

**ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ
В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ 2,3,4,5-ТЕТРАГИДРО[1,3]ДИАЗЕПИНО[1,2-а]
БЕНЗИМИДАЗОЛА**

© 2025 г. М. Ю. Дронь^{1,*}, Д. В. Мальцев², А. А. Спасов², Л. Н. Диваева³,
В. С. Сочнев³, А. С. Морковник³, О. И. Барыгин¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Волгоград, Россия

³ФГАУ ВО «Южный федеральный университет», Научно-исследовательский институт
физической и органической химии, Ростов-на-Дону, Россия

*E-mail: neuro.mike@yahoo.com

Поступила в редакцию 18.10.2024 г.

После доработки 22.11.2024 г.

Принята к публикации 23.11.2024 г.

В настоящей работе выполнен скрининг 14 новых производных диазепинобензи-
мидазола (соединения серии ДАБ) на ингибирующую активность в отношении
NMDA- и Ca^{2+} -непроницаемых (КН) AMPA-рецепторов. Эксперименты проводились
на изолированных нейронах головного мозга крыс линии Вистар, для исследования
NMDA- и КН-AMPA-рецепторов использовались пирамидные нейроны зоны CA1 гип-
покампа. Изоляция клеток осуществлялась методом вибродиссоциации, а регистрация
токов – методом фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Все иссле-
дованные соединения при концентрации 100 μM ингибировали NMDA-рецепторы
($\geq 30\%$), в то время как токи КН-AMPA-рецепторов ингибировались только четырьмя
соединениями: ДАБ-8, ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32. ДАБ-8, ДАБ-12 и ДАБ-32 имеют
у атома азота N^{11} 4-замещенную фенацильную группу с электроотрицательным атомом
фтора в пара-положении (ДАБ-8 и ДАБ-32), или без него (ДАБ-12), тогда как у наи-
более активного соединения ДАБ-19 у атома азота N^{11} находится 4-трет-бутил-бензиль-
ная группа с объемным трет-бутильным заместителем в пара-положении. Наиболее
активными из них оказались ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32, выбранные для дальнейшего
изучения их концентрационных зависимостей. Соединение ДАБ-19 продемонст-
рировало наиболее выраженную активность и к NMDA-, и к КН-AMPA-рецепторам; IC_{50}
составили $11.0 \pm 1.6 \mu\text{M}$ и $15.4 \pm 1.4 \mu\text{M}$ соответственно. Подобная способность инги-
бировать и NMDA-, и КН-AMPA-рецепторы в таких концентрациях является крайне
необычной. На основе предыдущих данных о нейropsychотропных эффектах ДАБ-19
была выдвинута гипотеза о его возможной противосудорожной активности, что было
подтверждено в тесте «Пентилен-тетразол индуцированных судорог». Выявление
ДАБ-19 как комбинированного антагониста NMDA- и КН-AMPA-рецепторов пред-
ставляет собой важное достижение для дальнейшей разработки эффективных проти-
восудорожных препаратов.

Ключевые слова: NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы, пэтч-кламп, диазепинобен-
зимидазолы

ВВЕДЕНИЕ

L-глутаминовая кислота – наиболее важный и наиболее распространенный возбуждающий нейромедиатор центральной нервной системы. После высвобождения из пресинаптической терминали глутамат способен активировать два класса рецепторов: метаботропные – связанные с G-белками и ионотропные лиганд-управляемые ионные каналы [1,2]. Исходя из названий фармакологических агентов, которые приводят к активации ионотропных глутаматных рецепторов, выделяют NMDA-, каинатные и AMPA-рецепторы. AMPA-рецепторы в свою очередь подразделяют на кальций-проницаемые и кальций-непроницаемые. Подобного рода снижение кальциевой проницаемости становится возможным за счет замены глутаминна на аргинин в селективном фильтре субъединицы GluA2 [3–5]. Активация AMPA-рецепторов влечет за собой деполяризацию мембраны нейрона, которая является одним из условий срабатывания NMDA-рецепторов, так как при отрицательных значениях мембранного потенциала они заблокированы ионом магния [6] и не могут проводить катионные токи. NMDA-рецепторы в силу высокой их проводимости (30–50 пСм) [7] и способности пропускать ионы кальция, являющегося одним из универсальных вторичных посредников внутри клеток, представляют у исследователей наибольший интерес. Чрезмерная активация ионотропных глутаматных рецепторов может привести к экс-сайтотоксическим эффектам, в ходе которых кальций, поступающий в нейрон в избыточных количествах, инициирует запуск апоптоза клетки. Эксайтотоксичность сопряжена с патогенезом ряда неврологических состояний, таких как эпилепсия, травматическое повреждение мозга, инсульт [8].

Несмотря на то, что известно колоссальное число блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов, в клинической практике активно используется ограниченное их количество. Кетамин, блокатор NMDA-рецепторов, использовался как диссоциативный анестетик, однако в настоящее время перспективен в качестве быстродействующего антидепрессанта [9]. Мемантин, в отличие от кетамина, демонстрирует меньшее количество побочных эффектов и применяется для улучшения когнитивных функций при болезни Альцгеймера [10]. Относительно новый препарат перампанель является селективным аллостерическим антагонистом AMPA-рецепторов. Он одинаково эффективно ингибирует кальций-проницаемые и кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы [11] и используется в составе адьювантной терапии эпилепсии. Особенности химического строения данных лекарств лежат в основе их клинической толерантности, механизма действия, кинетики и селективности. Структурные детерминанты являются тем самым фактором, от которого зависит то, как соединение будет влиять на синаптические токи в физиологических и патологических условиях, и именно поэтому изучение действия новых классов химических соединений на ионотропные глутаматные рецепторы является важнейшей задачей для физиологии и медицины.

