На правах рукописи

МУРАВЬЕВА ВАРВАРА ЮРЬЕВНА

«ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ ИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕНА»

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «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, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии.
Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится «____»_____2016 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 «___»_____2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Цереброваскулярные заболевания занимают лидирующее место среди причин смертности и инвалидизации взрослого населения [Баланова, 2013; Шляхто 2013] как в России, так и во всем мире [Сергеев, 2010; Путилина, 2013; Зухурова, 2013; Гусев 2013; Скворцова 2013; Клочихина, 2014; Григорова, 2015; Полуэктов, 2015; Go, 2013; Kumar, 2016].

В настоящее время соотношение ишемического и геморрагического нарушения мозгового кровообращения (НМК) составляет в среднем около 80–85 и 15–20% соответственно [Клочихина, 2014]. Одним из важных направлений базисной терапии ишемического инсульта является нейропротекция, которая направлена на борьбу с первичными механизмами ишемического повреждения головного мозга, либо способна оказывать влияние на его отдаленные последствия [Гусев, 2009; Петров, 2011; Скворцова, 2011; Мельникова, 2012; Евтушенко, 2013; Багметова, 2013; Мясоедов, 2014; Полуэктов, 2015; Тюренков, 2015; Ginsberg, 2008; Ginsberg, 2009].

Несмотря на обилие механизмов участвующих в патогенезе ишемического инсульта [Воронина, 2012; Середенин, 2013; Мирзоян, 2015], активация Na^+/H^+-обменника первой изоформы (NHE-1) является одним из основных факторов, приводящих к перегрузке нейрона кальцием и гибели клетки [Lee, 2009]. Поэтому актуальным направлением является поиск и исследование ингибиторов NHE-1 в качестве потенциальных лекарственных средств, способствующих защите головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения.

В настоящее время имеются данные о способности производных бензоилгуанидина ингибировать NHE-1 и тем самым уменьшать негативные последствия церебральной ишемии. Наиболее активным селективным ингибитором NHE-1 является производное бензоилгуанидина - зонипорид [Tracey, 2003; Lee, 2009]. Кроме того, высокую эффективность в качестве новых потенциальных ингибиторов NHE-1 проявили производные индолоилгуанидина (SM-20220, SM-20550) [Kitayama, 2001]. Способность ингибировать NHE-1 была выявлена и у циклических гуанидинов производных бензимидазола [Zhang, 2007].

Степень разработанности

NHE-1 принимает участие во многих патологических процессах центральной нервной и сердечно-сосудистой систем: ишемически-реперфузионом повреждении миокарда и головного мозга [Гурова, 2015; Ayoub, 2007; Luo, 2007; Boedtkjer, 2012; Karmazyn, 2013], нарушении ритма [Koliakos, 2008] и развитии гипертрофии сердца [Cingolani, 2011], сердечной недостаточности [Malo, 2006], эндотелиальной дисфункции, болезни Альцгеймера [Rönicke, 2009] и эпилепсии [Verma, 2015].

Согласно ведущим международным клиническим рекомендациям по лечению ОНМК и результатам большинства крупных рандомизированных исследований по изучению эффективности церебропротекторных препаратов, на сегодняшний день не существует нейропротекторной схемы назначения лекарственных средств, продемонстрировавшей достоверное улучшение исхода инсульта [Клинические рекомендации: диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики, включая первичную и вторичную профилактику, IV Всероссийском съезде врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации 15 ноября 2013 года, г. Казань; Ringleb, 2008].

В настоящее время мощным и селективным ингибитором NHE-1 является зонипорид - 1-(хинолин-5-ил)-5-циклопропил-1Н-пиразол-4-карбонил] гуанидина гидрохлорид моногидрат [Guzman-Perez, 2001; Lee, 2009]. Нейропротекторные эффекты зонипорида связаны с ингибированием так называемого глутамат-кальциевого каскада как *in vitro*, так и *in vivo* при моделировании фокального ишемического повреждения [Lee, 2009].

В настоящее время нет препаратов, селективно ингибирующих NHE-1, разрешенных для клинического применения, поскольку на разных этапах их изучения были выявлены некоторые побочные эффекты [Спасов, 2013; Murphy, 2009; Pettersen, 2008], поэтому представляется целесообразным продолжить поиск новых веществ с данным видом активности.

Целью исследования является поиск новых ингибиторов NHE-1 среди производных циклических гуанидинов и изучение фармакологических (нейропротекторных) и токсикологических свойств наиболее активного соединения.

Задачи

1. Провести поиск соединений с NHE-1–ингибирующей активностью среди циклических гуанидинов - производных N^9-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола.
2. Изучить зависимость NHE-1–ингибирующей активности соединений от их структуры и оценить их физико-химические свойства.
3. Исследовать церебропротекторное действие наиболее активного соединения при однократном и курсовом введении на модели фокальной 60-ти минутной ишемии головного мозга у крыс с последующей реперфузией.
4. Изучить гемореологические свойства и определить влияние на тромбогенный потенциал наиболее переспективного соединения в условиях патологии.
5. Определить влияние исследуемого вещества на нейромедиаторные системы головного мозга.
6. Изучить общетоксикологические свойства наиболее активного соединения.

Научная новизна

Впервые в исследованиях *in silico* было установлено, что NHE-1-ингибирующая активность соединений зависит от зарядов (электронные единицы) центрированных на гуанидиновый фрагмент. Впервые было показано, что вещества, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу (производные 2–аминобензимидазола) обладают более высокой NHE-1-ингибирующей активностью по сравнению с соединениями, содержащими в своей структуре полностью встроенную гуанидиновую группу (производные N^9-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола).

Впервые *in vivo* было выявлено нейропротекторное действие соединения РУ-1355 в эффективной дозе (1,12 мг/кг), что проявилось ограничением роста концентрации специфического маркера повреждения нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, уменьшением зоны некроза, выраженности отека мозга, снижением проявлений неврологических нарушений и восстановлением поведенческих реакций в условиях ишемии/реперфузии головного мозга. По совокупности исследуемых параметров соединение РУ-1355 превосходит препараты сравнения первичные нейропротекторы – глицин и магния сульфат и селективный ингибитор NHE-1 - зонипорид.

Впервые было показано, что соединение РУ-1355 способствует уменьшению вероятности тромбогенных осложнений за счет ограничения активации и агрегации тромбоцитов, эритроцитов и нормализации вязкостных свойств крови в условиях патологии.

