

ТИМОФЕЕВА АННА САМОВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ
ГУАНИДИНОВ – ИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕНА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2015

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Заведующий кафедрой фармакологии ВолгГМУ,
Академик РАН,
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор

Спасов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты:

1. Покровский Михаил Владимирович

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой фармакологии, Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

2. Резников Константин Михайлович

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой фармакологии, Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Воронежская медицинская академия имени Н.Н. Бурденко» Министерства
здравоохранения Российской Федерации.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в _____ ч. на заседании
Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский
государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru)
ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из основных причин инвалидизации и смертности больных [Мирзоян, 2010; Чазов, 2011; Шальнова, 2012; Беленков, 2014; McKelvie, 2003; De Paula, 2014]. В России ССЗ составляют 57% [Палаткина, 2012]. Большая доля здесь принадлежит ишемической болезни сердца (ИБС) и артериальной гипертензии (АГ) с их осложнениями [Морозова, 2008; Гарганеева, 2013; Недогада, 2013; Чигиринская, 2013; Петров, 2014].

Фармакологическая защита миокарда является неотъемлемой частью лечения патологии сердечно-сосудистой системы (ССС) [Стаценко, 2005; Михин, 2011; Асташкин, 2014; Belardinelli, 2006]. Кардиопротекторы – средства, которые оптимизируют работу и функцию сердца при патологических состояниях, а также предупреждают действие повреждающих экзо- и эндогенных факторов [Шляхто, 2005].

Одним из направлений в кардиологии является изучение эффектов ишемического [Галагудза, 2011; Маслов, 2014] и фармакологического preconditionирования миокарда как важного фактора, повышающего толерантность к ишемии [Атрощенко, 2006; Коняхин, 2006; Цырлин, 2009; Новикова, 2014]. Одним из таких подходов является использование ингибиторов Na^+/H^+ обменника первой изоформы (NHE-1) [Fliegel, 2009; Karmazyn, 2013].

Первоначально свойства ингибиторов NHE-1 обнаружены у амилорида и его производных [Benos, 1982; Kim, 2007]. Позднее были описаны бензоилгуанидиновые производные, такие как: НОЕ-642 (карипорид), энипорид (EMD-85131), сабипорид (ВПВ-722), бициклические производные гуанидина, содержащие циклогептапиридин (ТУ-12533), бензоксазион (КБ-R9032), дигидробензофуран (BMS 284640), хинолин (зонипорид (CP-597396, MS 31038)) [Lee1, 2009; Li, 2011]. Известно также, что производные бензимидазола оказывают подобное действие, ингибируя NHE-1 [Zhang3, 2007; Lee2, 2009].

Степень разработанности. На сегодняшний день доказано участие NHE-1 в патофизиологических процессах, происходящих при ССЗ: повреждении миокарда и мозга во время ишемии/реперфузии, возникновении нарушений ритма сердца

[Koliakos, 2008], развитии гипертрофии [Cingolani, 2011], эндотелиальной дисфункции, сердечной недостаточности (СН) [Malo, 2006], а также таких осложнений, как кардиомиопатии и ангиопатии [Дедов, 2006]. Многократно подтвержденные в эксперименте кардиопротекторные свойства ингибиторов NHE-1 позволили начать клинические исследования. Показана эффективность таких препаратов, как: зонипорид, карипорид, сабипорид, энипорид, при лечении атеросклероза, аритмий, острого инфаркта миокарда, СН [Kim, 2007]. Поскольку у данных веществ выявлены нейротоксические эффекты, представляется целесообразным продолжить поиск соединений с новыми химическими структурами.

Целью исследования является поиск веществ, обладающих NHE-1–ингибирующей активностью, среди новых производных циклических гуанидинов и изучение их фармакологических свойств.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести поиск соединений с NHE-1–ингибирующей активностью среди новых производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола;
2. Изучить зависимость биологической активности соединений от их структуры и физико-химических свойств;
3. Определить острую токсичность наиболее активных соединений;
4. Исследовать противоишемические свойства наиболее активного соединения на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией сердца у крыс в сравнении с препаратом зонипорид;
5. Оценить антиаритмические и антифибрилляторные эффекты наиболее активного вещества и зонипорида на моделях длительной и кратковременной ишемии/реперфузии миокарда;
6. Изучить кардиодинамические и морфологические эффекты активного вещества и препарата сравнения милдроната при хронической изопротереноловой интоксикации;
7. Определить общетоксикологические свойства наиболее активного соединения.

Научная новизна. Впервые была изучена NHE-1–ингибирующая активность новых производных, содержащих циклическую гуанидиновую группу: N¹ и N⁹ имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола. Установлено, что выраженность NHE-1-ингибирующих свойств производных 2–аминобензимидазола определяется наличием аминогруппы в положении С₂, диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в N¹, фторбензоилметила в N³.

Соединение РУ-1355 по NHE-1–ингибирующему эффекту превосходило зонипорид *in vitro*. Вещество эффективно снижало размер зоны некроза, рост миокардиального маркера повреждения тропонина I в плазме крови при ишемии/реперфузии *in vivo*. Соединение РУ-1355 оказывало антиаритмические и антифибрилляторные эффекты. Впервые показана способность вещества РУ-1355 снижать повреждающее действие изопротеренола (ИЗО) на миокард (предотвращать рост соединительной ткани, тропонина I в плазме крови и уровня малонового диальдегида (МДА) в тканях миокарда), улучшать сократительную активность миокарда и функциональные резервы при хронической интоксикации ИЗО.

Теоретическая и практическая значимость. Выявленные в ходе проведенного исследования закономерности между NHE-1–ингибирующей активностью новых производных циклических гуанидинов используются при целенаправленном поиске и синтезе новых соединений. Было показано, что повышение NHE-1–ингибирующей активности производных 2–аминобензимидазола связано со снижением липофильности первого заместителя при одновременном увеличении общей липофильности молекулы.

Впервые были получены данные о кардиопротекторном (противоишемическом, антифибрилляторном и антиремоделирующем) действии соединения РУ-1355 на моделях длительной и кратковременной ишемии/реперфузии, экспериментальной хронической сердечной недостаточности.

Методология и методы исследования. Эксперименты выполняли согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сыренский, 2008; Чичканов, 2008; Галенко-Ярошевский, 2012], с использованием современных высокоинформативных методов, имеющихся

в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, НИИ фармакологии и ГБУ ВМНЦ. Исходя из целей и задач исследования, были использованы модели сердечно-сосудистой патологии, позволяющие изучить противоишемические, антиаритмические и антифибрилляторные свойства соединения РУ-1355, влияние его на сократительную активность и процессы ремоделирования миокарда.

Исследование осуществлялось на нелинейных половозрелых самцах мышей, крысах, а также кроликах-самцах породы «шиншилла».

Реализация результатов исследования. Результаты выявленных закономерностей между структурой и физико-химической характеристикой исследованных рядов производных циклических гуанидинов внедрены в работу по оптимизации синтеза соединений с NHE-1-ингибирующей активностью, которая проводится на базе НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета и НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пермской государственной медицинской академии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Среди новых производных циклических гуанидинов треть оказывало выраженное ингибирующее влияние на NHE-1 - имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, среди 2-аминобензимидазола более 50%.

2. Соединение РУ-1355 (2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид) по NHE-1-ингибирующей активности *in vitro* превосходило зонипорид в 50 раз.

3. Вещество РУ-1355 на моделях 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс сокращало размеры зоны некроза сердца, ограничивало рост тропонина I в плазме крови и проявляло антиаритмические свойства; при кратковременной ишемии/реперфузии обладало антифибрилляторной активностью; при хронической интоксикации

изопротеренолом сохраняло сократительную активность и функциональные резервы, препятствовало образованию соединительной ткани в миокарде, ограничивало рост тропонина I в плазме крови и МДА в тканях миокарда.

4. Соединение РУ-1355 после однократного внутривентриального введения в дозе 1 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. В дозе 25 мг/кг вещество РУ-1355 вызывало снижение спонтанной двигательной активности, координации, угнетение горизонтальной активности, оказывало мышечно-расслабляющий эффект.

5. Величина ЛД₅₀ при внутривентриальном введении соединения РУ-1355 составила 342,7 мг/кг.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на кроликах, крысах обоего пола и мышах; использованием современных методов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противоишемической, антиаритмической, антифибрилляторной и антиремоделирующей активностью, а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на IV Международной научной конференции «Science4Health», Москва, 2012 г.; XIX Российском национальном конгрессе «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО», Москва, 2012 г.; V съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 2012 г.; XVII и XVIII Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, 2012-13 гг.; 69, 70, 71 и 72 итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 2012-14 гг.; Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», Москва, 2013 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 28 работ (в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Минобрнауки РФ, 3 патента на изобретения).

Объем и структура работы. Диссертационные исследования изложены на 175 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 34 рисунками, 24 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), главы материалы и методы (глава II), экспериментальной части (главы III-VII), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 131 источник, в том числе 48 зарубежных.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах решения поставленных задач: при проведении исследований *in silico*, экспериментального скрининга, изучении *in vitro* и *in vivo* фармакологической и токсикологической активности соединения-лидера, статистической обработке, обсуждении результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций, оформлении рукописи.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной литературы на тему: «Ингибиторы натрий–водородного обменника – фармакологическая мишень для создания кардиопротекторных средств». В первом разделе рассматривается биологическая роль NHE-1: основные изоформы, строение, регуляция, физиологическое значение, а также участие в патологии сердечно-сосудистой системы. Второй раздел литературного обзора посвящен анализу известных на сегодняшний день селективных и неселективных блокаторов NHE-1. В заключительном разделе обзора рассматриваются производные циклических гуанидинов как потенциальные высокоселективные ингибиторы NHE-1.

Вторая глава посвящена описанию **материалов и методов** исследований, использовавшихся при выполнении поставленных в диссертации задач. В работе было изучено 26 веществ, содержащих встроенную в цикл гуанидиновую группу:

15 производных 2-аминобензимидазола, включающих: 1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия (12 соединений), 1-замещенные 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил) бензимидазолия (3 соединения) и 11 производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, состоящих из: 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (3 соединения), N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (4 соединения), N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (4 соединения). Все вещества синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета¹.

Исследования проводили на 162 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г. и 76 белых неинбредных мышах обоего пола массой 17-36 г., 25 кроликах самцах, породы шиншилла весом 2,5-3,5 кг. Все животные были доставлены из питомников: ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва), ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово), ФГУП "НИИ ГТП" ФМБА России (г. Волгоград). Животные содержались в виварии кафедры фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной полнорационной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года.

Изучение **влияния соединений на NHE-1** проводили *in vitro* по методу [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002] на тромбоцитах кролика в диапазоне концентраций 10⁻¹¹–10⁻⁶ Моль/л. В качестве препарата сравнения был выбран селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (SIGMA, США) [Ayoub, 2007]. Активацию NHE-1 проводили с помощью натрий пропионата [Гурова, 2011]. Изменения формы тромбоцитов регистрировали с помощью лазерного агрегометра «БИОЛА-220LA НПФ», Россия. Расчёт эффективной концентрации (EC₅₀) по ингибированию NHE-1 проводили с помощью регрессионного анализа.

Для изучения *in silico* зависимости NHE-1–ингибирующей активности от

¹ Выражаем признательность ведущему научному сотруднику лаборатории синтеза биологически активных соединений, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для настоящего исследования.

физико-химических параметров производных циклических гуанидинов рассчитывали их липофильность и стерические параметры, а также средние и супремальные оценки биологической активности. Для анализа многопараметровой зависимости между ингибирующей активностью и физико-химическими параметрами производных циклических гуанидинов использовали процедуру множественного пошагового регрессионного анализа².

Изучение противоишемических свойств *in vivo* проводили **на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией** у крыс в соответствии с рекомендациями к доклиническим испытаниям [Чичканов, 2012]. Соединение РУ-1355 и препарат сравнения зонипорид вводили внутривенно в эквимолярных дозах 1,12 и 1 мг/кг соответственно, за 10 минут до реперфузии. Визуализацию зон риска и ишемии проводили с помощью двойного окрашивания Синим Эвансом (СЭ) и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) [Сыренский, 2008]. Приготовление срезов сердец осуществляли с помощью матрицы Alto, США. Расчет площадей проводили с помощью программы Image J. Определяли содержание тропонина I в плазме крови (пкг/мл) набором реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (сTn-I) фирмы CUSABIO BIOTECH CO., LTD. (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США).

Изучение антиаритмических и антифибрилляторных свойств соединения РУ-1355 в условиях ишемии проводили в соответствии с руководством по доклиническим испытаниям [Галенко Ярошевский, 2012].

При изучении антиаритмических свойств **на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией** у крыс, тяжесть нарушения ритма оценивали с помощью балльной системы [Цорин, 2004]. Препарат сравнения зонипорид [Frensis, 2007] и соединение РУ-1355 вводили внутривенно за пять минут до ишемии в эквимолярных дозах 1 и 1,12 мг/кг соответственно. Регистрацию ЭКГ производили на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия) во II стандартном отведении.

²Выражаем признательность старшему научному сотруднику НИИ фармакологии д.б.н. П.М. Васильеву за помощь при изучении зависимости между структурой исследуемых соединений и их биологической активностью.

Изучение антифибрилляторной активности проводили при **кратковременной 7 минутной ишемии и 5 минутной реперфузии** у крыс, по принципу наличия и отсутствия фибрилляций (в баллах). Препарат сравнения - зонипорид (1 мг/кг) [Reson, 2008]. Соединение РУ-1355 изучали в дозе 1,12; 2,5 и 5,0 мг/кг и вводили за пять минут до ишемии внутривенно. Рассчитывали ЕД₅₀ с помощью программы «Graph.Pad.Prism.5.0», США.

Изучение влияния на порог электрических фибрилляций и время до восстановления³ ритма сердца у крыс проводили согласно методу [Крыжановский, 2011]. Соединение РУ-1355 и зонипорид вводили в дозах 1,25 и 1 мг/кг соответственно, внутривенно (однократно). Навязывание ритма осуществляли с помощью электростимулятора HSE Stimulator II (Hugo Sach Electronik, Германия). Регистрацию ЭКГ проводили во II стандартном отведении электрокардиографом ЭК 4Т-02 (Россия). При помощи 4-канального осциллоскопа фирмы Elema-Siemens (Швеция) проводили визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента.

