотерпеноида изопулегола (рисунок 1).

Исследование анальгетической активности новых соединений, вводимых в дозе 10 мг/кг, показало, что соединение **53**, полученное взаимодействием изопулегола с фурфуролом, не оказало влияния на количество корчей в тесте «уксусные корчи» и латентное время нахождения животных на

Соединения **57** и **58**, содержащие метильную группу в пятом и третьем положении тиофенового кольца, соответственно, проявили достоверную анальгетическую активность только в тесте химического раздражения «уксусные корчи» (таблица 23). Достоверно снижал количество уксусных корчей (4*R*)-диастереомер 5-бром замещенного соединения **59**, в то время как (4*S*)-диастереомер не проявил анальгетическую активность ни в одном из скрининговых тестов (таблица 23). Соединение **60**, содержащее атом брома в четвертом положении ароматического кольца, а также серосодержащее соединение **61** оказали достоверное влияние на количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, снижая их количество, но не повлияли на латентное время нахождения мышей на горячей пластине (таблица 23).

Соединение **62**, как и его изомер по положению гетероатома в ароматическом кольце **53**, не проявило анальгетической активности в скрининговых тестах (таблица 23). Неожиданным оказался результат тестирования соединения **63**, являющегося изомером наиболее активного соединения **54** (таблица 23). Помимо того, что соединение **63** не проявило активности в тесте «уксусные корчи», введение его привело к достоверному проявлению гипералгезии в тесте «горячая пластина» (таблица 23). Таким образом, оказалось, что изменение положения атома серы в ароматическом кольце соединения **54** привело к обращению фармакологического эффекта в тесте «горячая пластина» и нивелированию проявления анальгетической активности в тесте «уксусные корчи» (таблица 23). Соединения **64** и **65**, полученные из (+)-неоизопулегола, не проявили анальгетической активности в обоих тестах (таблица 23), свидетельствуя о необходимости именно *транс*-сочленения колец для проявления анальгетического эффекта (соединения **54**).

Следующим синтезирован ряд соединений, сочетающих диазаадамантовый и монотерпеноидный фрагменты. Введение адамантильного фрагмента в биологически активные молекулы часто приводит к уменьшению токсичности и значительному улучшению терапевтического эффекта. Существенный интерес представляют азотистые аналоги адамантана – диазаадамантаны с расположением атомов азота в узлах молекулы (Jimenez-Cruz F. et al., 2005; Parchinsky V. et al., 2011). Известно, что производные адамантанов, содержащие монотерпеновый заместитель, могут демонстрировать различную фармакологическую активность (Kapitsa I.G. et al., 2012; Teplov G.V. et al., 2013; Avgustinovich D.F. et al., 2014; Suslov E. et al., 2015), что делает синтез соединений, сочетающих диазаадамантовый и монотерпеноидный фрагменты, перспективным для поиска новых биологически активных соединений, обладающих анальгетическим действием (рисунки 1).

Соединение **66** в дозе 10 мг/кг не проявило анальгетической активности в обоих тестах, но при наблюдении за мышами во время эксперимента визуально отмечено, что введение исследуемого соединения снизило выраженность растяжения тела животных, вызванного введением уксусной кислоты (таблица 24). Увеличение дозы соединения **66** до 20 и 30 мг/кг привело к достоверному снижению количества корчей и увеличило время нахождения животных на горячей пластине (таблица 24). То есть, проявление анальгетической активности соединением **66** носит прямой дозозависимый характер.

На основании проведенных экспериментов был сделан вывод о целесообразности тестирования остальных синтезированных соединений этого ряда

Таблица 24 – Анальгетическая активность соединений **66-76** (самцы мышей сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

	Доза мг/кг	Количество укусных корчей		Время на горячей пластине (с)	
		Контроль	Соединение (%)	Контроль	Соединение (%)
66	10	$8,6 \pm 1,3$	$6,1 \pm 0,7$	$17,4 \pm 2,5$	$18,0 \pm 2,7$
66	20	$11,0 \pm 0,7$	$5,4 \pm 1,0$ (51)***	$10,7 \pm 1,4$	$21,1 \pm 3,2$ (97)*
66	30	$8,4 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,9$ (61) ***	$10,4 \pm 1,2$	$18,9 \pm 2,2$ (82)**
67	20	$9,3 \pm 0,4$	$6,5 \pm 1,1$ (30)*	$20,9 \pm 2,0$	$16,9 \pm 3,1$
68	20	$9,3 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,6$	$20,9 \pm 2,0$	$21,8 \pm 2,9$
69	20	$7,5 \pm 1,4$	$7,4 \pm 1,5$	$11,6 \pm 0,8$	$13,3 \pm 1,5$
70	20	$11,1 \pm 1,0$	$9,4 \pm 0,9$	$12,5 \pm 1,0$	$22,9 \pm 2,0$ (83)***
71	20	$11,1 \pm 1,0$	$7,6 \pm 0,8$ (32)*	$12,5 \pm 1,0$	$24,3 \pm 3,2$ (94)**
72	20	$10,0 \pm 0,9$	$9,3 \pm 1,5$	$12,3 \pm 1,6$	$16,8 \pm 4,5$
73	20	$10,0 \pm 0,9$	$7,9 \pm 1,7$	$12,3 \pm 1,6$	$20,0 \pm 3,0$ (63)*
74	20	$10,0 \pm 0,9$	$8,6 \pm 0,8$	$12,3 \pm 1,6$	$12,1 \pm 2,9$
75	20	$11,1 \pm 1,0$	$7,0 \pm 0,9$ (37)*	$12,5 \pm 1,0$	$17,6 \pm 2,8$
76	20	$8,8 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,6$ (27)**	$12,6 \pm 1,9$	$12,5 \pm 1,8$

Примечание: % ингибирования = $100\% \cdot (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля.

анальгетической активности. Добавление CH_2 -группы при переходе от соединения **66** к соединению **68** или кетогруппы при переходе к соединению **69** привело к полному исчезновению проявления данными соединениями анальгетической активности в обоих скрининговых тестах (таблица 24). Соединения **70** и **71**, синтезированные с использованием цитраля и цитронеллала, достоверно уменьшали латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 24). Кроме того, соединение **71** проявило достоверную анальгетическую активность в тесте химического раздражения, снижая количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты (таблица 24). Соединение **75**, полученное с использованием кротонового альдегида и обладающее существенно более короткой алифатической цепочкой, чем соединения **70** и **71**, напротив, проявило достоверную анальгетическую активность только в тесте «уксусные корчи» (таблица 24). Среди соединений с моноциклическим остовом **72-74** соединение **73** достоверно увеличило латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 24). Отметим, что и в этом случае принципиальное значение имеет абсолютная конфигурация соединения, анальгетическая активность была

сделан вывод о целесообразности тестирования остальных синтезированных соединений этого ряда в скрининговых тестах в дозе 20 мг/кг.

Введение животным изомерного соединения **67** не выявило анальгетической активности в тесте «горячая пластина», в отличие от анальгетического эффекта в тесте «уксусные корчи» (таблица 24). Таким образом, и в данном случае, абсолютная конфигурация соединения, полученного из монотерпеноида миртеналя, оказывает решающее влияние на проявление им

обнаружено только у (*R*)-изомера соединения **73**, тогда как его (*S*)-изомер - соединение **74** не проявил анальгетической активности в скрининговых тестах.