Впервые установлено, что соединение РУ-1355 в эффективной дозе 1,12 мг/кг существенного влияния на нейромедиаторные модуляторы ЦНС не оказывает. В эффективной дозе соединение РУ-1355 не проявляет токсическое действие при курсовом введении.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе исследования *in silico* была выявлена закономерность между выраженной NHE-1–ингибирующей активностью новых производных циклических гуанидинов и электронными параметрами, центрированными на гуанидиновый фрагмент соединений с полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой и веществ с частично встроенной, что может быть использовано для направленного синтеза и поиска новых соединений с высокой активностью.

На основании экспериментального поиска соединений среди циклических гуанидинов, ингибирующих NHE-1, была сформирована база данных соединений, изученных на предмет описанного вида активности.

Результаты проведенных фармакологических исследований *in vivo* соединения РУ-1355 с NHE-1-ингибирующей активностью, оказавшего выраженное противоишемическое действие, проявляющее в уменьшении повреждения головного мозга и коррекции тромбогенных и

гемореологических нарушений, свидетельствуют о необходимости проведения расширенных доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Экспериментальные исследования были выполнены согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению лекарственных средств [Воронина, 2012; Макаров, 2012; Мирзоян, 2012; Островская, 2012] и по изучению механизмов действия, общетоксикологических свойств [Арзамасцев, 2012; Irwin, 1964]. Исследование проводили на нелинейных половозрелых самцах и самках крыс, мышей и кроликах-самцах.

Исследование было проведено с использованием современных высокоинформативных методов, использующихся на кафедре фармакологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, НИИ фармакологии ВолгГМУ и ГБУ ВМНЦ.

Исходя из поставленной цели и задач исследования, были использованы современные методы *in silico* (методы молекулярной механики и квантовой химии), позволяющие с высокой степенью достоверности выявить значимые признаки высокого уровня NHE-1–ингибирующей активности.

Реализация результатов исследования

Выявленные закономерности между структурой и физико-химическими свойствами исследованных рядов производных циклических гуанидинов используются для синтеза новых соединений с NHE-1-ингибирующей активностью в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону). Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоградского медицинского научного центра, кафедрах фармакологии Саратовского государственного медицинского университета и Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Основные положения, выносимые на защиту

1. NHE-1 ингибирующая активность в ряду производных циклических гуанидинов N^9 имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола определяется центрированными на гуанидиновый фрагмент электронными параметрами.

2. Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при однократном введении на модели фокальной 60-ти минутной ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией у крыс ограничивало рост концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, сокращало размеры зоны некроза и отека головного мозга, способствовало восстановлению неврологических нарушений. При курсовом введении соединение РУ-1355 на модели

фокальной 60-ти минутной ишемии с последующей реперфузией на разных сроках постреперфузионного повреждения ограничивало рост концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, уменьшало выраженность неврологических нарушений и восстанавливало поведенческие реакции.

3. Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при однократном введении на модели глобальной ишемии/реперфузии способствовало снижению агрегации тромбоцитов и улучшению реологических свойств крови, а также уменьшению агрегации эритроцитов.

4. Соединение РУ-1355 при однократном введении в эффективной дозе 1,12 мг/кг не оказывало нейротоксических и общетоксикологических эффектов.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на нелинейных половозрелых мышах, крысах обоего пола, кроликах породы «Шиншилла» с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологичного оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противоишемическим действием [Мирзоян, 2012], гемореологической активностью [Макаров, 2012], общетоксикологическими свойствами [Арзамасцев, 2012], а также с использованием параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII и XIX Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, 2012-14 гг.; 71, 72, 73 итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 2013-15 гг.; Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», Москва, 2013 г.; Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, Москва, 2013 г.; Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 2014 г.; V Всероссийском научно-практическом семинаре «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 2013 г.; Российской научной конференции «Фармакология экстремальных состояний», посвященная 150-летию Н.П. Кравкова Санкт-Петербург, 29 июня–2 июля 2015 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 29 работ (в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки РФ, 3 патента на изобретения).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 204 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 16 рисунками, 41 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), главы материалы и методы (глава II), экспериментальной части (главы III-VII), обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 180 источников, в том числе 104 зарубежных.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах поставленных задач: проведении экспериментального скрининга по изучению NHE-ингибирующей активности, исследований *in silico* и изучении *in vivo* фармакологической и токсикологической активности наиболее активного соединения, статистической обработке полученных данных, обсуждении результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций при оформлении рукописи.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** представлен анализ отечественной и зарубежной литературы на тему: **«Натрий–водородный обменник – новая фармакологическая мишень для создания нейропротекторных средств»**. В первом разделе рассматривается биологическая роль NHE: основные изоформы и их распределение в ЦНС, строение, регуляция, физиологическое значение, а также участие в патологиях головного мозга. Второй раздел литературного обзора посвящен анализу известных на сегодняшний день селективных и неселективных ингибиторов NHE-1. В заключительном разделе обзора рассматриваются производные циклических гуанидинов как потенциальные высокоселективные ингибиторы NHE-1.

Вторая глава посвящена поиску соединений с NHE-1 ингибирующей активностью среди новых циклических гуанидинов, которые в своей структуре содержат полностью или частично встроенную в цикл гуанидиновую группу. Исследование проводили на основании экспериментального изучения и методов компьютерной обработки информации. Были изучены 25 веществ, из которых 21 производные N^9-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с полностью встроенной и 4 - 2–аминобензимидазола с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой. Исследуемые соединения синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета (ведущим научном сотрудником лаборатории синтеза биологически активных соединений, к.х.н. В.А. Анисимовой).

Исследования проводили на 243 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г. и 196 белых неинбредных мышах обоего пола массой 17-36 г., 25 кроликах самцах, породы «Шиншилла» весом 2,5-3,5 кг, содержащихся по требованиям (ГОСТ Р 50258-92) [1993]. Все животные были доставлены из питомников: ООО «Питомник РАМТН» (г.Москва), ФГУП ПЛЖ

«Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово). Исследование проводили в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правилами лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Все исследования были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 15 февраля 2013 года).

Экспериментальное изучение NHE-1 ингибирующей активности соединений проводили *in vitro* на тромбоцитах кролика по методу D. Rosskopf et.al. [1991] и K. Kusumoto [2002], модифицированному Гуровой Н.А. [2011] (лазерный агрегометр «БИОЛА-220 ЛА», Россия) при сравнении с селективным ингибитором NHE-1 зонипоридом (SIGMA, США) [Ayoub, 2007][1]. Изучение *in silico* зависимости NHE-1–ингибирующей активности производных циклических гуанидинов от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров проводили с помощью методов компьютерной обработкой информации (пошагового дискриминантного анализа (выражаем 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). Исследования проводились с использованием программ ChemFinfer 9.0 (CambridgeSoft Corporation, USA, 2004), MarvinSketch 15.6.15.0 (ChemAxon, USA, 2014), HiperChem 8.0.8 (Hypercube, USA, 2009) и Statistica 8.0 (StatSoft, USA, 2007).