Для того, чтобы расширить круг клинически толерантных соединений, требуется не просто получение аналогов с улучшенной активностью, а поиск новых классов соединений с уникальными свойствами – именно поэтому мы обратили внимание на гидрированные производные диазепино[1,2-а]бензимидазола, сочетающих в своей структуре два привилегированных скаффолда – 1,3-дiazепиновый и бензимидазольный, каждый из которых по отдельности демонстрирует широкий спектр фармакологических активностей. Стоит отдельно отметить, что и некоторые производные бензимидазола [12] и некоторые diaзепины [13,14] являются антагонистами ионотропных глутаматных рецепторов. Это и послужило основанием для проведения нами скрининга новых производных diaзепинобензимидазолов в отношении NMDA- и AMPA-рецепторов в настоящей работе. В результате скрининга был обнаружен уникальный, перспективный комбинированный антагонист NMDA- и КН-AMPA-рецепторов ДАБ-19, ингибирующий их в микромолярных концентрациях и обладающий противосудорожным действием.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Осуществлялась декапитация под севофлурановым наркозом крыс линии Wistar двух недель жизни (13–19 дней) с последующей экстракцией головного мозга и его охлаждением до 2–4 °С. После прикрепления мозга на платформу вибратора Campden Instruments 700 smz 2 (Великобритания) изготавливались срезы гиппокампа толщиной 250 мкм, экспозиция которых осуществлялась в растворе для срезов, имеющем следующий состав (в мМ): NaHCO₃ – 26, D-глюкоза – 10, NaH₂PO₄ – 1.24, NaCl – 124, KCl – 5, MgSO₄ – 2, CaCl₂ – 1.3. Раствор барботировался карбогеном (95% O₂; 5% CO₂), при pH 7.4 и 24–26 °С. Далее срезы подвергались вибродиссоциации [15], в ходе которой осуществлялось выделение нейронов. Нейроны идентифицировались по морфологическому и фармакологическому критерию. Для исследования NMDA- (GluN2A/GluN2B) и КН-АМРА-рецепторов осуществлялась запись интегральных токов пирамидных нейронов из CA1 зоны гиппокампа [16,17].

Запись интегральных токов велась методом «пэтч-клармп» в конфигурации «Целая клетка» в режиме фиксации потенциала. Пэтч-пипетка заполнялась раствором, который содержал (в мМ): NaCl – 5, CaCl₂ – 0.5, HEPES – 10, EGTA – 5, CsCl – 40, CsF – 100, доведение pH раствора до величины 7.2 осуществлялось добавлением CsOH. Состав внеклеточного раствора (в мМ): NaCl – 143, KCl – 5, CaCl₂ – 2.3, D-глюкоза – 22, HEPES – 10, с коррекцией pH до 7,4 посредством добавления HCl. В экспериментах с АМРА-рецепторами во внеклеточный раствор добавлялся 2 мМ MgSO₄. В качестве агонистов NMDA-рецепторов использовался раствор NMDA (100 мМ) с добавлением глицина (10 мМ), активация АМРА-рецепторов производилась раствором каината (100 мМ). Исследования рецепторов проводились с использованием системы быстрой смены (10–15 мс) растворов на 8 каналов RCS-200 BioLogic (Франция), оснащенной электромагнитными клапанами и шаговым двигателем. Регистрация отведений проводилась усилителем EPC-8 НЕКА Elektronik (Германия). Для фиксации потенциала мембраны, управления подачей растворов, записи ионных токов и их анализа использовался персональный компьютер. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microcal™ Origin 6.0. Фармакологические модуляторы и реактивы были приобретены у фирм Sigma (США), Tocris (США), Helicon (Россия), Fluka (Швейцария). Производные диазепино[1,2-а]бензимидазола, структурные формулы которых представлены на рис. 1, синтезированы Л.Н. Диваевой и Т.А. Кузьменко в лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ Южного федерального университета (руководитель А.С. Морковник), Ростов-на-Дону. Все результаты представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение», рассчитанное на основании не менее 5 экспериментов. Для определения значений ИК₅₀ использовалось уравнение

$$I\% = 100 / (1 + (C/IC_{50})^n), \quad (1)$$

где $I\%$ – процент ингибирования, C – концентрация блокатора, IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования, n – коэффициент Хилла.

Дополнительно был изучен противосудорожный потенциал наиболее активного соединения на модели *in vivo*. Исследования проведены на трехмесячных нелинейных половозрелых белых мышах-самцах массой 20–24 г ($n = 18$). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP) № 2023/191 от 02.06.2023 г. Тест «Пентилентетразол-индуцированных судорог» предполагает формирование «малого» припадка (модель абсанса) посредством введения пентилентетразола в дозе 75 мг/кг подкожно в область шейного отдела спины грызунов [18–21]. Соединение ДАБ-19 и диазепам вводили внутривенно с помощью атравматичного металлического зонда за 30 мин до введения пентилентетразола. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду (растворитель) в эквивалентном объеме.

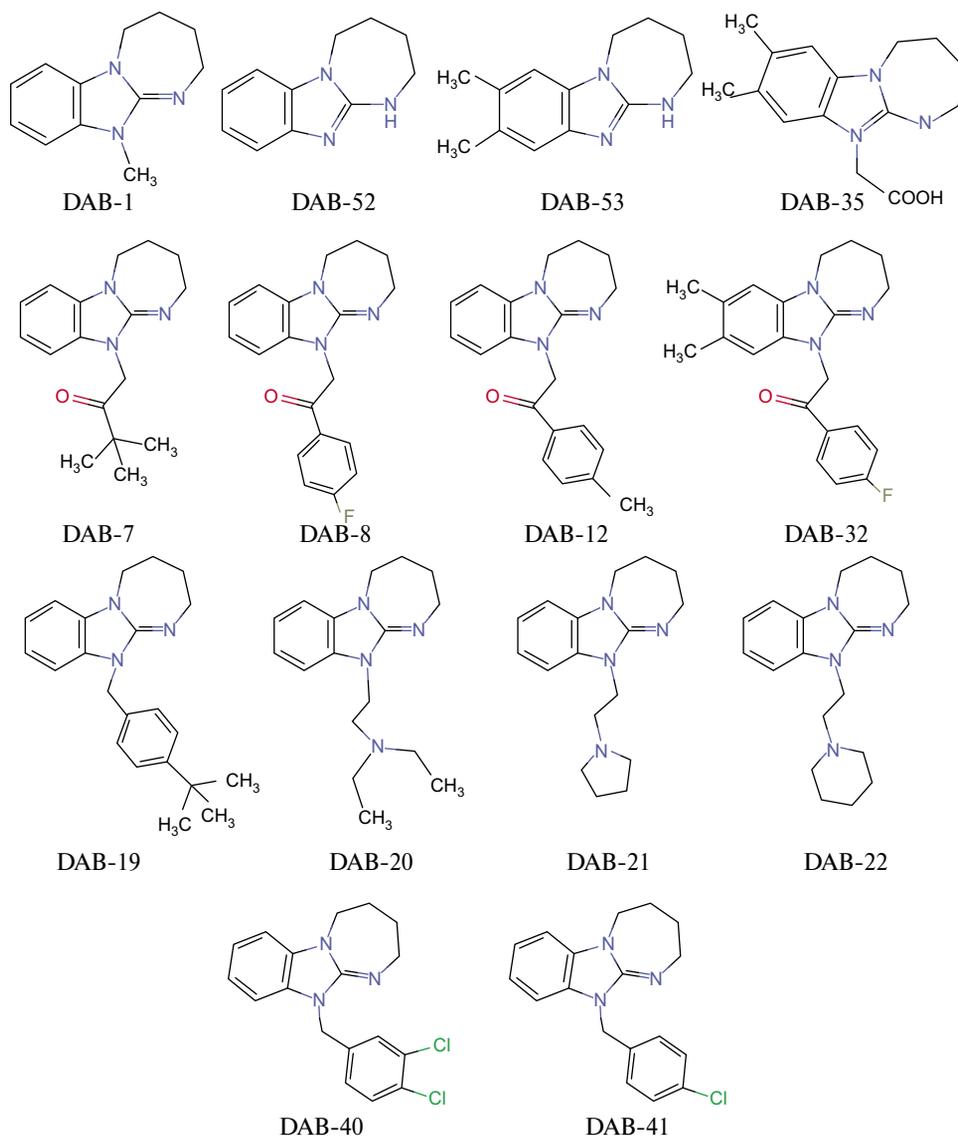


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых N^{11} -замещенных производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-а]бензимидазола. Соединения использовались в форме гидроиодида (ДАБ-1), гидробромидов (ДАБ-7, ДАБ-8, ДАБ-12, ДАБ-19, ДАБ-32), гидрохлоридов (ДАБ 40, ДАБ-41), дигидрохлоридов (ДАБ-20, ДАБ-21, ДАБ-22).

За животными вели наблюдение в течение 30 мин после введения пентилентетразола. Для оценки противосудорожной активности регистрировали следующие показатели: латентный период наступления судорог (c) и летальность животных в группе. Отсутствие судорог свидетельствовало о противосудорожной активности исследуемых веществ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Скрининг N¹¹-производных тетрагидродиазепинобензимидазола на активность в отношении NMDA-рецепторов и КН-АМРА-рецепторов

Протокол скрининга включал в себя запись интегрального тока нейрона путем активации NMDA-рецепторов или КН-АМРА-рецепторов с последующим ингибированием этих токов исследуемыми веществами в концентрации 100 μM путем их совместной подачи с соответствующим агонистом. Мы наблюдали большое разнообразие эффектов действия производных диазепинобензимидазола на NMDA- и КН-АМРА-рецепторы, что свидетельствует о различных структурных детерминантах их ингибирования. Репрезентативные примеры ингибирования представлены на рис. 2, а суммарные данные в табл. 1. Для практически всех производных диазепинбензимидазола в концентрации 100 μM процент ингибирования NMDA-рецепторов был выше, чем процент ингибирования КН-АМРА-рецепторов. Единственным исключением было наиболее активное соединение ДАБ-19, одинаково эффективно ингибировавшее оба подтипа рецепторов в этой концентрации (около 90% ингибирования). Апликация исследуемых соединений в концентрации 100 μM в отсутствие агониста не приводила к смещению изоэлектрической линии.

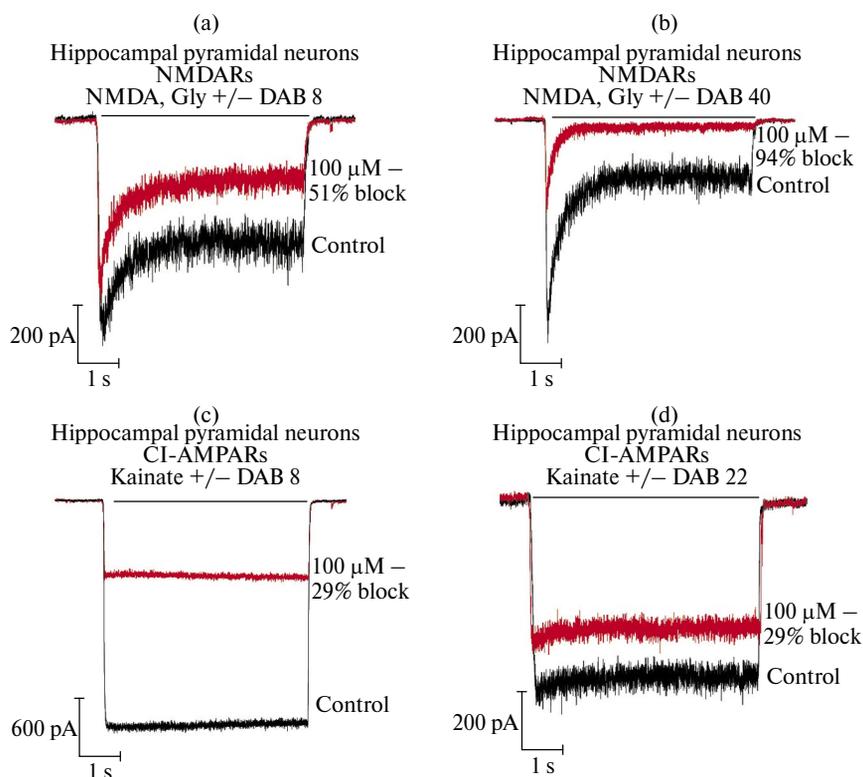


Рис. 2. Электрофизиологическая характеристика активностей соединений, оцененных на этапе скрининга: (a) – ДАБ-8 в концентрации 100 μM вызывает ингибирование 50% интегрального тока NMDA-рецепторов, экспрессированных на пирамидных нейронах CA1-зоны гиппокампа; (b) – ДАБ-40 в концентрации 100 μM демонстрирует выраженную ингибирующую активность в отношении NMDA-рецепторов; (c) – ДАБ-8 проявляет ингибирующую активность КН-АМРА-рецепторов, сопоставимую с таковой при действии данного соединения на NMDA-рецепторы; (d) – ДАБ-22 является низкоактивным ингибитором КН-АМРА-рецепторов пирамидных нейронов CA1 зоны гиппокампа.

Таблица 1. Результаты скрининга. Процент ингибирования интегральных токов NMDA- и КН-АМРА-рецепторов производными диазепинобензимидазола серии ДАБ в концентрации 100 μM

Шифр пробы	Ингибирование NMDA-рецепторов, %, $n = 5$	Ингибирование КН-АМРА-рецепторов, %, $n = 5$
ДАБ-1	62 \pm 2	10.9 \pm 0.4
ДАБ-7	53 \pm 5	7.6 \pm 0.7
ДАБ-8	48.7 \pm 1.0	61.4 \pm 1.1
ДАБ-12	92.3 \pm 1.6	41.1 \pm 0.9
ДАБ-19	92 \pm 5	93 \pm 4
ДАБ-20	89.9 \pm 1.7	13.4 \pm 1.0
ДАБ-21	62 \pm 5	18.6 \pm 0.9
ДАБ-22	45 \pm 5	28.9 \pm 1.1
ДАБ-32	82 \pm 3	56 \pm 3
ДАБ-35	34 \pm 13	10.4 \pm 0.6
ДАБ-40	92.9 \pm 1.2	0
ДАБ-41	66.9 \pm 1.4	0
ДАБ-52	42 \pm 4	8.6 \pm 0.7
ДАБ-53	54 \pm 4	8.3 \pm 0.4

Ингибирование NMDA-рецепторов N¹¹-производными тетрагидродиазепинобензимидазола

В концентрации 100 μM все исследованные производные диазепинобензимидазола продемонстрировали выраженную ингибирующую активность в отношении NMDA-рецепторов. Проценты ингибирования были в диапазоне от 34 до 92%. Наименьшей NMDAR-ингибирующей активностью в исследуемой когорте соединений обладало соединение с шифром ДАБ-35, с карбоксиметильным заместителем в 11 положении (34% ингибирования). Родоначальник ряда, 1(11)N-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazepино[1,2-a]бензимидазол (ДАБ-52), другой его N-замещенный представитель ДАБ-53, а также простейшее N-замещенное, с минимальной по размерам N¹¹ метильной группой, ДАБ-1, обладали чуть большей активностью (40–60% ингибирования). Наибольшую же активность (80–90% ингибирования) продемонстрировали соединения ДАБ-12, ДАБ-19, ДАБ-32 и ДАБ-40, у которых у атома азота N¹¹ присутствует п-замещенная фенильная группа, связанная с ним через метиленовый или CH₂CO-линкер, а также ДАБ-20 с 2-(N,N-диэтиламино)этильной группой у атома азота N¹¹.

Ингибирование КН-АМРА-рецепторов N¹¹-производными тетрагидродиазепинобензимидазола

Большинство исследованных тетрагидродиазепинобензимидазолов в концентрации 100 μM проявили слабую активность в отношении КН-АМРА-рецепторов (ингибирование < 20%). Среднюю активность (ингибирование 40–60%) продемонстрировали ДАБ-8, ДАБ-12 и ДАБ-32. Все эти соединения имеют у атома азота N¹¹ пара-замещенную фенацильную группу, а именно -4пара-фтор- (ДАБ-8, ДАБ-32) или -4пара-метилфенилацильную (ДАБ-12). Единственным высокоактивным в отношении КН-АМРА-рецепторов (ингибирование > 90%) оказалось соединение ДАБ-19, у которого диазепинобензимидазольный scaффолд через положение 11 и далее, через -CH₂-линкер, связан с бензольным циклом, имеющим в пара-положении объемистый трет-бутильный заместитель. Стоит

отметить, что замена в соединении ДАБ-19 трет-бутильной группы на гораздо меньшие по размеру и к тому же явно электроотрицательные атомы хлора, один (ДАБ-40) и два (ДАБ-41) полностью приводит к полной потере КН-AMPA-ингибиторных свойств.

Таким образом, по результатам скрининга выявлены диазепинобензимидазолы ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32, имеющие, что представляется важным, выраженную ингибирующую активность по отношению как к NMDA-, так и КН-AMPA-рецепторам. Поэтому эти соединения с двухтаргетной активностью были исследованы далее на концентрационные зависимости их действия на оба типа рецепторов. Установлено, что все 3 исследованных представителя диазепинобензимидазолов ингибировали NMDA- и КН-AMPA-рецепторы концентрационно-зависимым и обратимым образом. Репрезентативные примеры ингибирования токов различными концентрациями соединения с наибольшей активностью ДАБ-19, представлены на рис. 3а, с. Величины ИК₅₀ для ДАБ-12 составили для двух указанных рецепторов $9.4 \pm 2.6 \mu\text{M}$ ($n = 5$) и $139.6 \pm 22.5 \mu\text{M}$ ($n = 5$) соответственно. Примерно такую же активность проявило и соединение ДАБ-32 с величинами ИК₅₀ $8.5 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ($n = 5$) и $107.2 \pm 2.6 \mu\text{M}$ ($n = 5$) соответственно. Максимальную активность проявило соединение ДАБ-19 с объемистым пара-заместителем в фенильной группе. Для него характерна примерно одинаковая ингибирующая активность в отно-

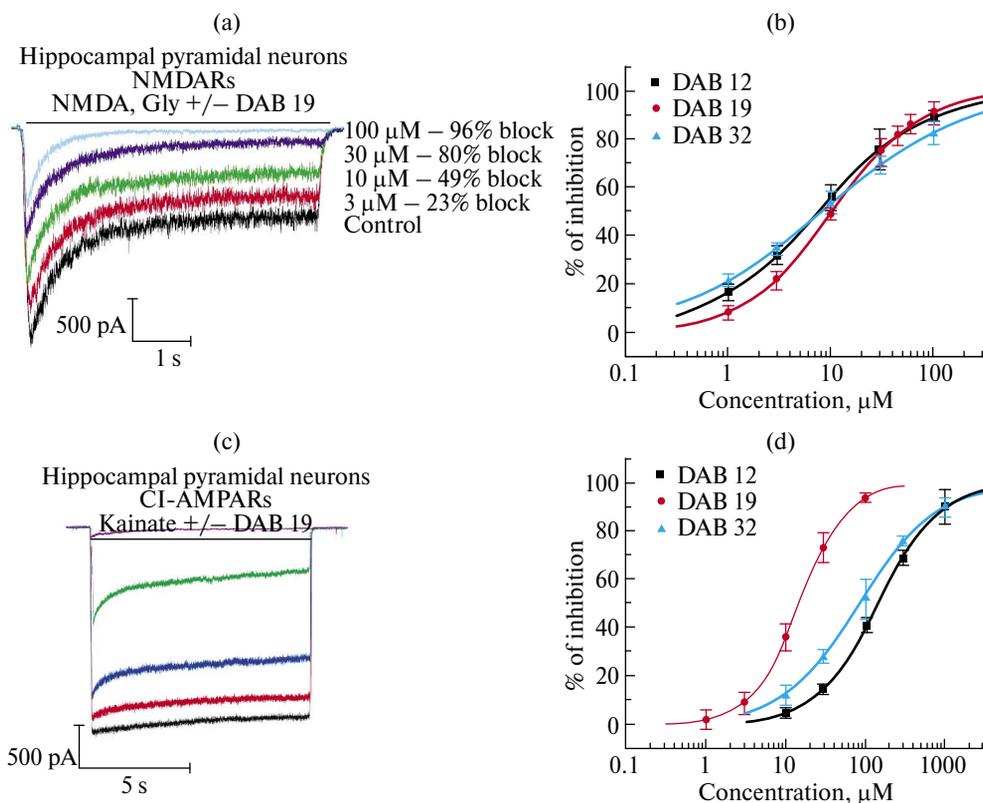


Рис. 3. Электрофизиологическое описание действия наиболее активных производных диазепинобензимидазола на NMDA- и КН-AMPA-рецепторы: (а) – ингибирование NMDA-рецепторов соединением ДАБ-19 при различных его концентрациях; (б) – кривые концентрационной зависимости, описывающие действие ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32 на NMDA-рецепторы; (с) – концентрационная зависимость ингибирования КН-AMPA-рецепторов соединением ДАБ-19; (д) – концентрационная зависимость ингибирования КН-AMPA-рецепторов диазепинобензимидазолами ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32.

шении каждой из двух мишеней. Для NMDA-рецепторов IC_{50} составляет $11.0 \pm 1.6 \mu M$ ($n = 8$), а для КН-AMPA-рецепторов – $15.4 \pm 1.4 \mu M$ ($n = 9$). Кривые концентрационных зависимостей для трех соединений представлены на рис. 3 б, д.