Несмотря на то, что анальгетическая активность была обнаружена у нескольких соединений различных структурных типов, наиболее перспективными для дальнейших исследований являются соединения **66** и **71**, проявившие выраженную анальгетическую активность в обоих тестах (рисунок 1).

При изучении анальгетической активности монотерпеноида (-)-миртеналя **76** (таблица 24) показано, что соединение **76** достоверно снижает количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, но не оказывает влияния на латентное время нахождения мышей на горячей пластине (таблица 24). Следуя полученным результатам, можно сделать вывод, что присоединение к (-)-миртеналю **76** диазаадамантанового фрагмента приводит к резкому усилению проявляемой им анальгетической активности. Учитывая коммерческую доступность (-)-миртеналя **76**, для дальнейших фармакологических исследований было выбрано соединение **66**, полученное на основе монотерпеноида (-)-миртеналя и проявившее выраженную анальгетическую активность в обоих скрининговых тестах.

Проведя анализ полученных результатов в ходе скрининговых исследований на анальгетическую активность среди всех впервые синтезированных соединений на основе монотерпеноидов, было выявлено несколько соединений (**45**, **45**, **54**, **66**), обладающих выраженной анальгетической активностью и являющихся коммерчески доступными в процессе их синтеза, для проведения дальнейших фармакологических исследований (рисунок 1).

Таблица 25 – Исследование анальгетической активности соединений **44**, **45** в дозах от 5 до 20 мг/кг (самцы мышей сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

	Латентное время на горячей пластине (с)				
	Контроль	5 мг/кг	10 мг/кг	15 мг/кг	20 мг/кг
44	12,0 $\pm$ 1,3	11,6 $\pm$ 1,3	17,9 $\pm$ 2,0*	17,9 $\pm$ 2,4*	21,1 $\pm$ 2,3**
45	15,0 $\pm$ 1,3	19,6 $\pm$ 2,6	15,3 $\pm$ 0,7	18,8 $\pm$ 1,4	14,9 $\pm$ 2,3
	Количество уксусных корчей				
	Контроль	5 мг/кг	10 мг/кг	15 мг/кг	20 мг/кг
44	11,3 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,3*	8,9 $\pm$ 0,7*	7,9 $\pm$ 1,3*	7,1 $\pm$ 1,6*
45	10,3 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,8**	3,5 $\pm$ 1,1***	6,3 $\pm$ 1,2*	5,3 $\pm$ 1,3***

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля.

в тесте «уксусные корчи», но не активен в тесте на термическое раздражение (таблица 25). Его стереоизомер - соединение **44** в дозах 10, 15 и 20 мг/кг достоверно снизило количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, и увеличило латентное время нахождения животных на горячей пластине. С понижением дозы до 5 мг/кг соединение **44** осталось активным лишь в тесте химического раздражения и не оказало влияния на латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 25). На основе проведенных экспериментов в дальнейших фармакологических исследованиях соединения **44** и **45** использованы в дозе 10 мг/кг.

Соединение **66** проявило выраженную анальгетическую активность в дозе 20 мг/кг, достоверно увеличивая нахождение животных на горячей пластине и

Исследование анальгетической активности соединения **45** и его стереоизомера **44** показало, что агент **45** в дозах 5, 10, 15 и 20 мг/кг проявляет достоверную анальгетическую активность в

сокращая количество корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, но было неактивно в дозе 10 мг/кг (таблица 26).

Таблица 26 – Исследование анальгетической активности соединения **66** (самцы мышей сток CD-1, n=8) (M±m)

Латентное время на горячей пластине (с)			
Контроль	10 мг/кг	Контроль	20 мг/кг
17,4±2,5	18±2,7	10,7±1,4	21,1±3,2*
Кол-во уксусных корчей			
Контроль	10 мг/кг	Контроль	20 мг/кг
8,6±1,3	6,1±0,7	11,0±0,7	5,4±1,0***

Примечание: * P < 0,05; *** P < 0,001 по сравнению с группой контроля.

латентное время нахождения животных на горячей пластине (таблица 27). С увеличением дозы соединения **54** до 10 и 20 мг/кг сохраняется анальгетическая

Таблица 27 – Исследование анальгетической активности соединения **54** в дозах от 0,5 до 20 мг/кг (самцы мышей сток CD-1, n=8) (M±m)

Доза мг/кг	Кол-во уксусных корчей		Время на горячей пластине (с)	
	Контроль	54	Контроль	54
0,5	10,1±0,7	7,4±1,3	15,8 ± 1,6	20,3 ± 2,2
1	8,4±0,6	2,4 ± 0,8***	10,4 ± 1,2	16,5 ± 1,9*
5	11,0±0,7	6,8 ± 0,9**	10,7 ± 1,4	18,5± 2,0**
10	11,0±0,7	6,4 ± 0,6***	10,7 ± 1,4	14,4 ± 1,6
20	11,0±0,7	8,3 ± 0,5**	10,7 ± 1,4	16 ± 2,6

Примечание: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 по сравнению с группой контроля.

эффективными для этого соединения являются дозы 1 и 5 мг/кг.

Острая токсичность определена для всех соединений. Внутрижелудочное введение исследуемых веществ (**45**, **54**, **66**) в дозе 1000 не привело к гибели животных и не оказало влияния на их физическое и психоэмоциональное состояние, вес тела и количество потребляемой пищи и воды. LD50 для данных соединений составляет более 1000 мг/кг.

В процессе проведения скрининговых исследований по изучению анальгетической активности выбранных соединений **44**, **45**, **54**, **66** наибольшее внимание привлекло соединение **54**, проявившее выраженную анальгетическую активность в низких дозах. Наблюдение за животными в ходе экспериментов показало, что соединение **54** эффективно уменьшает выраженность корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, вплоть до полного их отсутствия. Следующие эксперименты по исследованию анальгетической активности соединения **54** были направлены на изучение зависимости анальгетической активности от промежутка времени после внутрижелудочного введения исследуемого агента в дозе 1 мг/кг, а также изучения анальгетической активности при парентеральном способе введения. Результаты эксперимента показали, что соединение **54** в дозе 1 мг/кг при внутрижелудочном введении проявляет выраженную анальгетическую активность уже через 15 мин после введения агента, которая сохраняется как минимум в течение 24 ч. (таблица 28).

Для дальнейших исследований соединение **66** использовано в дозе 20 мг/кг. Соединение **54** проявило куполообразный дозозависимый эффект и наиболее выраженную анальгетическую активность проявило при введении в дозах 1 и 5 мг/кг, снижая количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, и увеличивая активность в тесте на химическое раздражение, но исчезает в тесте на термическое раздражение. С понижением дозы соединения **54** до 0,5 мг/кг анальгетический эффект полностью исчезает в обоих тестах (таблица 27). Таким образом, наиболее

При подкожном введении соединение **54** в дозах 1 и 10 мг/кг также сохраняет выраженную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи» спустя 6 часов после введения агента (таблица 29).