Модель **хронической сердечной недостаточности** формировали у крыс согласно методам [Shibata, 2011;Ennis, 2003]. Препаратом сравнения был выбран милдронат (АО «Гриндекс», Латвия). Животные были распределены на 4 группы: «интактные» – вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутрибрюшинно. Нагрузку объемом осуществляли болюсным введением изотонического раствора из расчета 3 мл/кг массы животного [Тюренков, 2012] (в течение двух секунд). Максимальную изометрическую нагрузку проводили пережатием восходящей части дуги аорты на 30 с. Регистрировали левожелудочковое давление (ЛЖД), скорости сокращения (dp/dt+) и расслабления (dp/dt-), частоту сердечных сокращений (компьютерный гемодинамический анализатор на базе программы BEAT (Россия)). После

³Исследования проводились совместно со старшим преподавателем кафедры фармакологии ВолгГМУ к.м.н. Н.А. Гуровой.

проведения всех нагрузок, животных подвергали эвтаназии, далее проводили забор миокарда, отдельно выделяли левый желудочек, межжелудочковую перегородку и определяли их массу. Рассчитывали индекс гипертрофии по отношению массы левого желудочка к массе животного [Ennis, 2003], определяли максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) расчетным способом $((LЖД_{max} \times ЧСС) / \text{масса левого желудочка} + 1/3 \text{ межжелудочковой перегородки})$ [Тюренков, 2012]. Определяли тропонин I в плазме крови (как указано выше на стр. 9) и продукт перекисного окисления МДА в тканях миокарда, в тесте с тиобарбитуровой кислотой [Андреева, 1988]. Определяли оптическую плотность верхней фазы на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 535 нм.

Морфологические изменения образцов сердец⁴ определяли при окраске тканевых срезов по Массону, гематоксилином и эозином. Гистологические препараты документировали цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10.

Изучение острой токсичности проводилось в соответствии с требованиями по проведению доклинических испытаний [Арзамасцев, 2012] на белых неинбредных мышах в диапазоне доз 50-800 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении. Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали метод Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 2004].

Изучение общетоксикологических эффектов соединения РУ-1355 проводилось при использовании широкого набора тестов по S. Irwin [Irwin, 1964] на мышах, в дозах 1 и 25 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении.

Обработку экспериментальных данных проводили с помощью встроенных функций программы Excel из пакета Office XP (Microsoft, США) (среднее арифметическое значение, стандартная ошибка средней арифметической), программ «Statistica 6.0» (StatSoft, США) и «Graph.Pad.Prism.5.0» (США). Для статистической обработки использовали непараметрический метод сравнения независимых групп с помощью U-критерия Манна-Уитни («Statistica 6.0»).

⁴Выражаем глубокую признательность зав. кафедрой патологической анатомии, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

Третья глава. Поиск ингибиторов Na^+/H^+ обменника среди соединений, содержащих гуанидиновую группировку. В результате проведенных исследований были найдены соединения среди производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2—аминобензимидазола разной степени выраженности по ННН-1-ингибирующему действию.

При изучении ННН-1-ингибирующей активности у производных 2—аминобензимидазола (1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия и 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[*d*][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия было показано, что структура 2-аминобензимидазола оказалась наиболее перспективна как по вкладу базовой структуры, так и по степени реакции на ее модификацию. Найдены 8 соединений, которые по величине EC_{50} превосходили зонипорид (табл.1).

Таблица 1

Влияние производных циклических гуанидинов на активность ННН-1 (*in vitro* на тромбоцитах кролика) ($\text{M} \pm \text{m}$)

№	Вещество	% ингибирования в концентрации $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$	EC_{50} , М	№	Вещество	% ингибирования в концентрации $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$	EC_{50} , М
1.	РУ-1355	70,93±7,99	$5,42 \cdot 10^{-10}$	15.	РУ-1363	29,09±6,56	$1,43 \cdot 10^{-7}$
2.	РУ-1199	73,95±12,55	$6,56 \cdot 10^{-10}$	16.	РУ-606	34,21±7,87	$2,89 \cdot 10^{-7}$
3.	РУ-1390	69,47±7,57	$6,68 \cdot 10^{-10}$	17.	РУ-64	22,45±12,88	$8,53 \cdot 10^{-7}$
4.	РУ-1200	57,29±5,64	$4,56 \cdot 10^{-9}$	18.	РУ-283	<36,13±22,53	—
5.	РУ-1369	57,40±2,07	$5,04 \cdot 10^{-9}$	19.	РУ-1205	<35,94±11,84	—
6.	РУ-1365	43,20±2,42	$1,31 \cdot 10^{-8}$	20.	РУ-354	<32,69±7,89	—
7.	РУ-1183	46,90±18,55	$1,76 \cdot 10^{-8}$	21.	РУ-1362	29,92±7,43	—
8.	РУ-1361	36,85±14,10	$2,23 \cdot 10^{-8}$	22.	РУ-254	<28,64±14,49	—
9.	Зонипорид	48,05±7,09	$2,70 \cdot 10^{-8}$	23.	РУ-1366	26,95±11,34	—
10.	РУ-1364	33,63±4,84	$3,01 \cdot 10^{-8}$	24.	РУ-1185	<26,50±2,50	—
11.	РУ-1184	46,41±7,69	$3,39 \cdot 10^{-8}$	25.	РУ-255	25,17±1,41	—
12.	РУ-1370	35,45±14,33	$3,52 \cdot 10^{-8}$	26.	РУ-355	<25,17±1,41	—
13.	РУ-602	39,26±15,11	$3,78 \cdot 10^{-8}$	27.	РУ-1204	<23,92±2,07	—
14.	РУ-17	27,80±18,50	$4,50 \cdot 10^{-8}$				

Примечание: «—» не рассчитывали, т.к. максимальная активность не превышала 50%.

При этом наибольшую активность проявили соединения производных

2-аминобензимидазола, которые в положении N¹ содержат такие аминоалкильные радикалы, как диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный, морфолиноэтильный. Введение в структуру производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола «активных» для производных 2-аминобензимидазола радикалов в положения N⁹ (соединения РУ-17, РУ-64, РУ-1204, РУ-1205, РУ-254, РУ-255, РУ-283) или N¹ (соединения РУ-602, РУ-606, РУ-354, РУ-355) не приводило к высокому уровню NHE-1-ингибирующей активности.

При анализе методом средних и супремальных оценок активности производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2-аминобензимидазола было подтверждено, что базовая структура 2-аминобензимидазола (бициклический «кор») является наиболее перспективной структурой для поиска новых высоко активных ингибиторов NHE-1.

Методом корреляционного анализа изучали зависимость NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов.

Установлено, что в классе производных 2-аминобензимидазола повышению активности способствует снижение липофильности заместителя R₁, при одновременном увеличении общей липофильности молекулы в целом – за счет увеличения липофильности заместителя R₂. В классе производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, наоборот, повышение NHE-1 ингибирующей активности обеспечивается снижением общей липофильности молекулы и увеличением липофильности заместителей R₁ и R₂.

Проведен пошаговый регрессионный анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров изучаемых соединений. Анализ полученных регрессионных QSAR-уравнений позволяет предположить, что у производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола имеется общий механизм взаимодействия с сайтом NHE-1, детерминированный размером их базовых структур. Возможно, этот механизм осуществляется через связывание данных конденсированных систем с каким-либо «особым» карманом сайта NHE-1, например, ответственным за фиксацию так называемых «привилегированных» подструктур, к которым относятся производные 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Более высокая активность производных 2-аминобензимидазола, по-видимому, объясняется меньшим размером данного бицикла, что позволяет ему более свободно помещаться в

указанном кармане и связываться с ним: для незамещенного 2-аминобензимидазола $MR_0=38,5 \text{ см}^3/\text{моль}$, а для незамещенного имидазо[1,2-*a*]бензимидазола $MR_0=44,4 \text{ см}^3/\text{моль}$.