Противосудорожная активность. Под влиянием диазепама в тесте «Пентилентетразол-индуцированные судороги» нивелировались генерализованные клонические судороги с утратой рефлекса переворачивания, индуцированные пентилентетразолом, а при введении ДАБ-19 регистрируемый эффект имел отложенный старт по сравнению с группой контроля, и судорожный эффект наблюдался преимущественно в виде миоклонических подергиваний тела грызунов ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента). Менее выраженное влияние соединения на латентный период развития судорог у мышей по сравнению с диазепамом, возможно, связано с меньшей аффинностью ДАБ-19 к сайту связывания ГАМК, чем у диазепама [21]. Полученные экспериментальные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Противосудорожная активность соединения ДАБ-19 (2.9 мг/кг, в/ж) в тесте «Пентилентетразол-индуцированные судороги», мыши, $M \pm SEM$

	Тест «Пентилентетразол-индуцированные судороги»	
	Латентное время возникновения судорог, с	Летальность, %
Контроль	75 ± 14	83.3 (5/6)*
ДАБ-19 (2.9 мг/кг)	140 ± 8^y	16.6 (1/6)*
Диазепам (2 мг/кг)	300 ± 0^y	0

Примечание. ^y – данные достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента); * – данные достоверны по отношению к контролю (хи-квадрат).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы провели скрининг 14 новых производных диазепинобензимидазола на активность в отношении NMDA- и КН-AMPA-рецепторов. Все исследованные соединения в концентрации $100 \mu M$ ингибировали NMDA-рецепторы ($\geq 30\%$ ингибирования), тогда как КН-AMPA-рецепторы – лишь 4 соединения: ДАБ-8, ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32. По результатам этого первичного скрининга три наиболее активных соединения – ДАБ-12, ДАБ-19 и ДАБ-32 – были отобраны для дальнейшего исследования концентрационных зависимостей их действия. Наиболее интересным соединением, высокоактивным по отношению сразу к двум рецепторам, оказался диазепинобензимидазол ДАБ-19, ингибирующий их в низкомикромолярных концентрациях. Стоит отметить, что способность ингибировать и NMDA-, и КН-AMPA-рецепторы в таких концентрациях является крайне необычной. Известно много комбинированных антагонистов NMDA- и КН-AMPA-рецепторов, действующих в низкомикромолярных концентрациях, – например, производные адамантана и фенилциклогексила [22,23]. Также известны комбинированные антагонисты двух основных типов AMPA-рецепторов – кальций-непроницаемых и кальций-проницаемых AMPA-рецепторов. К их числу относятся используемый в клинической практике противэпилептический препарат перампанел [24], конкурентный антагонист AMPA-рецепторов DNQX [25].

В ранних исследованиях [26–31], показан фармакологический потенциал не только производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазола в целом, но и конкретно одного из них – соединения ДАБ-19, как обладающего выраженной противотревожной активностью. Учитывая полученные данные о нейрорепрессивных эффектах соединения

ДАБ-19, можно было предположить возможность его противосудорожной активности, тем более, учитывая его определенное структурное сходство с известным антиконвульсантом диазепамом [32]. Для бензодиазепинов, как для ГАМК-миметиков, характерна выраженная противосудорожная активность в тесте «Пентилентетразол-индуцированные судороги» [21]. По результатам исследования соединения ДАБ-19 с использованием этого теста мы зарегистрировали противосудорожные свойства, что позволяет характеризовать это соединение как возможный противосудорожный агент широкого профиля.

Известно, что многие антагонисты NMDA- и AMPA-рецепторов обладают противосудорожным действием [33, 34]. Для противоэпилептического препарата перампана именно ингибирование AMPA-рецепторов является основным молекулярным механизмом его противосудорожного действия [11]. Таким образом, нами обнаружена мишень, которая может лежать в основе противосудорожного действия ДАБ-19. Комбинированных антагонистов NMDA- и КН-AMPA-рецепторов с ИК₅₀ по отношению к обоим типам рецепторов $\leq 15 \mu\text{M}$ ранее известно не было, и это является важной фармакологической новацией. В дальнейшем мы планируем исследовать уникальное действие ДАБ-19 на ионотропные глутаматные рецепторы более подробно.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям [Исследования были одобрены биоэтическим комитетом ИЭФБ РАН (протокол № 1/ 2021 от 28.01.2021 г.), а также комиссией по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP) № 2023/191 от 02.06.2023 г.]

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана средствами Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2022-296) о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости»», в рамках национального проекта «Наука и университеты». Химическая часть работы выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект № FENW-2023-0031.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Т.А. Кузьменко за плодотворное сотрудничество в рамках реализации раздела, посвященного разработке соединений серии ДАБ.

ВКЛАД АВТОРОВ

М. Ю. Д. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта, О. И. Б. – сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта, Д. В. М. – сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта, А. А. С. – планирование эксперимента, обработка данных, написание и редактирование манускрипта, Л. Н. Д. – разработка и синтез соединений, написание и редактирование манускрипта, В. С. С. – разработка и синтез соединений, написание и редактирование манускрипта, А. С. М. – разработка и синтез соединений, написание и редактирование манускрипта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Collingridge G, Singer W* (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11(7):290–296.
[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90011-v](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90011-v)
2. *Reiner A, Levitz J* (2018) Glutamatergic signaling in the central nervous system: Ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron* 98(6):1080–1098.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
3. *Fleming J, England P* (2010) Developing a complete pharmacology for AMPA receptors: A perspective on subtype-selective ligands. *Bioorganic & Med Chem* 18(4): 1381–1387.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.072>
4. *Washburn M, Numberger M, Zhang S, Dingledine R* (1997) Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors. *J Neurosci* 17(24):9393–9406.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-24-09393.1997>
5. *Cull-Candy S, Farrant M* (2021) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and their auxiliary subunits in synaptic plasticity and disease. *J Physiol* 599(10):2655–2671.
<https://doi.org/10.1113/JP279029>
6. *Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A* (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(5950): 462–465.
<https://doi.org/10.1038/307462a0>
7. *Wyllie D, Béhé P, Nassar M, Schoepfer R* (1996) Single-channel currents from recombinant NM DANR1a/NR2D receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Royal Soc Lond Ser B: Biol Sci* 263(1373):1079–1086.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0159>
8. *Lau A, Tymianski M* (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Europ J Physiol* 460(2):525–542.
<https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
9. *Zanos P, Gould T* (2018) Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatr* 23(4):801–811.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.255>
10. *Kotermanski S, Wood J, Johnson J* (2009). Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. *J Physiol* 587(19): 4589–4604.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176297>
11. *Hanada T, Hashizume Y, Tokuhara N, Takenaka O, Kohmura N, Ogasawara A, Hatakeyama S, Ohgoh M, Ueno M, Nishizawa Y* (2011) Perampanel: A novel, orally active, noncompetitive AMPA-receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy. *Epilepsia* 52(7): 1331–1340.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03109.x>
12. *Sun L, Chiu D, Kowal D, Simon R, Smeyne M, Zukin R, Olney J, Baudy R, Lin S* (2004) Characterization of Two Novel N-Methyl-D-aspartate Antagonists: EAA-090 (2-[8, 9-Dioxo-2, 6-diazabicyclo [5.2. 0] non-1 (7)-en-2-yl] ethylphosphonic Acid) and EAB-318 (R- α -Amino-5-chloro-1-(phosphonomethyl)-1H-benzimidazole-2-propanoic Acid Hydrochloride). *J Pharmacol Exp Therap* 310(2):563–570.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.066092>
13. *Wu A, Wang C, Niu L* (2014) Mechanism of inhibition of the GluA1 AMPA receptor channel opening by the 2, 3-benzodiazepine compound GYKI 52466 and a N-methyl-carbamoyl derivative. *Biochemistry* 53(18): 3033–3041.
<https://doi.org/10.1021/bi5002079>
14. *Qneibi M, Hamed O, Jaradat N, Hawash M, Al-Kerm R, Al-Kerm R, Sobuh S, Tarazi S* (2021) The AMPA receptor biophysical gating properties and binding site: Focus on novel curcumin-based diazepam derivatives as non-competitive antagonists. *Bioorganic Chem* 116:105406.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105406>
15. *Vorobjev V* (1991) Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue. *J Neurosci Meth* 38 (2–3):145–150.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90164-U](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90164-U)
16. *Chen Q, He S, Hu X, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan W, Xiong, Z* (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci* 27(3):542–552.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
17. *Buldakova S, Vorobjev V, Sharonova I, Samoilova M, Magazanik L* (1999) Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460. *Brain Res* 846(1): 52–58.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01970-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01970-8)

18. *Жмуренко Л, Воронина Т, Литвинова С, Неробкова Л, Гайдук И, Мокров Г, Гудашева Т* (2018) Синтез и противосудорожная активность производных оксимов 3-и 4-бензоилпиридинов. Хим-фарм журн 52(1):19–28. [*Zhmurenko L, Voronina T, Litvinova S, Nerobkova L, Gaidukov I, Mokrov G, Gudashева T* (2018) Synthesis and anticonvulsant activity of 3- and 4-benzoylpyridine oxime derivatives. *Pharmaceut Chem J* 52(1):19–28. (In Russ)]. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-1-19-28>
19. *Воронина Т, Неробкова Л* (2012) Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть 1 235–250. [*Voronina T, Nerobkova L* (2012) Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu protivosudorozhnoy aktivnosti farmakologicheskikh veshchestv. *Ruk Proveden Doklinich Issl Lek Sredstv* 235–250. (In Russ)].
20. *Shimada T, Yamagata K* (2018) Pentylentetrazole-induced kindling mouse model. *Journal of visualized experiments: JoVE* 136:56573. <https://doi.org/10.3791/56573>
21. *Dhaliwal J, Rosani A, Saadabadi A* (2023) Diazepam. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing PMID: 30725707
22. *Antonov S, Johnson J, Lukomskaya N, Potapyeva N, Gmiro V, Magazanik L* (1995) Novel adamantane derivatives act as blockers of open ligand-gated channels and as anticonvulsants. *Mol Pharmacol* 47(3):558–567.
23. *Bolshakov K, Kim K, Potapjeva N, Gmiro V, Tikhonov D, Usherwood P, Mellor I, Magazanik L* (2005) Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors. *Neuropharmacology* 49(2):144–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.02.007>
24. *Barygin O* (2016) Inhibition of calcium-permeable and calcium-impermeable AMPA receptors by perampanel in rat brain neurons. *Neurosci Lett* 633:146–151. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.028>
25. *Armstrong N, Gouaux E* (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: Crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28(1):165–181. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00094-5)
26. *Таран А, Мальцев Д, Яковлев Д, Караваева Т, Ткаченко Ю, Диваева Л, Морковник А, Кузьменко Т* (2017) Изучение анксиолитической активности в ряду новых производных диазепинобензимидазола на установке «Приподнятый крестообразный лабиринт». *Волгоградский научно-медицинский журнал* 1:24–26. [*Taran A, Maltsev D, Yakovlev D, Karavaeva T, Tkachenko Y, Divaeva L, Morkovnik A, Kuzmenko T* (2017) A study of anxiolytic activity of new diazepinobenzimidazoles in the elevated plus maze test. *Volgograd Sci Med J* 1:24–26. (In Russ)].
27. *Спасов А, Диваева Л, Мальцев Д, Кузьменко Т, Морковник А, Мирошников М, Таран А, Золотова Е* (2018) Анксиолитический потенциал нового ряда производных диазепинобензимидазола. *Вестн Волгоград гос мед ун-та* 3(67):19–23. [*Spasov A, Divaeva L, Maltsev D, Kuzmenko T, Morkovnik A, Miroshnikov M, Taran A, Zolotova E* (2018) The anxiolytic potential of a new series of diazepinobenzimidazole derivatives. *J Volgograd State Med Unvers* 15(3):19–23. (In Russ)]. [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2018-3\(67\)-19-23](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2018-3(67)-19-23)
28. *Maltsev D, Spasov A, Miroshnikov M, Skripka M, Divaeva L* (2020) Influence of Diazepino [1, 2-а] benzimidazole derivative (DAB-19) on behavioral aspects of animals. *Res Res Pharmacol* 6(3):9–14. <https://doi.org/10.3897/rppharmacology.6.55142>
29. *Спасов А, Мальцев Д, Мирошников М, Таран А, Нурмагомедова Б, Скрипка М, Кузьменко Т, Морковник А, Диваева Л* (2020) Антидепрессивная активность и потенциальные механизмы действия производного диазепинобензимидазола ДАБ-19. *Экспер клин фармак* 83(4):31–36. [*Spasov A, Maltsev D, Miroshnikov M, Taran A, Nurmagamedova B, Skripka M, Kuzmenko T, Morkovnik A, Divaeva L* (2020) The antidepressant activity of diazepinobenzimidazole derivative DAB-19 and its potential mechanisms of action. *Exp Clin Pharmacol* 83(4):31–36. (In Russ)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-4-31-36>
30. *Мирошников М, Мальцев Д, Спасов А, Таран А, Скрипка М, Суркова Е, Гонtareва А, Диваева Л, Морковник А* (2020) Анксиолитическая активность нового производного диазепино [1, 2-а] бензимидазола соединения ДАБ-19. *Экспер клин фармак* 83(10):3–8. [*Miroshnikov M, Maltsev D, Spasov A, Taran A, Skripka M, Surkova E, Gontareva A, Divaeva L, Morkovnik A* (2020) The Anxiolytic Activity of a New Derivative of Diazepinobenzimidazole (DAB-19). *Exp Clin Pharmacol* 83(10):3–8. (In Russ)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-10-3-8>

31. Мальцев Д, Таран А, Скрипка М, Мирошников М, Диваева Л, Кузьменко Т, Морковник А (2023) Диазепинобензимидазолы – новый класс для поиска соединений с аксиолитической активностью. Экспер клин фармак 86(11s):101. [Maltsev D, Taran A, Skripka M, Miroshnikov M, Divaeva L, Kuzmenko T, Morkovnik A (2023) Diazepinobenzimidazoles – a new class for searching for compounds with axiniolytic activity. Exp Clin Pharmacol 86(11s):101. (In Russ)]. <https://doi.org/10.30906/ekf-2023-86s-101a>
32. Kotloski R, Gidal B (2022) Rescue treatments for seizure clusters. Neurologic Clinics 40(4):927–937. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2022.03.016>
33. Rogawski M (2013) AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. Acta Neurologica Scandinavica 127:9–18. <https://doi.org/10.1111/ane.12099>
34. Sivakumar S, Ghasemi M, Schachter S (2022) Targeting NMDA receptor complex in management of epilepsy. Pharmaceuticals 15(10):1297. <https://doi.org/10.3390/ph15101297>

Search for Inhibitors of Ionotropic Glutamate Receptors in a Series of 2,3,4,5-Tetrahydro[1,3]Diazepino[1,2-a]Benzimidazole Derivatives

M. Y. Dron^{a,*}, D. V. Maltsev^b, A. A. Spasov^b, L. N. Divaeva^c, V. S. Sochnev^c,
A. S. Morkovnik^c, and O. I. Barygin^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia*

^c*Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

*E-mail: neuro.mike@yahoo.com

In the present work, 14 new diazepinebenzimidazole derivatives (DAB series) were screened for inhibitory activity against NMDA- and Ca²⁺-impermeable (CI) AMPA-receptors. Experiments were conducted on isolated Wistar rat neurons; pyramidal neurons of the CA1 zone of the hippocampus were used to study NMDA- and CI-AMPA-receptors. Cell isolation was performed by vibrodissociation, and currents were recorded by whole-cell patch-clamp method. All the studied compounds at a concentration of 100 μM inhibited NMDA-receptors (≥30%), while CI-AMPA receptors currents were inhibited by only four compounds: DAB-8, DAB-12, DAB-19, and DAB-32. DAB-8, DAB-12 and DAB-32 have a 4-substituted phenacyl group at the nitrogen atom N¹¹ with an electronegative fluorine atom in the para position (DAB-8 and DAB-32) or without it (DAB-12), whereas the most active compound DAB-19 has a 4-tert-butyl-benzyl group at atom N¹¹ with a bulky tert-butyl substituent in the para position. The most active of them were DAB-12, DAB-19, and DAB-32, which were studied further for their IC₅₀ values. Compound DAB-19 demonstrated the most pronounced activity against both NMDA- and CI-AMPA-receptors: IC₅₀ values were 11,0 ± 1,6 μM and 15,4 ± 1,4 μM, respectively. Such an ability to inhibit both NMDA- and CI-AMPA-receptors at such concentrations is quite remarkable. Based on previous data on the neuropsychotropic effects of DAB-19, we put forward hypothesis about its possible anticonvulsant activity, which was confirmed in the "Pentylenetetrazol Seizure" test. The identification of DAB-19 as a combined antagonist of NMDA- and CI-AMPA-receptors is an important achievement for the further development of effective anticonvulsants.

Keywords: NMDA-receptors, AMPA-receptors, patch-clamp, diazepinebenzimidazoles