Таблица 28 – Зависимость анальгетической активности соединения **54** (1 мг/кг, *per os*) от промежутка времени в тесте «уксусные корчи» (самцы мышей сток CD-1, *n*=8) ($M \pm m$)

Время	Кол-во уксусных корчей	
	Контроль	54 (%)
15 мин	10,0 ± 0,3	4,1 ± 1,4 (59)***
30 мин	10,0 ± 0,3	7,3 ± 0,7 (27)**
60 мин	10,0 ± 0,3	5,3 ± 1,3 (47)**
2 ч	10,0 ± 0,3	5,6 ± 0,8 (44)***
3 ч	10,1 ± 0,7	7,3 ± 0,5 (28)**
4 ч	10,1 ± 0,7	5,0 ± 1,4 (50)**
5 ч	10,1 ± 0,7	4,0 ± 0,9 (60)***
24 ч	10,4 ± 0,7	5,6 ± 1,0 (45)**

Примечание: % ингибирования = $100\% * (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таблица 29 - Исследование анальгетической активности соединения **54** при подкожном способе введения в тесте «уксусные корчи» (самцы мышей сток CD-1, *n*=8) ($M \pm m$)

Количество уксусных корчей		
Контроль	54 (10 мг/кг)	54 (1 мг/кг)
10,4 ± 1,2	6,8 ± 1,1*	7,0 ± 0,9*

Примечание: * $P < 0,05$; по сравнению с контролем.

противовоспалительной активности. Таким образом, механизм действия исследуемых веществ не является сходным с таковым нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС).

Среди различных механизмов действия, опосредующих анальгетический ответ биологически активных соединений, наиболее распространенными являются вовлечение каннабиноидной и опиоидной систем ЦНС (Manzanares J. et al., 1999). Учитывая, что исследуемые соединения оказывают влияние на показатели двигательной активности животных в тесте «открытое поле», можно предположить, что в механизм анальгетического действия исследуемых соединений могут быть вовлечены каннабиноидные и/или опиоидные рецепторы.

Изучение вовлечения опиоидных и каннабиноидных рецепторов в механизм анальгетического действия соединений было проведено на модели «уксусные корчи» с использованием неселективного антагониста опиоидных рецепторов налоксона (Lewanowitsch T. et al., 2006) и антагониста CB1-каннабиноидных рецепторов римонабанта (Booker L. et al., 2009).

Изучение влияния тестируемых соединений на двигательную исследовательскую активность показало, что агент **44** в дозе 10 мг/кг проявил достоверный угнетающий эффект на все показатели двигательной активности животных, а агент **45** в дозе 10 мг/кг достоверно снижал лишь скорость движения животных и пройденную ими дистанцию. Введение агента **66** также привело к снижению скорости животных и уменьшению пройденной дистанции. Агент **54**, вводимый в дозах 1 и 10 мг/кг, не оказал достоверного влияния на параметры двигательной активности животных.

Исследование противовоспалительной активности для соединений **44**, **45**, **54** и **66** показало, что ни один из исследуемых агентов не оказал достоверного влияния на развитие отека, вызванного введением формалина (3%) в подошвенный апоневроз стопы животных, то есть не проявил

Результаты исследований показали, что налоксон (1 мг/кг *i.p.*) не оказал влияния на проявление анальгетической активности соединениями **45**, **66** и **54**, в то время как ингибировал анальгетический эффект соединения **44** (таблица 30).

Таблица 30 – Исследование анальгетической активности соединений **44**, **45**, **54** и **66** на фоне введения налоксона (самцы мышей сток CD-1, $n=8$) ($M \pm m$)

	Количество укусных корчей		
	Контроль	Соединение	Налоксон + соединение
44 (10 мг/кг)	12,4 $\pm$ 0,7	9,1 $\pm$ 0,5**	11,1 $\pm$ 0,6 #
45 (10 мг/кг)	12,4 $\pm$ 0,7	8,3 $\pm$ 0,8**	8,3 $\pm$ 0,6***
54 (10 мг/кг)	10 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 1,2 *	6,9 $\pm$ 1,0*
54 (1 мг/кг)	10 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,8 *	6,1 $\pm$ 1,4*
66 (20 мг/кг)	10 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,9 **	7,1 $\pm$ 1,1*

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля; # $P < 0,05$ по сравнению с группой «Соединение».

соединения **44** опосредован еще и через опиоидные рецепторы ЦНС.

Таблица 31 – Исследование анальгетической активности соединений **44**, **45**, **54** и **66** на фоне введения римонабанта (самцы мышей сток CD-1, $n=8$) ($M \pm m$)

	Кол-во укусных корчей		
	Контроль	Соединение	Римонабант + соединение
44 (10 мг/кг)	8,6 $\pm$ 1,4	4,4 $\pm$ 0,9 *	6,6 $\pm$ 1,3 #
45 (10 мг/кг)	8,6 $\pm$ 1,4	5,8 $\pm$ 0,9 **	9,1 $\pm$ 1,4 ##
54 (10 мг/кг)	6,3 $\pm$ 2,1	2,5 $\pm$ 0,6 *	4,3 $\pm$ 1,3 #
54 (1 мг/кг)	6,3 $\pm$ 2,1	2,1 $\pm$ 0,4 **	6,3 $\pm$ 1,1 ##
66 (20 мг/кг)	6,3 $\pm$ 2,1	2,6 $\pm$ 0,5 *	4,6 $\pm$ 1,1 #

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с группой контроля; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ по сравнению с группой «Соединение».

44. Учитывая вовлечение в механизм действия соединения **44** опиоидных (наркотических) рецепторов, проведение дальнейших исследований по изучению его анальгетической активности посчитали нецелесообразными.

Исследование вовлеченности различных медиаторных систем ЦНС в механизм анальгетического действия тестируемых соединений было проведено в серии экспериментов на модели «укусные корчи» с использованием антагонистов рецепторов основных нейро-медиаторных систем, которые могут принимать участие в реализации анальгетического ответа.

Введение антагониста 5-HT₃-серотониновых рецепторов одансетрона (0,5 мг/кг, *i.p.*) не оказало влияния на проявление анальгетической активности соединениями **54** и **66**, но достоверно блокировало антиноцицептивный ответ соединения **45** в тесте «укусные корчи» (таблица 32), что показывает возможное вовлечение в механизм анальгетического действия соединения **45** 5-HT₃-серотониновых рецепторов. Предварительное введение кетансерина тартрата (0,3

Введение римонабанта (3 мг/кг, *i.p.*) достоверно блокировало проявление анальгетической активности всех исследуемых соединений (**44**, **45**, **54**, **66**) в тесте «укусные корчи» (таблица 31). Эксперименты показали, что в анальгетический ответ всех исследуемых соединений, вероятно, вовлечены каннабиноидные CB₁-рецепторы, а механизм анальгетического действия

Обнаружено, что. положение метоксигруппы в фенильном кольце стереоизомеров **44** и **45** оказывает решающее влияние на механизм их анальгетического действия, вовлекая в анальгетический ответ различные рецепторы: каннабиноидные для соединения **45** и, по крайней мере, частично, опиоидные для соединения

мг/кг, *i.p.*) - антагониста 5-HT_{2A}-серотониновых рецепторов не оказало влияния на количество корчей, индуцированных введением уксусной кислоты (таблица 32), что позволяет предположить отсутствие вовлеченности данных рецепторов в аналгетический ответ всех выбранных соединений (**45**, **54**, **66**). Введение галоперидола (1 мг/кг, *i.p.*) - неселективного антагониста D₂-дофаминовых рецепторов оказало влияния на проявление исследуемыми соединениями аналгетической активности в тесте «уксусные корчи» (таблица 32). Антагонист D₁-дофаминовых рецепторов R(+)-SCH-23390 (0,05 мг/кг, *i.p.*) полностью блокировал аналгетический эффект соединения **54**, но не повлиял на ноцицептивную активность других исследуемых соединений (таблица 32). Предварительное введение антагониста D₂-дофаминовых рецепторов сульпирида (5 мг/кг, *i.p.*) блокировало развитие аналгетического ответа соединений **45** и на уровне тенденции соединения **54**, но не повлияло на аналгетическую активность соединения **66** (таблица 32). Таким образом, в механизм аналгетического действия соединения **45**, вероятно, вовлечены D₂-дофаминовые рецепторы, тогда как соединение **54**, возможно, опосредует свой аналгетический ответ и через D₁-, и через D₂-дофаминовые рецепторы ЦНС. Но дофаминовая система, вероятно, не принимает участие в реализации ноцицептивного ответа соединением **66**.