Взаимодействие производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с сайтом NHE-1, вероятно, происходит в два этапа: связывание с «привилегированным» карманом сайта основной части молекулы (регулируется размерами лиганда) и связывание со «специфическим» карманом сайта (определяется липофильностью и электронными параметрами).

При оценки эффективной концентрации (EC_{50}) и острой токсичности (LD_{50}) у наиболее активных соединений было найдено производное 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенил)бензимидазолия хлорид - соединение РУ-1355, которое в исследовании *in vitro* на тромбоцитах кролика превосходило зонипорид по величине EC_{50} в 50 раз (табл. 2).

Таблица 2

Влияние некоторых производных 2-аминобензимидазола на активность NHE-1 в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (EC_{50}), острую токсичность (LD_{50} мг/кг внутрибрюшинно)

№	Вещество	EC_{50}		LD_{50} мг/кг в/бр. мыши
		M	мг/л	
1.	РУ-1355	$5,42 \cdot 10^{-10}$	0,0002	342,7
2.	РУ-1199	$6,56 \cdot 10^{-10}$	0,0003	401,8
3.	РУ-1200	$4,56 \cdot 10^{-9}$	0,0020	643,3
4.	РУ-1183	$1,76 \cdot 10^{-8}$	0,0080	240,0
5.	Зонипорид	$2,70 \cdot 10^{-8}$	0,0100	250,0*

Примечание: * - [Tracey, 2003].

Четвертая глава. Кардиопротекторные свойства соединения РУ-1355 и зонипорида на модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс. Во время ишемии, активность NHE-1 увеличивается и приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов Na^+ , увеличивая вход ионов Ca^{2+} внутрь клетки, вызывая «кальциевый парадокс» [Mackenzie, 2006], что ведет к контрактурам и некрозу кардиомиоцитов [Fliegel, 2009]. Ингибиторы NHE-1 оказывают свое кардиопротекторное действие [Спасов, 2013; Andreadou, 2008; Fliegel, 2009].

При проведении исследований *in vivo* на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс было показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг ограничивало размеры зоны некроза миокарда. Изучаемое вещество превосходило в 1,3 раза препарат сравнения зонипорид (рис.1, 2).

Кроме того, соединение РУ-1355 ограничивало рост в плазме крови маркера повреждения миокарда тропонина I, равный по данному виду активности препарату зонипорид (рис.3).

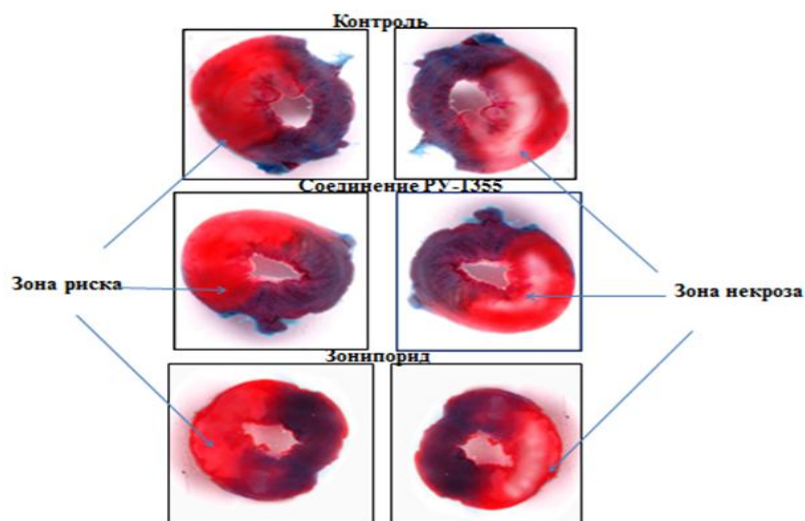


Рис. 1. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимольных дозах на зоны риска и инфаркта миокарда крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии.

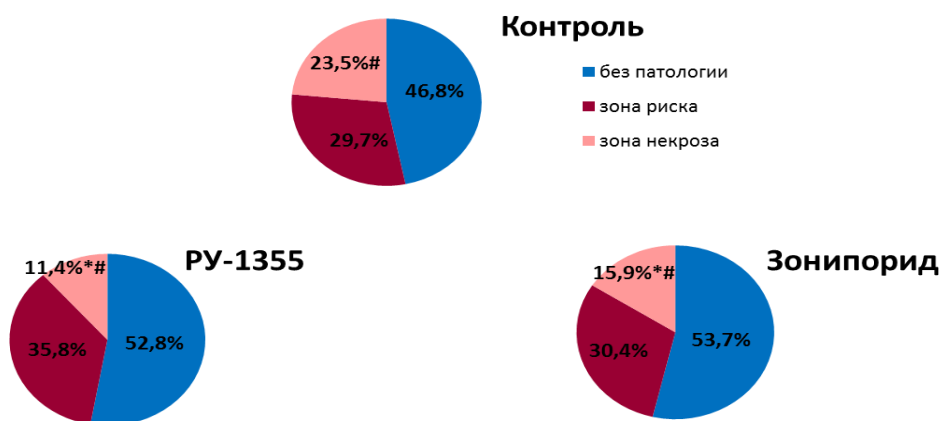


Рис. 2. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимольных дозах на распределение зон повреждения миокарда крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии (% левого желудочка). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - группе «ложнооперированные»; * - группе «ишемия/реперфузия».

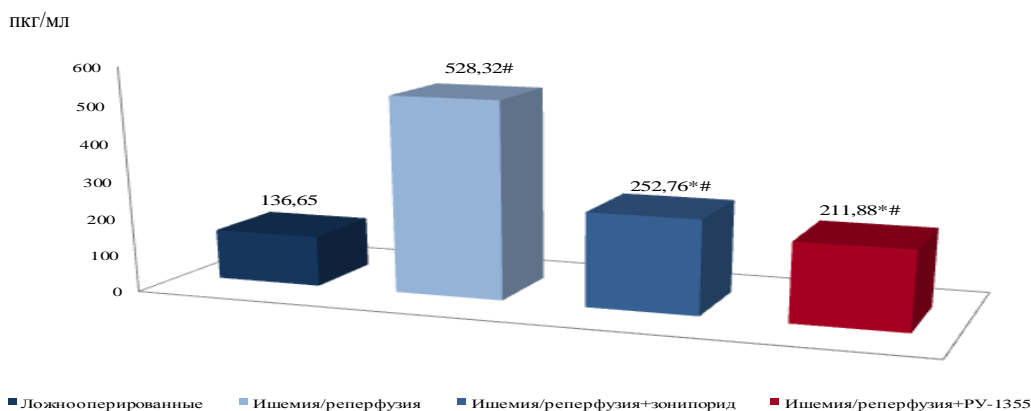


Рис. 3. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимольных дозах на уровень тропонина I (пкг/мл) в плазме крови крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии. Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - группе «ложнооперированные»; * - группе «ишемия/реперфузия».

Таким образом, на основании проведенных исследований *in vivo* на модели ишемии/реперфузии показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг превосходило зонипорид по противоишемическому действию.

Пятая глава. Антиаритмические свойства соединения РУ-1355 и зонипорида.

Во время острой ишемии/реперфузии в кардиомиоцитах происходят процессы, которые приводят к изменению протонного градиента на мембране сарколеммы. Они способствуют активации NHE-1, который осуществляет выход ионов водорода из клетки в обмен на натрий. В результате этого повышается концентрации Na^+ в миокарде и, как результат этого, «перегрузка» внутриклеточным кальцием. Избыток ионов кальция вызывает активацию механизма *re-entry*, задержанных постдеполяризаций (триггерную активность), что приводит к развитию опасных для жизни тахиаритмий [Крыжановский, 2008; Столярук, 2010; Нарыжная, 2012; Sánchez, 2011; Yui, 2011].

Исследуемое вещество при внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг оказывало защитное действие в отношении ишемических нарушениях ритма сходное по направленности эффекта с зонипоридом. На модели длительной 60-ти минутной ишемии и последующей 60-ти минутной реперфузией было показано, что к концу периода реперфузии соединение РУ-1355 подобно зонипориду статистически достоверно снижало выраженность аритмических нарушений на 34,7% по отношению к животным с ишемией (рис.4).

Соединение РУ-1355 на модели кратковременной (семи минутной) ишемии и последующей пяти минутной реперфузией оказывало антифибрилляторное действие, его ED₅₀ составила 1,25 мг/кг.

Вещество РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг во время проведения **серий прямоугольных электрических импульсов** продолжительностью 30 секунд, повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца как по отношению к группе животных с патологией, так и по отношению к зонипориду на 90,6 и 20% соответственно, однако эти различия оказались статистически не значимы. По способности уменьшать время до восстановления нормального ритма, исследуемое соединение превосходило контрольную группу с патологией на 33,3% ($p < 0,05$) и препарат сравнения на 6% ($p > 0,05$) (рис.5).

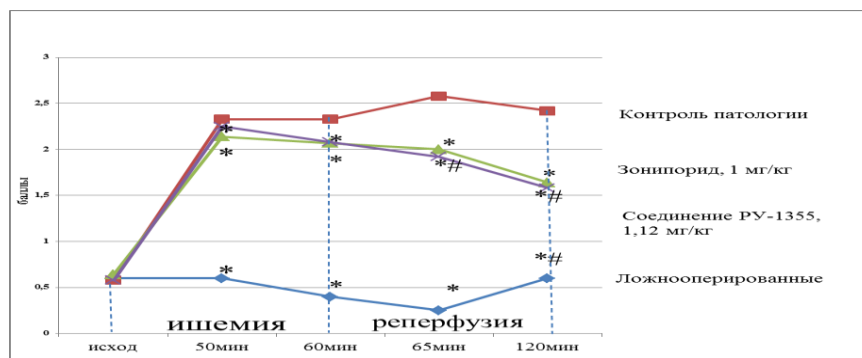


Рис. 4. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида (в эквимоларных дозах) при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии на тяжесть нарушений ритма на этапах 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс в динамике (в баллах, $M \pm m$). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с: * - исходом, # - контролем патологии.

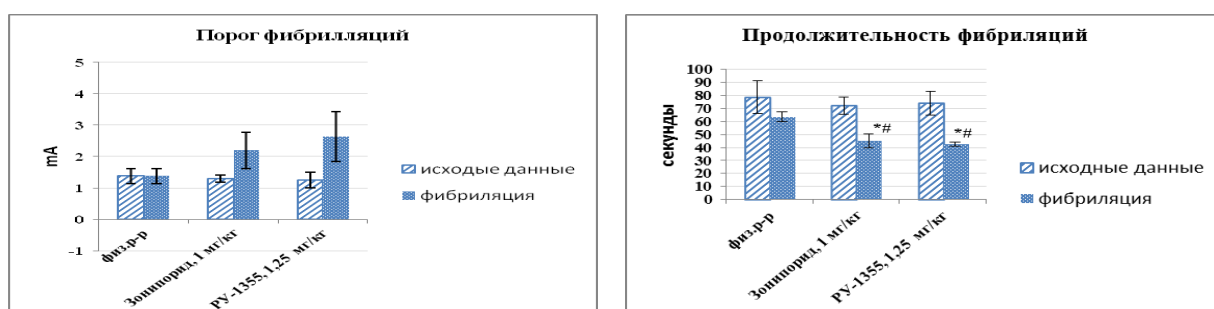


Рис. 5. Влияние соединения РУ-1355 (в дозе равной ED_{50} при кратковременной ишемии/реперфузии) и зонипорида на порог и продолжительность электрических фибрилляций желудочков у крыс ($M \pm m$). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с: * - исходом, # - физиологическим раствором.

При изучении основных параметров ЭКГ у наркотизированных животных при однократном введении соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг статистически значимых изменений не наблюдалось.

Шестая глава. Кардиопротекторные свойства соединения РУ-1355 и милдроната на модели хронической сердечной недостаточности. В данной серии исследований в качестве препарата сравнения был выбран милдронат, оказывающий антиишемическую эффективность при инфаркте миокарда [Киселев, 2010], отмечено его положительное действие в комбинированной терапии как систолической, так и диастолической ХСН [Самородская, 2013; Стаценко, 2009, 2012].

При проведении пред- и постнагрузок было показано, что соединение РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозе 1,25 мг/кг (в течение 31 дня) улучшало сократительную активность миокарда при экспериментальной ХСН у крыс. Так в условиях нагрузки объемом по максимальным показателям ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС статистически достоверно превосходило аналогичные параметры в группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно, оказывая эффект равный милдронату (рис.6).

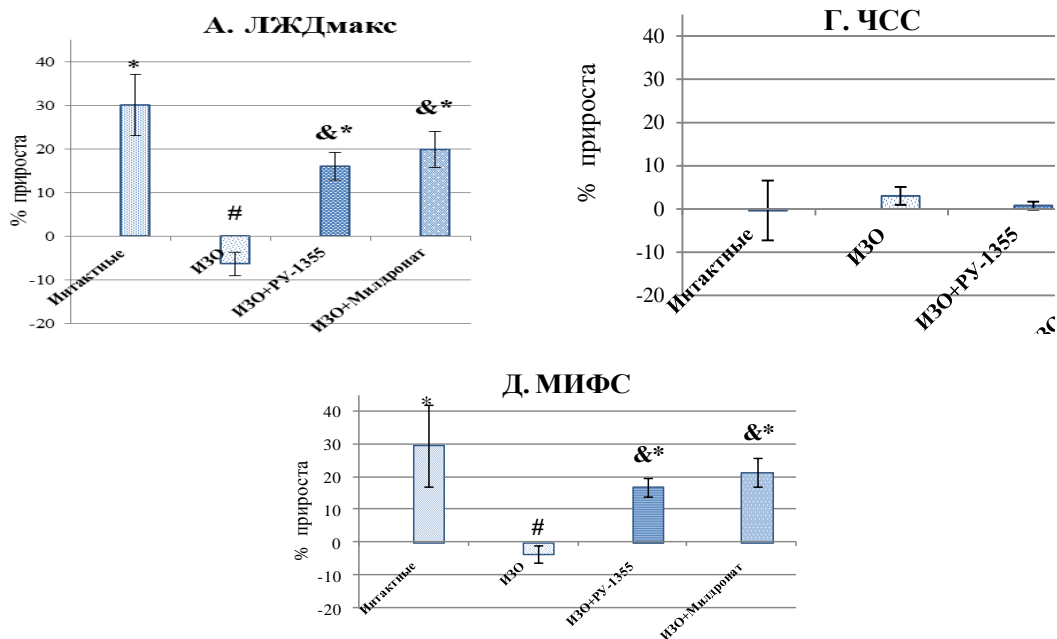


Рис. 6. Влияние соединения РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на максимальные показатели кардиодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (2,5 мг/кг). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: * - исход; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО».

Прирост при пережатии аорты отличался от показателей контрольных животных, однако четко просматривается тенденция к их сохранности. Соединение РУ-1355 статистически незначимо превосходило милдронат по удержанию эффекта на 25 секунде: по показателям ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС на 21,8, 65,7, 67,4, 52,7, 40,6% соответственно (рис.7).

Известно, что в условиях развития изопротереноловой гипертрофии миокарда происходит активация NHE-1 и повышение маркеров повреждения миокарда тропонина I в плазме крови и ПОЛ [Серов, 2009; Матвеев 2010; Adaramoye, 2014]. Соединение РУ-1355 статистически значимо ограничивало рост тропонина I и МДА в 6,9 и 1,7 раза соответственно, было ниже, чем у животных с экспериментальной патологией. Изучаемое вещество в 2,5 раза активнее милдроната предотвращало рост тропонина I и не уступало ему по влиянию на уровень МДА (рис.8).

При изучении морфологических изменений миокарда было установлено, что исследуемое вещество препятствовало образованию соединительной ткани. Ее количество было статистически достоверно ниже по сравнению с группой, получавшей изопротеренол, как по общей плотности, так и по уровню коллагена на 29,3 и 25% соответственно (рис.9).

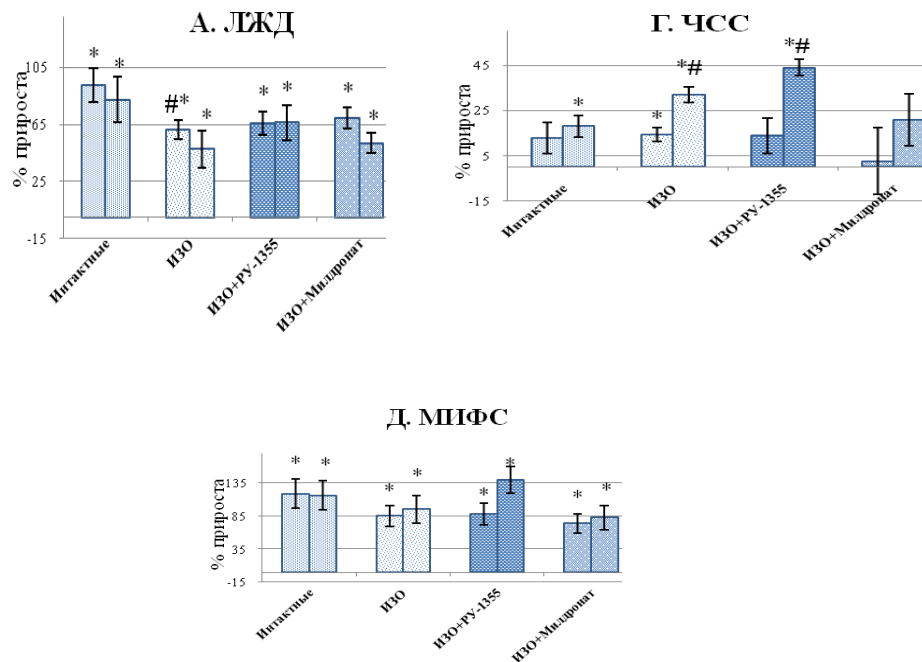


Рис. 7. Влияние соединения РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на показатели кардиодинамики в тесте с изометрической нагрузкой у животных с хронической интоксикацией изопроterenолом (2,5 мг/кг). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: * - исход; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО». В каждой группе первый столбик: максимальный эффект на 5 секунде; второй столбик: эффект на 25 секунде.

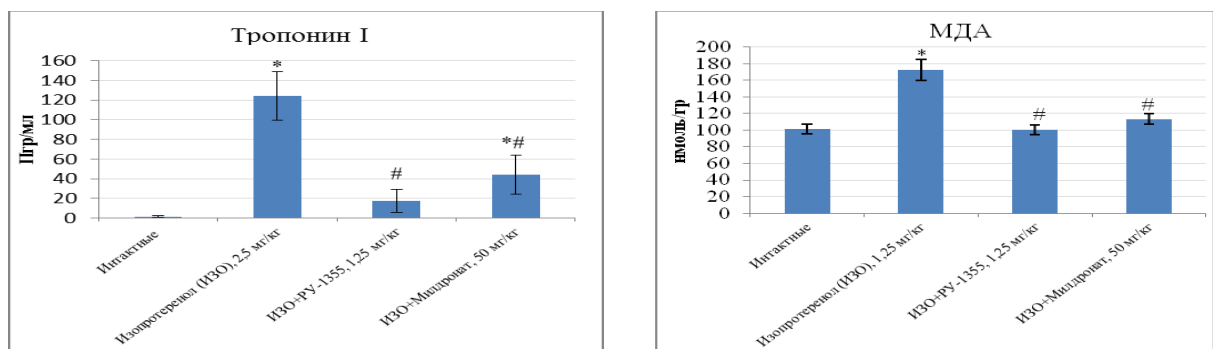


Рис. 8. Влияние соединения РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на уровень тропонина I в плазме крови и МДА в миокарде крыс с хронической интоксикацией изопроterenолом (2,5 мг/кг).

Известно, что при активации NHE-1 образуются прогипертрофические факторы [Kitagawa, 2007], поэтому можно предположить, что соединение РУ-1355, блокируя NHE-1, останавливает патологический каскад ремоделирования, ограничивая гипертрофию миокарда и, оказывая защитное действие от прогипертрофических факторов.

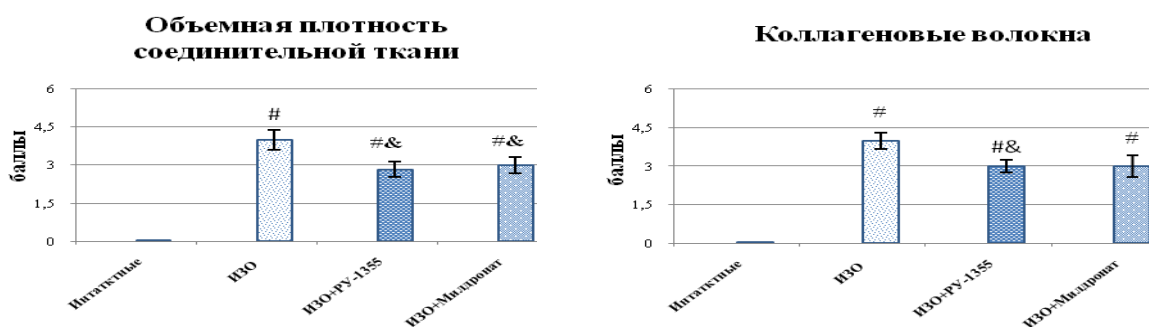


Рис. 9. Влияние РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на морфологические изменения миокарда при хроническом повреждении изопротеренолом (2,5 мг/кг). Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО».

Таким образом, можно утверждать, что для соединения РУ-1355 характерны кардиопротекторные свойства при курсовом введении у животных с экспериментальной ХСН, вызванной хронической изопротереноловой интоксикацией.

Седьмая глава. Изучение общетоксикологических свойств соединения РУ-1355. В результате проведенных исследований общетоксикологических свойств по С. Ирвину [Irwin, 1964] на мышах, было установлено, что соединения РУ-1355 в эффективной дозе в дозе 1 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. Начиная с дозы 25 мг/кг (1/14 LD₅₀), наблюдается снижения спонтанной двигательной активности, координации, расслабляющего эффекта, угнетение горизонтальной активности и уровня эмоционального реагирования.

При изучении острой токсичности соединения РУ-1355 (LD₅₀ = 342,7 мг/кг), было установлено, что в соответствии с классификацией токсичности веществ [Березовская, 2003] оно относится к классу умеренно токсичных (3 класс). Наблюдались характерные признаки отравления (ограничение подвижности, частое поверхностное дыхание, снижение болевой и тактильной чувствительности). Непосредственной гибели животных предшествовали явления глубокой седации, угнетение дыхания, боковое положение с редкими клоническими судорогами.

В **восьмой главе** проводится обсуждение полученных результатов. На основании проведенных исследований было показано, что для соединений, содержащих циклическую гуанидиновую группировку, а именно производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-а]бензимидазола, характерно ингибирование NHE-1. Следует отметить, что среди изученных производных

2-аминобензимидазола наблюдалось более 50% ингибиторов NHE-1 в исследованиях *in vitro* на тромбоцитах кролика. Наиболее активное вещество РУ-1355 по ингибированию NHE-1, статистически значимо превосходило препарат сравнения зонипорид по величине EC_{50} .

При изучении исследуемого вещества на моделях длительной и кратковременной ишемии/реперфузии, экспериментальной хронической сердечной недостаточности были выявлены кардиопротекторные эффекты (противоишемические, антифибрилляторные и антиремоделирующие).

Соединения РУ-1355 относятся к классу умеренно токсичных (3 класс). При введении его в эффективной дозе не выявлено существенных изменений в поведении животных. В дозе, превышающей эффективную в 25 раз, наблюдалось снижение спонтанной двигательной активности, координации, расслабляющего эффекта и угнетение горизонтальной активности.

ВЫВОДЫ

1. Новые производные 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола оказывают ингибирующее влияние на NHE-1 тромбоцитов.

2. Высокая NHE-1-ингибирующая активность наиболее характерна для производных 2-аминобензимидазола и определяется наличием аминогруппы в положении C_2 , диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в N^1 , фторбензоилметила в N^3 . В классе данных производных, повышению NHE-1 ингибирующей активности способствует снижение липофильности первого заместителя $\log P_{R1}$, при одновременном увеличении общей липофильности молекулы $\log P_0$.

3. Максимальная NHE-1-ингибирующая активность показана у соединения РУ-1355 – 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид. В исследованиях *in vitro* соединение РУ-1355 по уровню NHE-1 ингибирующей активности статистически значимо превосходило зонипорид по величине EC_{50} .

4. На модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс, исследуемое вещество сокращало размеры зоны некроза миокарда по сравнению с животными с ишемией и, получавших зонипорид в 1,8 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). Соединение РУ-1355 подобно зонипориду

ограничивало рост маркера повреждения миокарда тропонина I в 2,5 раза по сравнению с животными с патологией ($p < 0,05$).

5. Соединение РУ-1355 проявляло антиаритмический эффект при введении за 10 минут до реперфузии. Исследуемое вещество в 1,5 раза уменьшало тяжесть постреперфузионных нарушений ритма подобно препарату сравнения.

6. Соединение РУ-1355 при профилактическом однократном внутривенном введении проявляет дозозависимый антифибрилляторный эффект. ED_{50} составила 1,25 мг/кг.

7. Вещество РУ-1355 повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца на 90,6% по отношению к контрольной группе с патологией ($p > 0,05$) и на 20% было активнее зонипорида ($p > 0,05$). По способности уменьшать время до восстановления нормального ритма, исследуемое соединение превосходило контрольную группу с патологией на 33,3% ($p < 0,05$) и препарат сравнения на 6% ($p > 0,05$).

8. Соединение РУ-1355 улучшало сократительную активность миокарда при хронической интоксикации изопротеренолом. Так в условиях нагрузки объемом по максимальным показателям ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС статистически достоверно превосходило аналогичные параметры в группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно, оказывая эффект подобно милдронату. В период увеличения постнагрузки у вещества РУ-1355 по сравнению с милдронатом, отмечалась тенденция к сохранению нагрузки в течение всего периода наблюдения, по следующим показателям: ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС на 21,8, 65,7, 67,4, 52,7, 40,6% соответственно. Изучаемое соединение в 2,5 раза активнее милдроната предотвращало рост тропонина I в плазме крови и не уступало ему по влиянию на уровень МДА в миокарде крыс.

9. При изучении общетоксикологических свойств исследуемое соединение РУ-1355 в дозе 1 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. В дозе 25 мг/кг вещество РУ-1355 вызывало снижение спонтанной двигательной активности, координации, угнетение горизонтальной активности, оказывало мышечно-расслабляющий

эффект. Соединение РУ-1355 в соответствии с классификацией токсичности веществ можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс). Величина LD₅₀ составила 342,7 мг/кг.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданная база данных соединений с NHE-1 ингибирующей активностью может быть использована для прогноза данного вида активности у новых синтезированных веществ. В исследованиях *in silico* были выявлены признаки высокого уровня NHE-1 блокирующих эффектов, что может быть использовано для направленного синтеза соединений. На основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности дальнейшего доклинического изучения соединения под лабораторным шифром РУ-1355.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Минобрнауки:

1. Гурова, Н. А. Метод изучения влияния новых соединений на активность натрий/водородного обменника / Н. А. Гурова, А. А. Спасов, **А. С. Питерсен** // Вестник ВолгГМУ. – 2011. - Т. 38. - № 2. – С. 70 – 72.
2. Гурова, Н. А. Кардиопротекторные свойства зонипорида на модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс / Н. А. Гурова, А. А. Спасов, **А. С. Тимофеева**, А. А. Желтова, В. Ю. Федорчук // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. - Т. 76. - № 8. С. 17 - 19.
3. Спасов, А. А. Антиаритмические свойства зонипорида (экспериментальное исследование) / А. А. Спасов, Н. А. Гурова, **А. С. Тимофеева**, С. М. Сорокин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т. 77. № 6. С. 13 – 17.
4. Патент РФ RU 2526902. Средство, обладающее кардиопротекторным действием, и галогениды 1,3-дизамещенных 2-иминобензимидазолия. / А. А. Спасов, В. А. Анисимова, Н. А. Гурова, **А. С. Тимофеева**, В. Ю. Федорчук, В. И. Минкин // опубл. 27.08.2014. Бюл. Изобретений. - 2014. - № 24. - 9 с.
5. Патент РФ RU 2518741. Средство, ингибирующее Na⁺/H⁺-обмен, и галогениды 1-диалкиламиноэтил-3-[замещенный(дизамещенный) фенацил]-2-аминобензимидазолия. / В. А. Анисимова, А. А. Спасов, Н. А. Гурова, И. Е. Толпыгин, **А. С. Тимофеева**, В. Ю. Федорчук, В. И. Петров, В. И. Минкин // опубл. 10.06.2014. Бюл. Изобретений. - 2014. - № 16. - 8 с.
6. Патент РФ RU 2518740. Средство, ингибирующее Na⁺/H⁺-обмен, и дигидрохлорид 2-(3,4-метилendioксифенил)-9-морфолиноэтилимидазо [1,2-а]бензимидазола. / А. А. Спасов, В. А. Анисимова, Н. А. Гурова, **А. С. Тимофеева**, В. Ю. Федорчук, В. И. Минкин // опубл. 10.06.2014. Бюл. Изобретений. – 2014. - №16. - 8 с.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. **Питерсен, А. С.** Компьютерный анализ классов конденсированных азолов как источников веществ с высокой антиаритмической активностью / **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук // XV Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. Волгоград, 2010 г. – С. 54 – 56.
2. **Питерсен, А. С.** Сравнительная оценка влияния производных циклических гуанидинов на активность Na⁺/H⁺-обменника / **А. С. Питерсен**, Н. А. Гурова, В. А. Анисимова // Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии». – Волгоград, 2011 г. – С. 68 – 69.
3. **Питерсен, А. С.** Влияния некоторых циклических производных гуанидина на активность натрий/водородного обменника / **А. С. Питерсен**, Федорчук В. Ю. // Материалы 69-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием

- «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2011 г. – С. 203 – 204.
4. Федорчук, В. Ю. Влияния некоторых конденсированных азотсодержащих соединений на активность Na^+/H^+ -обменника / В. Ю. Федорчук, **А. С. Питерсен**, Д. В. Косолапова, В. В. Гурова // Материалы XVI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. Волгоград, 2011 г. – С. 39 – 41.
 5. Гурова, Н. А. Поиск и изучение ингибиторов Na^+/H^+ обменника среди производных азолов / Н. А. Гурова, В. А. Анисимова, **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 2012 г. – С. 53.
 6. Федорчук, В. Ю. Изучение острой токсичности амилорида / В. Ю. Федорчук, **А. С. Питерсен** // Материалы юбилейной 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2012 г. – С. 337.
 7. **Питерсен, А. С.** Изучение влияния некоторых производных азолов на активность Na^+/H^+ -обменника / **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук, Д. В. Косолапова, В. В. Гурова // Материалы IV Международной научной конференции «Science4Health». – Москва, 2012. – С. 63.
 8. Гурова, Н. А. Влияние амилорида на активность Na^+/H^+ -обменника тромбоцитов / Н. А. Гурова, А. А. Спасов, **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук, Д. В. Косолапова // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. - № 2. – С. 19 – 21.
 9. Бригадирова, А. А. Оценка новизны химической структуры производных конденсированных азолов – ингибиторов Na^+/H^+ обменника / А. А. Бригадирова, **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук, Д. В. Косолапова, В. В. Гурова // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». - Волгоград, 2012 г. – С. 10 – 11.
 10. **Питерсен, А. С.** Изучение влияния зонипорида на размеры зоны инфаркта миокарда / **А. С. Питерсен** // XVII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. Волгоград, 2012 г. – С.61 – 62.
 11. Гурова, В. В. Динамика индекса гипертрофии при хроническом изопротереноловом повреждении миокарда / В. В. Гурова, Е. В. Резников, **А. С. Тимофеева** // Материалы V Международной научной конференции «Science4Health». – Москва, 2013 г. – С. 89 – 90.
 12. Спасов, А. А. Изучение влияния некоторых конденсированных азотсодержащих соединений на активность Na^+/H^+ -обменника / А. А. Спасов, Н. А. Гурова, В. А. Анисимова, **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук // Тезисы докладов XIX Российского национального конгресса «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО». – Москва, 2012. – С. 425.
 13. Гурова, Н. А. Поиск и изучение ингибиторов Na^+/H^+ обменника среди производных азолов / Н. А. Гурова, В. А. Анисимова, **А. С. Питерсен**, В. Ю. Федорчук // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 2012. – С. 53.
 14. Федорчук, В. Ю. База данных по химической структуре и фармакологической активности ингибиторов Na^+/H^+ обменника / В. Ю. Федорчук, **А. С. Питерсен** // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». – Волгоград, 2012 г. – С. 135 – 136.
 15. **Питерсен, А. С.** Изучение эффекта соединения АКС-284 на активность натрий/водородного обменника в сравнении с зонипоридом / **А. С. Питерсен**, Н. А. Гурова, В. Ю. Федорчук // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». – Волгоград, 2012. – С. 157.
 16. **Тимофеева, А. С.** Кардиопротекторные свойства соединения РУ–1190 на модели ишемии/реперфузии миокарда у крыс / **А. С. Тимофеева**, В. А. Анисимова, А. А. Желтова, В. Ю. Федорчук, В. В. Гурова, Е. В. Резников, С. М. Сорокин // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2013. С. 21-23.
 17. Федорчук, В. Ю. Поиск новых ингибиторов Na^+/H^+ -обмена среди бромидов 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия / В. Ю. Федорчук, **А. С. Тимофеева**, В. В. Гурова, И. Е. Толпыгин // Сборник тезисов «Проблемы разработки новых лекарственных средств». - Москва, 2013 г. – С. 126.
 18. Гурова, Н. А. Поиск ингибиторов Na^+/H^+ -обменника среди производных бензимидазольных систем / Н. А. Гурова, А. А. Спасов, В. А. Анисимова, **А. С. Тимофеева**, В. Ю. Федорчук, А.

- А. Желтова // Сборник тезисов с международным участием Первая Российская конференция по медицинской химии (Med Chem Russia-2013). – Москва, 2013 г. – С. 279.
19. Тимофеева, А. С. Кардиопротекторный эффект соединения ру-295/ А. С. Тимофеева, В. Ю. Федорчук, А. А. Желтова, А. А. Спасов, В. А. Анисимова // «Современные проблемы химической науки и фармации» Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В. А. Кухтина Чебоксары, 2014 г – С. 155 – 156.
 20. Тимофеева, А. С. Сравнительное изучение селективного и неселективного ингибитора NHE-1 в исследованиях *in vitro* / А. С. Тимофеева, В. Ю. Федорчук // «Современные проблемы химической науки и фармации» Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В. А. Кухтина Чебоксары, 2014 г – С. 215 – 216.
 21. Тимофеева, А. С. Анализ зависимости NHE-ингибирующей активности от химической структуры производных бензимидазолов / А. С. Тимофеева, В. Ю. Федорчук, В. А. Анисимова, И. Е. Толпыгин // Вестник ВоГМУ: приложение. Материалы V Всероссийского научно-практического семинара «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств» Волгоград, 2013 г. – С. 134 – 135.
 22. Дронь, М. Ю. Биоинформационное сравнение первичных аминокислотных последовательностей натрий-водородных последовательностей./ М. Ю. Дронь, А. Н. Енькова, В. Ю. Федорчук, А. С. Питерсен, П. М. Васильев // Вестник ВоГМУ: приложение. Материалы V Всероссийского научно-практического семинара «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств» Волгоград, 2013 г. – С. 36 – 37.
 23. Тимофеева, А. С. // Кардиотропные эффекты соединения ру-1355 в условиях хронической сердечной недостаточности «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград 24-27 апреля 2013 г. – С. 255 – 256.
 24. Тимофеева, А. С. // Кардиопротекторные свойства ингибитора Na⁺/H⁺ обмена соединения РУ–284 // А. С. Тимофеева / Материалы 71-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2014 г. – С. 245 – 246.
 25. Гурова, Н. А. Влияние амилорида на Na⁺/H⁺-обменник тромбоцитов / Н. А. Гурова, А. С. Питерсен // Пятая Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием). – Москва, 2011 г. – С. 156-157.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИЗО – изопротеренол

МДА – малоновый диальдегид

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РУ – лабораторный шифр соединения

NHE – Na⁺/H⁺-обменник

NHE-1 – Na⁺/H⁺-обменник первой изоформы

ТИМОФЕЕВА АННА САМОВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ
ГУАНИДИНОВИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕНА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук