

А.И. Краснова, Н.А. Пулина, В.Д. Полежаева

**Изучение *in silico* и *in vivo* влияния
N-(гет)ариламидов 4-арил-2,4-диоксобутановых кислот
с фрагментом пиримидина на мышечный тонус
и двигательную координацию животных**

ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, Пермь

Резюме. Методами *in silico* и *in vivo* изучена острая токсичность и влияние на ряд показателей работы нервно-мышечной системы для пяти гетариламидов 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот с фрагментами пиримидина (PV-150, PV-210, PV-220 PV-310, PV-410). Установлено, что вещества относятся к малотоксичным соединениям. Выявлено отсутствие значимого влияния на мышечный тонус и улучшение координации движений у лабораторных животных для 3-х соединений, в большей степени прогноз *in silico* реализован у гетариламида PV-410.

Ключевые слова: мышечный тонус, координация, острая токсичность, *in silico*, *in vivo*.

Актуальность. При разработке лекарственных средств одним из важных требований фармакологической безопасности является необходимость экспериментальной оценки потенциальных нейротоксичных эффектов. Развитие неврологического дефицита, сопровождающееся нарушениями нервно-мышечного поведения, оценивают при помощи целого ряда клинико-функциональных тестов. В свою очередь, изучение аспектов воздействия потенциальных субстанций, связанных с двигательной функцией, позволяет прогнозировать терапевтический эффект при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при мышечных дистрофиях, миопатиях, болезни Паркинсона и других, при которых наблюдается значительное снижение качества жизни пациентов: ограничение двигательной активности и, в ряде случаев, последующая инвалидизация. Несмотря на широкую распространенность нервно-мышечных патологий, особенно среди пожилого населения, варианты радикальных методов лечения отсутствуют [1,2], а современные подходы к терапии в основном направлены на замедление прогрессирования заболевания и улучшение симптоматики, однако не позволяют полностью восстановить мышечную функцию. Учитывая вышесказанное, проблема поиска лекарственных препаратов, воздействующих на новые молекулярные звенья патогенеза миопатий [3] является актуальной, а использование ряда общетоксикологических фармакологических тестов позволяет оценить не только профиль безопасности, но и потенциал проявления нейропротекторной активности, улучшения мышечного тонуса.

Ранее ряд синтезированных соединений на основе 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот с фрагментами пиримидина и бензимидазола показал наличие нейропсихотропной активности [4,5], что позволило сделать вывод о наличии анксиолитического профиля действия у некоторых веществ. Это послужило предпосылкой к последующему применению компьютерного моделирования для прогноза и поиска высокоактивных веществ среди производных данного ряда, их

синтезу и изучению влияния полученных веществ на поведенческие реакции животных, в первую очередь показатели двигательной активности.

Материал и методы исследования. Объектом исследования являлись 5 новых гетариламидов 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот с фрагментами пириимидина (PV-150, PV-210, PV-220 PV-310, PV-410).

Исследование *in silico* включало компьютерное прогнозирование биологической активности, которое осуществляли с помощью программы PASS Online. Прогноз взаимосвязей «структура-активность», проводили по следующим критериям - вероятность проявления активности P_a и отношение вероятности проявления активности к вероятности ее отсутствия P_a/P_i [6]. Предикцию параметров острой токсичности синтезированных структур производили посредством программного продукта GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) [7].

Экспериментальные исследования *in vivo* были выполнены с использованием в эксперименте нелинейных половозрелых белых мышей обоих полов массой 18-24г ($n=60$) с учетом этических норм, изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1989) и одобрены комиссией по биоэтике ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (протокол № 5 от 15.01.2024 г.).

Оценку острой токсичности при пероральном введении осуществляли методом фиксированной дозы (Fixed Dose Procedure, FDP), согласно протокола OECD №420 (ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы»). Класс токсичности определяли согласно GHS-классификации (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) [8]. Помимо определения летальных доз исследуемых веществ, также оценивали показатели острой интоксикации (поведенческие реакции, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы, вегетативные эффекты). Общая продолжительность наблюдения составила 2 недели.

Исследование влияния изучаемых соединений на показатели мышечной силы животных оценивали в тесте подтягивания на горизонтальной перекладине («перекладина»). В ходе эксперимента фиксировали способность мышей подтянуться из положения виса на передних конечностях и зацепиться нижней конечностью за перекладину в течение 20 с, при этом отмечали количество лапок, участвующих в удержании животного, и производили оценку в баллах (1 лапа – 1 балл). Тест считался не выполненным (отрицательным), если животному требовалось больше времени или оно вовсе не удерживалось на перекладине [9].

Оценку влияния полученных веществ на мышечный тонус и координацию животных проводили с помощью теста «вращающийся стержень» [10], который представляет собой специальный аппарат «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия) со стержнем диаметром 3 см, вращающийся с переменным ускорением (от 4 до 40 об/мин). Регистрировали способность животных удерживаться на вращающемся со

скоростью 8 об/мин стержне в течение 4-х минут и латентный период первого падения [9, 10]. Для достижения достоверных результатов эксперимента регистрацию показателей (латентный период до падения животного со стержня, скорость вращения стержня, скорость падения животного, а также общее пройденное расстояние и количество оборотов) осуществляли три раза в течение 5 минут с 10 минутным интервалом между подходами и предварительным трехкратным обучением мышей за час до введения веществ. Способность мышей сохранять равновесие и увеличивать время нахождения на вращающемся стержне рассматривали как положительное влияние на моторные функции и координацию животного.

Исследуемые соединения вводили перорально с помощью внутрижелудочного зонда в форме мелкодисперсной суспензии, стабилизированной твином-80, за 60 минут до начала эксперимента в скрининговой дозе 50 мг/кг. Животным контрольной группы был введен эквивалентный объем 0,9% раствора хлорида натрия.

Для статистической обработки экспериментальных данных применяли специализированное программное обеспечение (Statistica 6.0 и расширенный пакет анализа Microsoft Excel 2018). Были рассчитаны средние значения, стандартные отклонения ($M \pm m$) и стандартные ошибки. Нормальность распределения данных оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка, при ненормальном распределении - U-критерий Манна-Уитни. Статистическую значимость различий между средними значениями определяли с помощью t-критерия Стьюдента, при этом уровень значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Для 5-ти новых соединений (PV-150, PV-210, PV-220, PV-310, PV-410) при помощи программы PASS Online был выполнен прогноз фармакологических эффектов со стороны нервно-мышечной системы. Для всех исследуемых соединений были установлены значения вероятности проявления активности (P_a) в диапазоне от 0,210 до 0,355 (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты прогноза изучаемых соединений с помощью программы PASS Online

Шифр	P_a	P_i	Прогнозируемый эффект
PV-150	0,242	0,157	Лечение симптомов болезни Паркинсона
	0,291	0,220	Лечение дискинезий
	0,263	0,193	Спазмолитический
PV-210	0,309	0,130	Лечение миопатий
	0,218	0,121	Периферическая миорелаксация
	0,274	0,254	Лечение острых неврологических заболеваний
PV-220	0,355	0,107	Спазмолитический
	0,229	0,066	Активатор холинацетилтрансферазы
	0,210	0,176	Лечение мышечных дистрофий
PV-310	0,266	0,117	Лечение миопатий
	0,245	0,124	Периферическая миорелаксация
	PV-410	0,214	0,120
0,248		0,218	Лечение миопатий
0,232		0,221	Лечение мышечных дистрофий

Данные значения свидетельствуют о достаточно высокой вероятности наличия влияния на нервно-мышечную систему, что обосновывает целесообразность экспериментальной оценки данных соединений.

Прогноз GUSAR показал, что исследуемые соединения предварительно относятся к 4 классу опасности (вещества малотоксичные) по классификации GHS [8], что согласовывалось с экспериментальными данными, полученными в исследованиях острой токсичности *in vivo* (табл. 2). Введение веществ в фиксированной дозе 2000 мг/кг не вызывало гибели экспериментальных животных, их внешний вид и состояние отмечались как удовлетворительные.

Важно отметить, что проведенный анализ спектра фармакологических и токсических эффектов *in silico* представляет собой исключительно количественный прогноз вероятности проявления тех или иных биологических свойств исследуемых соединений, что позволяет оптимизировать временные и ресурсные затраты. Однако компьютерное прогнозирование не может служить полной заменой исследований *in vivo*.

Таблица 2 – Показатели острой токсичности изучаемых соединений, полученные методами *in silico* и *in vivo*

Соединение	LD50 <i>in silico</i> , мг/кг	LD50 <i>in vivo</i> , мг/кг	Класс опасности GHS
PV-150	2066	>2000	IV
PV-210	3037	>2000	IV
PV-220	2327	>2000	IV
PV-310	2024	>2000	IV
PV-410	3003	>2000	IV

Результаты теста «вращающийся стержень» показали, что у 4-х соединений PV-150, PV-220, PV-310 латентный период падения составлял более 3-х минут, превосходя показатели контрольной группы животных, что свидетельствует о положительном влиянии на мышечный тонус и отсутствии двигательного-координационных нарушений. У гетариламида PV-210 показатели латентного периода падения были сопоставимы с данными контрольной группы и не достигали 2-х минут, что свидетельствует об отсутствии значимого положительного влияния на координацию движения животных.

При этом при введении всех изучаемых соединений у животных не отмечалось нарушений мышечного тонуса и миорелаксации, что выражалось в способности подтянуться на «перекладине» (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние изучаемых соединений на двигательную координацию и мышечный тонус ($M \pm m$)

Соединение	«Ротарод»	«Перекладина»
	ЛП падения, с	Удержание на проволоке, баллы
PV-150	160,52±44,84	3,50±0,37
PV-210	77,41±28,25	3,17±0,34
PV-220	194,57±46,38*	3,67±0,23
PV-310	190,15±39,83*	4,00±0,0
PV-410	190,34±28,58*	3,17±0,34
Контроль	94,70±20,59	4,00±0,0

Примечание: * = $p < 0,05$ - по сравнению с интактным контролем

Выводы. Изучаемые гетариламиды 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот с фрагментами пиримидина (PV-150, PV-210, PV-220 PV-310, PV-410) относятся к малотоксичным веществам согласно классификации GHS. Выявлено отсутствие значимого влияния на мышечный тонус и улучшение координации движений у лабораторных животных для 4-х соединений, в большей степени прогноз *in silico* реализован у гетариламида PV-410.

Литература / References.

1. Elsworth J.D. Parkinson's disease treatment: past, present, and future // J. Neural. Transm. - 2020. - Vol. 127, № 5. - P. 785–791.
2. Larson S.T., Wilbur J. Muscle weakness in adults: evaluation and differential diagnosis // American family physician. - 2020. - Vol. 101, № 2. - P. 95–108.
3. Zambon A.A. et al. Molecular mechanisms and therapeutic strategies for neuromuscular diseases // Cell. Mol. Life Sci. - 2024. - Vol. 81, № 1. - P. 198.
4. Краснова А.И., Пулина Н.А., Полежаева В.Д. Экспериментальное изучение нейрорепродуктивной активности новых производных 2,4-диоксобутановых кислот, содержащих фрагмент бензимидазола // Пермский медицинский журнал. – 2023. – Т. 40, № 3. – С. 139-145.
5. Краснова, А.И. Оценка влияния новых производных солей 2,4-диоксобутановых кислот на поведенческие реакции лабораторных животных / А. И. Краснова, В. Д. Полежаева, Н. А. Пулина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № S4. – С. 139-145.
6. Poroikov V.V. et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: the possibilities and limitations // Russ Chem Bull. -2019. - Vol. 68, № 12. - P. 2143–2154.
7. Zakharov A. V., Lagunin A. A., Filimonov D. A., Poroikov V. V. Quantitative prediction of antitarget interaction profiles for chemical compounds // Chemical Research in Toxicology. 2012. Vol. 25. No 11. Pp. 2378–2385.
8. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Part 3 Health Hazards, United Nations, 2017.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, - 2012. - 944 с.
10. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. // J. Neurosci. Methods. - 2010. - 15;189(2). - P. 180-185.

Abstract.

Krasnova A.I., IPulina N.A., IPolezhaeva V.D.

In silico and in vivo studies of the effect of N-(het)arylamides of 4-aryl-2,4-dioxobutanoic acid with a pyrimidine fragment on muscle tone and motor coordination in animals

Perm State Pharmaceutical Academy

The acute toxicity and effect on a number of neuromuscular system parameters for five 4-(het)arylamides of aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acids with pyrimidine fragments (PV-150, PV-210, PV-220 PV-310, PV-410) were studied using *in silico* and *in vivo* methods. It has been established that the substances belong to low-toxic compounds. The absence of a significant effect on muscle tone and improved coordination of movements in laboratory animals was revealed for 3 compounds, to a greater extent the prognosis *in silico* was realized for hetarylamide PV-410.

Keywords: muscle tone, coordination, acute toxicity, *in silico*, *in vivo*.

Сведения об авторах: Краснова Анастасия Ивановна – к.фарм.н, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава РФ, krasnova_ai@mail.ru; Пулина Наталья Алексеевна – д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава РФ, pulinapata@mail.ru; Полежаева Валерия Дмитриевна – ассистент кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава РФ, аспирант, polezgaevalera@inbox.ru

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

Статья поступила в редакцию 27.04.2025; одобрена рецензентами и принята к публикации 04.06.2025.