Изучение вовлечения адренергической системы в механизм аналгетического действия исследуемых соединений было проведено на модели «уксусные корчи» на фоне введения антагониста α_2 -адренорецепторов йохимбина (1 мг/кг, *i.p.*). Результаты эксперимента показали, что предварительное введение йохимбина блокировало антиноцицептивную активность соединения **45** на уровне тенденции, но не оказало влияния на аналгетический эффект, проявляемый соединениями **54** и **66** в тесте «уксусные корчи» (таблица 32). То есть, α_2 -адренорецепторы, вероятно, вовлечены в механизм аналгетического действия только соединения **45**.

Предварительное введение антагониста ГАМКА-рецепторов бикикуллина (1 мг/кг, *i.p.*) не оказало влияния на проявление аналгетической активности исследуемых соединений **45**, **54** и **66** в тесте «уксусные корчи» (таблица 32), что указывает на отсутствие воздействия на ГАМК-ергическую систему исследуемых соединений в реализации их ноцицептивного ответа.

Введение антагониста M₁-мускариновых рецепторов скополоманина (2,5 мг/кг, *i.p.*) привело к полному исчезновению проявления аналгетической активности соединениями **54** и **66**, тогда как не оказало влияния на таковую у соединения **45** в тесте «уксусные корчи» (таблица 32). Результаты эксперимента показали, что, вероятно, механизм аналгетического действия соединений **54** и **66** опосредован через M₁-мускариновые рецепторы.

Оценку влияния исследуемых соединений на никотиновые рецепторы проводили с использованием теста «никотиновая токсичность». Результаты эксперимента показали, что исследуемые соединения **45**, **54** и **66** не оказали достоверного влияния на уровень смертности у животных (таблица 33), вызванной введением никотина (20 мг/кг, подкожно).

Таблица 32 – Исследование анальгетической активности соединений **45**, **54**, **66** на фоне введения антагонистов (самцы мышей сток CD-1, n=8) ($M \pm m$)

	Количество укусных корчей						
	Контроль	45, 10 мг/кг	45, 10 мг/кг + антагонист	54, 10 мг/кг	54, 10 мг/кг + антагонист	66, 20 мг/кг	66, 20 мг/кг + антагонист
Ондансетрон 0,5 мг/кг	8,1±1,1	4,3±0,6 ** #	6,8±0,9	4,1±0,9 **	4,4±0,7 **	4,4±0,8 *	4,0±1,0 *
Кетансерина тартрат 0,3 мг/кг	7,5±0,5	5,2±0,8 **	5,0±1,0 *	4,9±0,9 **	5,1±0,8 *	2,7±0,7 **	2,5±0,8 ***
Галоперидол 1 мг/кг	8,1±1,5	3,1±0,7 **	2,0±0,8 **	2,5±1,3 **	2,8±1,1 *	3,4±0,9 *	4,0±0,6 *
R(+)-SCH-23390 0,05 мг/кг	7,0±0,3	3,3±1,1 **	3,8±1,2 *	3,5±1,1* #	6,8±0,8	3,2±0,8 **	3,4±0,9 *
Сульпирид 5 мг/кг	8,0±0,7	4,1±0,7 ** #	7,6±1,0	4,8±0,6 **	6,4±0,6 ##	4,4±1,1 *	4,3±0,8 **
Йохимбин 1мг/кг	8,1±1,0	4,6±0,4 ** ##	6,4±0,9	3,6±1,1 *	3,8±0,8 **	4,3±0,6 *	4,9±0,5 *
Бикукуллин 1 мг/кг	6,9±0,4	4,3±0,6 **	4,9±0,8 *	4,5±0,7 *	5,4±0,6 *	4,4±0,9 *	4,4±0,8 *
Скополамин 2,5 мг/кг	7,6±0,8	4,6±0,6 *	4,0±0,7 **	3,4±1,1 * #	6,3±0,5	3,4±0,5 *	7,4±1,3 #

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой; # $P < 0,05$; ## $0,05 < P < 0,1$ по сравнению с группой соединения, введенного на фоне антагониста.

Таблица 33 – Влияние соединений **45**, **54**, **66** на уровень смертности животных в тесте «никотиновая токсичность» (самцы мышей сток CD-1, n=8)

	Никотин 20 мг/кг	Никотин + 54	Никотин + 66	Никотин + 45
% летальности	37,5%	25%	37,5%	50%

Таблица 34 – Вовлечение рецепторов ЦНС в механизм анальгетического действия соединений **45**, **54**, **66**

Рецепторы	Вовлечение(+/-)		
	45	54	66
Опиоидные	-	-	-
Каннабиноидных CB1	+	+	+
5-HT2-серотониновые	-	-	-
HT3-серотониновые	+	-	-
Мускариновые	-	+	+
Никотиновые	-	-	-
$\alpha 2$-адреналиновые	+	-	-
ГАМК	-	-	-
D2-дофаминовые	+	+	-
D1-дофаминовые	-	+	-

Подводя итог, можно заключить, что все исследуемые соединения имеют сходство в механизме действия, так как опосредуют анальгетический ответ, по крайней мере, частично, через каннабиноидные CB1-рецепторы. Вовлечение же других нейромедиаторных структур в механизм анальгетического действия исследуемых соединений варьируется и представлено в таблице 34.

Для исследования раздражающего действия на слизистую оболочку желудка крыс исследуемые соединения **45**, **54** и **66**

вводили внутривенно в дозе 30 мг/кг в течение трех дней. На 4-й день животных подвергли эвтаназии и визуально оценивали эффект воздействия соединений на слизистую желудка крыс, в качестве препарата сравнения был выбран индометацин натрия в дозе 20 мг/кг. Трехдневное введение индометацина натрия в дозе 20 мг/кг привело к гибели 50% животных в группе, у остальных животных на слизистой желудка были обнаружены множественные эрозии и изъязвления. Введение же исследуемых соединений в целом не оказало влияния на состояние ЖКТ слизистой оболочки желудка животных, при визуальном осмотре слизистой желудка повреждений не обнаружено, цвет и рельеф слизистой оболочки желудка не отличались от таковых у животных контрольной группы. Результаты эксперимента показали, что исследуемые соединения **45, 54, 66** не оказывают выраженного раздражающего действия на слизистую оболочку желудка крыс, то есть обладают явным преимуществом по сравнению с индометацином, обладающим выраженным гастротоксическим побочным эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты исследования фармакологической активности диола, для которого была обнаружена выраженная противопаркинсоническая активность.