Изучение противоишемической активности *in vivo* проводили при однократном и курсовом введении соединения РУ-1355 в эффективной дозе 1,12 мг/кг на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА у крыс [Мирзоян, 2012]. Противоишемическую активность соединения РУ-1355 при однократном в/в введении за 30 минут до ишемии исследовали в условиях 60-ти минутной ишемии и 24-х часовой реперфузии. В качестве препаратов сравнения были выбраны первичные нейропротекторы - магния сульфат (90 мг/кг) [Yang, 2000] и глицин (800 мг/кг) [Yao, 2012], и селективный ингибитор NHE-1 – зонипорид (1 мг/кг) [Lee, 2009]. Эффект соединений оценивали по: уровню концентрации нейронспецифической (NSE) в сыворотке крови (набор Rat neuron-specific Enolase (NSE) Elisa Kit фирмы CUSABIO (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США)), размеру зоны некроза и отека головного мозга (методом окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом), неврологическим нарушениям [Garcia, 1995] с использованием дополнительных тестов из других шкал [Гацура, 1974; Воронина, 2012].

[1] Выражаем признательность старшему преподавателю кафедры фармакологии ВолгГМУ к.м.н. Н.А. Гуровой и аспиранту Тимофеевой А.С. за помощь при изучении NHE-1 ингибирующей активности *in vitro*.

Изучение противоишемической активности соединения РУ-1355 при курсовом введении проводили в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей реперфузией. Вводили соединение РУ-1355 в/бр за 10 мин до реперфузии и в течение последующих 7 дней после ишемии 1 раз/сутки. Постреперфузионное повреждение головного мозга оценивали по уровню NSE в сыворотке крови (набор Neuron Specific (NSE) Organism Species: Rattus norvegicus (Rat) Elisa Kit фирмы Cloud-Clone Corp. (США), неврологическим нарушениям (шкала Гарсия, «адгезивный» тест и тест «вытягивания языка») [Garcia, 1995 Gulyaeva, 2003 Sughrue, 2006] и поведенческим реакциям (тест «открытое поле») [Буреш, 1992] на различных сроках после операции. Препарат сравнения - глицин (800мг/кг).

Влияние на нейромедиаторные системы исследуемого соединения проводили на основании взаимодействия с различными модуляторами ЦНС *in vivo*. Воздействие соединения РУ-1355 на эффекты модуляторов моноаминергической системы проводили с помощью следующих тестов: апоморфиновой (1 мг/кг) и сульфат амфетаминовой стереотипии (5 мг/кг), каталептогенного эффекта галоперидола (1 мг/кг), гиперкинеза, вызванного введением 5-гидрокситриптофана (300 мг/кг), гипотермического эффекта клофелина (0,1 мг/кг) и резерпина (2,5 мг/кг) и эффектов L-3,4-диоксифенилаланина (L-ДОФА) (100 и 500 мг/кг). Изменение со стороны холинергической системы оценивали по никотиновому (2 и 4 мг/кг) и ареколиновому тремору (25 мг/кг). Изучение воздействия соединения РУ-1355 на ГАМК-ергическую систему было проведено при помощи влияния на судорожный эффект пикротоксина (2,5 мг/кг). Исследуемое соединение вводили в/бр за 30 минут до эксперимента и исследовали в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг.

Изучение гемобиологических свойств крови проводили в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА) в сочетании с контролируемой гипотензией [Мирзоян, 2012]. Препарат сравнения зонипорид (1мг/кг) и соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) вводили в/в через 10 минут после реперфузии. Анализ гемореологических показателей проводили по агрегации эритроцитов (степень агрегации и средний размер агрегатов) методом оптической микроскопии с видеорегистрацией и компьютерной обработкой изображения светового микроскопа Биола Д11У11 и видеокамеры (Sony Handycam Video 8) [Муравьев, 2003], агрегации тромбоцитов (Δ% ингибирования функциональной активности тромбоцитов) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ("Биола", г. Москва) по методу [Born, 1962] в модификации [Габбасова, 1989] и вязкости крови (кажущейся вязкость крови) на реологическом АКР-2 (Россия) анализаторе [Муравьев, 2009] при скоростях сдвига от 300 $с^{-1}$ до 10 обратных секунд ($с^{-1}$) в мПа*с. Артериальный тромбоз моделировали наложением аппликации 50% раствора хлорида железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия) [Kurz, 1990].

Изучение острой токсичности проводилось в соответствии с требованиями по

проведению доклинических испытаний [Арзамасцев, 2012] в диапазоне доз 50-800 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении. Для расчета величины токсикологического показателя LD_{50} использовали метод Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 2004].

Общетоксилогические свойства соединения РУ-1355 исследовали с помощью схемы многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin, 1964]. Исследование проводили в возрастающих дозах 1,12, 5, 25, 125 и 250 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Проверку выборки на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили непараметрическим (парный тест Вилкоксона) методом. Сравнение трех и более независимых выборок проводили параметрическими (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна) и непараметрическими (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна) методами. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p<0,05$. Расчет величины IC_{50} выполнен с использованием метода регрессионного анализа.

В третьей главе проводили поиск *in vitro* ингибиторов NHE-1 среди соединений, содержащих гуанидиновую группу. В ранее проведенном фармакофорном анализе [Гурова, 2015] были выявлены потенциальные 2D-фармакофоры соединений, в том числе гуанидиновая группировка - частично или полностью встроенная в гетероцикл. Поэтому для исследования были выбраны соединения двух химических классов: производных 2-аминобензимидазола (частично встроенная в цикл гуанидиновая группа) и производные N^9-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (полностью встроенная в цикл гуанидиновая группа), содержащие в одном и том же положении по отношению к азоту в гуанидиновой группе или диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный или морфолиноэтильный заместители. В результате проведенных исследований среди данных химических классов были найдены соединения с разной степенью выраженности по NHE-1-ингибирующему действию. Производные N^9-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола - соединения РУ-67, РУ-273 и РУ-284 - и производные 2–аминобензимидазола соединения РУ-1355, РУ-1390, РУ-1199 и РУ-1200 превосходили зонипорид по величине IC_{50}. Производные N^9-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола - соединения РУ-17, РУ-293 и РУ-374 проявили эффект в концентрации того же порядка, что и зонипорид. Остальные вещества уступали препарату сравнения зонипориду по NHE-1–ингибирующей активности. По величине IC_{50} соединения можно расположить в следующем порядке - РУ-1355>РУ-1199>РУ-1390>РУ-1200>РУ-273>РУ-67>РУ-284 зонипорид.

При анализе структура/активность в ряду изученных гетероциклических соединений наблюдались следующие закономерности. Было показано, что при исследовании зависимости NHE-ингибирующей активности среди производных N^9-имидазо[1,2-a]бензимидазола в

концентрации $1x10^{-6}$M от химической структуры наибольшей активностью обладают вещества, имеющие в положении N^9 морфолиноэтильный и пиперидиноэтильный, а в положении C^2 фенильный, метоксифенильный или бромфенильный заместители. Анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола от их химической структуры не проводили ввиду их низкой вариабельности.

В исследованиях *in silico* методом молекулярной механики и квантовой химии рассчитаны гуанидинцентрированные электронные параметры для соединений с частично (производные 2-аминобензимидазола) и полностью (производные N^9-имидазо[1,2-а]бензимидазола) встроенной в цикл гуанидиновой группой. Методом ансамблевого дискриминантного анализа проведена оценка зависимости NHE-ингибирующий активности от данных показателей. Было выявлено, что электронные параметры второго порядка Q_2, характеризующие ближайшее окружение атома азота гуанидинового фрагмента, оказывают статистически значимое влияние на уровень активности во всех изученных концентрациях и предположительно определяют наличие устойчивой NHE-1-ингибирующей активности. Наиболее достоверные результаты были получены для концентрации $1x10^{-8}$M, что, скорее всего, связано с усилением роли селективных взаимодействий в формировании NHE-1-ингибирующей активности. В результате прогноза методом ансамблевого дискриминантного анализа было выявлено, что соединения, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу обладают более высокой NHE-1-ингибирующий активностью. Центрированные на гуанидиновый фрагмент электронные параметры соединений с полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой статистически значимо отличаются от веществ с частично встроенной группой (рис. 1).

Рисунок 1. Сравнительный анализ центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров соединений, содержащих частично и полностью встроенную в цикл гуанидиновую группу, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность

Примечание:*- данные достоверны по отношению к группе, содержащих полностью встроенную в цикл гуанидиновую группу, t-критерий Стьюдента ($p<0,05$).

В главе 4 были изучены нейропротекторные свойства соединения РУ-1355, зонипорида, глицина и магния сульфата на модели ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга крыс. Несмотря на обилие механизмов, приводящих к перегрузке кальцием и гибели клетки при ишемическом повреждении головного мозга, NHE является одним из основных факторов регуляции гомеостаза в условиях ишемии/реперфузии [Lee, 2009;Verma, 2015].

При исследовании нейропротекторных свойств соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) при однократном в/в введении за 30 мин до окклюзии ЛСМА в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией у крыс наблюдали ограничение роста концентрации маркера повреждения головного мозга NSE в 1,67 раза (табл. 1), зоны некроза в 2,3 раза, а также уменьшение отека головного мозга на 61% (рис. 3) и коррекцию неврологических нарушений: двигательной активности и координации на 58%, мышечного тонуса на 68%, хватательного рефлекса на 40% и 25% улучшение чувствительности по сравнению с контрольной группой животных «ишемия/реперфузия» без лечения ($p<0,05$) (рис. 2). Соединение РУ-1355 по совокупности результатов исследуемых показателей превосходило препараты сравнения магния сульфат, глицин и зонипорид.

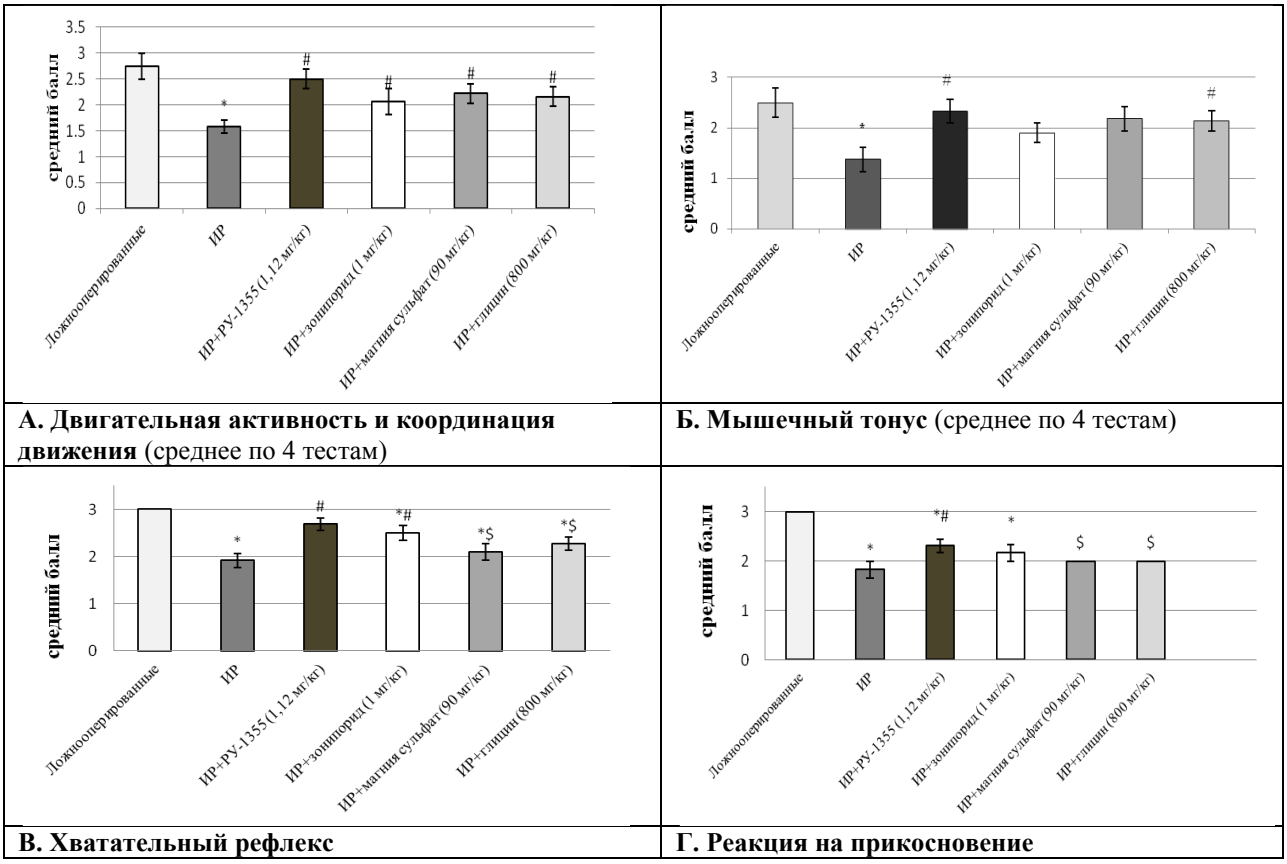
Таблица 1. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на показатели нейропротекторного действия крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией (M±m)

№	Группа	Зона некроза, Δ%	Коэффициент асимметрии (усл. ед.)	NSE (нг/мл) через 6 ч. после окклюзии
1	Интактные	0,00±0,00	1,00±0,00	0,34±0,16
2	Ложнооперированные	0,00±0,00	1,00±0,00	0,78±0,22
3	ИР	19,07±2,04*	1,18±0,02*	1,37±0,15*
4	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	8,49±1,58*#	1,07±0,02*#	0,82±0,11#
5	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12,25±2,03*#	1,14±0,03*	0,59±0,29
6	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	10,13±2,58*#	1,14±0,01*	0,82±0,20
7	ИР + глицин (800 мг/кг)	8,51±1,61*#	1,12±0,01*#	0,64±0,12#

Примечание: Различия статистически значимы по отношению к группе соответствующего дня:
*-л/о, интактных; # - контроль ИР ($p\leq0,05$, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)
Обозначение: NSE - нейронспецифическая енолаза, ИР - контроль-ишемия/реперфузия.

Таким образом, на основании полученных данных *in vivo* на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 30 минут до ишемии в дозе 1,12 мг/кг оказывало первичное нейропротекторное действие и по совокупности результатов исследуемых показателей превосходило препараты сравнения. Для оценки лечебного действия, скорости восстановления нарушений и токсикологических свойств в эффективной дозе (1,12 мг/кг) на фоне ишемии/реперфузии было проведено изучение соединения РУ-1355 при курсовом введении. Через 24 часа после операции исследуемое соединение способствовало снижению неврологических нарушений на 17%, ($p<0,05$), к 3

суткам на 18% ($p<0,05$) и на 7 сутки наблюдали полное восстановление всех неврологических нарушений, тестируемых с помощью шкалы Гарсия: мышечного тонуса, координации движения, двигательной активности и чувствительности во всех экспериментальных группах (рис. 4).



А. Двигательная активность и координация движения (среднее по 4 тестам)

Б. Мышечный тонус (среднее по 4 тестам)

В. Хватательный рефлекс

Г. Реакция на прикосновение

Рисунок 2. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на неврологический дефицит крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА.

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе: * - ложнооперированных; # - ИР; $ - соединение РУ-1355 ($p\leq0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

А Ложнооперированные **Б** ИР **В** ИР+зонипорид **Г** ИР+соединение РУ-1355

Рисунок 3. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимолярных дозах на зоны повреждения головного мозга при окрашивании ТТС через 24 часа после окклюзии ЛСМА

Примечание: окраска в розовой цвет (зона ишемии или живая ткань), неокрашенная часть (зона некроза).

Обозначение: ИР - контроль-ишемия/реперфузия.

При исследовании чувствительности и моторной функции лапы в адгезивном тесте с контралатеральной стороны в данной серии экспериментов соединение РУ-1355 статистически значимо восстанавливало нарушения данного показателя на всем протяжении наблюдения (рис. 4). На 1 и 3 сутки наблюдения было получено наиболее выраженное действие. В группе ИР+РУ-1355 наблюдали восстановление коэффициента тактильной асимметрии на 1 и 3 сутки в 3 и 3,75 раза соответственно по сравнению с группой животных ИР ($p<0,05$).

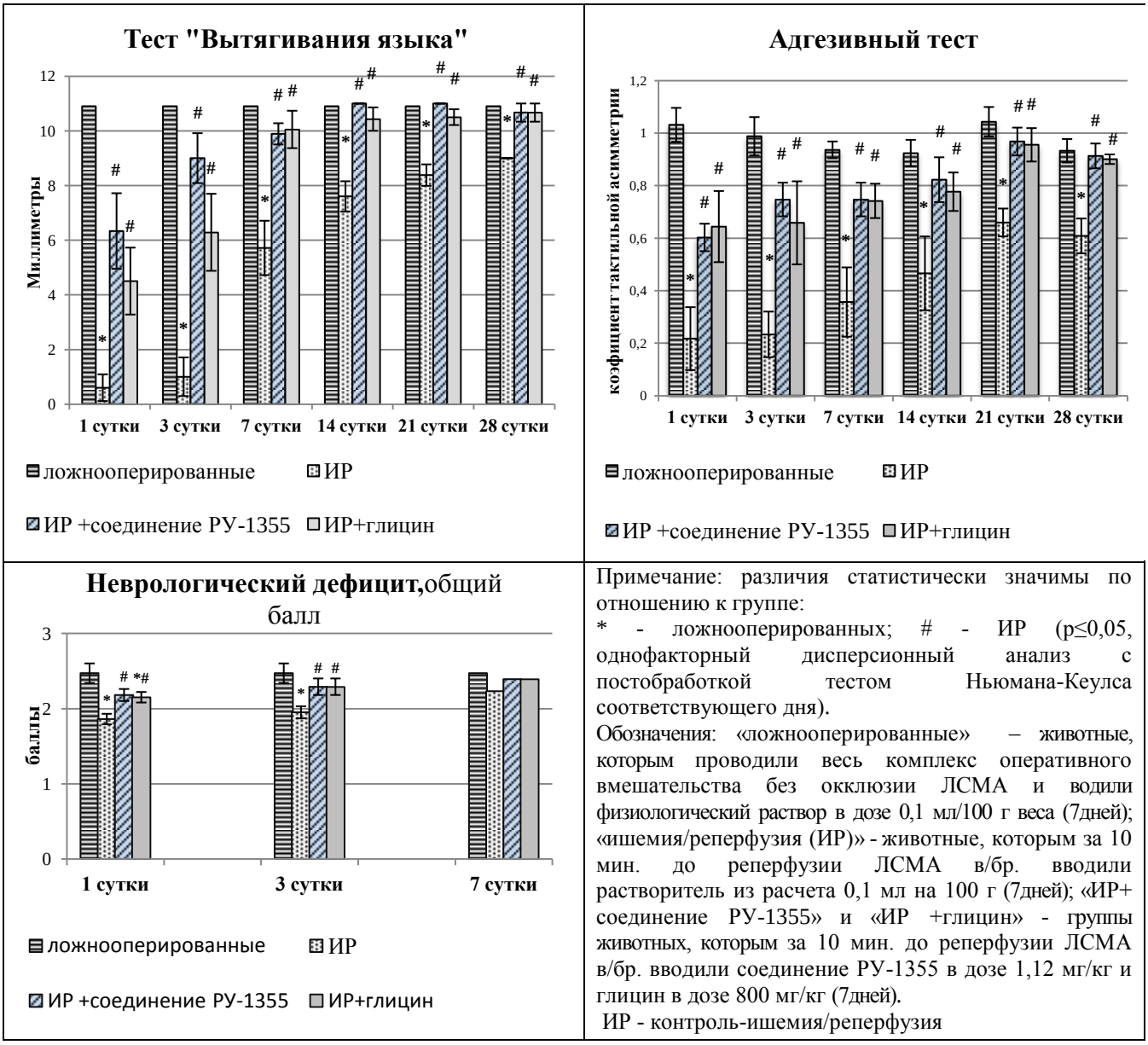


Рисунок 4. Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения глицин при курсовом введении животным с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА на динамику изменения неврологических нарушений.