Обнаружено, что диол усиливает угнетающее действие L-ДОФА в тесте «открытое поле», тем самым проявляет дофаминомиметические свойства. Также выявлено, что диол проявляет холинолитические свойства в тестах с ареколином и никотином. Сопоставление обнаруженных свойств и развивающегося при БП нейромедиаторного дисбаланса между дофаминергическими и холинергическими нейромедиаторами головного мозга послужило основанием для исследования противопаркинсонической активности диола. В проведенных сериях экспериментов было показано, что диол в дозе 20 мг/кг при внутривенном введении полностью восстанавливает параметры двигательной-исследовательской активности в тесте «открытое поле» на модели экспериментального паркинсонизма, вызванного однократной инъекцией нейротоксина МФТП (30 мг/кг, *i.p.*). Введение диола препятствует развитию пилоэрекции и саливации, способствует снижению тремора и ригидности, вызванных введением нейротоксина МФТП. Противопаркинсоническое действие диола (20 мг/кг, *per os*) было подтверждено в эксперименте, проведенном согласно международному протоколу, при 4-кратном введении нейротоксина МФТП (20 мг/кг, *i.p.*, 4 раза через каждые два часа). В экспериментах с 10-дневным и 30-дневным введением нейротоксина диол также проявил выраженное противопаркинсоническое действие. Диол значительно снижал процент гибели мышей, вызванной 10-дневным введением нейротоксина МФТП. В 30-дневном эксперименте диол действовал аналогично препарату сравнения леводопе, снимая проявления олигокинезии, вызванной введением нейротоксина МФТП, и повышая уровень дофамина в стриатуме головного мозга крыс.

Коллегами из НИИ фармакологии им. В.В. Закусова было показано, что субхроническое (7-14 дней) введение диола в дозе 20 мг/кг значительно снижает выраженность паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина роторона. В экспериментах с 6-ОНДА-индуцированным паркинсоническим синдромом было обнаружено, что диол в дозе 20 мг/кг нивелирует проявления сенсомоторного дефицита правых конечностей в тесте

«сужающаяся дорожка» уже на 7 день, в то время как эффект от введения леводопы проявлялся только на 14 день (Valdman E. et al., 2017).

Обязательным условием проявления противопаркинсонической активности диолом в тесте с нейротоксином МФТП является определенное взаиморасположение гидроксид- и изопропенильной группы. Диол состоит из наиболее активного стереоизомера **6** (85%) и изомера **11** (15%), проявившего тенденцию к противопаркинсонической активности, что делает получение диола (85:15) наиболее фармакоэкономичным, поскольку его оптическая чистота соответствует таковой исходного монотерпеноида (-)-вербенон - коммерчески доступного вещества для синтеза диола.

Противопаркинсоническое действие диола подтвердили на моделях лекарственного паркинсонизма с использованием трифтазина и галоперидола, которые являются блокаторами D₂-дофаминовых рецепторов. Диол полностью устранял развитие галоперидоловой каталепсии и сокращал продолжительность трифтазиновой. В тесте с йохимбином диол не проявил активирующего действия в отношении адренергической системы ЦНС, что еще раз подтверждает наличие именно противопаркинсонической активности у диола.

Противопаркинсоническая активность диола была подтверждена в независимом исследовании, проведенном в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, где установили, что диол (20 мг/кг, *per os*) проявляет выраженную противопаркинсоническую активность, улучшая показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности животных с МФТП-индуцированным паркинсонизмом в тесте «открытое поле», достоверно восстанавливает двигательную активность мышей в модели резерпин-индуцированной олигокинезии, обладает выраженным антикаталептогенным действием, аналогичным препарату сравнения L-DOPA. В модели галоперидол-индуцированной каталепсии диол снижает выраженность и количество животных с тремором в модели тремора, индуцированного введением оксотреморина (специфического агониста М-холинорецепторов) (Valdman E. et al., 2017).

Исследование острой токсичности диола показало, что его LD₅₀ = 4250 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении, а это в 1,8 раз превосходит среднюю смертельную дозу препарата сравнения леводопы (LD₅₀ = 2363 мг/кг). Увеличение показателя LD₅₀ позволяет увеличить широту терапевтического действия диола по сравнению с леводопой.

В длительном эксперименте (30 дней) было установлено, что диол при ежедневном внутрижелудочном введении в дозе 20 мг/кг не оказывает негативного влияния на жизненно важные системы и органы животных, не влияет на набор массы тела и температуру. Установлено, что диол обладает выраженной анальгетической активностью в тесте химического раздражения, что добавляет ему преимущество для применения диола в качестве противопаркинсонического средства, оказывая анальгетический эффект у пациентов с БП, испытывающих боли, связанные с ригидностью и дискинезией мышц.

При изучении влияния химической структуры диола на проявления им противопаркинсонической активности было показано, что наличие в структурной формуле всех четырех функциональных групп (две гидроксигруппы и две двойные связи) имеет решающее значение для проявления диолом противопаркинсонической активности.

Поэтому исследование противопаркинсонической активности было проведено для производных диола, модифицируемых по С-9 положению, не затрагивая важные для проявления противопаркинсонической активности функциональные группы (две двойные связи и две гидроксигруппы). Исследование противопаркинсонической активности производных диола показало, что введение заместителей, содержащих гетероатомы в С-9 положении, привело к полной или частичной потере проявления полученными соединениями антипаркинсонической активности. А введение в молекулу диола алифатического или тиаалифатического заместителя позволило сохранить проявление исследуемыми соединениями выраженных противопаркинсонических свойств.

В ходе поиска и исследования возможных метаболитов диола был обнаружен моноэпоксид (27), проявляющий выраженную противопаркинсоническую активность, способный проникать через гематоэнцефалический барьер.

В Лаборатории молекулярной нейронауки Института биотехнологии (Хельсинки) исследованы свойства моноэпоксида 27 на способность увеличивать выживаемость культивируемых эмбриональных дофаминовых нейронов, а также защищать культивируемые клетки дофаминовых нейронов против 6-ОНДА-индуцированной дегенерации (Sidorova Y. A. et al., 2019). Кроме того, в совместной работе с Институтом биотехнологии города Хельсинки показано, что моноэпоксид диола стимулирует рост дофаминовых нейронов мозга животных с индуцированным паркинсоническим синдромом, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме, что, вероятно, повышает содержание дофамина в полосатом теле и будет способствовать облегчению симптомов болезни Паркинсона. То есть одним из возможных механизмов действия диола является способность его метаболита восстанавливать поврежденные дофаминергические нейроны головного мозга.

Проведенные исследования показали, что диол, являясь соединением растительного происхождения, обладает выраженной противопаркинсонической активностью в совокупности с низкой токсичностью, противосудорожным и обезболивающим эффектом. Диол оказывает дофаминомиметическое и холинолитическое действия, уравнивая баланс данных нейромедиаторных структур головного мозга. Обнаруженный активный метаболит диола (соединение 27) способствует сохранению дофаминовых нейронов в тестах *in vitro*, а также стимулирует рост дофаминовых нейронов мозга животных с индуцированным паркинсоническим синдромом, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме.

Диол допущен для прохождения первого этапа клинических испытаний в качестве противопаркинсонического средства.

В ходе проделанной работы были проведены скрининговые исследования на выявление анальгетической активности среди 42-х впервые синтезированных производных монотерпеноидов. В ряду соединений, сочетающих в своей химической структуре *пара*-ментановый и ароматический фрагменты, полученных путем взаимодействия (1R,2R,6S)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола и эпоксида вербенола с ароматическими альдегидами, обнаружены перспективные агенты 44, 45, проявившие выраженную анальгетическую активность в дозе 10 мг/кг в тестах: «уксусные корчи» и «горячая пластина». В ряду аналогичных соединений, содержащих гетероароматические (фурановые и

тиофеновые) заместители, синтезированные исходя из монотерпеноида изопулегола, также было выявлено наиболее активное соединение **54** (10 мг/кг), достоверно снизившее количество корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, и увеличивающее латентное время пребывания животных на горячей пластине.

В ряду соединений, сочетающих диазаадамантовый и монотерпеноидный фрагменты, выраженную анальгетическую активность в обоих скрининговых тестах проявило соединение **66** (20 мг/кг), полученное на основе монотерпеноида (-)-миртеналя. Для всех активных соединений (**44**, **45**, **54**, **66**) была определена острая токсичность. LD₅₀ составила более 1000 мг/кг, что относит данные соединения согласно отечественному ГОСТу 12.1.007-76 «Классификация и общие требования безопасности» к препаратам умеренно опасным – 3-му классу опасности.

Исследование влияния дозы соединений **44**, **45**, **54**, **66** на проявление данными веществами анальгетической активности в скрининговых тестах «уксусные корчи» и «горячая пластинка» показало, что соединения **44**, **45** и **66** проявляют прямой дозозависимый эффект, и с понижением дозы вводимого вещества анальгетическая активность исчезает, а соединение **54** показало куполообразный дозозависимый эффект и наиболее выраженную анальгетическую активность проявило при введении в дозах 1 и 5 мг/кг, снижая количество корчей, вызванных введением уксусной кислоты, и увеличивая латентное время нахождения животных на горячей пластине. С увеличением дозы соединения **54** до 10 и 20 мг/кг сохраняется анальгетическая активность в тесте «уксусные корчи», но исчезает в тесте «горячая пластинка». С понижением дозы соединения **54** до 0,5 мг/кг анальгетический эффект полностью исчезает в обоих тестах. Для дальнейших исследований соединение **54** использовалось в дозах 1 и 10 мг/кг. Кроме того, соединение **54** (1 мг/кг) сохранило свою анальгетическую активность и при парентеральном способе введения. В дозе 1 мг/кг при внутрижелудочном введении соединение **54** проявляет выраженную анальгетическую активность уже через 15 мин после введения агента, которая сохраняется на протяжении как минимум 24 ч.

В тесте «открытое поле» соединение **44** (10 мг/кг) оказало угнетающее действие на все параметры двигательной-исследовательской активности животных, а его изомер **45** (10 мг/кг) и соединение **66** (20 мг/кг) достоверно снижали лишь скорость животных и пройденную ими дистанцию. Соединение **54** (1 и 10 мг/кг) достоверного влияния на показатели двигательной-исследовательской активности животных не оказало. Показано, что исследуемые агенты **44**, **45**, **54** и **66** не оказывают достоверного влияния на развитие отека, вызванного введением формалина (3%) в подошвенный апоневроз стопы животных, то есть не проявляют противовоспалительной активности.

При исследовании вовлеченности опиоидной и каннабиноидной системы обнаружено, что в анальгетический ответ всех исследуемых соединений **44**, **45**, **54**, **66** вовлечены каннабиноидные рецепторы, а механизм анальгетического действия соединения **44** опосредован еще и через опиоидные рецепторы центральной нервной системы. То есть положение метоксигруппы в фенильном кольце изомеров **44** и **45** оказывает решающее влияние на механизм анальгетического действия, вовлекая в анальгетический ответ различные рецепторы: каннабиноидные для соединения **45** и, по крайней мере, частично, опиоидные для соединения **44**. Изучение предположительного механизма анальгетического действия соединений **45**, **54** и **66** показало, что в анальгетический ответ данных

агентов помимо каннабиноидной системы вовлечены и другие нейромедиаторные структуры центральной нервной системы. Соединение **45**, вероятно, опосредует анальгетический механизм еще и через НТЗ-серотониновые, $\alpha 2$ -адреналиновые и D2-дофаминовые рецепторы ЦНС. В механизм анальгетического действия соединения **54**, могут быть вовлечены мускариновые и дофаминовые рецепторы, а для соединения **66** возможно вовлечение мускариновых рецепторов.

Совместно с Институтом биохимии и молекулярной медицины (Берн, Швейцария) в проведенных исследованиях *in vitro* установили, что соединения **45** и **54** в концентрации 10 мкМ не связываются с каннабиноидными рецепторами CB₁. Соединение **45** (10 мкМ) незначительно взаимодействует с каннабиноидным рецептором CB₂ (Li-Zhulanov N.S. et al., 2019). Полученные данные дают основания предполагать, что исследуемые соединения **45** и **54**, вероятно, проявляют анальгетическое действие посредством активации эндоканнабиноидной системы.

Оценка ulcerогенного действия исследуемых соединений показала, что внутрижелудочное введение соединений **45**, **54** и **66** не вызывает повреждения слизистой оболочки желудка, а значит, не оказывает гастротоксичного действия.

Результаты проведенных исследований показали, что впервые синтезированные на основе монотерпеноидов соединения обладают выраженной анальгетической активностью и низкой токсичностью, что делает их перспективными для дальнейших исследований в качестве обезболивающих средств.

ВЫВОДЫ

1. Впервые среди новых кислородсодержащих производных параментанового ряда выявлено высокоэффективное, низкотоксичное соединение – диол ((4S,5R,6R)-пара-мента-1,8-диен-5,6-диол), обладающее выраженной противопаркинсонической а также анальгетической и противосудорожной активностью. Установлено, что абсолютная конфигурация диола и наличие всех четырех функциональных групп (две гидроксигруппы и две двойные связи) оказывает решающее влияние на его противопаркинсоническую активность.

2. Установлено, что диол в дозе 20 мг/кг при внутрижелудочном введении проявляет дофаминомиметическое и холинолитическое действие, способствуя восстановлению нейромедиаторного дисбаланса, развивающегося при болезни Паркинсона.

3. Впервые показано, что диол проявляет выраженную противопаркинсоническую активность в дозе 20 мг/кг *per os* при различных схемах введения (от однократного до 30-дневного). Установлено, что длительное (30 дней) внутрижелудочное введение диола крысам в дозе 20 мг/кг не оказывает токсического влияния на внутренние органы и системы.

4. Установлено, что обнаруженный активный метаболит диола -эпоксид **27** ((1S,2S,3R,4S,6R)-1-метил-4-(1-метилэтенил)-7-оксабицикло[4.1.0]гептан-2,3-диол) в дозах 5 и 20 мг/кг *per os* стимулирует рост дофаминовых нейронов, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме.

5. Впервые в ряду новых производных монотерпеноидов обнаружены низкотоксичные соединения (**44** - (2S,4R,4aR,8R,8aR)-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-4,7-диметил-3,4,4a,5,8,8a-гексагидро-2H-хромен-4,8-диол, **45** - (2S,4R,4aR,8R,8aR)-2-(4-метоксифенил)-4,7-диметил-3,4,4a,5,8,8a-гексагидро-2H-хромен-4,8-диол, **54** - (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-

2Н-хромен-4-ол, 66 - 2-((1S,5R)-6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен-2-ил)-5,7-диметил-1,3-диаадамантан-6-он), обладающие выраженной анальгетической активностью на моделях висцеральной боли и термического раздражения.

6. Установлено, что положение метоксигруппы в фенильном кольце изомеров 44 и 45 оказывает решающее влияние на механизм анальгетического действия, вовлекая в анальгетический ответ каннабиноидные рецепторы для соединения 45 и опиоидные рецепторы для соединения 44. Соединения 45, 54 и 66 не оказывают влияния на опиоидные рецепторы.

7. Установлено, что механизм анальгетического действия соединений 45, 54 и 66 реализуется через каннабиноидную систему, а также через 5HT₃-серотониновые, α 2-адреналиновые и D2-дофаминовые рецепторы для соединения 45); М-холинорецепторы и дофаминовые D1 и D2рецепторы для соединения 54 и М-холинорецепторы для соединения 66.

8. Установлено, что соединения 45, 54 и 66 не оказывают угнетающего действия на двигательную-исследовательскую активность животных, не оказывают раздражающего влияния на слизистую оболочку желудка крыс.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России:

1. Ardashov, O.V. Highly potent activity of (1R,2S,6S)-3-methyl-(prop-1-en-yl)cyclohex-3-ene-1,2-diol in animal models of Parkinson's disease / O.V. Ardashov, **A.V. Pavlova**, I.V. Il'ina, E.A. Morozova, D.V. Korchagina, E.V. Karpova, K.P. Volcho, T.G. Tolstikova, N.F. Salakhutdinov // Journal of Medicinal Chemistry. – 2011. – V. 54. – P. 3866-3874.
2. Tolstikova, T.G. The analgesic activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepine-6-amine and its hydrochloride / T.G. Tolstikova, **A.V. Pavlova**, E.A. Morozova, T.M. Khomenko, K.P. Volcho, N.F. Salakhutdinov // Letters in Drug Design & Discovery. – 2012. – V. 9. – P. 513-516.
3. Ardashov, O.V. Antiparkinsonian activity of some 9-N-, O-, S- and C-derivatives of 3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-3-ene-1,2-diol / O.V. Ardashov, **A.V. Pavlova**, D.V. Korchagina, K.P. Volcho, T.G. Tolstikova, N.F. Salakhutdinov // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2013. – V. 21. – P. 1082–1087.
4. Mikhachenko, O. Synthesis and analgesic activity of new heterocyclic compounds derived from monoterpenoids / O. Mikhachenko, I. Il'ina, **A. Pavlova**, E. Morozova, D. Korchagina, T. Tolstikova, E. Pokushalov, K. Volcho, N.Salakhutdinov // Medicinal Chemistry Research. – 2013. – V. 22. – P. 3026–3034.
5. Ardashov, O.V. 3-Methyl-6-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-3-ene-1,2-diol: the Importance of Functional Groups for Antiparkinsonian Activity / O.V. Ardashov, **A.V. Pavlova**, D.V. Korchagina, K.P. Volcho, T.G. Tolstikova, N.F. Salakhutdinov // Medicinal Chemistry. – 2013. – V. 9. – P. 731-739.
6. Pavlova, A.V. Application of Monoterpenoids and their Derivatives Against CNS Disorders / **A.V. Pavlova**, K.P. Volcho, T.G. Tolstikova // Frontiers in CNS Drug Discovery. – 2013. – V. 2. – P. 334-380.
7. Kurbakova, S. Synthesis and analgesic activity of monoterpenoid-derived 2-aryl-4,4,7-trimethyl-4a,5,8,8a-tetrahydro-2H-benzo[d][1,3]dioxin-8-ols / S. Kurbakova, I. Il'ina, **A. Pavlova**, D. Korchagina, O. Yarovaya, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // Medicinal Chemistry Research. – 2014. – V. 23. – P. 1709–1717.

8. **Pavlova, A.V.** Potent Neuroprotective Activity of Monoterpene Derived 4-[(3aR,7aS)-1,3,3a,4,5,7a-Hexahydro-3,3,6-trimethylisobenzofuran-1-yl]-2-methoxyphenol in MPTP Mice Model / **A.V. Pavlova**, I.V. Il'ina, E.A. Morozova, D.V. Korchagina, S.Yu. Kurbakova, I.V. Sorokina, T.G. Tolstikova, K.P. Volcho, N.F. Salakhutdinov // *Letters in Drug Design & Discovery*. – 2014. – V. 11. – P. 611-617.
9. Il'ina, I. Highly potent analgesic activity of monoterpene-derived (2S,4aR,8R,8aR)-2-aryl-4,7-dimethyl-3,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-chromene-4,8-diols / I. Il'ina, O. Mikhalchenko, **A. Pavlova**, D. Korchagina, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov, E. Pokushalov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2014. – V. 23. – P. 5063-5073.
10. **Pavlova, A.** Synthesis and analgesic activity of stereoisomers of 2-(3(4)-hydroxy-4(3)-methoxyphenyl)-4,7-dimethyl-3,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-chromene-4,8-diols / **A. Pavlova**, O. Mikhalchenko, A. Rogachev, I. Il'ina, D. Korchagina, Yu. Gatilov, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2015. – V. 24. – P. 3821–3830.
11. Ponomarev, K. Synthesis and analgesic activity of new compounds combining azaadamantane and monoterpene moieties / K. Ponomarev, **A. Pavlova**, E. Suslov, O. Ardashov, D. Korchagina, A. Nefedov, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2015. – V. 24. – P. 4146–4156.
12. Nazimova, E. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegol-derived (2R,4aR,7R,8aR)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2H-chromen-4-ol / E. Nazimova, **A. Pavlova**, O. Mikhalchenko, I. Il'ina, D. Korchagina, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2016. – V. 25. – P. 1369–1383.
13. Sokolova, A. Synthesis and analgesic activity of new α -truxillic acid derivatives with monoterpenoid fragments / A. Sokolova, **A. Pavlova**, N. Komarova, O. Ardashov, A. Shernyukov, Yu. Gatilov, O. Yarovaya, T. Tolstikova, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2016. – V. 25. – P. 1608–1615.
14. **Pavlova, A.V.** Synthesis and Analgesic Activity of 4,7-Dimethyl-3,4,4a,5,8,8a-Hexahydro-2H-Chromen-4,8-Diols Containing Thiophene Substituents / **A.V. Pavlova**, E.V. Nazimova, O.S. Mikhal'chenko, I.V. Il'ina, D.V. Korchagina, O.V. Ardashov, E.A. Morozova, T.G. Tolstikova, K.P. Volcho, N.F. Salakhutdinov // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2016. – V. 52 (5). – P. 813-820.
15. **Pavlova, A.** The Decisive Role of Mutual Arrangement of Hydroxy and Methoxy Groups in (3(4)-hydroxy-4(3)-methoxyphenyl)-4,7-dimethyl-3,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-chromene-4,8-diols in their Biological Activity / **A. Pavlova**, O. Patrusheva, I. Il'ina, K. Volcho, T. Tolstikova, N. Salakhutdinov // *Letters in Drug Design & Discovery*. – 2017. – V. 14. – P. 508-514.
16. Il'ina, I. Synthesis and analgesic activity of monoterpenoid-derived alkyl-substituted chiral hexahydro-2H-chromenes / I. Il'ina, **A. Pavlova**, D. Korchagina, O. Ardashov, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2017. – V. 26. – P. 1415–1426.
17. Ponomarev, K. Synthesis and Analgesic Activity of Amines Combining Diazaadamantane and Monoterpene Fragments / K. Ponomarev, E. Morozova, **A. Pavlova**, E. Suslov, D. Korchagina, A. Nefedov, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // *Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 13. – P. 773-779.
18. Patrusheva, O.S. Synthesis and Analgesic Activity of 4,7-Dimethyl-3,4,4a,5,8,8a-Hexahydro-2-Chromen-4,8-Diols Containing Alkyl-Substituted Aromatic Moieties / O.S.

- Patrusheva, **A.V. Pavlova**, D.V. Korchagina, T.G. Tolstikova, K.P. Volcho, N.F. Salakhutdinov // Chemistry of Natural Compounds. – 2017. – V. 53 (6). – P. 1066-1071.
19. Ardashov, O.V. A novel small molecule supports the survival of cultured dopamine neurons and may restore the dopaminergic innervation of the brain in the MPTP mouse model of Parkinson's disease / O.V. Ardashov, **A.V. Pavlova**, A.K. Mahato, Yu. Sidorova, E.A. Morozova, D.V. Korchagina, G.E. Salnikov, A.M. Genaev, O.S. Patrusheva, N. Li-Zhulanov, T.G. Tolstikova, K.P. Volcho, N. Salakhutdinov // ACS Chemical Neuroscience. – 2019. – V. 16 (10). P. 4337-4349.
20. Il'ina, I. Synthesis and analgesic activity of aliphatic ketones-derived chiral hexahydro-2H-chromenes / I. Il'ina, E. Morozova, **A. Pavlova**, D. Korchagina, T. Tolstikova, K. Volcho, N. Salakhutdinov // Medicinal Chemistry Research. – 2020. – V. 29. – P. 738–747.

Патенты на изобретение (RU):

21. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Ильина И.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Применение 4,7-диметил-2-(проп-1-енил)-3,4,4а,5,8,8а-гексагидро-2Н-хромен-4,8-диола в качестве анальгезирующего средства. Заявка 2009145563/15, приоритет от 08.12.2009. Патент RU 2418578 С1, Бюлл. №14, 20.05.2011
22. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Ильина И.В., Ардашов О.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Средство для лечения болезни Паркинсона. Заявка 2009148376/15, приоритет от 24.12.2009. Патент RU 2418577 С1, Бюлл. №14, 20.05.2011.
23. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Ильина И.В., Ардашов О.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Применение 2-гидрокси-3-метил-6-(1-метилэтилен)циклогекс-3-енона в качестве анальгезирующего средства. Заявка 2010106573/15, приоритет от 24.02.2010. Патент RU 2421213 С1, Бюлл. №17, 20.06.2011.
24. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Ильина И.В., Ардашов О.В., Корчагина Д.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-4,7-диметил-3,4,4а,5,8,8а-гексагидро-2Н-хромен-4,8-диол – новое анальгезирующее средство. Заявка 2010106866/04, приоритет от 24.02.2010. Патент RU 2430100 С1, Бюлл. № 27, 27.09.2011.
25. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Ильина И.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 2-Метокси-4[(3аR,7аS)-3,3,6-триметил-1,3,3а,4,5,7а-гексагидро-2-бензофуран-1-ил]фенол – новое средство для лечения болезни Паркинсона. Заявка 2010123741/04, приоритет от 10.06.2010. Патент RU 2436782 С1, Бюлл. № 35, 20.12.2011.
26. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Хоменко Т.М., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 8-(трифторметил)бензо[*f*][1,2,3,4,5]пентатиэпин-6-амин в качестве анальгезирующего средства. Заявка 2011113135/15, приоритет от 05.04.2011, Патент RU 2453311 С1, Бюлл. №17, 20.06.2010.
27. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Михальченко О.С., Ильина И.В., Корчагина Д.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 4,7-диметил-2-(2,4,5-триметоксифенил)-3,4,4а,5,8,8а-гексагидро-2Н-4,8-эпоксихромен, обладающий анальгетической активностью. Заявка 2012107053/04, приоритет от 27.02.2012. Патент RU 2477283 С1, Бюлл. № 7, 10.03.2013.
28. Толстикова Т.Г., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Михальченко О.С., Ильина И.В., Покушалов Е.А., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 2-(3-гидрокси-4-

метоксифенил)-4,7-диметил-3,4,4а,5,8,8а-гексагидро-2Н-хромен-4,8-диол в качестве анальгезирующего средства. Заявка 2013101417/15, приоритет от 10.01.2013. Патент RU 2506079 С1, Бюлл. № 4, 10.02.2014.

29. Пономарев К.Ю., **Павлова А.В.**, Сулов. Е.В., Корчагина Д.В., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Производные 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-она, содержащие монотерпеновый остаток, новые анальгезирующие средства. Заявка 2014142836/04, приоритет от 23.10.2014. Патент RU 2564446, Бюлл. № 28. 10.10.2015

30. Хайд Е.В., **Павлова А.В.**, Михальченко О.С., Корчагина Д.В., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Хазанов В.А., Салахутдинов Н.Ф. Производные 2Н-хромена в качестве анальгезирующих средств. Заявка 2014127953/15, приоритет от 08.07.2014. Патент RU 2555361, Бюлл. № 19, 10.07.2015.

31. Ильина И.В., **Павлова А.В.**, Морозова Е.А., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. 4,7-диметил-3,4,4а,5,8,8а-гексагидро спиро [хромен-2,1'-циклогексан]-4,8-диол в качестве анальгезирующего средства. Заявка 2019136378, приоритет от 13.11.2019. Патент RU 2713946, Бюлл. №5, 11.02.2020.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-АГ – 2-арахидонилглицерин	ЧСС – частота сердечных сокращений
АД – артериальное давление	ЭК – эндоканнабиноидный
АДР – агонист дофаминовых рецепторов	ЭС – эндоканнабиноидная система
АЛТ – аланинаминотрансфераза	АЕА – анамид
АСТ – аспартатаминотрансфераза	DAGL – диацилглицерол липаза
АТФ – аденозинтрифосфат	ФААН – гидролаза амидов жирных кислот
БП – болезнь Паркинсона	GABA – гамма-аминомасляная кислота
ГАМК – гамма-амино масляная кислота	<i>i.p.</i> – интраперитонеально
ГЗК – ганглии задних корешков	(внутрибрюшинно)
ГМ – головной мозг	LD100 – абсолютносмертельная доза
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер	LD50 – среднесмертельная доза
ДОФА – дигидрооксифенилаланин	MAGL – моноацилглицерол липаза
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт	МАРК – митоген-активированные
КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза	протеинкиназы
МДА – малоновый диальдегид	NAC – N-ацетил-трансфераза
ПНС – периферическая нервная система	NADA – N-арахидоноилдофамин
ЦНС – центральная нервная система	NAPE – ацетилфосфатидилэтанол
МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин	NMDA – N-метил-D-аспартат
МФП+ – 1-фенил-4-фенилпиридиний	NOR – ноцицепти-орфановый фактор
МАО – моноаминооксидаза	OEA – олеилэтаноламин
НПВС – нестероидные	6-OHDA – 6-гидроксидофамин
противовоспалительные средства	PEA – пальмитоилэтаноламин
ОР – опиоидные рецепторы	PTZ – пентилентетразол
ПС – паркинсонический синдром	<i>per os</i> – перорально (внутрижелудочно)
ССС – сердечно-сосудистая система	<i>s.c.</i> – подкожно
ТГК – тетрагидроканнабинол	TRP – транзиторийный рецепторный
ЦОГ – циклооксигеназа	потенциал