Соединение РУ-1355 статистически значимо уменьшало расстройство функции языка в тесте «вытягивания языка». На 1 и 3 сутки введения исследуемого соединений наблюдали восстановление двигательной активности языка в 10,5 и в 9 раз соответственно по сравнению с группой ИР ($p<0,05$) (рис. 4). Так же при курсовом введении соединения РУ-1355 было

получено частичное восстановление всех показателей поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» на 7 сутки, а к 4 неделе исследования наблюдали полное восстановление всех поведенческих нарушений, по сравнению с результатами контрольной группы животных с ишемией/реперфузией ($p>0,05$). В данной серии экспериментов соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг также ограничивало рост концентрации NSE с сыворотке крови на 1 и 3 сутки определения на 23% и 32,7% по сравнению с результатами контрольной группы животных ИР, без лечения ($p>0,05$).

Таким образом, по совокупности эффектов соединение РУ-1355 при курсовом введении в дозе 1,12 мг/кг способствовало наиболее быстрому восстановлению нарушенных функций после ишемии/реперфузии по сравнению с первичным нейропротектором глицином. Токсического действия в эффективной дозе обнаружено не было.

В пятой главе проводили изучение влияния соединения РУ-1355 на тромбогенный потенциал и вязкость крови. Так, известно, что изменение активности NHE-1 в условиях ишемии/реперфузии приводит к активации и повышению образования агрегатов эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов и нарушению гемореологических свойств крови [Ichard, 2011].

На первом этапе было показано, что при введении соединения РУ-1355 и селективного ингибитора NHE-1 - зонипорида животным без патологии, агрегация тромбоцитов, вызванная индуктором АДФ, не изменялась (табл. 2). На втором этапе было получено, что соединение РУ-1355 в условиях глобальной ишемии/реперфузии достоверно снижало АДФ – индуцированную агрегацию тромбоцитов на 45,7% по сравнению с результатами контрольной группы животных ИР (табл. 2). Также способствовало нормализации вязкости крови при низких скоростях сдвига $50с^{-1}$, $20с^{-1}$ и $10с^{-1}$ и статистически значимый эффект соединение РУ-1355 на вязкость крови оказало при скорости сдвига $10с^{-1}$ на 24,5% по сравнению с результатами группы «контроль-ишемия/реперфузия. На основании полученных результатов исследуемое вещество в большей степени воздействует на агрегационный компонент данного показателя, что подтверждается тенденцией снижения индекса агрегации эритроцитов на 21% по сравнению с группой животных ИР ($p>0,05$). Так же в условиях билатеральной окклюзии ОСА соединение РУ-1355 достоверно снижало степень агрегации эритроцитов и уменьшало средний размер эритроцитарных агрегатов на 43 и 23% соответственно по сравнению с группой животных ИР (рис. 5). По совокупности результатов наиболее эффективное восстановление гемореологических показателей наблюдали у соединения РУ-1355 по сравнению с препаратом сравнения зонипоридом у животным с билатеральной окклюзией ОСА. На последнем этапе, в условиях артериального тромбоза, который учитывает влияние не только тромбоцитов, но и внутрисосудистых факторов тромбообразования было выявлено, что соединение РУ-1355 и зонипорид удлиняют время образования тромба на 14% и 21% соответственно по сравнению с

результатами интактных животных (p>0,05).

Таблица 4. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида при однократном внутривенном введении на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крови крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий и в условиях нормы (M±m)

№	Группа животных	Δ % ингибирования агрегации тромбоцитов	
		Без патологии	При ишемии/реперфузии
1	Ложнооперированные	28,41±1,89	28,41±1,89
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	-	46,69±3,41*
3	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	26,56±3,23	25,37±3,07#
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	27,62±1,60	28,17±2,06#

Примечания: Различия статистически значимы (p≤0,05) по отношению к группе: *-л/о; # - контроль ИР (p≤0,05, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

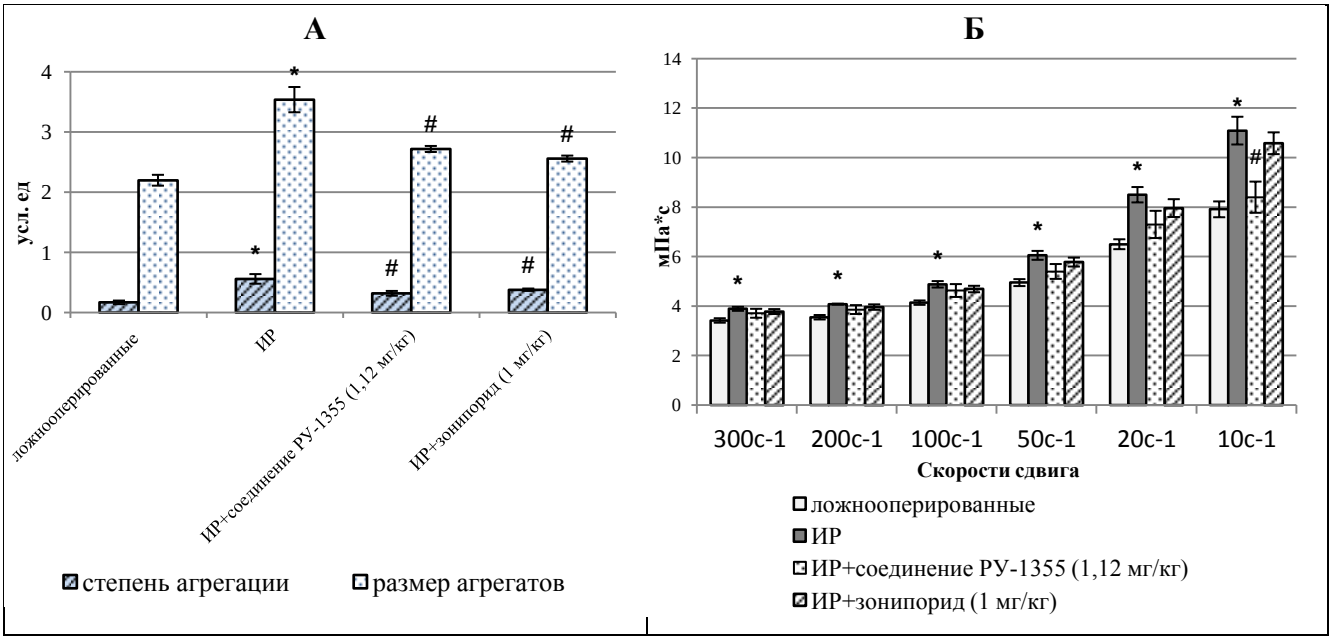


Рисунок 5. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида при однократном внутривенном введении А - на показатели агрегации эритроцитов и Б – на вязкость крови крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

Примечание: Различия статистически значимы (p≤0,05) по отношению к группе:
*-л/о; # - контроль ИР (p≤0,05, однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).
Обозначение: ИР - контроль-ишемия/реперфузия

В шестой главе представлены данные взаимодействия соединения РУ-1355 с различными нейромедиаторными системами. В настоящее время известно, что ингибиторы NHE способны взаимодействовать с различными рецепторными мишенями вследствие широкого распространения NHE-1 в ЦНС [Pedersen, 2006; Goñi-Allo, 2007; Rocha, 2008].

Соединение РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении в эффективной дозе 1,12 мг/кг существенного влияния на нейромедиаторные модуляторы ЦНС не оказывало.

В дозе 5,0 мг/кг соединение РУ-1355 проявило в различной степени выраженности воздействие на некоторые индукторы ЦНС. При изучении фенаминовой стереотипии, было показано, что соединение РУ-1355 в дозе 5,0 мг/кг статистически значимо потенцировало эффекты модулятора у мышей по сравнению с результатами контрольной группы животных, которым вводили только фенамин. Что подтверждается тенденцией исследуемого соединения в

дозе 5,0 мг/кг к потенцированию эффектов индуктора серотонинергической системы (5-ГТФ) на 10 и 20 минуте наблюдения. В дозе 5,0 мг/кг было показано, что соединение РУ-1355 препятствует гипотермии, вызванной модулятором норадренергической системы клофелином на 30 минуте эксперимента, однако данные были статистически незначимы. При введении соединения РУ-1355 в дозе, превышающей эффективную, была также показана тенденция к потенцированию действия центрального холиномиметика ареколина ($p>0,05$), эффекты никотина не изменялись. Исследуемое соединение в дозе 5,0 мг/кг не влияло на эффекты дофаминергических, ГАМКергических анализаторов нейромедиаторных систем и не проявило МАО-ингибирующее свойство.

В главе 7 проводили изучение общетоксикологических свойств соединения РУ-1355. Изучение общефармакологических свойств с помощью многотестового наблюдения на мышах по С. Ирвину [Irwin, 1964] показало, что соединение РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 1,12 мг и 5,0 мг/кг не приводило к изменениям эмоционального поведения животных, нервно-мышечной возбудимости, двигательной активности, мышечной координации и к изменениям со стороны вегетативной нервной системы. В дозах, превышающих эффективные (25, 125 и 250 мг/кг), было выявлено постепенное нарастание неблагоприятных эффектов соединения РУ-1355, что проявилось следующими изменениями: нарушением двигательной, мышечной координации, поведенческих реакций, изменением со стороны вегетативной нервной системы и рефлексов и при введении максимально изучаемой дозы (250 мг/кг) наблюдали гибель животных.

В ранее проведенных исследованиях по изучению острой токсичности соединения РУ-1355 при внутрибрюшинном введении был определен показатель LD_{50}, который составил 342,7 мг/кг. Ориентируясь на классификацию токсичности веществ [ГОСТ 12.1.007–76, 1976], соединение РУ-1355 можно отнести к группе умеренно токсичных веществ.

Глава 8 посвящена обсуждению полученных результатов. На основании исследования *in vitro* и по совокупности данных *in silico* среди циклических гуанидинов было выбрано соединение РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид с высокой NHE-ингибирующий активностью, которое *in vivo* проявило первичное нейропротекторное действие, а также снижало агрегацию тромбоцитов, эритроцитов и улучшало реологические свойства крови в условиях ишемии/реперфузии. В эффективной дозе соединение РУ-1355 не оказывало токсического действия и по совокупности эффектов превосходило исследуемые препараты сравнения: первичные нейропротекторы - глицин и магния сульфат и селективный ингибитор NHE-1 - зонипорид.

Заключение

В результате проведенного исследования было установлено, что NHE-1 ингибирующая активность в ряду производных циклических гуанидинов N^9 имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола определяется центрированными на гуанидиновый фрагмент электронными параметрами. Электронные параметры, центрированные на гуанидиновый фрагмент соединений с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой статистически значимо отличаются от данных показателей веществ с полностью встроенной, и вероятно определяют биологическую активность. И на основании исследования *in vitro* было выбрано соединение РУ-1355 превосходившее зонипорид и изученные соединения по IC_{50}.

В эффективной дозе (1,12 мг/кг) при однократном введении на модели фокальной 60-ти ишемии с последующей 24-й реперфузией у крыс ограничивало рост концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, сокращало размеры зоны некроза и отека головного мозга, способствовало восстановлению неврологических нарушений. При курсовом введении соединение РУ-1355 на модели фокальной 60-ти минутной ишемии с последующей реперфузией на разных сроках постреперфузионного повреждения ограничивало рост концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, уменьшало выраженность неврологических нарушений и восстанавливало поведенческие реакции. По совокупности эффектов соединение РУ-1355 превосходило исследуемые препараты сравнения глицин, магния сульфат и зонипорид. Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг в условиях патологии снижало вероятность тромбогенных осложнений: уменьшало активацию и агрегацию тромбоцитов, эритроцитов и улучшало реологические свойства крови. Соединение РУ-1355 при однократном введении в эффективной дозе 1,12 мг/кг не оказывало нейротоксических и общетоксикологических эффектов.

Выводы

1. Циклические гуанидины - производные 2–аминобензимидазола и N^9-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола - проявляют NHE-1-ингибирующую активность на тромбоцитах кролика.

2. Высокая NHE-1-ингибирующая активность наиболее характерна для производных 2–аминобензимидазола. Электронные параметры, центрированные на гуанидиновый фрагмент соединений с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой статистически значимо отличаются от данных показателей веществ с полностью встроенной группой, и вероятно определяют биологическую активность.

3. На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА у крыс, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг оказало нейропротекторное действие. При профилактическом однократном введении соединение РУ-1355 ограничивало рост концентрации нейронспецифической енолазы в

сыворотке крови в 1,67 раза, уменьшало зону некроза в 2,3 раза и выраженность отека головного мозга на 61%, способствовало коррекции неврологических нарушений ($p<0,05$) и по совокупности эффектов превосходило препараты сравнения глицин, магния сульфат и зонипорид.

4. Соединение РУ-1355 на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА у крыс в дозе 1,12 мг/кг при курсовом введении способствовало снижению выраженности неврологической симптоматики на 17% на 1 сутки ($p<0,05$), 18% - 3 сутки ($p<0,05$) и полному восстановлению – на 7 сутки, нормализации чувствительности и моторной функции правой передней конечности и уменьшению расстройства функции языка в тесте «вытягивания языка» ($p<0,05$), восстановлению поведенческих реакций, начиная с 7 дня наблюдения. По совокупности эффектов исследуемое соединение при курсовом введении в дозе 1,12 мг/кг превосходило препарат сравнения глицин.

5. Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при однократном в/в введении на модели глобальной ишемии/реперфузии снижало вероятность тромбогенных осложнений: достоверно уменьшало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 45,7%, способствовало нормализации вязкости крови при низких скоростях сдвига, снижало индекс агрегации эритроцитов на 21% ($p>0,05$), достоверно уменьшало степень агрегации эритроцитов и средний размер эритроцитарных агрегатов на 43 и 23% соответственно. На модели артериального тромбоза вещество РУ-1355 удлиняло время образования тромба. По совокупности эффектов исследуемое соединение превосходило препарат сравнения зонипорид.

6. Соединение РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении в эффективной дозе 1,12 мг/кг существенного влияния на эффекты нейромедиаторных модуляторов ЦНС не оказывало.

7. При экспериментальном изучении общефармакологических свойств вещества РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг не наблюдали изменения в изучаемых показателях. В дозах, превышающих эффективную (25, 125 и 250 мг/кг), было выявлено постепенное нарастание неблагоприятных эффектов, что проявилось в нарушении двигательной, мышечной координации, поведенческих реакций, изменением со стороны вегетативной нервной системы, рефлексов и при введении максимально изучаемых доз наблюдали гибель животных. Соединение РУ-1355 в соответствии с классификацией токсичности веществ можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс). Величина LD_{50} при внутрибрюшинном введении мышам 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 проведенного исследования 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. Спасов, А.А. Нейропротекторные свойства нового ингибитора Na^+/H^+ - обменника соединения РУ-1355 на модели фокальной ишемии у крыс / А.А. Спасов, **В.Ю. Муравьева**, Н.А. Гурова, Н.И. Чепляева, Е.В. Резников, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. - Т. 79. - № 4. - С. 3 - 7.
2. Спасов, А. А. Сравнительная характеристика нейропротекторных свойств глицина и магния сульфата у крыс с использованием морфометрических, иммуноферментных и неврологических методов оценки повреждения головного мозга / А. А. Спасов, **В.Ю. Муравьева**, Н. А. Гурова, Н. И. Чепляева, Е. В. Резников // Вестник ВолгГМУ. - 2015. - Т. 46. - № 6. – С. 100-105.
3. 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.

Патенты

1. Патент РФ RU 2526902. Средство, обладающее кардиопротекторным действием, и галогениды 1,3-дизамещённых 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.
2. 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.
3. Патент РФ RU 2518740. Средство, ингибирующее Na^+/H^+-обмен, и дигидрохлорид 2-(3,4-метилендиоксифенил)-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. 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.
2. **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.
3. 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 IVсъезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 2012 г. – С. 53.
4. **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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. **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.

11. 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.

12. **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.

13. 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 // Тезисы Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia- 2013) с международным участием, 8-12 сентября 2013. -С. 279.

14. **Федорчук, В. Ю**. Поиск новых ингибиторов Na^+/H^+ обмена среди производных бензимидазола, содержащих гуанидиновую группу / В. Ю. Федорчук, Д. Н. Резников, И. Е. Толпыгин // Материалы 71-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2013 г. - С. 258.

15. 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 ВолГМУ: приложение. Материалы V Всероссийского научно-практического семинара «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств». – Волгоград, 2013 г. – С. 134 – 135.

16. 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 ВолГМУ: приложение. Материалы V Всероссийского научно-практического семинара «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств». – Волгоград, 2013 г. – С. 36 – 37.

17. **Федорчук, В.Ю.** Сравнительное изучение селективного и неселективного ингибитора NHE1 в исследованиях *in vitro* / В.Ю. Федорчук, А.С. Тимофеева, Н.А. Гурова // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина «Современные проблемы химической науки и фармации», Чебоксары, 3-4 апреля, 2014. -С.215-216

18. Спасов, А. А. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте / А. А. Спасов, **В. Ю. Федорчук**, Н. А. Гурова, Н. И. Чепляева, Е.В. Резников // Научно-практический журнал Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. - №4. – С. 39-45.

19. **Федорчук, В. Ю**. Церебропротекторные свойства соединения РУ-1355 / В. Ю. Федорчук, А. Ф. Жиряков, А. А. Смольянинов // Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2014 г. – С. 248 – 249.

20. **Федорчук, В. Ю**. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на уровень нейронспецифической енолазы при фокальной обратимой ишемии головного мозга у крыс / В. Ю. Федорчук, Е. В. Желудков // Материалы XIX Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. – Волгоград, 2014 г. - С.62-63.

21. Спасов, А. А. Na^+/H^+ обменник – как мишень для поиска соединений с цитопротекторным действием / А. А. Спасов, Н. А. Гурова, **В. Ю. Федорчук**, А. С. Тимофеева, В.А. Анисимова // Обозрение психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева: приложение (тезисы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения 44 академика АМН СССР Артура Виторовича Вальдмана, «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014). -2014.-Т. Приложение, №б/н. -С. 163-164

22. **Муравьева, В. Ю**. Взаимодействие блокатора Na+/H+ - обменника соединения РУ-1355 с индукторами моноаминергической системы мозга / В. Ю. Муравьева, Е. В. Желудков, Д. В. Мальцев // Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». - Волгоград, 2015 г. - С.329-330.

23. **Муравьева, В. Ю**. Поиск соединений для первичной нейропротекции среди ингибиторов Na^+/H^+ обменника / В. Ю. Муравьева, А. А. Спасов, Н. А. Гурова, Н. А. Чепляева, В. А. Анисимова // Материалы Российской научной конференции «Фармакология экстремальных состояний» посвященная 150-летию Н.П. Кравкова. - Санкт-Петербург, 2015 г - С. 160-161.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-ГТФ - 5-гидрокситриптофан

АДФ - аденозин-5-дифосфорная кислота

ИАЭ – индекс агрегации эритроцитов

ИР - ишемия/реперфузия

ЛСМА – левая средняя мозговая артерия

ОСА - общие сонные артерии

РУ - лабораторный шифр соединения

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

NSE - нейронспецифическая енолаза

На правах рукописи

МУРАВЬЕВА ВАРВАРА ЮРЬЕВНА

«ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ ИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕНА»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук