

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
**«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»**

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**МУРАВЬЕВА ВАРВАРА ЮРЬЕВНА**

**«ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ  
ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ ИНГИБИТОРОВ  $\text{NA}^+/\text{H}^+$  ОБМЕНА»**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
академик РАН,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук,  
профессор  
Спасов Александр Алексеевич

ВОЛГОГРАД, 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1. НАТРИЙ–ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕННИК – НОВАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	12
1.1. Нейропротекторы. Современное состояние вопроса	12
1.2. Механизмы развития ишемического инсульта	14
1.3 Натрий–водородный обменник – многофункциональная мишень (общая характеристика, изоформы, биологическая роль)	15
1.4 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ обменник 1 изоформы (общая характеристика и распределение в клетках и тканях головного мозга)	20
1.5. Роль NHE-1 в развитии патологии головного мозга	24
1.6 Ингибиторы NHE-1	32
1.7 Заключение	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	37
2.1 Материалы исследования	37
2.2 Методы исследования	43
<b>ГЛАВА 3. ЦИКЛИЧЕСКИЕ ГУАНИДИНЫ КАК СОЕДИНЕНИЯ С NHE-1 ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ</b>	72
3.1 Поиск соединений с NHE-1-ингибирующей активностью <i>in vitro</i> на тромбоцитах кролика	73
3.2 Взаимосвязь между NHE-1–ингибирующей активности соединений и их химической структуры	79
3.3 Зависимость уровня NHE-1–ингибирующей активности соединений от их центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров (QSAR-анализ)	81
3.4 Заключение	86
<b>ГЛАВА 4. НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ ЗОНИПОРИД, ГЛИЦИН И МАГНИЯ</b>	

<b>СУЛЬФАТ НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС</b>	88
4.1 Нейропротекторные свойства соединения РУ-1355, магния сульфата, глицина и зонипорида при однократном введении	89
4.2 Нейропротекторные свойства соединения РУ-1355 и глицина при курсовом введении	104
4.3 Заключение	117
<b>ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ЗОНИПОРИД НА ТРОМБОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ВЯЗКОСТЬ КРОВИ</b>	121
5.1 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на различные звенья гемостаза в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий	123
5.1.1 Действие соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию тромбоцитов	123
5.1.2 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на вязкость крови	125
5.1.3 Изучение влияния соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию эритроцитов крови	126
5.2 Антитромбогенный эффект соединения РУ-1355 и зонипорида	128
5.3 Заключение	131
<b>ГЛАВА 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 С РАЗЛИЧНЫМИ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫМИ СИСТЕМАМИ</b>	133
6.1 Влияние на моноаминергическую систему головного мозга	133
6.2 Взаимодействие с ГАМК-ергической системой мозга	141
6.3 Влияние на холинергическую систему	142
6.4 Заключение	145
<b>ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355</b>	147
7.1 Изучение острой токсичности соединения РУ-1355	147
7.2 Изучение нейротоксикологических свойств соединения РУ-1355 с использованием схемы многотестового наблюдения по Ирвину	148

7.2.1 Действие соединения РУ-1355 на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы	148
7.2.2 Влияние соединения РУ-1355 на двигательную активность, координацию движений и реактивность	150
7.2.3 Изучение влияния соединения РУ-1355 на поведенческие реакции мышей в тесте «открытое поле»	154
7.2.4 Действие соединения РУ-1355 на функции вегетативной нервной системы мышей	155
7.3 Заключение	157
<b>ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	158
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	172
<b>ВЫВОДЫ</b>	173
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	175
<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b>	176
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	177
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	195

## 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника первой изоформы (NHE-1) является одним из основных факторов, приводящих к перегрузке 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-реперфузионном 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 церебропротективных препаратов, на сегодняшний день не существует нейропротективной 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-1H-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<sup>9</sup>-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 перспективного 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<sup>9</sup>-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 описанных видов активности.

Результаты проведенных фармакологических исследований *in vivo* соединения РУ-1355 с NHE-ингибирующей активностью, оказавшего выраженное противоишемическое действие, проявляющегося 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, используемых 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 используется 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<sup>9</sup> 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-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.

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

параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XIX и XVII 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 28 работ (в том числе 2 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.

# ГЛАВА 1. НАТРИЙ–ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕННИК – НОВАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Нейропротекторы. Современное состояние вопроса

Цереброваскулярные заболевания на сегодняшний день остаются одной из важных медико-социальных проблем, которая способствует нанесению экономического ущерба обществу. Церебральный инсульт занимает особое место среди них, так как приводит к высокому уровню летальности, значительной инвалидизацией и социальной дезадаптацией больных [Сергеев, 2010; Зухурова, 2013; Путилина, 2013; Григорова, 2015; Go, 2013]. В большинстве стран мира, как и в нашей стране, на долю ишемических нарушений мозгового кровообращения (НМК), приходится до 80% от общего числа инсультов. Однако, геморрагический инсульт, несмотря на более редкую встречаемость, способствует поражению лиц молодого и среднего (работоспособного) возраста, так же характеризуется высокой летальностью и инвалидизацией [Клочихина, 2014; Муравьева, 2014].

Терапия острого периода церебрального инсульта включает следующие критерии: базисная терапия, реперфузия, нейропротекция, мультидисциплинарная реабилитация и профилактика повторных нарушений мозгового кровообращения [Гусев, 2001; Анисимов, 2012; Шамалов, 2012; Мясоедов, 2014; Warach, 2002; Secades, 2006].

Очень важным направлением терапии является нейропротекция, которая подразумевает под собой как монотерапию, так и комбинированное лечение. Нейропротекция способствует прерыванию или замедлению последовательных повреждающих биохимических и молекулярных процессов либо активизирует защитные свойства нейронов, эндотелиальных и глиальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга [Мельникова, 2012; Евтушенко, 2013; Полуэктов, 2015; Ginsberg, 2009].

Гибель нейронов может носить как острый, так и отсроченный характер. В зависимости от этого современную фармакологическую нейропротекцию можно рассматривать как первичную и вторичную. Однако разделение нейропротекции на первичную и вторичную носит достаточно условный характер, так как многие препараты, которые относятся к вторичным нейропротекторам зачастую эффективно оказывают влияние также и на начальные этапы повреждения головного мозга [Мельникова, 2012; Никонов, 2013; Farooqui, 2000; Conant, 2004].

К первичной нейропротекции (первые 1-12 – 72 ч) относятся препараты, способные быстро прерывать глутамат-кальциевый каскад, что необходимо для коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем, и активировать естественные тормозные процессы. Примерами данной группы являются препараты магния и глицина, применение которых ускоряет регресс признаков отека мозга, очагового дефекта и улучшает восстановление нарушенных функций ЦНС [Петров, 2011; Selin, 2012]. Вторичная нейропротекция (6–12 ч до 7 суток) направлена на борьбу с отдаленными последствиями ишемии и прерывание отсроченных механизмов гибели клеток, к которым относят избыточный синтез оксида азота и оксидативный стресс, активацию микроглии и связанный с нею дисбаланс цитокинов, иммунные сдвиги, локальное воспаление, нарушение микроциркуляции гематоэнцефалического барьера, трофическую дисфункцию и апоптоз. К ним относятся препараты с метаболическим, вазоактивным и антиоксидантным действием: пентоксифиллин, пирацетам, мексидол, церебролизин [Воронина, 2009], кроме того на сегодняшний день ведется постоянный поиск новых средств обладающих нейропротекторной активностью.

Однако, препараты, которые проявили хорошие результаты в экспериментах на животных, не продемонстрировали убедительную клиническую эффективность [Ginsberg, 2009]. Разработка более 1000 активных веществ была прекращена на той или иной стадии клинических испытаний в связи с отсутствием положительных результатов [O'Collins, 2006]. Ни у одного из препаратов, проявивших эффективность у некоторых подгрупп пациентов

(например, цитиколин, пирацетам, клометиазол) [Заутнер, 2014] или в исследованиях 2-й фазы, не показали клиническую эффективность в крупных исследованиях 3-й фазы [Мельникова, 2012; Martinez-Vila, 2001; Philip, 2009]. Первичные нейропротекторы такие как магния сульфат и глицин имеют свои недостатки. Во-первых, низкий уровень доказательности (D). Во-вторых, магния сульфат при инъекционном введении имеет ряд побочных эффектов: брадикардия, снижение АД, угнетение ЦНС, угнетение дыхательного центра, угнетение проводимости сердца, остановка сердца и др. Глицин в свою очередь имеет ограничение в применении у больных, так как не существует в инъекционной лекарственной форме вследствие плохой растворимости в воде. Более того согласно ведущим международным клиническим рекомендациям по лечению острых НМК и результатам большинства крупных рандомизированных исследований по изучению эффективности церебропротекторных препаратов, в настоящее время пока не существует нейропротекторной программы, продемонстрировавшей достоверное улучшение исхода инсульта. В частности, в клинических рекомендациях European Stroke Organization (ESO) от 2008 года указано, что на сегодняшний день отсутствуют рекомендации по лечению острого ишемического инсульта при помощи нейропротекторных препаратов (уровень доказательности А) [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].

## **1.2 Механизмы развития ишемического инсульта**

Патобиохимический каскад повреждения нервной ткани - это серия многочисленных взаимосвязанных процессов (рис. 1.1). В первую очередь это метаболические нарушения, которые вызывают дисбаланс между процессами гликолиза и окисления глюкозы, приводящие к внутриклеточному накоплению лактата и ацидозу [Расулова, 2013]. Понижение pH способствует активации

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменника (NHE) [Cuomo, 2015], а дефицит энергии нарушает работу наиболее энергозависимого фермента натрий-калий-АТФазы [Дерягин, 2012]. Последствием этих процессов является избыточное проникновение в клетку ионов натрия. На следующей стадии ишемического каскада происходит деполяризация клетки и высвобождение возбуждающего нейромедиатора глутамата с последующей активацией NMDA (N-метил-D-аспартат) и AMPA ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) рецепторов [Green, 2008]. Все это приводит к активации кальциевых каналов, усилению поступления внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку и высвобождению внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Перегрузка кальцием клетки активизирует различные ферментные системы, приводит к образованию свободных радикалов, повышает синтез NO, способствует цитотоксическому отеку, развитию оксидантного стресса, что в конечном итоге способствует гибели клетки по некротическому либо апоптотическому пути [Хуе, 2009; Verma, 2015]. Несмотря на обилие механизмов, приводящих к перегрузке кальцием и гибели клетки, NHE-1 является одним из основных факторов регуляции гомеостаза в условиях ишемии/реперфузии [Lee, 2009].

### **1.3 Натрий–водородный обменник – многофункциональная мишень (общая характеристика, изоформы, биологическая роль)**

#### **1.3.1 Структура и физиологические функции**

NHE - семейство мембранных белков, которое является основным регулятором объема и pH клетки за счет трансмембранного обмена ионов  $\text{Na}^+$  на ионы  $\text{H}^+$  со стехиометрией 1:1, что указывает на электронейтральность процесса [Ху, 2015]. Кроме того, NHE участвует в процессах пролиферации, миграции, роста, дифференцировки, адгезии и иммунитете клеток, а так же в организации цитоскелета [Спасов, 2013; Leng, 2014]. NHE млекопитающих кодируются геном SLC9 и имеет три подсемейства SLC9A, SLC9B2 и SLC9C [Donowitz, 2013].

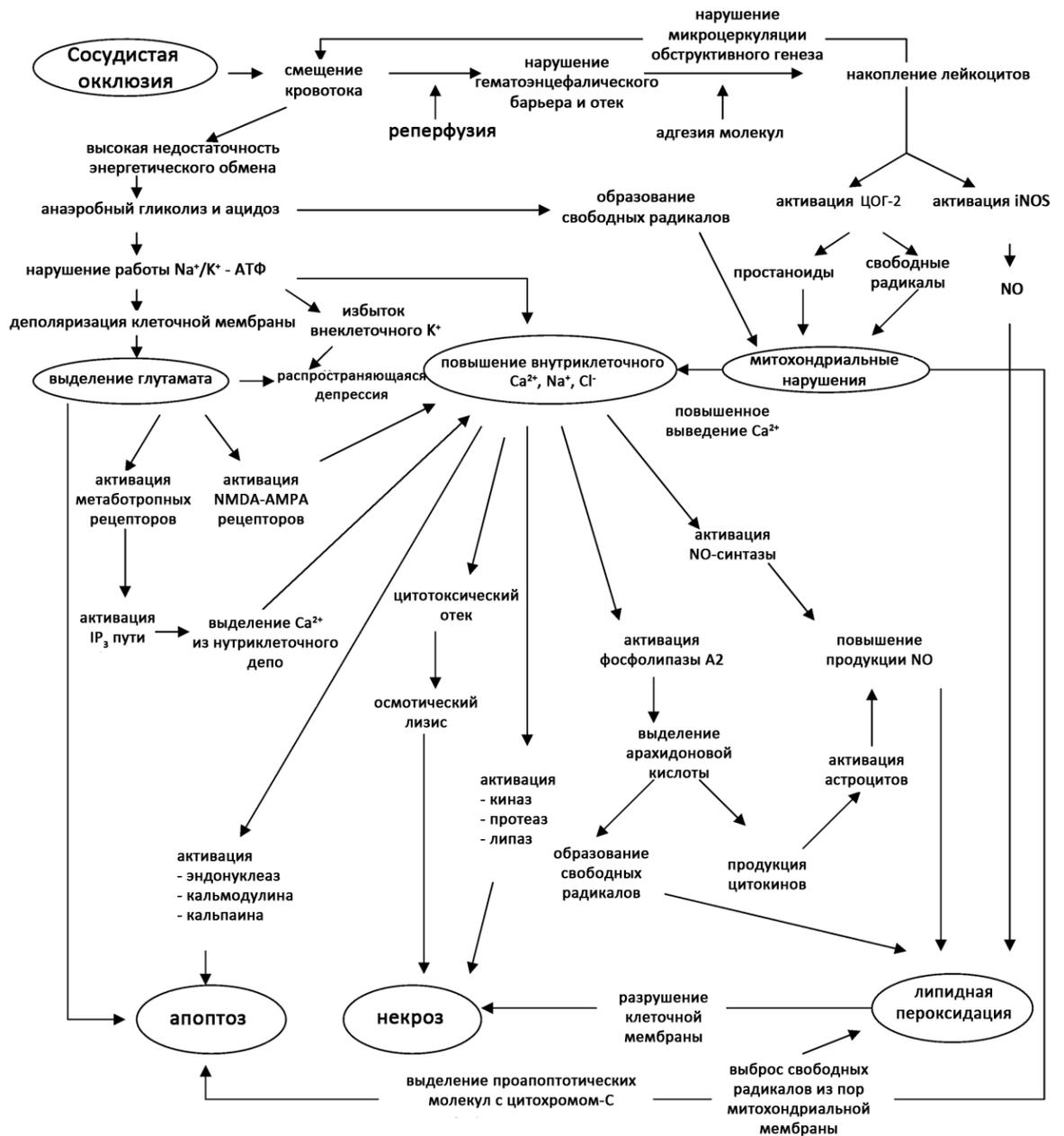


Рисунок 1.1. Патологический каскад ишемического повреждения в головном мозге [Durukan, 2007].

Подсемейство генов SLC9A делится на SLC9A1-11, кодирующее NHE-1-11 изоформу. К настоящему времени обнаружено уже 11 изоформ NHE: NHE-1–5,10,11 располагаются в клеточных мембранах, а NHE-6–9 находятся во внутриклеточном пространстве. NHE различаются по: тканевой специфичности, структуре, субклеточном распределении, кинетическим свойствам и индивидуальной чувствительности к фармакологическим ингибиторам [Luo, 2007; Annunziato, 2013; Karmazyn, 2013; Xu, 2015] (табл. 1.1).

Таблица 1.1. Изоформы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменника.

Изоформы	Разновидность	Локализация
NHE-1 <sup>1</sup>	Human	Кардиомиоциты, тромбоциты, головной мозг, базолатеральные мембраны различных тканей
NHE-2 <sup>1</sup>	Rat	Клетки желудка, ободочной кишки, тонкого кишечника, надпочечников
NHE-3 <sup>1</sup>	Rat	Тонкий кишечник, желудок (апикальная часть), эпителий проксимальных канальцев почек, кишечник)
NHE-4 <sup>1</sup>	Rat	Желудок, тонкая и толстая кишка, почечные канальца
NHE-5 <sup>1</sup>	Human	Мозг (гиппокамп), селезенка, семенники, скелетные мышцы
NHE-6 <sup>1</sup>	Human	Головной мозг, скелетные мышцы, сердце
NHE-7,8,9 <sup>1</sup>	Human	Мозг (затылочная доля), скелетные мышцы, секреторные ткани (желудка, простаты, поджелудочной железы, щитовидной железы)
NHE-10 <sup>2</sup>	Human	Остеобласты и остеокласты
NHE-11 <sup>2</sup>	Human, Rat	-

Семейство структурных белков NHE регулируются протеинкиназопосредованным фосфорилированием, а также рядом сигнальных молекул, включая фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат ( $\text{PIP}_2$ ), кальциневрин В, эзрин, радиксин, мезин (ERM), кальмодулин, и карбоангидразу II. Митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) [Зверев, 2003] является одними из наиболее

<sup>1</sup>Спасов, 2013; Malo, 2006; Luo, 2007.

<sup>2</sup>Lee, 2008.

<sup>2</sup>Электронный ресурс: [http://www.guidetopharmacology.org/..](http://www.guidetopharmacology.org/)

распространенных механизмов регулирования эукариотических клеток. МАРК млекопитающих активируются самыми разнообразными раздражителями, которые включают гормоны, факторы роста, цитокины, осмотический шок, ишемическое повреждение, и внутриклеточный ацидоз [Torres-López, 2013]. После активации МАРК происходит фосфорилирование NHE-1. Так же помимо МАРК существуют киназы, которые фосфорилируют NHE и стимулируют его активацию: ERK 1/2 (внеклеточные регулируемые киназы 1 и 2) [Fliegel, 2009], p90<sup>rsk</sup> (p90 рибосомальная киназа s6) [Fliegel, 2009], Rho-связанная киназа (ROCK) [Koliakos, 2008], NIK (Nck-взаимодействующая киназа) [Malo, 2006], CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин зависимая киназа II) [Slepков, 2007] (рис. 1.2).

В частности, внутриклеточное закисление приводит к фосфорилированию протеинкиназами остатков серина/треонина, которые располагаются на дистальной области С фрагмента и активации обменника.

Таким образом, активация NHE происходит в ответ на различные внеклеточные стимулы. И происходит это через взаимодействие вспомогательных белков или биологически активных веществ с С-доменом путем фосфорилирования [Torres-López, 2013].

NHE принимает участие в патогенезе многих заболеваний: сахарный диабет [Slepков, 2007], сердечная недостаточность [Cingolani, 2011], нарушение мозгового кровообращения [Luo, 2007], онкологические состояния [Spugnini, 2015].

### *1.3.2 Локализация изоформ NHE в структурах головного мозга*

При экспериментальном исследовании мозга грызунов было показано, что NHE-1 является наиболее распространенной изоформой, в то время как распределение других изоформ (например, NHE-2-4) имели ограниченный характер. Преимущественно NHE-1 распространена в области гиппокампа и коре головного мозга. NHE-3 изоформа была обнаружена только в клетках Пуркинье мозжечка [Verma, 2015].

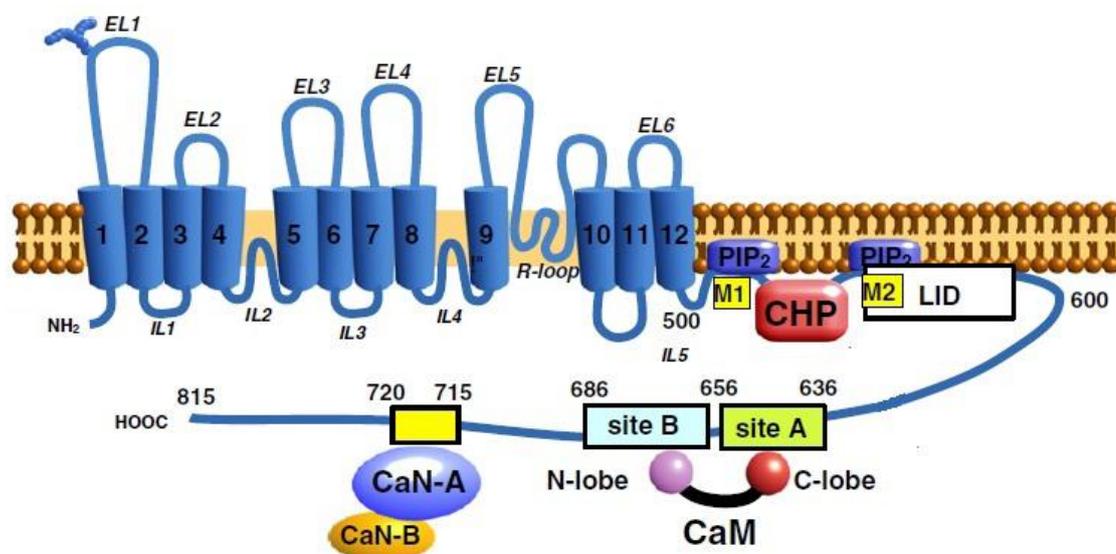


Рисунок 1.2. Топологическая модель NHE-1 [Wakabayashi, 2013].

Обозначения: EL1–EL6, внеклеточные петли 1–6; IL1–IL5, внутриклеточные петли 1–5; CaM (кальмодулин); CHP (кальциневрин (кальцийзависимая фосфатаза, белковая фосфатаза III) гомологичный белок (протеин); CaNA/B (Кальцинейрин A/B); CAII (карбоангидраза изоформа II); PIP<sub>2</sub> (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат); LID (липид-взаимодействующий домен).

Изменение активности данной изоформы у мышей, не способствовало возникновению нейродегенеративных или других неврологических симптомов, поэтому можно предположить меньшую роль NHE-3 в функционировании нервной системы по сравнению с другими изоформами. NHE-4 наименее распространена в головном мозге, чем в других органах. NHE-5 преимущественно экспрессируется в дискретных областях головного мозга, в том числе в зубчатой извилине коры головного мозга и гиппокампа [Luo, 2007; Diering, 2011; Karmazyn, 2013; Xu, 2015; Verma, 2015]. NHE-6, 7, 8 и 9 располагаются в головном мозге, однако об их физиологической роли в настоящее время нет исчерпывающих данных [Morrow, 2008; Ohgaki, 2010].

## **1.4 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обменник 1 изоформы (общая характеристика и распределение в клетках и тканях головного мозга)**

Наиболее активно изучена NHE-1 изоформа, которая широко распространена и была первой клонирована из тканей человека. Данный белок, кодируется SLC9A1, имеет в своем составе 815 аминокислот и содержит гидрофобный N-концевой трансмембранный домен, состоящий из 500 аминокислот и ответственный за катионный транспорт обменника, и гидрофильный внутриклеточный C-концевой трансмембранный домен длиной 315 аминокислот, необходимый для регулирования активности обменника [Donowitz, 2013].

NHE-1 располагается в кардиомиоцитах, эритроцитах, тромбоцитах (табл. 1.2) [Pedersen, 2006], а так же широко экспрессируется в различных структурах мозга: во всех изученных типах нейронов, глиальных клетках, эндотелиальных клетках мозговых капилляров и в эпителиальных клетках сосудистой оболочки [Lee, 2009].

### *1.4.1 NHE-1 в астроцитах*

Белок NHE-1 был обнаружен в астроцитах [Ruffin, 2014]. Астроциты образуют опорный аппарат центральной нервной системы и играют важную роль среди других клеток, регулирующих pH среды [Torres-López, 2013]. NHE-1 представляет собой наиболее важный транспортер плазматической мембраны, участвующий в регуляции pH астроцитов.

На примере с амилоридом было показано, что ингибирование NHE-1 ослабляет вредные последствия ишемии и реперфузии. Тем не менее, до сих пор неизвестно, связаны ли эти защитные эффекты с ингибированием активности NHE в нейронах или в астроцитах.

Впоследствии было показано, что снижение экспрессии гена, кодирующего белок NHE-1 у мышей, способствовало ограничению повышения Na<sup>+</sup> в корковых

астроцитах на фоне гипоксии, что может свидетельствовать об ишемическом повреждении реализуемом за счет активации NHE-1 в астроцитах (рис. 1.3) [Annunziato, 2013].

#### 1.4.2 NHE-1 в микроглии

Микроглия - особый класс глиальных клеток центральной нервной системы, к которым относятся фагоциты. NHE-1 в большом количестве экспрессируется и оказывает ключевую роль в поддержании внутриклеточного pH после ацидоза в [Liu, 2010]. Было показано, что фармакологическое ингибирование или генетическое устранение экспрессии генов NHE-1 не только уменьшало регулирование pH клетки, а также снижало продукцию супероксидного аниона, провоспалительных цитокинов и синтез NO при ишемии, как в пробирке, так и в естественных условиях (рис. 1.3) [Liu, 2010].

Таблица 1.2. Локализация и физиологические функции NHE-1 [Pedersen, 2006].

Орган	Локализация	Функция
Сердце	Кардиомиоциты (Т-трубочки и интеркалированные диски ) Эндотелиальные клетки аорты	Регулирование pH (устранение метаболического ацидоза) и объема клетки. Регулирование растяжения клетки (гипертрофия) и pH клетки.
Мозг	Нейроны (все изученные типы) Глиальные клетки (все изученные типы) Мозговые капиллярные эндотелиальные клетки Эпителиальные клетки сосудистой оболочки	Регулирование pH (устранение метаболического ацидоза). Регулирование pH и объема клетки. Перенос ионов Na <sup>+</sup> и регулирование pH. Ионный транспорт.
Кровь	Эритроциты Тромбоциты Лейкоциты	Регулирование насыщения и сродства гемоглобина O <sub>2</sub> , объема и pH клетки. Активация тромбоцитов. Регулирование объема, pH, активация.

### *1.4.3 NHE-1 в олигодендроцитах*

Как и астроциты олигодендроциты относятся к глиальным клеткам, которые образуют миелиновые оболочки. Одна из основных функций - формирование оболочек аксонов в ЦНС.

Было показано Ро и Carson [Ro, 2007], что олигодендроциты содержат NHE-1,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  транспортер (NBC) и карбоангидразу II (CaII) [Annunziato, 2013]. Так, CaII является основным изоферментом, который концентрируется в миелиновом отсеке олигодендроцитах головного мозга. CaII и NHE-1 локализуется в перикарионе, а NBC в отростках. С-терминальный цитоплазматический домен NHE-1 взаимодействуют с CaII и способствуют выталкиванию ионов  $\text{H}^+$  при закислении среды (рис. 1.3) [Annunziato, 2013].

Таким образом, учитывая, что NHE-1 регулирует pH в данном виде клеток, то можно предположить, что при ишемическом повреждении изменение активности NHE в них может оказывать нейропротекторное действие.

### *1.4.4 NHE-1 и гематоэнцефалический барьер*

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является физическим и метаболическим барьером между кровеносными сосудами и окружающей паренхимой головного мозга. Он играет важную роль в поддержании нормального функционирования ЦНС и его гомеостаза. Эндотелиоциты капилляров мозга составляют анатомическую основу ГЭБ [Leng, 2014]. Ишемия головного мозга приводит к нарушению целостности ГЭБ и повышению проницаемости, что являются факторами, приводящими к нейродегенеративным процессам вследствие выхода в периферический кровоток забарьерных антигенов с последующим запуском механизмов иммунного ответа, развитием вторичной нейродегенерации и нарушением функции нейротрансмиттерных систем [Блинов, 2013; Zhang, 2012].

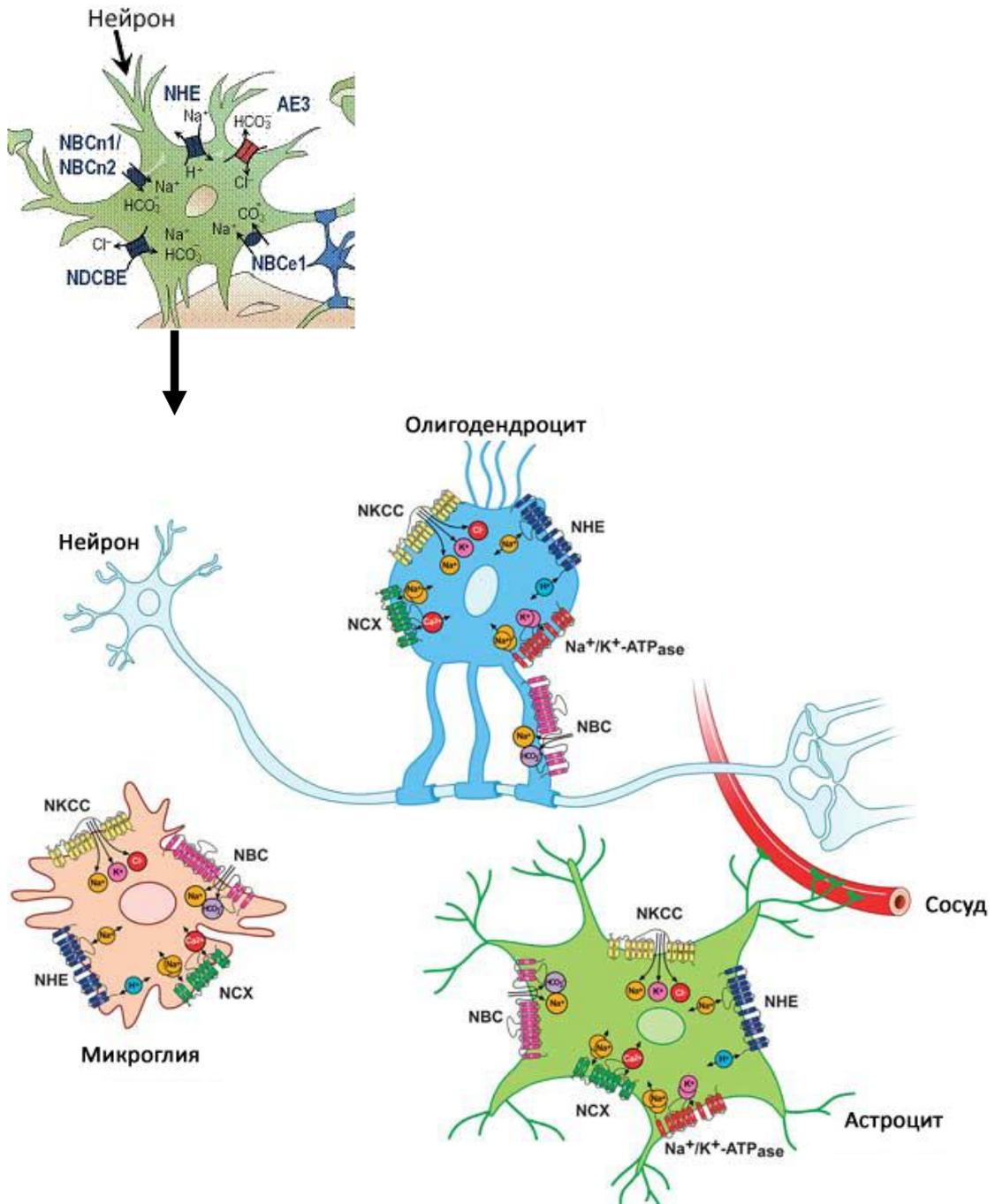


Рисунок 1.3. Распределение  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменника в клетках головного мозга [Annunziato, 2013; Ruffin, 2014].

Обозначения: Основные ионные транспортеры, выраженные в микроглии, астроцитах, и олигодендроцитах. NBC ( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ – транспортер); NCX, ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник); NHE ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник); NKCC, ( $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{Cl}^-$  транспортер).

NHE-1 располагается в эндотелиальных клетках мозговых капилляров ГЭБ. [Leng, 2014]. При ишемии головного мозга активация NHE способствует

разрушению ГЭБ и формированию отека [Leng, 2014]. Так, при применении селективного ингибитора NHE-1 SM-20220 на модели окклюзии средней мозговой артерии (СМА) у крыс было показано снижение отека и повреждения головного мозга. Введение НОЕ-642 в первые часы ишемии СМА у крыс способствовало ограничению отека мозга и уменьшению внутриклеточного  $\text{Na}^+$  [O'Donnell, 2013]. Кроме того, NHE-1 может играть определенную роль в дисфункции ГЭБ путем изменения ее проницаемости. С помощью окрашивания Синим Эвансом, было показано, что ингибирование NHE-1 сабипоридом способствовало снижению проницаемости ГЭБ [Park, 2010; Leng, 2014].

Таким образом, сохранение структурной и функциональной целостности эндотелиоцитов капилляров мозга ГЭБ имеет решающее значение для терапевтических подходов, предназначенных для снижения ишемического повреждения головного мозга.

Защитные эффекты ингибирования NHE-1 основных структур сосудисто-нервной системы (т.е. эндотелия ГЭБ, а также астроцитов, олигодендроцитов, микроглии и нейронов) продемонстрировали свой потенциал в качестве новой терапевтической мишени при ишемии головного мозга [Leng, 2014].

## **1.5 Роль NHE-1 в развитии патологии головного мозга**

### *1.5.1 Церебральная ишемия*

NHE-1 является основным регулятором внутриклеточного pH как при физиологических, так и при патологических условиях в головном мозге [Verma, 2015]. Кроме того, исследования, проведенные на нулевых по гену, кодирующему NHE-1 мутантных мышях показали, что NHE-1 является основной изоформой обменника регулирующей внутриклеточный pH корковых астроцитов. NHE также присутствуют в гематоэнцефалическом барьере [Helmu, 2012], и около 50% трансцеллюлярного транспорта натрия в крови приходится на NHE и натриевые каналы. Исследования показали, что повышение активности NHE в ГЭБ при

ишемическом повреждении головного мозга [Helmy, 2012], способствовало внутриклеточной перегрузке натрием, и отеку головного мозга [Chang, 2008; Liu, 2010]. Введение SM-20220 (селективного ингибитора NHE-1) способствует предотвращению разрушения эндотелиальных клеток ГЭБ при ишемическом повреждении головного мозга [Verma, 2015].

Различные доклинические исследования показали, что фармакологическое или генетическое ингибирование NHE приводит к нейропротекторному эффекту в условиях ишемического повреждения головного мозга [Wang, 2008]. Kendall и его коллеги [Verma, 2015] показали, что N-метил-изобутил-амилорид (неселективный ингибитор NHE) уменьшает повреждение головного мозга на модели неонатальной ишемии. Так при введении амилорида за 30 мин до ишемии было показано значительное нейропротекторное действие в переднем мозге и гиппокампе. Применение селективного ингибитора NHE-1 диметиламилорида также уменьшало объем зоны инфаркта мозга у спонтанно гипертензивных крыс после окклюзии средней мозговой артерии [Hom, 2007]. В более позднем исследовании, лечение N-метил-изобутил-амилоридом после тяжелой перинатальной асфиксии у поросят приводило к нейропротекторному эффекту [Robertson, 2013].

Эксперименты в пробирке на культуре данных клеток также продемонстрировали, что NHE-1 играет значительную роль в активации микроглии. При ингибировании NHE-1 карипоридом (НОЕ-642) наблюдали снижение проявления различных повреждающих клеточных событий, таких как повышение рН, увеличение внутриклеточного содержания  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , образование супероксид аниона и цитокинов на фоне гипоксии [Liu, 2010].

Sengiz и соавторы [Verma, 2015] показали, что после 72 ч гипоксии наблюдали реактивный астроглиоз в гиппокампе, который характеризуется быстрым синтезом глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и NHE-1 экспрессии. Соответственно, было предположено, что активация NHE-1 в реактивных астроцитах приводит к гибели нейронов. НОЕ-642 оказывает нейропротекторное действие за счет ингибирования NHE-1 активности в

реактивных астроцитах и уменьшения вредных эффектов, которые способны оказывать реактивные астроциты на нейроны. Была выдвинута гипотеза, что активация NHE астроцитов во время ишемии/реперфузии способствует повышению высвобождения глутамата и перегрузке кальцием [Verma, 2015].

Карипорид предотвращал глутамат-индуцированную некротическую и апоптотическую гибель нейронов за счет снижения внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и производства активных форм кислорода [Verma, 2015].

Было показано, что оба NHE ингибитора (SM-20220, NOE-642) и антагонист (NMDA) рецептора (МК-801) ослабляют вызванную глутаматом гибель нейронов в культуре крысиных корковых нейронов, тем самым подтверждая гипотезу, о том, что негативные эффекты NHE активации опосредуются косвенно, через высвобождения глутамата. С другой стороны, глутамат также участвует в активации NHE в головном мозге, создавая своеобразный порочный круг. Глутамат вызывает перегрузку нейронов кальцием, дисфункцию митохондрий, нарушая синтез АТФ, что в свою очередь понижает рН и активизирует NHE. Увеличение внутриклеточного  $\text{Na}^{+}$  из-за активации NHE вызывает внутриклеточную перегрузку  $\text{Ca}^{2+}$ , ведущую к выпуску провоспалительных цитокинов, которые приводят к гибели клеток головного мозга [Ruffin, 2014] (рис. 1.4).



Рисунок 1.4. Участие NHE-1 в развитии церебральной ишемии [Verma, 2015].

Manhas и соавторы показали, что кратковременное повышение фосфорилирования NHE-1 во время ранней реперфузии (3-10 мин) у мышей сопровождалось одновременным повышением внеклеточной интенсивности экспрессии p90 рибосомальной киназы s6 (P<sup>90</sup> PCK). Иммунофлуоресцентный анализ показал значимое увеличение p90 PCK киназы NHE-1 при ишемии в нейронах полосатого тела и нейронах коры головного мозга. Кроме того, прямое ингибирование p90 PCK киназы его селективным ингибитором фторметилкетонем способствовало не только снижению экспрессии NHE-1, но также уменьшению области инфаркта на 60% и количества выродившихся нейронов на 80%. Таким образом, реперфузия способствует кратковременной стимуляции ERK/p<sup>90</sup> PCK пути, и активации p<sup>90</sup> PCK, усугубляя ишемическое повреждение головного мозга за счет активации NHE-1 белка [Manhas, 2010].

Напротив, Douglas и его коллеги показали уменьшение экспрессии кислотно-основных транспортных белков, таких как NHE и Na<sup>+</sup>/HCO<sup>3-</sup> в ответ на хроническую непостоянную гипоксию в головном мозге мышей. Было установлено, что экспрессия NHE-1 и NHE-3 изоформы уменьшилась во всех отделах ЦНС, особенно в мозжечке и гиппокампе, которые наиболее чувствительны к гипоксии. Уменьшение экспрессии белков, отвечающих за кислотно-щелочной эффект во время хронической непостоянной гипоксии, рассматривают как активацию адаптационных клеточных механизмов (уменьшение синтеза клеточного белка и минимизация расхода энергии метаболических резервов при гипоксии). Тем не менее, данный вариант регулирования снижения кислотности оказывает влияние на нейроны, которые более склонны к повреждению во время хронической постоянной гипоксии, в основном, располагающиеся в области мозжечка и гиппокампа [Verma, 2015].

В условиях ишемии/реперфузии головного мозга происходит нарушение клеточных мембран клеток крови. В повреждение головного мозга вовлекаются различные иммунные клетки: лимфоциты, лейкоциты, лимфобласты и др.

Известно, что NHE первой изоформы экспрессируется не только в различных структурах головного мозга, но и в клетках крови. В норме обменник выполняет различные функции: в эритроцитах регулирует сродство и насыщение гемоглобина  $O_2$ , в тромбоцитах, эритроцитах и лимфоцитах отвечает за объем и pH клетки [Boedtkjer, 2012; Chang, 2015]. В условиях ишемическо-реперфузионного повреждения происходит активация NHE-1, что приводит к повышению образования агрегатов эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов (рис. 1.5) [Ichard, 2011; Chang, 2015]. Гемостаз с участием тромбоцитов может быть разделен на четыре фазы: адгезию, активацию, секрецию и агрегацию. NHE-1 играет важную роль в регуляции  $H^+$  и  $Na^+$  гомеостаза в тромбоцитах. Скоординированная работа гликопротеиновых рецепторов (IIA, IIB и т.д.) с NHE-1 и  $Na^+/Ca^{2+}$  обменником приводит к повышению уровня  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и агрегации тромбоцитов, лейкоцитов. Карипорид (селективный ингибитор NHE-1) оказывает тормозящее действие на дегрануляцию тромбоцитов человека и на формирование агрегатов тромбоцитов и лейкоцитов [Chang, 2015].

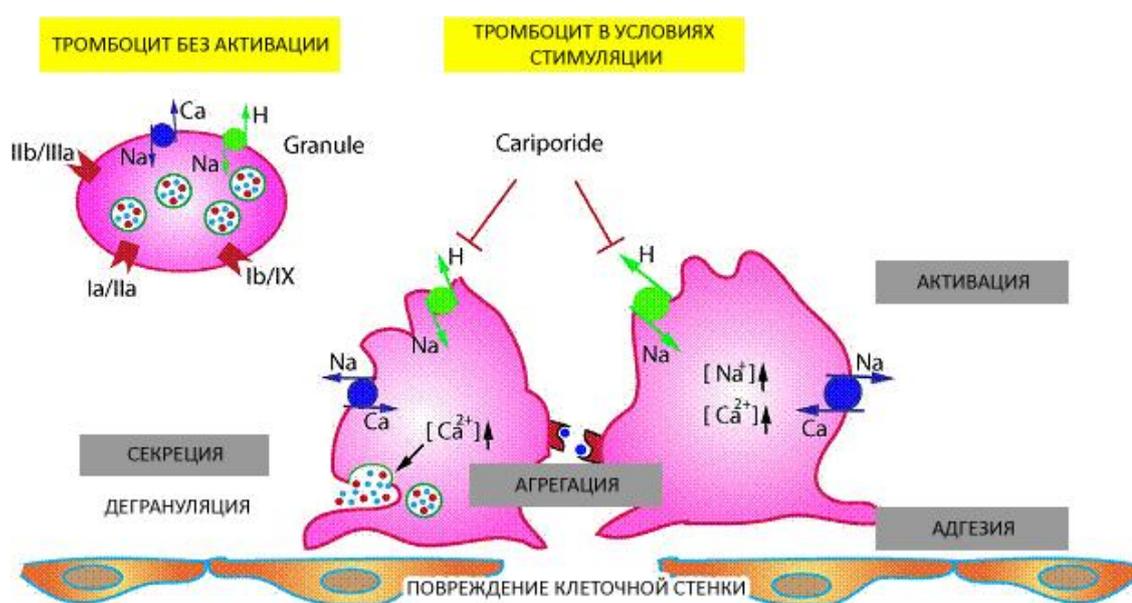


Рисунок 1.5. Механизм активации NHE-1 в тромбоцитах [Chang, 2015].

Также NHE-1 играет важную роль в некоторых типах иммунных клеток. В нейтрофилах NHE-1 способствует регулированию pH, что является необходимым

условием для их функционирования [Boedtkjer, 2012], индукции Ig E и стимуляции макрофагов [Wang, 2011].

### *1.5.2 Слабоумие*

Болезнь Альцгеймера является прогрессирующим нейродегенеративным расстройством и считается наиболее распространенной формой слабоумия, которая характеризуется образованием бета-амилоидного белка и его отложение в виде бляшек в сосудах и паренхиме мозга. Однако некоторые исследования показали, что не только повреждение головного мозга приводит к патологии, но и различные системные изменения лимфобластной активности. Urcelay [Verma, 2015] и его сотрудники связывают патологическую пролиферацию лимфобластов с активацией NHE и изменение pH среды у пациентов с болезнью Альцгеймера (рис. 1.6).

Было сделано предположение, что  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-опосредованная активация NHE-1 может внести существенный вклад в аномальную пролиферацию лимфобластов у больных с болезнью Альцгеймера.

Помимо 1 изоформы NHE в нейрональном возбуждении и длительном потенцировании принимают участие и другие изоформы, такие как NHE-4 и NHE-5. Лечение амилоридом, неселективным NHE ингибитором, способствовало контролю возбудимости нейронов и их пластичности у животных возраста 8 недель (молодых) и 30 месяцев (стареющих) [Rönicke, 2009]. Наряду с NHE-1, NHE-4 и NHE-5 также преобладают в нейронах гиппокампа. Таким образом, эффекты амилорида оказывали ингибирующее влияние на все три изоформы [Rönicke, 2009]. Аномальная экспрессия изоформы NHE-6 способствовала ненормальной агрегации тау-белка и развитию таупатии, что в конечном итоге приводила к деменции. Ген SLC9A6 кодирует белок изоформы NHE-6. Удаление 9 пары оснований приводит к мутации в гене, вызывая аномальное отложение тау-белка и гибель нейронов (рис. 1.6) [Garbern, 2010]. В норме данный белок скрепляет и стабилизирует микротрубочки, обеспечивающие

перенос через цитоплазму нейронов клеточных органелл, гликопротеидов и других образований. Чрезмерное фосфорилирование нарушает его функцию [Verma, 2015] из-за мутации в гене SLC9A6 NHE-6 и способствует связыванию нитей белка в нейрофибриллярные клубки и разрушению транспортной системы нейрона [Garbern, 2010] (рис. 1.6).



Рисунок 1.6. Участие NHE-1 в развитии болезни Альцгеймера [Verma, 2015].

### 1.5.3 Эпилепсия

Роль NHE-1 также была исследована в модуляции электрических свойств нейронов и судорожной активности как в пробирке, так в естественных условиях. Функциональные дефекты NHE-1 способны изменять нейронную активность, приводящие к различным патологиям ЦНС, таким как эпилепсия. Было показано, что генетическая модификация гена NHE-1 у мышей образует нефункциональные изоформы NHE-1, что в свою очередь приводит к развитию эпилептических припадков, атаксии и высокой смертности в течение 2 - 3 недель [Verma, 2015]. Функциональное развитие NHE-1 в процессе эмбриогенеза играет роль в возникновении данной патологии. Gu и его коллеги сообщили, что изменение активности у мышей NHE-1 увеличивает ток  $\text{Na}^+$  в клетку, что приводит к

аномальному возбуждению нейронов гиппокампа CA1 и развитию эпилепсии [Verma, 2015]. Соответственно, было предположено, что NHE в различных областях мозга, включая гиппокамп и кору, оказывает регулирующее действие на  $\text{Na}^+$  каналы. Нарушение активности функционирования обменника приводит к изменению возбудимости нейронов и развитию эпилепсии.

С другой стороны, роль активированной NHE в формировании эпилепсии реализуется за счет рН-опосредованного увеличения возбудимости нейронов или косвенного NHE-опосредованного увеличения внутриклеточного  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмена (NCX). Активация NCX в свою очередь способствовала внутриклеточной перегрузке  $\text{Ca}^{2+}$  и повышению высвобождения нейромедиатора глутамата. Применение ингибитора NHE амилорида или карипорида способствует подавлению активности нейронов (рис. 1.7) [Verma, 2015].

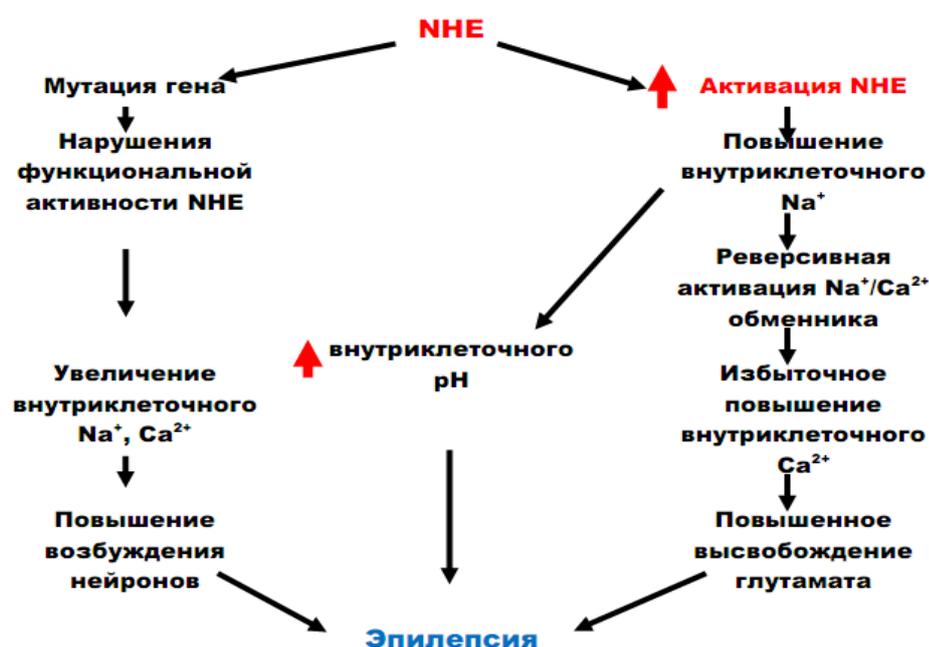


Рисунок 1.7. Роль NHE в развитии эпилепсии [Verma, 2015].

### 1.5.4 NHE-1 и боль

Изменение активности NHE-1 играет роль в реализации болевого синдрома. Однако, были получены неоднозначные результаты на различных экспериментальных моделях болевой чувствительности.

Так, при изучении острой воспалительной боли на модели формалин-индуцированной чувствительности Castañeda-Corral и сотрудники с помощью иммуногистохимических методов показали значительное снижение экспрессии NHE-1 в ипсилатеральных и контралатеральных боковых спинальных ганглиях и задних рогах спинного мозга крыс, предполагая активное участие NHE в процессах реализации боли как на периферии, так и на уровне спинного мозга [Castañeda-Corral, 2011; Castañeda-Corral, 2012]. Введение частичного селективного ингибитора NHE-1, такого как диметилсульфоксид амилорида (DMA), EIPA (0,3-30 мкМ / крыса) и селективного NHE-1 ингибитора зонипорида (0,03-3 мкМ / крыса) способствовало значительному увеличению формалин-индуцированной ноцицепции [Castañeda-Corral, 2011]. Соответствующие данные свидетельствуют о том, что NHE-1 играет важную роль в качестве внутриклеточного рН регулятора и защитного механизма в ноцицептивных нейронах при острой воспалительной боли [Torres-López, 2013].

Роль NHE1 в невропатической боли была менее изучена. Системное введение амилорида ослабляет винкрестин-индуцированную хроническую невропатическую боль. Авторы объясняют наблюдаемые антиноцицептивные эффекты у амилорида ингибированием активности NHE и последующим снижением ионов  $Ca^{2+}$  и окислительного стресса [Torres-López, 2013; Verma, 2015].

## 1.6 Ингибиторы NHE-1

Вследствии активного участия NHE-1 в патогенезе различных заболеваний, активно ведется поиск среди ингибиторов NHE-1.

### 1.6.1. Классификация ингибиторов NHE-1 [модификация, Orłowski, 2011]

Ингибиторы NHE подразделяются на:

I. Производные пиразина (амилорид, DMA, EIPA, MIBA).

II. Бензоилгуанидины и производные (НОЕ-642, НОЕ-694, EMD-96785).

III. Моноциклические производные гуанидина:

а) Производные метакрилоилгуанидина (S1611, S3226).

IV. Бициклические производные гуанидина:

а) производные индолоилгуанидина (SM-20220);

б) производные хинолина (зонипорид).

V. производные бензимидазолов (378488, 452945) [Thomson Reuters Integrity, 2011].

В настоящее время для подавления NHE-1 активности используются два основных класса фармакологических средств [Putney, 2002]. Первый класс препаратов включает амилорид и его 5'-алкилзамещенные производные [Counillon, 1993], такие как этилизопропилаамилорид (EIPA), диметилаамилорид (DMA), 5-N (метилпропил) амилорид (MPA), 5-(N-метил-N-изобутил)-амилорид (MIBA) и 5-(N, N-гексаметилен)-амилорид (HMA). Эти агенты являются более эффективными ингибиторами NHE-1, чем амилорид, но имеют относительно слабую селективность в отношении NHE-1. Замену арильной группы на фенильную приводит образованию другого класса ингибиторов, который включает в себя бензоилгуанидины и производные, такие как НОЕ 694 [Counillon, 1993] и НОЕ 642 (карипорид) [Scholz, 1995]. Оба класса являются более специфичными для NHE-1, чем для NHE-3. НОЕ соединения рассматриваются как наиболее перспективные агенты для лечения ишемии-реперфузии головного мозга из-за их селективности в отношении NHE-1 и превосходной растворимостью и биодоступностью [Хуе, 2010]. НОЕ соединения являются конкурентными ингибиторами связывания  $\text{Na}^+$  на внеклеточных катион-связывающих сайтах, а производные амилорида также действуют не селективно. В последнее время были разработаны несколько новых молекул в качестве потенциальных блокаторов NHE на основе бициклической структуры, в том числе

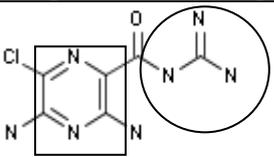
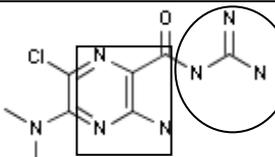
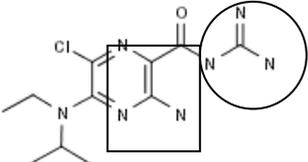
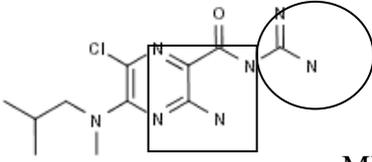
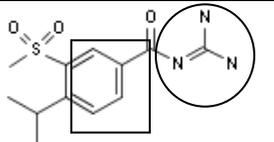
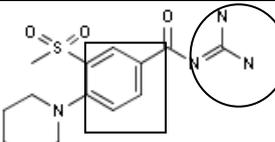
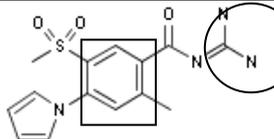
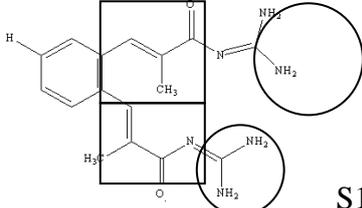
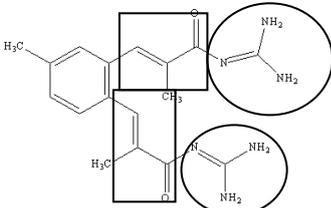
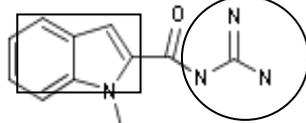
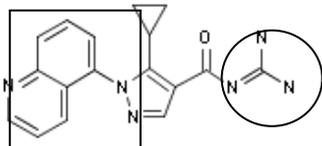
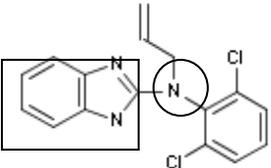
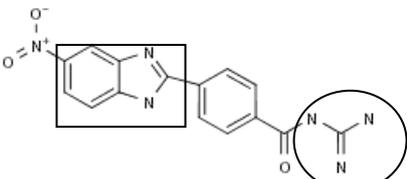
производные индолоилгуанидина (SM-20220, SM-20550), которые также показали многообещающие результаты при церебральной ишемии *in vivo* [Kitayama, 2001]. IC<sub>50</sub> для человеческого NHE-1 следующие: амилорид = 10,7 мкМ, карипорид = 0,08 мкМ, T-165229 = 13 нМ.

Важно отметить, что ингибиторы NHE, NOE 642 и SM-20220, не только уменьшают отек и гибель клеток, но и уменьшают неврологическую симптоматику в постишемическом периоде [Kuribayashi, 2000; Kintner, 2007]. В настоящее время появились данные о наличии способности ингибировать Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обменник у производных бензимидазолов, отличительной особенностью которых также является наличие нециклической гуанидиновой группы [Zhang, 2007] (табл. 1.3).

При анализе базы данных Thomson Reuters Integrity, содержащей 481 соединение, проявляющие NHE-ингибирующую активность, было выявлено, что среди всех таких соединений ~54% являются производными гуанидина, ~9% являются производными бензимидазола и ~6% - соединениями аминобензимидазола, которые находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований. Всего в базе данных Thomson Reuters Integrity находится 293 соединения, производных гуанидина и бензимидазола, имеющих отношение к той или иной терапевтической группе. Среди них большее количество соединений входят в терапевтические группы для лечения стенокардии, нарушений ритма сердечных сокращений, нарушений мозгового кровотока и лечения сердечной недостаточности [база данных Thomson Reuters Integrity, 2011].

В настоящее время наиболее активным для селективного фармакологического ингибирования NHE-1 считается производное бензоилгуанидина - зонипорид [Tracey, 2003].

Таблица 1.3. Химические структуры некоторых ингибиторов Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обмена.

I. Производные пиразина	
 <p>.HCl .H<sub>2</sub>O .H<sub>2</sub>O Амилорид</p>	 <p>.HCl DMA</p>
 <p>EIPA</p>	 <p>MIBA</p>
II. Бензоилгуанидины и производные	
 <p>.CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H Карипорид(HOE-642)</p>	 <p>.HCl HOE-694</p>
 <p>.CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H Этипорид(EMD-96785)</p>	
III. Моноциклические производные гуанидина: а) Производные метакрилоилгуанидина	
 <p>S1611</p>	 <p>S3226</p>
IV. Бициклические производные гуанидина: а) производные индолоилгуанидина	
 <p>.CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H SM-20220</p>	
б) производные хинолина	
 <p>.HCl H<sub>2</sub>O Зонипорид</p>	
V. Производные бензимидазолов	
 <p>378488</p>	 <p>.HCl 452945</p>

В экспериментальных исследованиях он ограничивал повреждение головного мозга (уменьшал выраженность отека и зоны некроза) и способствовал восстановлению неврологических показателей [Lee, 2009]. Однако существуют данные о нейротоксическом действии зонипорида, что существенно ограничивает его использование.

Исходя из теоретических предпосылок и предварительных экспериментальных данных, представлялось целесообразным провести поиск соединений с нейропротекторной активностью среди новых производных циклических гуанидинов.

## 1.7 Заключение

Поиск новых способов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения на сегодняшний день остается актуальной проблемой. К настоящему времени разработаны и изучены в экспериментальных условиях несколько десятков соединений, обладающих нейропротекторной активностью [Бачурин, 2008; Мирзоян, 2012; Тюренокв, 2015]. Однако в клинической практике лечения больных с церебральным инсультом нашли применения лишь единичные препараты [Петров, 2011; Середенин, 2013; Peter, 2008]. NHE-1 играет важную роль в патогенезе ишемии/реперфузии. Положительные основные эффекты ингибиторов NHE-1 в экспериментах связаны с ограничением ишемического повреждения головного мозга: уменьшением зоны некроза, отека и восстановлением неврологических показателей.

В базу данных Thomson Reuters Integrity входят 293 соединения, производных гуанидина и бензимидазола, среди которых есть соединения, относящиеся к терапевтической группе нарушения мозгового кровотока.

Таким образом, на основании представленных данных актуальным является поиск ингибиторов NHE-1 циклических производных бензимидазола и производных 2-аминобензимидазола, содержащих гуанидиновую группу.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы исследования

#### 2.1.1 Соответствие работы правилам и рекомендациям к проведению экспериментальных исследований

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правил 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 эксперименты были одобрены Этическим комитетом Волгоградского Государственного Медицинского Университета (протокол № 126-2011 от 15 февраля 2013 года). Забой животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). Острую токсичность соединений исследовали в соответствии с требованиями по проведению доклинических испытаний [Арзамасцев, 2012].

#### 2.1.2 Перечень используемых реактивов и веществ

*Реактивы:* натрия пропионат (MP Biomedicals, Inc., Франция), NEPES (GERBU, Германия), кальций хлористый 2-х-водный (дигидрат)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), магний хлористый 6-водный «ч»  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ЗАО «УНИХИМ», Россия), D-глюкоза (безводная) кристаллическая «ч»  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), натрий хлористый «ХЧ»  $\text{NaCl}$  (ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия), калий хлористый «ЧДА»  $\text{KCl}$  (ООО «РЕАХИМ», Россия), калий фосфорнокислый однозамещённый  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  «ЧДА» (ОАО «Петербургский Красный химик», Россия), магний сернистоокислый 7-водный  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ООО

«РЕАХИМ», Россия), гидрокарбонат натрия  $\text{NaHCO}_3$  (ООО «РЕАХИМ», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), этанол 96°, хлоралгидрат («Panreac», Barcelona), цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), 10% забуференный нейтральный формалин (ООО «МоДиТех, Казань»), никотин («Sigma», США), ареколин («Фармакон», Россия), резерпин («Sigma», США), галоперидол («Мосхимфармпрепараты», Россия), апоморфин («ICN Biomedical», США), 3,4-диокси-L-фенилаланин («Sigma», США), 5-гидрокси-L-триптофан («Sigma», США), пикротоксин («Sigma», США), клофелин («Биомед», Россия), натрия хлорида раствор 0,9% («Эском», Россия), динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Sigma, США). Субстанции веществ (препараты сравнения) ацетилсалициловая кислота («Sigma», США), зонипорид («Sigma», США), магния сульфат (ООО «Фармстандарт», Россия), глицин («Serva», Германия). Красители: 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (SIGMA, США). *Наборы:* набор реактивов для иммуноферментного анализа Rat neuron-specific Enolase (NSE) Elisa Kit фирмы CUSABIO (Китай) и Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Enolase, Neuron Specific (NSE) Organism Species: Rattus norvegicus (Rat) Elisa Kit фирмы Cloud-Clone Corp. (США).

Изучены 25 веществ под лабораторными шифрами «РУ», которые содержат не только свободную, но и частично встроенную гуанидиновую группу (табл. 2.1).

Исследуемые вещества синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

Таблица 2.1. Химические структуры изучаемых соединений.

№	Шифр соединения	R	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
<b>I. Производные 2-аминобензимидазола</b> Ia. 1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия					
1	ПУ-1199	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	$\text{Br}^-$	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{BrFN}_4\text{O}$	461,39
2	ПУ-1200	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$	$\text{Br}^-$	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrFN}_4\text{O}_2$	463,37
3	ПУ-1355	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$	$\text{Cl}^-$	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_2$	418,90
4	ПУ-1390	$-(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$\text{Br}^-$	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{BrFN}_4\text{O}$	449,39

Таблица 2.1 (продолжение)

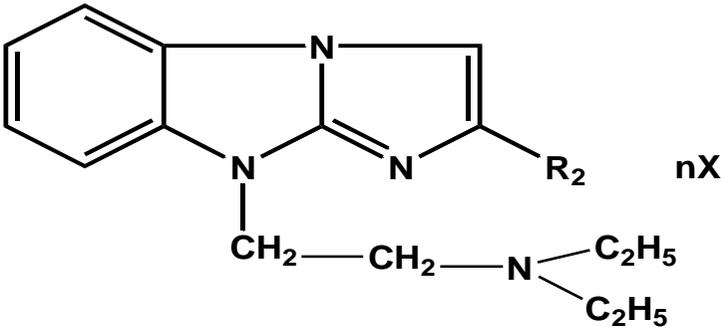
№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
<b>II. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-a]бензимидазола</b>					
					
1.	ПУ-64	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HNO <sub>3</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> -	458,4
2.	ПУ-185	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBr	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	526,2
3.	ПУ-292	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	465,4
4.	ПУ-35	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	484,2
5.	ПУ-1193	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	439,8

Таблица 2.1 (продолжение)

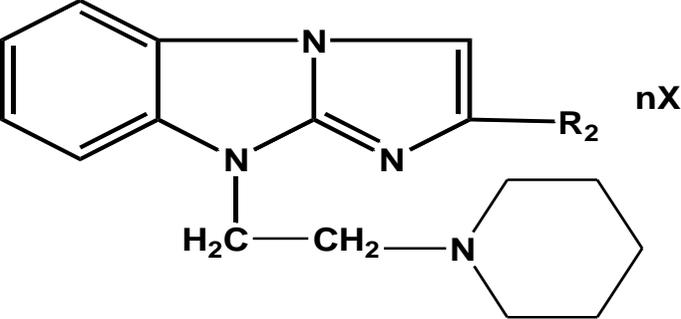
№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
<b>II. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-a]бензимидазола</b>					
					
6.	ПУ-17	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HCl	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	417,3
7.	ПУ-87	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	2HCl	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	433,3
8.	ПУ-376	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBrX2H <sub>2</sub> O	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	574,3
9.	ПУ-67	-C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	2HCl	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	447,4
10.	ПУ-293	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	477,4
11.	ПУ-1189	-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	461,3
12.	ПУ-1204	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> F	2HCl	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub>	435,3
13.	ПУ-66	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	496,2
14.	ПУ-273	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	451,8

Таблица 2.1 (продолжение)

№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
<b>II. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-a]бензимидазола</b>					
15.	ПУ-284	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	419,3
16.	ПУ-474	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HBr	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	508,2
17.	ПУ-374	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBrX2H <sub>2</sub> O	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	576,2
18.	ПУ-294	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	479,3
19.	ПУ-1205	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> F	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O	437,3
20.	ПУ-1191	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	498,2
21.	ПУ-285	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O	453,7

### 2.1.3 Список использованного программного обеспечения

В работе использовалось следующее программное обеспечение CS Chem3D 8.0; MORAC2009 [Stewart, 2011]; программный пакет AutoDock Vina 1.1.1 в комплекте с дополнительными инструментами AutoDock Tools и PyMol [Trott, 2011], программы HyperChem 7.1 Evaluation Copy 2002 [HyperCube Inc. URL: <http://www.hyper.com>]; ChemDraw Ultra 8.0 (США), Adobe Photoshop 4.0 (США), компьютерная программа Image J 1.46r (США), компьютерная программа AGGR версия 4.0 фирма Биола, Россия; программа Минимакс Доплер версия 1.7, Россия; программа Scorerphoto версия 3.0, США. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «GraphPad.Prism.5.0» (США) и Excel 2007 (MS OfficeXP, США).

### 2.1.4 Экспериментальные животные

Исследования были выполнены 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 в условиях вивария (температура 22-24°C), с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92). На момент проведения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования. В течение 18 часов до проведения экспериментов животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. Поставщик ООО «Питомник лабораторных животных АМТН», ветеринарное свидетельство 250 № 0469483 от 16.02.2014 (крысы); ООО «Питомник РАМНТ», ветеринарные свидетельства 250 № 0503605 от 1.06.2014 (крысы); 250 № 0503688 от 13.07.2014 (мыши); 250 № 0380791 от 14.01.2013 г., поставщик ФГБУ НЦБМТ РАМН (кролики); 247 № 0111207 от 18.12.2013 г., поставщик ФГУП «Питомник лабораторных животных» «Рапполово» (крысы,

мышь).

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Методы поиска ингибиторов NHE-1 *in vitro*

Для поиска веществ, обладающих блокирующей активностью в отношении NHE обменника, был использован метод *in vitro* на тромбоцитах кролика [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002] в модификации Гуровой Н.А. [2011]<sup>2</sup>. Изменение формы тромбоцитов регистрировали по светопропусканию с помощью лазерного агрегометра «БИОЛА-220 ЛА», Россия при добавлении буферного раствора, содержащего пропионат натрия. Забор крови проводили из краевой вены уха кролика (n=25) в пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия, в соотношении 1:10. Получение богатой тромбоцитами плазмы (ПБогТ) производили путем центрифугирования цельной крови на центрифуге Multi centrifuge CM 6M (Латвия) при 1000 оборотах в минуту в течение 12 минут. Для снижения внутриклеточного рН в контрольные пробы 200 мкл ПБогТ добавляли 600 мкл раствора пропионата натрия (в ммоль/л: Na пропионат 135, HEPES 20, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, глюкоза 10; рН 6.7; t=37<sup>0</sup>C). После чего происходила, активация NHE-1 и увеличивался приток натрия в клетки, что приводило к выделению цитозольного H<sup>+</sup> и отеку (сферуляции) тромбоцитов вследствие аккумуляции воды в цитоплазме. При этом наблюдалось снижение светопропускания плазмы. Для оценки изменения светопропускания в условиях нормальной рН в контрольной серии экспериментов использовали раствор Кребса (600 мкл, в ммоль/л: NaCl – 120, KCl – 4,8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, MgSO<sub>4</sub> – 2,5, NaHCO<sub>3</sub> – 25, CaCl<sub>2</sub> – 2,6, глюкоза – 5,4; рН 7,4; t=37<sup>0</sup>C). Изменения формы тромбоцитов регистрировали на основании уровня светопропускания с помощью лазерного

---

<sup>2</sup> 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*.

агрегометра «БИОЛА-220LA НПФ», Россия. Вначале исследуемые соединения в объеме 10 мкл добавляли в кювету с ПБогТ (200 мкл), инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (1000 оборотов в минуту) по истечении 5 минут добавляли раствор пропионата натрия. Изучение соединений и препарата сравнения проводили в диапазоне концентраций 10<sup>-11</sup>–10<sup>-6</sup> М. Для наиболее активных соединений производили расчет IC<sub>50</sub> – концентрация (в М) соединения, блокирующая NHE-обменник тромбоцитов кролика на 50%. В качестве препарата сравнения был выбран селективный ингибитор NHE-1 зонипорид [Ayoub, 2007].

Проводился расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $\bar{M}$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ). Расчет величины IC<sub>50</sub> выполнен с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excel (пакет Office XP, Microsoft, США).

## 2.2.2 Методы QSAR-анализа<sup>3</sup>

### 2.2.2.1 Построение и 3D расчет электронных параметров

Расчет и сравнение центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров для соединений с частично и полностью встроенной в цикл гуанидиновой группы проводили в несколько этапов.

1. Формирование базы данных по структуре соединений с NHE-1 ингибирующей активностью (программа ChemFinfer 9.0, CambridgeSoft Corporation, USA, 2004).

2. Построение методами молекулярной механики первичных 3D-моделей (программа MarvinSketch 15.6.15.0 ChemAxon, USA, 2014).

---

<sup>3</sup> Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым и Л. Р. Янолиевой, за что выражаем благодарность и глубокую признательность

3. Оптимизация исследуемых конформаций полуэмпирическим квантово-химическим методом PM7 (пакет MOPAC, 2012, Stewart Computational Chemistry, USA, 2012).

4. Выбор лучшей 3D-конформации по минимальной величине общей энергии молекулы (BestConfList, ВолгГМУ, Россия, 2015) и конвертация out-файлов в in-файлы (программа OpenBabel-2.3.2, Free Software Foundation, USA, 2011).

5. Расчет центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров (программа HiperChem 8.0.8, Hypercube, USA, 2009).

6. Формирование обучающих выборок (по результатам кластерного анализа).

7. Пошаговый дискриминантный анализ (программа Statistica 8.0 StatSoft, USA, 2007) [Халафян, 2007], выявление значимых систем дискриминантных функций.

8. Расчет граничных значений гуанидинцентрированных электронных параметров, соответствующих высокоактивным соединениям.

9. Анализ соответствия электронных параметров изученных соединений граничным условиям NHE-1 активности ансамбля дискриминантных функций.

10. Расчет средних значений электронных параметров и статистическое сравнение (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ) групп соединений с полностью встроенной и частично встроенной в цикл гуанидиновой группировкой.

Расчет систем дискриминантных функций для NHE-1 ингибирующей активности для всех исследуемых концентраций проводили по формуле:

$$\begin{cases} g_1 = \alpha_{01} \pm \sum_{i=1}^{\mu} \alpha_{i1} \times \iota \\ g_2 = \alpha_{02} \pm \sum_{i=1}^{\mu} \alpha_{i2} \times \iota \end{cases}$$

Где,  $\alpha_{01}, \alpha_{02}$  – свободный член дискриминантной функции;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}$  – коэффициенты перед независимыми переменными,  $i = 1, \dots, M$ ;  $M$  – число

независимых переменных.

### *2.2.3 Методы изучения нейропротекторных свойств in vivo*

Все исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени [Мирзоян, 2012]. Исследования проводили в условиях наркоза (хлоралгидрата 400 мг/кг, внутривенно). Обратимую фокальную ишемию головного мозга выполняли с помощью эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии (ЛСМА) по методике [Koizumi, 1986] в модификации [Longa, 1989] и [Belayev, 1997] путем введения полипропиленовой нити длиной 22 мм Ethicon, Inc. США (4-00) в наружную сонную артерию, с последующим перекрыванием устья ЛСМА.

#### *2.2.3.1 Изучение противоишемической активности при однократном введении*

Нейропротекторные свойства изучали на модели ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга на крысах-самках при однократном введении (n=76), массой 230-250 г. В данной серии экспериментов исследовали следующие 7 групп: 1 – «интактные» (n=10), животные без оперативного вмешательства; 2 – «ложнооперированные» (n=10) животным проводился весь комплекс операций, кроме окклюзии ЛСМА; 3 – «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» (n=11) – животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили физиологический раствора в дозе 0,1 мл/100 г веса; 4 – «ИР+глицин» (n=10) – животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили глицин (800 мг/кг) [Yao, 2012]; 5 – «ИР+магния сульфат» (n=9) – животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили магния сульфат (90 мг/кг) [Yang, 2000]; 6 – «ИР +зонипорид» (n=12) – животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили зонипорид

(1 мг/кг) [Lee, 2009]; 7 - «ИР +соединение РУ-1355» (n=14) - животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг), в дозе эквимольной зонипориду. Продолжительность ишемии составляла 60 минут, реперфузии 24 часа. Введение всех исследуемых соединений проводили однократно за 30 минут до ишемии.

Постреперфузионное повреждение головного мозга оценивали по уровню нейроспецифического маркера в сыворотке крови, неврологическим нарушениям, размерам инфаркта и выраженности отека мозга. Уровень нейронспецифической енолазы (NSE) в сыворотки крови (нг/мл) определяли через 6 часов после окклюзии ЛСМА [Barone, 1993; Anand, 2005] иммуноферментным «сэндвич методом» при помощи коммерческого набора Rat neuron-specific Enolase (NSE) Elisa Kit фирмы CUSABIO (Китай). Исследование проводили на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США). Через 24 часа после операции оценивали неврологические расстройства у крыс по шкале Гарсия [Garcia, 1995] с использованием дополнительных тестов с учетом следующих показателей: мышечный тонус, двигательная активность, координация движения, чувствительность и основные физиологические рефлексы. Основные неврологические тесты представлены в табл. 2.2. Для анализа неврологических нарушений использовали балльную оценку различий показателей на стороне повреждения и контрлатерально по каждому тесту: 3 балла - норма, 2 балла – незначительное нарушение симметричности, 1–0 балла – выраженные нарушения или отсутствие движения (табл. 2.3). Тестирование проводилось до и через 24 часа после операции. На последнем этапе проводили визуализацию зоны повреждения и выраженность отека мозга методом окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТФТ) (SIGMA, США) рис. 2.1.

Таблица 2.2. Неврологическая шкала Гарсия (дополненная тестами из других неврологических шкал).

Показатели	Неврологические симптомы	Литература
<b>Рефлексы</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Реакция на звук,</li> <li>• Роговичный рефлекс</li> <li>• Реакция на свет</li> <li>• Болевая реакция</li> <li>• Хватальный рефлекс</li> </ul>	[Гацура,1974]
<b>Двигательная активность</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Симметричность движения конечностей</li> <li>• Симметричность вытягивания передних лап</li> <li>• Спонтанная двигательная активность</li> </ul>	[Garcia, 1995]
<b>Мышечный тонус</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Подъем груза передними лапами</li> <li>• Удержание на сетке</li> <li>• Движение по вертикали (Забирается по стенке проволочной клетки )</li> <li>• Отдергивание передних лапок</li> </ul>	[Garcia, 1995] [Гацура,1974]
<b>Координация движения</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Удержание на горизонтальной перекладине</li> </ul>	[Воронина, 2012]

Поперечные срезы головного мозга толщиной 2 мм готовили с помощью матрицы Alto, США (рис. 2.1).



Рисунок 2.1. Матрица из нержавеющей стали для приготовления поперечных срезов головного мозга толщиной 1 мм у крыс весом 175-300 г. (Alto, США, Roboz Surgical Instrument Company, Inc.).

Затем инкубировали в 1% растворе трифенилтетразолия хлорида при  $t=37,0^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут. Анализировали 5 срезов мозга, получаемых во фронтальной плоскости. Затем с помощью фотоаппарата Canon (China) получали

цифровые фотографии передней и задней поверхности срезов, на которой измеряли площадь зоны некроза. Процент зоны повреждения вычисляли по отношению площади всего среза к площади инфаркта. Расчет степени отека мозга выполняли по асимметрии полушарий, которая выражалась в отношении площади поврежденного полушария (левого) к площади правого фронтального среза мозга. Расчет площадей осуществляли с помощью графического редактора для обработки и анализа изображений программы Image J, США ([imagej.ru](http://imagej.ru)).

Сравнение независимых выборок проводили параметрическим однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с тестом Ньюмана-Кеулса. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

#### *2.2.3.2 Изучение противоишемической активности при курсовом введении*

Исследование нейропротекторной активности при курсовом введении проводили на крысах самках (n=41), разделенных на 4 группы: 1 - «ложнооперированные» (n=10), животным проводился весь комплекс операций, кроме окклюзии ЛСМА; 2 – «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» (n=11) животным с эндovasкулярной окклюзией ЛСМА внутрибрюшинно вводили физиологический раствора в дозе 0,1 мл/100 г веса; 3 – «ИР +глицин» (n=10) животным с эндovasкулярной окклюзией ЛСМА вводили глицин (800 мг/кг); 4 - «ИР +соединение РУ-1355» (n=10) животным с эндovasкулярной окклюзией ЛСМА вводили соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг). Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно за 10 мин до реперфузии в течение последующих 7 дней после ишемии 1 раз/сутки.

Постреперфузионное повреждение головного мозга оценивали по уровню нейроспецифического маркера в сыворотке крови, неврологическим нарушениям и поведенческим реакциям.

Таблица 2.3. Балльная оценка неврологического дефицита (шкала Гарсия, дополненная тестами из других неврологических шкал).

<b>Неврологический симптом</b>	<b>Наличие</b>	<b>Баллы</b>
Хватательный рефлекс (передние лапы)	Проведение по передним лапам карандашом. Норма – захват предмета. Анализ каждой лапы отдельно	<b>Норма - 3</b> (симметричный захват 2 лапами.)
		<b>Снижен – 2</b> (несимметричный захват, медленно правой стороны)
		<b>Отсутствие -1</b> (правая лапа не реагирует, висит)
Отдергивание лап	Раздражение подошвы лап пинцетом передних лап. Норма – быстрое отдергивание	<b>Норма - 3</b> (симметричное отдергивание лап)
		<b>Снижен – 2</b> (несимметричное отдергивание, медленно правой стороны)
		<b>Отсутствие - 0</b> (справой стороны не ответа)
Мышечный тонус (сетка)	Животное сажают на сетку в метре от пола и переворачивают на 180 градусов. Норма - животное удерживается лапами в течение 3 секунд, попытки выбраться из неудобного положения	<b>Норма - 2</b>
		<b>Сниженная - 1</b> (слабая попытка удерживания)
		<b>Отсутствие- 0</b> (отказ цепляться)
Координация движение	Удерживание позы на перекладине в течение 10 сек.	<b>Норма (7-10 сек.) - 2</b>
		<b>Снижение (3-6 сек.) - 1</b>
		<b>Отсутствие (0-2 сек.) - 0</b>
Движение по вертикали (подъем по стенке проволочной клетки (Garcia))	Вертикальная сетка все 4 лапы держаться. В норме крыса пытается симметрично взбираться вверх	<b>Норма - 3</b> (поднимается легко, держится крепко)
		<b>«Слабая правая сторона» - 2</b> (движения разобщены правой и левой стороны)
		<b>Не удается забраться - 1</b> (либо тенденция к кружению, висит)

Таблица 2.3 (продолжение)

Неврологический симптом	Наличие	Баллы
Симметричность движений конечностей (Garcia)	Крысу подвешивают в воздухе за хвост и наблюдают симметричность движения 4 конечностей	<b>Норма - 3</b> (все 4 конечности симметрично вытягиваются)
		<b>Медленное – 2</b> (справой вытягиваются, медленнее и меньше чем с левой стороны)
		<b>Не большое справа - 1</b> (минимальная двигательная активность справа)
		<b>Отсутствие справа - 0</b> (передняя конечность с правой стороны не двигалась)
Симметричность вытягивания передних лап (Garcia)	Крысу кладут на стол и заставляют идти на передних лапах, в то время как ее держат за хвост	<b>Норма - 3</b> (симметрично перебирает лапами)
		<b>Медленное – 2</b> (ходьба разобщена, правая лапа вытягивалась меньше)
		<b>Не большое слева - 1</b> (правая передняя конечность двигалась минимальна)
		<b>Отсутствие слева - 0</b> (правая передняя конечность не двигалась)
Удержание на сетке	Животное подвешивают за хвост и дают схватить передними лапами сетку и начинают поднимать животное. Норма – животное поднимает сетку и удерживает. Контроль 10 сек.	<b>Норма (7-10 сек.) - 2</b>
		<b>Снижен (3-6 сек) - 1</b>
		<b>Отсутствие (0-2 сек.) - 0</b>
		<b>Норма (7-10 сек.) - 2</b>
Спонтанная двигательная активность (Garcia )	Животного кладут в клетку (размер 35-55 см) и наблюдают за подвижностью (1 мин)	<b>Норма – 3</b> (исследование клетки, подход минимумом к 3 сторонам)
		<b>Легкая степень поражения - 2</b> (двигалась, но не достигала всех сторон)
		<b>Тяжелая степень поражения - 1</b> (практически не двигалась по клетке)
		<b>Отсутствие - 0</b> (не двигалась)

Определение концентрации нейронспецифической енолазы (NSE) в сыворотке крови осуществляли иммуноферментным «сэндвич методом» при помощи коммерческого набора Neuron Specific (NSE) Organism Species: Rattus norvegicus (Rat) Elisa Kit фирмы Cloud-Clone Corp. (США). Исследование проводили также на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США). Содержание NSE выражали в нг/мл. Определение уровня NSE у крыс проводили на 1 и 3 сутки после операции. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

Оценка неврологического дефицита проводилась по шкале Гарсия (1995) на 1, 3 и 7 сутки (более подробно метод описан выше в разделе 2.7.1).

Кроме того для исследования неврологических нарушений были использованы «адгезивный» тест и тест «вытягивания языка».

Тест «Вытягивания языка» [Gulyaeva, 2003] позволяет изучать дискординацию языка у животных. Метод основан на измерении длины высывания языка. Для этого использовали стеклянный цилиндр длиной 2,5 см с наружным диаметром 8 мм и внутренним диаметром 5 мм, который фиксировался на наружной поверхности чашки Петри и заполнялся арахисовым маслом. Цилиндр располагался в клетке на ночь, и животное имело возможность слизывать масло из стеклянного цилиндра. При этом крыса имела свободный доступ к воде. Утром оценивали длину трубки без масла, что коррелирует с нарушением двигательной дискординации языка. Уровень трубки без масла в норме составляет от 9-11 мм. Оценка неврологического теста «Вытягивания языка» [Gulyaeva, 2003] производилась на 1, 3, 7, 14, 21, 28 сутки после окклюзии ЛСМА.

На основании «адгезивного» теста оценивали односторонние координационные неврологические повреждения. Данный метод основан на закреплении липкой ленты (Klebe bander, Германия) длиной 3 см, шириной 1 см

на запястье крысы, помещении животного обратно в клетку и наблюдении в течение 30 секунд. Были использованы два таймера. Первый работал без перерыва, а второй включали только во время попыток удалить ленту с лапы. Контралатеральная и ипсилатеральная конечность тестировалась отдельно. Тест повторяли три раза в течение всего экспериментального дня, после чего выбирали два лучших результата и их усредняли. Был введен коэффициент тактильной асимметрии. Неврологический «адгезивный тест» [Sughrue, 2006] оценивали на 1, 3, 7, 14, 21, 28 сутки после моделирования ишемии/реперфузии.

Сравнение независимых выборок проводили параметрическим однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с тестом Ньюмана-Кеулса. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

Ориентировочно-исследовательское поведение и защитно-оборонительные реакции у животных изучали в тесте «открытое поле» [Бурещ, 1992] на 1, 7, 14, 21, 28 сутки после операции. Для этого исследуемых животных помещали на 5 минут в равномерно освещенный ринг диаметром 1 м и высотой 80 см, размеченный на квадраты 15x15 см с отверстиями на пересечении квадратов. За сутки до начала эксперимента животных приучали к рукам для уменьшения выраженности стрессорных реакций.

Все показатели оценивали по отдельным элементам поведения

Показатель «двигательная активность» включает в себя следующие элементы:

- «горизонтальная активность» (перемещение на четырех лапах горизонтально по установке);
- «движение на месте» (т.е. перемещение передних лап в горизонтальной плоскости без движения задних лап);
- «сидение» (неподвижность).

К исследовательской активности относятся:

- «обнюхивание» т.е. принюхивание и поворот головы без существенных изменений координат корпуса в вертикальной и горизонтальной плоскости;

- «норка» (заглядывание в круглое отверстие установки);
- «вертикальная стойка» (вертикальная стойка на задних лапах).
- Показателям тревожности соответствуют элементы:
  - «груминг» (вылизывание и почесывание);
  - «фризинг» (замирание);
  - «стойка с упором» (т.е. вертикальная стойка на задних лапах с упором передними в стенку).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

#### *2.2.4 Методы исследований взаимодействия с модуляторами основных нейромедиаторных систем in vivo*

Оценку взаимодействия исследуемого соединения с различными модуляторами ЦНС проводили с использованием основных нейромедиаторных систем. Так, изучение взаимодействия соединения РУ-1355 с модуляторами моноаминергической системы *in vivo* проводили с использованием следующих тестов: влияние на апоморфиновую стереотипию, сульфат амфетаминовую стереотипию, каталептогенный эффект галоперидола; гиперкинез, вызванный введением 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ), гипотермический эффект клофелина, резерпина и эффекты L-3,4-диоксифенилаланина (L-ДОФА). Изучение влияния на холинергическую систему исследуемого соединения проводили на основании воздействия на никотиновый и ареколиновый тремор. Изучение влияния соединения на ГАМК систему проводили при помощи воздействия на судорожный эффект пикротоксина.

### *Влияние на эффекты апоморфина*

Введение апоморфина в дозах 0,3–1 мг/кг является наиболее информативным методом для выявления у веществ способности блокировать дофаминергическую нейротрансмиссию в нигростриатной системе мозга [Островская, 2012]. В качестве экспериментальных животных используются крысы, которым вводился агонист пресинаптических дофаминовых рецепторов.

Исследование выполнялось на 18 крысах-самцах весом 250-280 г. Данная серия экспериментов включала 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса по истечению необходимого времени вводили апоморфин; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+апоморфин» (n=6) исследуемое соединение вводили за 30 мин до эксперимента, после чего данная группа крыс получала апоморфин; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+апоморфин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до эксперимента, после чего данная группа крыс получала апоморфин.

Исследуемое соединение РУ-1355 и физиологический раствор вводили внутрибрюшинно. Апоморфин вводили в дозе 1 мг/кг, подкожно.

Оценку проводили каждые 30 мин продолжительностью не более 1 минуты после введения апоморфина. Наблюдение велось в течение 2 ч. Учитывается интенсивность и общая продолжительность стереотипного поведения. Для исследования стереотипии использовалась балльная шкала: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе единичные случаи зевательных движений, непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе зевание, лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. О выраженности влияния изучаемого соединения на данный феномен судили в сравнении с показателями контрольной группы.

### *Влияние на фенаминовую стереотипию*

При введении фенамина происходит увеличение спонтанной двигательной активности, что связывают с усилением дофаминергической передачи в мезолимбической системе головного мозга [Островская, 2012].

Исследование проводили на 18 крысах-самцах, весом 250-280 г. Данная серия экспериментов включала 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса по истечению необходимого времени вводили амфетамин; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ амфетамин» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала амфетамин; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ амфетамин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начала исследования, после чего данная группа крыс получала амфетамин.

Соединение РУ-1355 и физиологический раствор вводили внутрибрюшинно.

Животным подкожно вводили амфетамин (фенамин) в дозе 2,5–5 мг/кг и через 15–30 мин регистрировали интенсивность стереотипных движений в течение всего периода, когда наблюдалась стереотипия вплоть до полного исчезновения нарушений двигательной активности. Оценка выраженности стереотипии проводилась на основании отличий от показателей контрольной группы.

### *Влияние на каталептогенный эффект галоперидола*

Галоперидол относится к типичным нейролептикам. Механизм действия его заключается в блокировании дофаминовых рецепторов 2 типа в области стриарной системы, центральным альфа-адреноблокирующим действием и нарушением процесса обратного нейронального захвата и депонирования адреналина [Воронина, 2012]. Побочным эффектом типичных нейролептиков считают появления экстрапирамидных нарушений.

Исследование проводили на 18 беспородных крысах-самцах, весом 250-280 г. Исследование включало 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса, после чего вводили галоперидол; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ галоперидол» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала галоперидол; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ галоперидол» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начало исследования, после чего данная группа крыс получала галоперидол.

Соединение РУ-1355 и физиологический раствор вводили внутрибрюшинно. Катаlepsию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг. Оценивали способность сохранять заданную непривычную позу через 15, 30, 45, 60, 120 минут после введения модулятора по шкале С. Morpurgo (1962) в баллах.

Если животное сохраняет неподвижную позу в течение 10 сек при высоте ступени 3 см, соответствует 1 баллу, при высоте ступени 10 см — 2 баллам и 3 балла – крыса стоит на передних лапах, одна задняя лапа помещена на подставку высотой 10 см. Попытки усадить животное в необходимую позу продолжают в течение 1 мин. Влияние изучаемого вещества с показателями на катаlepsию в опытных группах судили по сравнению с контрольной группы животных.

#### *Влияние на гиперкинез, вызванный введением 5-гидрокситриптофана*

5-окситриптофан вызывает в дозах 200-300 мг/кг у мышей характерный кинез в виде резких встряхиваний головой, что объясняется активацией серотонинергической системы, так как 5-гидрокситриптофан (5-ГТФ) является метаболитическим предшественником серотонина. Механизм соответствующего эффекта связан с усилением серотонинергической нейротрансмиссии в головном мозге путем стимуляции 5-HT<sub>2</sub>-серотониновых рецепторов [Островская, 2012].

Эксперименты были проведены на 18 беспородных мышках-самцах 35-30 г. Исследование включало 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин

до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса далее вводили 5-ГТФ; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ 5-ГТФ» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала 5-ГТФ; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг) + 5-ГТФ» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начало исследования, по истечению времени данная группа крыс получала 5-ГТФ.

Животным опытных групп внутрибрюшинно вводилось соединение РУ-1355 и физ. раствор, контрольным мышам производилась инъекция физиологического раствора. Через 1 час внутрибрюшинно вводился 5-ГТФ в дозе 300 мг/кг. Далее в течение 1 часа проводили подсчет количества встряхиваний головой у мышей в течение 1 минуты с промежутком в 10 минут. Влияние изучаемого соединения на регистрируемый показатель оценивалось в сравнении с контрольной группой животных.

#### *Влияние на никотиновый тремор*

Никотиновый тест позволяет изучить способность исследуемых соединений, влиять на N-холиннергическую систему. При введении никотина в больших дозах (более 4 мг/кг) можно наблюдать появление судорог и тремора, а в более низких дозах (до 2 мг/кг) введение модулятора холинергической системы не вызывает возникновение судорог. Поэтому на основании данного теста можно изучать влияние исследуемых соединений на эффекты N-холиномиметика [Damaј, 1999].

Эксперименты были проведены на 24 беспородных мышах-самцах 35-30 г., разделенных на 6 групп: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса далее вводили N-холиномиметик – никотин в дозе 2 мг/кг; 2 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до исследования также получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса далее вводили никотин в дозе 4 мг/кг; 3 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ никотин» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала никотин в дозе 2 мг/кг; 4 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ никотин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до

начало исследования, по истечению времени данная группа крыс получала никотин в дозе 2 мг/кг.

После чего проводили регистрацию латентного периода развития тремора и отмечали появление судорог. Оценка влияния на холинергическую систему исследуемого вещества проводили при сравнении эффектов в контрольных и опытных группах.

### *Влияние на ареколиновый тремор*

Центральные холиномиметики такие как ареколин, оксотреморин способны вызывать тремор, гипотермию и гиперкинез, данный тест можно использовать для выявления возможных центральных М-холинергических свойств [Андреева, 2005].

Эксперименты были проведены на 18 беспородных мышах-самцах, весом 35-30 г. Исследование включало 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса, после чего вводили ареколин; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ ареколин» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала ареколин; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ ареколин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начала исследования, после чего данная группа крыс получала ареколин.

Исследуемое соединение РУ-1355 и физиологический раствор вводили внутрибрюшинно. Центральный холиномиметик вводили в дозе 25 мг/кг (внутрибрюшинно), что способствовало возникновению тремора. Оценивали 2 критерия: латентный период тремора и его продолжительность. Выраженность эффекта оценивали при сравнении соответствующих показателей с контрольной группой.

### *Влияние на эффекты резерпина*

Резерпин вызывает у животных уменьшение двигательной активности, гипотермию, кататонию, блефароптоз [Воронина, 2012]. Механизм действия резерпина связан с истощением запасов катехоламинов в нейронах мозга.

Гипотермический эффект резерпина исследовали на 24 беспородных мышцах-самцах 35-30 г., разделенных на 4 группы: 1 – «интактная» (n=6), животные не подвергающиеся воздействию резерпина, получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; 2-«контрольная», (n=6) животные получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса, через 4 часа после введения резерпина; 3 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ резерпин» (n=6); 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ резерпин» (n=6). Соединение РУ-1355 в исследуемых дозах вводили через 4 часа после введения резерпина, вследствие длительности развития фиксируемых эффектов резерпина (3,5-4 часа).

Экспериментальным группам резерпин вводили внутривенно в дозе 2,5 мг/кг. По истечению 4 часов 30 минут после введения резерпина и исследуемого соединения оценивали развитие у мышей гипотермии. Измерение ректальной температуры проводили электронным термометром («OMRON», Германия). Действие изучаемых веществ оценивали по изменению соответствующих показателей в опытных группах по сравнению с контрольными.

### *Влияние на эффекты L-ДОФА*

Использование предшественника дофамина L-ДОФА позволяет выявлять MAO-ингибирующие эффекты у исследуемого соединения. Метод основан на способности L-ДОФА в высоких дозах (500 мг/кг) в отличие от малых (100 мг/кг) вызывать различные поведенческие реакции (стереотипию). При наличии у вещества MAO-ингибирующего свойства стереотипные движения будут проявляться уже при применении малых доз предшественника [Андреева, 2005].

Методика была проведена на 24 беспородных мышцах - самцах 35-30 г., разделенных на 4 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса, через необходимое

время вводился L-ДОФА в дозе 500 мг/кг; 2 - «контрольная», (n=6) животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса, после чего L-ДОФА в дозе 100 мг/кг; 3 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ L-ДОФА» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала L-ДОФА в дозе 100 мг/кг; 4 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ L-ДОФА» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начало исследования, далее L-ДОФА в дозе 100 мг/кг. Оценивали наличие и выраженность поведенческих изменений. Интервал наблюдения составил 30 минут на протяжении полутора часов после введения L-ДОФА. Продолжительность наблюдения за животным составляло 1 минуту. Оценка стереотипии проводилась по бальной шкале: 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия. MAO-ингибирующий эффект в опытных группах оценивали при сравнении данными с контрольной группы.

#### *Влияние на судорожный эффект пикротоксина*

Пикротоксин как антагонист в отношении ГАМК рецепторов способен вызывать тремор и повторяющиеся клонические судороги [Воронина, 2005]. Эксперименты были проведены на 18 беспородных мышах-самцах 35-30 г., Исследование включало 3 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные за 30 мин до тестирования получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса далее вводили пикротоксин; 2 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+ пикротоксин» (n=6) за 30 мин до эксперимента вводили соединение РУ-1355, после чего данная группа крыс получала пикротоксин; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+ пикротоксин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до начала исследования, по истечению времени данная группа крыс получала пикротоксин. После введения пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг животные наблюдались в течение 60 мин, отмечая латентный период появления тремора, латентный период

развития судорог и количество судорожных приступов. Регистрируемые данные в опытных группах оценивали в сравнении с контрольными показателями.

### *Влияние на гипотермический эффект клофелина*

Данная методика позволяет изучать влияние исследуемых соединений на различные адренергические нейрохимические механизмы, в основе которых лежит активация пресинаптических  $\alpha_2$ -адренорецепторов клофелином. Стимуляция пресинаптических  $\alpha_2$ -адренорецепторов приводит к различным угнетением двигательной активности, гипотензии, гипотонии и др. [Андреева, 2005]. Исследование выполнялось на 24 крысах-самцах весом 250-280 г. Данная серия экспериментов включала 4 группы: 1 – «контрольная» (n=6), животные получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; 2 – «контрольная» (n=6), животные получали физ. раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса за 30 мин до введения клофелина; 3 - «РУ-1355 (1,12 мг/кг)+клофелин» (n=6) исследуемое соединение вводили за 30 мин до эксперимента, после чего данная группа крыс получала клофелин; 3 – «РУ-1355 (5,0 мг/кг)+клофелин» (n=6) соединение РУ-1355 вводили за 30 мин до эксперимента, после чего данная группа крыс получала клофелин.

Исследование нейромодулятора адренергической системы клофелина проводили в малой дозе 0,1 мг/кг, внутривенно. Термометрию осуществляли каждые 30 мин в течение 2 часов наблюдения электротермометром («OMRON», Германия). Оценку влияния соединения РУ-1355 на адренергические эффекты клофелина проводили при сравнении изучаемого показателя с группой контроля.

Статистическая обработка результатов для множественных сравнений проводили с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных.

### *2.2.5 Определение гемореологических показателей в условиях ишемии/реперфузии*

Изучение гемореологических свойств крови [Макаров, 2012] проводили в условиях глобальной переходящей ишемии головного мозга. Ишемию головного мозга у крыс создавали окклюзией обеих общих сонных артерий (ОСА) с одновременным снижением артериального давления до 50 мм. рт. ст. методом кровопускания на крысах-самках (24), массой 260-300 г. Изучение исследуемых соединений проводили на модели длительной 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией.

Исследование осуществляли на 4 группах животных: 1 - «ложнооперированные» (n=6) животным проводили выделение сонных артерий без их перевязки; 2 – «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» (n=6) животным с билатеральной окклюзией ОСА внутривенно вводили физиологический раствора в дозе 0,1 мл/100 г веса; 3 – «ИР +зонипорид» (n=6) животным с билатеральной окклюзией ОСА внутривенно вводили зонипорид (1 мг/кг); 4 - «ИР +соединение РУ-1355» (n=6) животным с билатеральной окклюзией ОСА внутрибрюшинно вводили соединение РУ-1355.

Препарат сравнения зонипорид и соединение РУ-1355 вводили внутривенно в эквимолярных дозах 1 и 1,12 мг/кг соответственно, через 10 минут после реперфузии.

По истечении 60-ти минут реперфузии проводили забор крови из брюшной аорты во всех экспериментальных группах. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:9.

Анализ гемореологических показателей проводили: по агрегации эритроцитов (степень агрегации и средний размер агрегатов) агрегации тромбоцитов ( $\Delta$  % ингибирования функциональной активности тромбоцитов) и вязкость крови (кажущаяся вязкость крови).

**Кажущуюся вязкость крови** проводили на анализаторе крови реологическом АКР-2 (Россия) [Муравьев, 2009]. Принцип действия прибора

основан на методе ротационной вискозиметрии со свободно плавающим цилиндром-ротором [Добровольский, 1998]. Показатель вязкости крови является производным от скорости вращения ротора в исследуемом образце крови. Проба крови в объеме 0,84 мл переносилась в измерительную кювету, туда же помещался ротор-поплавок, и кювета устанавливалась на 10 минут в блок термостата прибора. После термостатирования кюветы переносилась в измерительную ячейку, и после установления показаний результат анализа считывался с цифрового табло [Добровольский, 1998]. Влияние исследуемого вещества на агрегацию эритроцитов оценивали по индексу агрегации эритроцитов (ИАЭ), который рассчитывали как отношение вязкости крови при самой низкой скорости сдвига ( $10\text{с}^{-1}$ ) к самой высокой ( $300\text{с}^{-1}$ ) [Парфенов А.С., 1994]. Вязкость крови изучали при скоростях сдвига от 300 до  $10\text{ с}^{-1}$  обратных секунд в мПа\*с.

**Агрегацию эритроцитов** определяли методом оптической микроскопии с видеорегистрацией и компьютерной обработкой изображения. Предварительно перед проведением реологических исследований проводили трехкратную отмывку эритроцитов крови 0,9% раствором натрия хлорида. В начале цельную готовую кровь центрифугировали, убрали плазму и потом повторно центрифугировали эритроциты с изотоническим раствором. Взвесь эритроцитов, из которой в основном удалена плазма, лейкоциты и тромбоциты, ресуспендировали с обедненной тромбоцитами аутологичной плазмой при стандартном показателе  $\text{Ht} = 0,5\%$ . Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [Муравьев, 2003]. Видеорегистрация процесса агрегатообразования эритроцитов проводилась при помощи светового микроскопа Биолам Д11У11 и видеокамеры (Sony Handycam Video 8).

Установка для агрегатометрии позволяет непосредственно визуально наблюдать образование агрегатов и исключить случаи изменения форм эритроцитов и их морфологии агрегатов. С помощью данного метода можно

разделять качественные характеристики наблюдаемых агрегатов (линейные, разветвленные, глыбчатые) и оценивать процесс агрегатообразования.

В исследование входили только те образцы крови, где образовывались физиологические агрегаты по типу «монетных столбиков» при сохранении нормальной дискоидной формы эритроцитов.

Рассчитывали степень агрегации как отношение числа агрегатов к количеству эритроцитов и средний размер агрегата, равный среднему числу эритроцитов, приходящемуся на один агрегат.

Статистическую обработку гемореологических параметров проводили параметрическим однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с тестом Ньюмана-Кеулса. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

#### *2.2.6 Определение агрегации тромбоцитов и тромбогенного потенциала*

Определение **агрегации тромбоцитов** проводили в условиях длительной 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией (более подробное описание смотрите выше).

Влияние исследуемых веществ на агрегацию тромбоцитов изучали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ("Биола", г. Москва) по методу [Born, 1962] в модификации [Габбасова, 1989]. Степень агрегации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы.

Исследование проводили на богатой тромбоцитами плазме крови. Для этого кровь центрифугировали в течение 12 мин при 1000 об/мин. В кювету агрегометра объемом 0,3 мкл вносили 270 мкл богатой тромбоцитами плазмы, после чего в опытном измерении добавляли 30 мкл динатриевой соли аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) в конечной концентрации 5 мкМ. При графической регистрации агрегации тромбоцитов на протяжении 5 мин. получали кривые,

отражающие падение оптической плотности плазмы. Степень агрегации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы.

Моделирование артериального тромбоза проводили наложением аппликации 50% раствора хлорида железа (III) на общую сонную артерию (ч., «Мосреактив» Россия) [Kurz, 1990].

Предварительно наркотизировали крыс (хлоралгидратом 400 мг/кг, внутривенно), выделяли сонную артерию и подводили под нее парафиновую пленку с загнутыми краями, между которыми помещался ватный диск и на него наносился 50% раствор хлорида железа (0,025 мл). Пленка Parafilm позволяла предотвращать повреждение окружающих тканей. Что способствовало развитию в месте наложения реакции Хабера-Вейса, с образованием белого (артериального) тромба, основу которого составляют тромбоциты. Проксимальнее участка нанесения раствора хлорида железа устанавливался ультразвуковой датчик (частота 25 МГц).

Эксперименты были выполнены на 24 крысах самцах массой 260-310 г. Животных разделили на 4 группы: 1 – «контрольная», животные с экспериментальным тромбозом, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1мл/100г. веса; 2 – «РУ-1355+артериальный тромбоз», вызванный хлоридом железа (III); 3 – «зонипорид + артериальный тромбоз», вызванный хлоридом железа (III); 4 – «ацетилсалициловая кислота + артериальный тромбоз», вызванный хлоридом железа (III).

Исследуемое соединение РУ-1355 вводили внутривенно в эффективной дозе 1,12 мг/кг. Препарат сравнения зонипорид вводили внутривенно в эквимолярной дозе 1 мг/кг, а в качестве эталонного препарата по эффекту была выбрана ацетилсалициловая кислота в дозе 114,7 мг/кг ( $ED_{50}$ ), путь введения внутривенный. Период инкубации для аспирина составлял 30 минут, введение РУ-1355 и зонипорида проводили непосредственно перед аппликацией 50% раствора хлорида железа. Фиксировалось время полной окклюзии. Скорость кровотока регистрировалась с использованием ультразвукового доплерографа

(«Минимакс–доплер-К», г. Санкт-Петербург, ООО «СП Минимакс»). Перед аппликацией хлоридом железа фиксировался исходный уровень средней линейной ( $V_{am}$ , см/сек) скорости кровотока, после чего фиксировалось время и скорость образования тромба.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

### *2.2.7 Метод изучения общетоксикологических свойств*

Общетоксикологические свойства соединения исследовали с помощью схемы многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin, 1964].

Научную работу проводили на 36 мышах-самках массой 18-22 г. Животные были распределены на 6 групп: 1 групп - «контрольная» - животным внутрибрюшинно вводили изотонический раствор натрия хлорида 0,1 мл на 10 г веса; 2 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 1,12 мг/кг; 3 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг; 4 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг; 5 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 125 мг/кг; 6 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 250 мг/кг. Регистрацию показателей проводили для всех групп до введения вещества и в последующие 60 и 120 минут.

Поведенческие реакции были изучены в тесте «открытое поле», который позволяет оценить ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных. Описание установки смотрите выше. Проводили регистрированию следующих параметров: горизонтальной двигательной активности (число пересеченных линий), вертикальной двигательной активности (число вставаний на задние лапы), ориентировочно-исследовательской активности (число заглядываний в отверстия), количество

выходов в центральную зону, наличие фекальных болюсов, мочеиспускания и груминга (эмоциональный фактор).

Двигательную координацию и мышечно-расслабляющее действие исследовали при помощи метода вращающегося стержня «тест Ротарод» и теста «удержания на проволоке и сетке». В тесте «Ротарод» оценивали длительность удержания животного на металлической перекладине диаметром 3 см, в течение 30 секунд, со скоростью вращения 10 оборотов в минуту. В тестах «удержания на проволоке и сетке», отмечали количество лапок, участвующих в удержании животного и производили оценку в баллах (1 лапка – 1 балл), в течение 20 секунд.

Регистрация скорости развития болевой реакции осуществлялась при наложении зажима на основании хвоста (оценивали в секундах). Изучение изменения реакции на окружающую обстановку (реактивность) оценивали по перемещению мышей на открытом полу («время побега» в секундах).

Страх животного оценивали при совершении стандартного звукового раздражителя (громкий хлопок), что характеризует тревожность животного и выражается в его вздрагивании и замирании в баллах: 0б – отсутствие реакции; 1б – замирание; 2б – вздрагивание; 3б – прыжок.

Синдром Штраубе характеризует степень возбуждения спинальных мотонейронов, ответственных за регуляцию тонуса мышц хвоста. Оценивали реакцию хвоста каждые 5 мин в течение 50 мин. 1б - 45°, 1,5б - 45-90°, 2б - 90°, 2,5б – 90-180°, 3б – более 180°.

Пугливость животных оценивали по прикосновению корнцангом. Судороги (0баллов – отсутствие, 1б – двигательное возбуждение, бег, 2б – клонические, 3б – тонические), тремор (0баллов – отсутствие, 1б – локальный, мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2б - локальный, среднеамплитудный тремор, 3б – генерализованный мелко - или среднеамплитудный тремор всего тела), изменение положения тела (1балл - нормальное положение, 2-5б – последовательно возрастающее угнетение рефлексов положения: 2б – боковое; 3б – на спине, сгибается; 4б – полубок, 3б – лапы вверху, одна на полу; 5б – на

спине, лапы сложены), характер походки (изменение, сниженный тонус передних лапок) оценивали по % животных с развившимся признаком при визуальном наблюдении. Слуховой и роговичный рефлекс регистрировали по реакции отдергивания головы при раздражении слухового прохода и роговицы соответственно (в процентах). Ипсилатеральный сгибательный рефлекс исследовали путём сдавливания задней лапы зажимом и времени возникновения ответной реакции.

Спонтанную двигательную активность регистрировали на основании передвижения животных и замыкания неподвижных контактов, расположенных на полу камеры в течение 5 минут (оценивали суммарное количество и процент) на одноканальном актометре фирмы "Ugo Basile" (Италия).

Функциональное состояние вегетативной нервной системы определяли на основании размера зрачка, птоза верхнего века, саливации, пилоэрекции, цвета кожи. Производили подсчет числа дыхательных движений у бодрствующих животных в течение 1 мин. Измерение температуры проводили электронным термометром («OMRON», Германия), в прямой кишке на глубине 15 мм.

О влиянии исследуемого соединения на состояние животных судили по изменению регистрируемых показателей по отношению к контрольным данным.

### *2.2.8 Метод изучения острой токсичности*

Определяли в соответствии методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Арзамасцев, 2012]. Исследование соединения РУ-1355 проводили на 40 белых нелинейных мышах–самцах массой 20-24 г. (ООО «Питомник РАМТН», ветеринарное свидетельство 202 № 0128531 от 19.12.2012) при внутрибрюшинном введении, однократно. Оценка общего состояния и поведения животных проводилась по: характеру двигательной активности, координации движений, наличию судорог и их типу, наличию тремора, рефлекторных реакций на внешние раздражители - звуковые

(постукивание по клетке), тактильные (прикосновение к коже), оценивали состояние шерстяного покрова (шерсть взъерошенная или гладкая, блестящая или тусклая). По истечению 14 суток проводили подсчет процента павших и выживших животных. Расчет токсикологического показателя - LD<sub>50</sub> – проводили по методу Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 1963].

### *2.2.9 Методы статистической обработки*

При парном сравнении независимых данных использовались Т-тест и тест Манна-Уитни, для анализа зависимых данных использовали тест Вилкоксона. Величину IC<sub>50</sub> рассчитывали методом линейного регрессионного анализа. Для многопараметровых исследований статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмана-Кеулса в случае нормального распределения данных. Результаты динамических наблюдений рассчитывала с помощью двухфакторного ANOVA метода с использованием программы GraphPad Prism 5.0 и «Microsoft Excel 2002».

### ГЛАВА 3. ЦИКЛИЧЕСКИЕ ГУАНИДИНЫ КАК СОЕДИНЕНИЯ С NHE-1 ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

При анализе современной литературы [Спасов, 2013; Zhang, 2007; Orłowski, 2011] было выявлено, что NHE-ингибирующая активность может быть связана с гуанидиновой группой, представленной во многих структурах. Так, из 481 ингибитора NHE международной базы данных Thomson Reuters Integrity [2011] 259 - гуанидинсодержащие соединения.

Кроме того, опубликованы данные о наличии у производных бензимидазолов способности ингибировать  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменник [Zhang, 2007], содержащие не только свободную, но и частично встроенную гуанидиновую группу.

В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии ВолгГМУ были выявлены определенные зависимости NHE-1-ингибирующей активности от химической структуры. В исследованиях Тимофеевой А.С. [2015] было показано, что высокая NHE-1-ингибирующая активность наиболее характерна для производных аминобензимидазола и определяется наличием аминогруппы в положении  $\text{C}^2$ , диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в положении  $\text{N}^1$ , фторбензоилметила в положении  $\text{N}^3$ . В классе данных производных, повышению NHE-1 ингибирующей активности способствует снижение липофильности первого заместителя  $\log P_{R1}$ , при одновременном увеличении общей липофильности молекулы  $\log P_0$  – за счет увеличения липофильности второго заместителя. Кроме того, было установлено, что введение в структуру производных имидазо[1,2-а]бензимидазола «активных» для производных аминобензимидазола радикалов в положение  $\text{N}^9$  или  $\text{N}^1$  не приводило к высокому уровню NHE-1-ингибирующей активности.

В последующем Гуровой Н.А. [2015] с целью выявления фрагментов скаффолда, ответственных за возможное фармакофорное взаимодействие с

биомишенью, был проведен фармакофорный<sup>1</sup> анализ соединений с высоким NHE-1-ингибирующим уровнем активности (порог значимости  $p < 0,05$ ). Были выявлены потенциальные 2D-фармакофоры<sup>2</sup> соединений, в том числе гуанидиновая группировка - частично или полностью встроенная в гетероцикл.

Учитывая это, нами было выдвинуто предположение, что на реализацию данного вида активности влияют электронные параметры, центрированные на гуанидиновом фрагменте. Поэтому для исследования были выбраны соединения двух химических классов: производные 2-аминобензимидазола (частично встроенная в цикл гуанидиновая группа) и производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (полностью встроенная гуанидиновая группа в цикл), содержащие в одном и том же положении по отношению к азоту в гуанидиновой группе или диэтиламиноэтильный, или пиперидиноэтильный, или морфолиноэтильный заместители.

### 3.1 Поиск соединений с NHE-1-ингибирующей активностью *in vitro* на тромбоцитах кролика

На первом этапе была изучена NHE-1-ингибирующая активность 25 соединений производных циклических гуанидинов под лабораторными шифрами «РУ», из которых 21 производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 4 - 2-аминобензимидазола (Анисимова В.А., НИИ ФОХ ЮФУ (Ростов-на-Дону) (табл. 3.1) в сравнении с селективным ингибитором зонипоридом *in vitro* на тромбоцитах кролика по методу D. Roskopf et.al. [1991] и K. Kusumoto [2002], модифицированному Гуровой Н.А. [2011].

---

<sup>1</sup> фармакофор (определение IUPAC), - это совокупность пространственных и электронных особенностей, которые необходимы для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий со структурой специфической биологической мишени и приводящих в действие ее биологический отклик. Фармакофор не представляет собой реальную молекулу или реальную совокупность функциональных групп, но является чисто абстрактной концепцией, рассматривающей общие молекулярные способности групп соединений по отношению к структуре мишени.

<sup>2</sup> 2D-фармакофор представляет собой фрагмент структурной формулы, общий для активных соединений, который содержит несколько фармакофорных групп, соединенных между собой цепочками связей различной длины.

При добавлении к 200 мкл плазме богатой тромбоцитами в контрольной серии экспериментов изменение светопропускания составляло в среднем 30-40% от исходного уровня калибровки. При добавлении 135 ммоль/л натрия пропионата, подобные изменения составляли до 60-70%.

При добавлении натрия пропионата к плазме богатой тромбоцитами, предварительно инкубированной с селективным ингибитором NHE-1 зонипоридом, происходило снижение уровня светопропускания по отношению к исследованиям только с буфером, что свидетельствовало о блокаде NHE-1 препаратом сравнения и уменьшении вероятности сферуляции тромбоцитов.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002].

Исследуемые соединения проявили NHE-1-ингибирующую активность различной степени выраженности. Было показано дозозависимое действие. Результаты представлены в табл. 3.1.

NHE-1-ингибирующая активность зонипорида ( $IC_{50}$ ) составила  $2,70 \cdot 10^{-8}$  М.

Производные N<sup>9</sup>-замещенные 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<sup>9</sup>-замещенные 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 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. Данные по  $LD_{50}$  представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.1. Влияние некоторых производных циклических гуанидинов на активность NHE-1 обменника в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (дельта %).

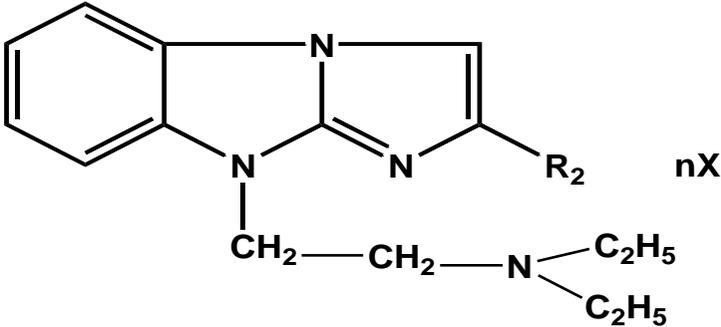
№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Ингибирующая активность в концентрации			IC <sub>50</sub> (M)
				1x10 <sup>-8</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-6</sup> M	
<b>I. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазола</b>							
							
1.	ПУ-64	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HNO <sub>3</sub>	-	22,45±12,88	52,05±12,08	8,53x10 <sup>-7</sup>
2.	ПУ-185	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBr	-	30,54±4,56	34,00±16,32	-
3.	ПУ-292	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	-	17,95±10,15	56,70±23,27	2,28x10 <sup>-6</sup>
4.	ПУ-35	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	-	-	7,74±4,91	-
5.	ПУ-1193	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	-	27,90±1,91	35,72±15,12	-

Таблица 3.1 (продолжение)

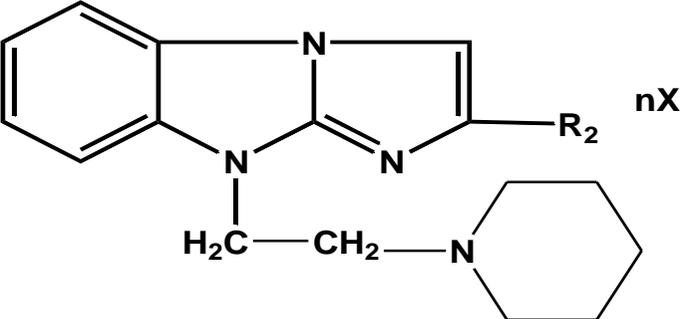
№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Ингибирующая активность в концентрации			IC <sub>50</sub> (M)
				1x10 <sup>-8</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-6</sup> M	
<b>I. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-a]бензимидазола</b>							
							
6.	ПУ-17	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HCl	27,84±18,50	65,37±6,32		4,50x10 <sup>-8</sup>
7.	ПУ-87	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	2HCl	29,46±12,71	50,39±6,42	66,36±8,84	1,17x10 <sup>-7</sup>
8.	ПУ-376	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBrX2H <sub>2</sub> O	-	47,51±8,62	-	-
9.	ПУ-67	-C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	2HCl	49,03±7,56	59,53±7,96	69,78±11,58	1,36x10 <sup>-8</sup>
10.	ПУ-293	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	37,81±6,94	48,45±20,43	76,75±9,36	5,99x10 <sup>-8</sup>
11.	ПУ-1189	-C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	-	27,90±1,91	53,46±15,53	-
12.	ПУ-1204	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> F	2HCl	-	31,21±5,22	29,26±13,26	-
13.	ПУ-66	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	-	38,49±10,29	62,61±7,54	3,61x10 <sup>-7</sup>
14.	ПУ-273	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	56,46±8,24	67,57±5,01	54,81±7,80	3,23x10 <sup>-9</sup>

Таблица 3.1 (продолжение)

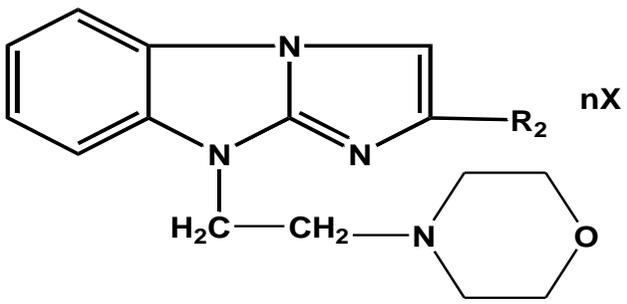
№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Ингибирующая активность в концентрации			IC <sub>50</sub> (M)
				1x10 <sup>-8</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-6</sup> M	
<b>I. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-a]бензимидазола</b>							
							
15.	ПУ-284	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HCl	50,19±6,88	61,91±5,54	67,93±8,40	1,22x10 <sup>-8</sup>
16.	ПУ-474	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2HBr	48,68±6,15	54,89±7,71	71,07±1,62	6,15x10 <sup>-8</sup>
17.	ПУ-374	-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2HBrX2H <sub>2</sub> O	-	-	42,79±12,54	-
18.	ПУ-294	-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2HCl	-	-	28,62±8,72	-
19.	ПУ-1205	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> F	2HCl	-	-	39,97±10,90	-
20.	ПУ-1191	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	2HCl	-	-	43,16±25,13	-
21.	ПУ-285	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl	2HCl	-	39,50±3,95	65,67±8,75	2,73x10 <sup>-7</sup>

Таблица 3.1 (продолжение)

№	Шифр	R <sub>2</sub>	nX	Ингибирующая активность в концентрации			IC <sub>50</sub> (M)
				1x10 <sup>-8</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-6</sup> M	
<b>II. Производные 2-аминобензимидазола</b>							
<b>1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия</b>							
<p style="text-align: center;">nX</p>							
22.	РУ-1199	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	Br <sup>-</sup>	75,38±11,20	75,07±12,90	51,03±15,09	6,29x10 <sup>-10</sup>
23.	РУ-1200	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	Br <sup>-</sup>	59,99±5,12	56,23±17,19	74,59±8,63	3,82x10 <sup>-9</sup>
24.	РУ-1355	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	Cl <sup>-</sup>	71,75±8,96	54,05±18,65	74,46±9,29	4,4x10 <sup>-10</sup>
25.	РУ-1390	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Br <sup>-</sup>	71,38±9,11	65,74±13,72	-	6,18x10 <sup>-10</sup>
<b>Препарат сравнения</b>							
26.	Зонипорид			48,05±7,09	52,28±5,43	-	2,70x10 <sup>-8</sup>

- не изучалось

Таблица 3.2. Влияние некоторых производных циклических гуанидинов на активность NHE-1 в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (IC<sub>50</sub>) и изучение острой токсичности (LD<sub>50</sub> мг/кг внутривенно).

№	Вещество	IC <sub>50</sub>		LD <sub>50</sub> мг/кг в/бр. мыши
		М	мг/л	
1.	РУ-1355	5,42x10 <sup>-10</sup>	0,0002	342,7
2.	РУ-1199	6,56x10 <sup>-10</sup>	0,0003	401,8
3.	РУ-1390	6,68x10 <sup>-10</sup>	0,0003	-
4.	РУ-1200	4,56x10 <sup>-9</sup>	0,0020	643,3
5.	РУ-284	1,28x10 <sup>-8</sup>	0,0058	197,5
6.	РУ-273	3,23x10 <sup>-9</sup>	0,0015	-
7.	РУ-67	1,36x10 <sup>-8</sup>	0,0061	120
8.	Зонипорид	2,70x10 <sup>-8</sup>	0,0100	250,0*

Примечание:

\* - [Gracey, 2003];

- не изучалось.

### 3.2 Взаимосвязь между NHE-1-ингибирующей активности соединений и их химической структуры

На втором этапе была изучена зависимость NHE-1-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола в концентрации 1x10<sup>-6</sup>М от их химической структуры.

Ранее Гуровой Н.А. [2015] методом кластерного анализа были определены границы классов NHE-1-ингибирующей активности *in vitro* среди изученных веществ, которые в концентрации 1\*10<sup>-6</sup> М составили: высокоактивные Δ(10<sup>-6</sup>)>63,0%; умеренно активные 63,0%≥Δ(10<sup>-6</sup>)>41,0%; низкоактивные Δ(10<sup>-6</sup>)<41,0%.

При анализе структура/активность в ряду изученных гетероциклических соединений наблюдается увеличение NHE-ингибирующей активности в гомологичных рядах при наличии в положении N<sup>9</sup> морфолиноэтильного заместителя – высоко - и умеренно активные соединения составили 3/7 (42,9 %) и 4/7 (57,1%) соответственно.

При замене этого радикала на пиперидиноэтильный количество соединений с высокой активностью не изменилось - 4/9 (44,4 %) и увеличилось с умеренной активностью - 6/9 (66,7%).

Последующая замена пиперидиноэтильного радикала в положение N<sup>9</sup> на диэтиламиноэтильный приводит к выраженному снижению активности. Высокоактивные соединения не найдены, а с умеренной активностью составили 2/5 (40%).

Таким образом, при анализе зависимости уровня активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М от химической структуры выявлена следующая закономерность влияния заместителя в N<sup>9</sup> положении: морфолиноэтильный = пиперидиноэтильный < диэтиламиноэтильный.

При анализе зависимости уровня ННЕ-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М от заместителя в положении C<sup>2</sup> оказалось, что наибольший вклад вносит фенильный радикал (соединения РУ-64, РУ-284, РУ-474).

При присоединении к фенильной группировке в пара-положении заместителя в виде атома Br (4-бромфенил) (соединения РУ-66, РУ-1191) или -ОСН<sub>3</sub> группировки (метоксифенил) (соединение РУ-67) активность сохраняется на высоком уровне.

Введение различных галогенов в пара-положение фенильного заместителя оказывает влияние на уровень ННЕ-ингибирующей активности. При этом максимальная активность демонстрируется при наличии 4-бромфенильного радикала (соединения РУ-66, РУ-1191). Замена -Br на -Cl (соединения РУ-273, РУ-1193, РУ-285) незначительно, а на -F (соединения РУ-1204, РУ-1205) выражено (практически в 2 раза) снижает данный вид активности.

Присоединение к фенильному радикалу в пара-положении гидроксигруппы (гидроксифенил) (соединение РУ-87) не приводит к значительному изменению

активности. Однако добавление второй гидроксигруппы в мета-положение (соединения РУ-185, РУ-376, РУ-374) выражено снижает активность.

Интересной является особенность, что сочетание пиперидиноэтильного радикала в положении N<sup>9</sup> с 4-метоксифенильным радикалом в положении C<sup>2</sup> (соединение РУ-67) или 2,4-диметоксифенильным радикалом в положении C<sup>2</sup> (соединение РУ-293) приводит к увеличению NHE-ингибирующей активности до 70%. При этом, сочетание 2,4-диметоксифенильного заместителя в C<sup>2</sup> положении с морфолиноэтильным в положении N<sup>9</sup> (соединение РУ-294) наоборот приводит к снижению активности. Вероятно это обусловлено наличием не более 2-х атомов кислорода в комбинации заместителей по N<sup>9</sup> и C<sup>2</sup> положениям. Добавление третьего атома кислорода в виде оксиметильной группы у заместителя C<sup>2</sup> в мета-положении приводит к снижению активности практически в 3 раза.

В результате проведенного анализа зависимости NHE-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазола в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М от химической структуры было показано, что наибольшей активностью обладают соединения, имеющие в положении N<sup>9</sup> морфолиноэтильный и пиперидиноэтильный, а в положении C<sup>2</sup> фенильный, метоксифенильный или бромфенильный заместители.

Анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола от их химической структуры не проводили ввиду их низкой вариабельности.

### **3.3 Зависимость уровня NHE-1-ингибирующей активности соединений от их центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров (QSAR-анализ)**

На последнем этапе была изучена зависимость NHE-1-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2-

аминобензимидазола в концентрациях  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$  М от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров.

Все изученные соединения в соответствии с граничными значениями активности, полученными в результате кластерного анализа, были разделены на 2 класса: «активные» (а) в концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М  $\Delta(10^{-8}) > 42,0\%$ ; б) в концентрации  $1 \times 10^{-7}$  М  $\Delta(10^{-7}) > 30,0\%$ ; в) в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М  $\Delta(10^{-6}) > 41,0\%$ ) и «неактивные». В концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М было выявлено «активных» 32% производных циклических гуанидинов. В концентрациях  $1 \times 10^{-7}$  М и  $1 \times 10^{-6}$  М количество таких соединений увеличилось и составило 58% и 68%, соответственно.

В исследованиях *in silico* методами молекулярной механики и квантовой химии были рассчитаны центрированные на гуанидиновый фрагмент электронные параметры различного порядка – суммы зарядов на неводородных атомах (в электронных единицах, эл. ед.), начиная с центрального атома углерода гуанидинового фрагмента ( $Q_0$ ) и далее для атомов от первого до седьмого окружения ( $Q_1$ - $Q_7$ ). Приложение 1.

Методом пошагового дискриминантного анализа были рассчитаны зависимости уровня активности в концентрациях веществ  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  М от электронных параметров изученных соединений. В результате было получено 9 систем дискриминантных уравнений (табл. 3.3). Для всех систем дискриминантных функций были рассчитаны граничные условия гуанидинцентрированных электронных параметров, соответствующих активным соединениям.

На активность в концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М статистически значимо влияют характеристики от нулевого до четвертого уровня ( $Q_0$ - $Q_4$ ) (табл. 3.3). На активность в концентрации веществ  $1 \times 10^{-7}$  М статистически значимо оказывают влияние от нулевого до второго уровня ( $Q_0$ - $Q_2$ ). При оценке циклических гуанидинов в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М было выявлено, что статистически значимо влияет только один электронный параметр  $Q_2$  сумма зарядов для атомов второго

окружения. При сопоставлении дискриминантных зависимостей активности соединений в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-6}$  М от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров был найден общий показатель, предположительно обеспечивающий устойчивое наличие NHE-1-ингибирующей активности - это сумма зарядов на атомах второго окружения  $Q_2$  от центрального атома углерода (первое окружение атомов азота в гуанидиновой группировке). Обращает на себя тот факт, что с уменьшением концентрации число статистически значимых электронных параметров возрастает от одного до трех и до пяти, соответственно. Это может свидетельствовать о том, что именно в низких концентрациях в большей степени проявляется специфичность взаимодействия изучаемых соединений с мишенью, тогда как в высоких концентрациях наблюдается менее селективное взаимодействие.

С учетом граничных условий, был определен спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа для каждого из испытанных циклических гуанидинов в концентрации  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  М. Индекс активности соединения принимается равным 1, если значение его электронного параметра соответствовало пороговому условию; в противном случае индекс активности полагали равным 0. Приложение 2,3,4.

Спектр уровней активности по данным ансамблевого дискриминантного анализа циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность, позволил выявить соединения с высокой активностью (табл. 3.4). К ним относятся производные 2-аминобезимидазола - соединения РУ-1355, РУ-1390, РУ-1199, РУ-1200 с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой.

При сравнении средних значений электронных параметров двух групп изученных соединений с полностью и частично встроенной в цикл гуанидиновой группировкой выявлены статистически значимые различия для всех уровней электронного окружения (табл. 3.5).

Таблица 3.3. Статистически значимые системы дискриминатных функций для NHE-1 ингибирующей активности некоторых производных циклических гуанидинов.

Электронный параметр	Системы дискриминатных функций для 3 исследуемых концентраций		
	$1 \times 10^{-8}$ М	$1 \times 10^{-7}$ М	$1 \times 10^{-6}$ М
$Q_0$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -17,54 + 106,41 * Q_0 & (1) \\ g_{\text{act}} = -29,79 + 137,53 * Q_0 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=15,96; p=5,7*10^{-4};$ $F_0=0,840; F_{\text{inact}}=1,000; F_{\text{act}}=0,500;$ Граничные условия для активных соединений $Q_0 > 0,394$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -16,44 + 84,27 * Q_0 & (6) \\ g_{\text{act}} = -12,36 + 71,63 * Q_0 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=4,17; p=5,3*10^{-2};$ $F_0=0,792; F_{\text{inact}}=600; F_{\text{act}}=0,929;$ Граничные условия для активных соединений $Q_0 > 0,322$	
$Q_1$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -30,18 - 58,52 * Q_1 & (2) \\ g_{\text{act}} = -45,08 - 71,07 * Q_1 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=14,92; p=7,9*10^{-4};$ $F_0=0,840; F_{\text{inact}}=1,000; F_{\text{act}}=0,500;$ Граничные условия для активных соединений $Q_1 < -1,187$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -26,23 - 44,92 * Q_1 & (7) \\ g_{\text{act}} = -21,19 - 39,95 * Q_1 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=3,67; p=6,8*10^{-2};$ $F_0=0,625; F_{\text{inact}}=0,500; F_{\text{act}}=0,714;$ Граничные условия для активных соединений $Q_1 < -1,0130$	
$Q_2$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -0,47 + 6,26 * Q_2 & (3) \\ g_{\text{act}} = -1,35 - 9,91 * Q_2 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=6,01; p=2,2*10^{-2};$ $F_0=0,800; F_{\text{inact}}=0,880; F_{\text{act}}=0,630;$ Граничные условия для активных соединений $Q_2 < 0,054$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -0,55 - 3,28 * Q_2 & (8) \\ g_{\text{act}} = -1,11 + 11,29 * Q_2 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=4,69; p=4,1*10^{-2};$ $F_0=0,625; F_{\text{inact}}=0,700; F_{\text{act}}=0,571;$ Граничные условия для активных соединений $Q_2 > 0,038$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -1,37 + 10,16 * Q_2 & (9) \\ g_{\text{act}} = -0,41 - 3,27 * Q_2 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=4,39; p=4,7*10^{-2};$ $F_0=0,640; F_{\text{inact}}=0,000; F_{\text{act}}=0,941;$ Граничные условия для активных соединений $Q_2 > 0,0715$
$Q_3$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -4,14 - 14,81 * Q_3 & (4) \\ g_{\text{act}} = -2,11 - 7,52 * Q_3 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=9,90; p=4,5*10^{-3};$ $F_0=0,800; F_{\text{inact}}=0,941; F_{\text{act}}=0,500;$ Граничные условия для активных соединений $Q_3 > -0,279$		
$Q_4$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -5,53 - 12,85 * Q_4 & (5) \\ g_{\text{act}} = -11,60 - 18,31 * Q_4 \end{cases}$ $N=25; F(1,23)=10,15; p=4,1*10^{-3};$ $F_0=0,840; F_{\text{inact}}=1,00; F_{\text{act}}=0,500;$ Граничные условия для активных соединений $Q_4 < -1,110$		

Обозначения:  $g_{\text{inact}}$  - дискриминатная функция для класса неактивных соединений;  $g_{\text{act}}$  - дискриминатная функция для класса активных соединений;  $N$  - количество исследуемых соединений;  $F(1,23)$  - значение критерия Фишера для числа степеней свободы;  $F_0$  - общая точность прогноза;  $F_{\text{inact}}$  - точность прогноза для неактивных соединений;  $F_{\text{act}}$  - точность прогноза для активных соединений;  $p$  - статистическая значимость системы дискриминатных функций.

Таблица 3.4. Общий спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность.

№	Соединение	Ранг активности соединения (в исследуемой концентрации, М)			
		$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$\Sigma$
<b>N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазола</b>					
1	РУ-0185	2	2	0	<b>4</b>
2	РУ-0376	1	3	0	<b>4</b>
3	РУ-87	0	3	0	<b>3</b>
4	РУ-35	1	2	0	<b>3</b>
5	РУ-67	0	3	0	<b>3</b>
6	РУ-284	1	2	0	<b>3</b>
7	РУ-285	1	2	0	<b>3</b>
8	РУ-292	1	2	0	<b>3</b>
9	РУ-293	0	2	1	<b>3</b>
10	РУ-294	1	2	0	<b>3</b>
11	РУ-374	1	2	0	<b>3</b>
12	РУ-474	1	2	0	<b>3</b>
13	РУ-1205	1	2	0	<b>3</b>
14	РУ-64	1	1	0	<b>2</b>
15	РУ-17	0	2	0	<b>2</b>
16	РУ-66	1	1	0	<b>2</b>
17	РУ-273	0	2	0	<b>2</b>
18	РУ-1193	0	2	0	<b>2</b>
19	РУ-1204	0	2	0	<b>2</b>
20	РУ-1189	0	1	0	<b>1</b>
21	РУ-1191	1		0	<b>1</b>
<b>2-аминобензимидазола</b>					
22	РУ-1199	5	2	0	<b>7</b>
23	РУ-1200	5	2	0	<b>7</b>
24	РУ-1355	5	2	0	<b>7</b>
25	РУ-1390	5	2	0	<b>7</b>

Можно предположить, что центрированные на гуанидиновый фрагмент электронные параметры соединений с частично встроенной гуанидиновой группировкой наиболее оптимальны для взаимодействия с NHE-1.

Таблица 3.5. Сравнительный анализ центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров соединений, содержащих частично и полностью встроенную в цикл гуанидиновую группу, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность.

Уровень электронного окружения	Средние значения электронных зарядов для соединений, содержащих гуанидиновую группу	
	полностью встроенную в цикл	частично встроенную в цикл
Q <sub>0</sub>	0,323 ±0,001	0,510 ±0,0005*
Q <sub>1</sub>	-1,017±0,003	-1,459±0,001*
Q <sub>2</sub>	0,020±0,014	-0,077±0,001*
Q <sub>3</sub>	-0,505±0,027	-0,020±0,045*
Q <sub>4</sub>	-0,822±0,049	-1,378±0,042*
Q <sub>5</sub>	-0,688±0,067	-0,379±0,035*
Q <sub>6</sub>	-0,454±0,079	-0,888±0,195*
Q <sub>7</sub>	-0,425±0,046	-0,044±0,091*

Примечание:

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

### 3.4 Заключение

В исследованиях *in vitro* на тромбоцитах кролика изучена NHE-1-ингибирующая активность 25 гуанидинсодержащих соединений производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2-аминобензимидазола. Производные N<sup>9</sup>-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<sub>50</sub>.

При проведении анализа зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола в концентрации 1x10<sup>-6</sup>М от химической структуры соединения было показано, что наибольшей активностью обладают соединения, имеющие в положении N<sup>9</sup> морфолиноэтильный и пиперидиноэтильный, а в положении С<sup>2</sup> фенильный, метоксифенильный или бромфенильный заместители.

В исследованиях *in silico* методом молекулярной механики и квантовой

химии получены гуанидинцентрированные электронные параметры для соединений с частично (производные 2-аминобензимидазола) и полностью (производные N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазола) встроенной в цикл гуанидиновой группы. Методом дискриминантного анализа проведена оценка зависимости NHE-ингибирующей 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 статистически значимые результаты были получены для концентрации  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ , что, скорее всего, связано с усилением роли селективных взаимодействий в формировании NHE-1-ингибирующей активности.

Методом ансамблевого дискриминантного анализа было выявлено, что соединения, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу обладают более высокой NHE-1-ингибирующей активностью. Центрированные на гуанидиновый фрагмент электронные параметры соединений с полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой статистически значимо отличаются от веществ с частично встроенной.

#### **ГЛАВА 4. НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ RU-1355, И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ ЗОНИПОРИД, ГЛИЦИН И МАГНИЯ СУЛЬФАТ НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

NHE-1 играет важную роль в патогенезе многих заболеваний ЦНС: эпилепсии, болезни Альцгеймера и ишемии головного мозга [Verma, 2015]. Формирование дефицита энергии и снижение pH клеток, возникшие в результате ишемического инсульта, способствует нарушению работы наиболее энергозависимого фермента калий-натриевой АТФазы и активации  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника 1 изоформы (NHE-1). Активация NHE-1 приводит к поступлению натрия в клетку и ее деполяризации. Накопление данного иона способствует реверсивной активации  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -обменника и высвобождению возбуждающего нейромедиатора глутамата. На следующей стадии ишемического каскада происходит накопление глутамата в синаптической щели и активация NMDA (N-метил-D-аспартат) и AMPA ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) рецепторов [Saavedra, 2005; Green, 2008]. Данный процесс приводит еще большему увеличению содержания кальция в клетке. Происходит активация внутриклеточных ферментов, развитие цитотоксического отека, оксидативного стресса, что в конечном итоге способствует гибели нейронов по некротическому либо по апоптотическому путям [Durukan, 2007]. Несмотря на разнообразие механизмов, приводящих к перегрузке кальцием и гибели клетки, активация NHE-1 является одним из основных факторов регуляции гомеостаза в условиях ишемии/реперфузии [Lee, 2009]. Таким образом, NHE-1 может рассматриваться как мишень патогенетической коррекции постишемического повреждения мозга.

В настоящее время в литературе имеются экспериментальные данные о нейропротекторной активности ингибиторов NHE-1 – амилорида и его аналогов,

энипориды, зонипориды и сабипориды при ишемическо/реперфузионном повреждении мозга [Luo, 2007; Wang, 2014].

К настоящему времени разработаны и изучены в экспериментальных условиях несколько десятков соединений, обладающих нейропротекторной активностью. Однако в клинической практике лечения больных с церебральным инсультом нашли применения лишь единичные препараты [Петров, 2011; Peter, 2008]. Так, доказанным методом лечения инсульта в острой фазе остается применение первичных нейропротекторов: естественного агониста глицинового участка NMDA-рецептора глутаматергических структур мозга глицина, а также магния сульфата, который является природным стабилизатором всех подтипов NMDA-рецепторов и контролируют работу потенциалзависимых ионных каналов для  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  [Петров, 2011; Акарачкова, 2013].

#### **4.1 Нейропротекторные свойства соединения РУ-1355, магния сульфата, глицина и зонипорида при однократном введении**

Современные подходы комплексной оценки эффективности активных соединений с нейропротекторной активностью определяются уровнем биохимических маркеров, неврологических и морфометрическими нарушениями и изменением в поведенческих реакциях.

Так, известно, что наибольшая активация NHE-1 происходит во время реперфузии [Luo, 2007], однако первоначальная активация обменника осуществляется на этапе снижения рН клетки [Писаренко, 2004; Cuomo, 2015], поэтому вначале проводили изучение ингибирования обменника на этапе ишемии (профилактическое введение).

#### *4.1.1 Действие вещества РУ-1355 на уровень нейронспецифической енолазы в сыворотке крови у крыс*

К нейроспецифическим белкам (НСБ), которые используются, в настоящее время для оценки функционального состояния мозга при повреждении нервной ткани относятся основной белок миелина (МВР), нейронспецифическая енолаза (NSE), белок S-100, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротропин-3 (NT3) и нейротропин-4/5 (NT4/5) и другие. Однако единственным известным в настоящее время общим маркером всех дифференцированных нейронов является нейронспецифическая енолаза [Черний, 2014]. Повышение содержания в плазме крови после окклюзии СМА наблюдается с 2 ч до 3 дней. Максимальные значения находятся в пределах от 6 до 12 часов [Barone, 1993; Anand, 2005].

В качестве референтного значения концентрации фермента NSE использовали показатель группы интактных животных, который сопоставим с литературными данными [Семененко, 2013] и составил 0,34 нг/мл.

При анализе уровня NSE у животных всех экспериментальных групп с ишемией/реперфузией ЛСМА наблюдали повышение концентрации маркера в сыворотке крови. У животных контрольной группы («ишемия/реперфузия»), которые не получали исследуемые вещества, наблюдали значительный в 4,03 раза рост уровня биомаркера (1,37 нг/мл) в сыворотке крови по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ) табл. 4.1. Животным, которым за 30 мин. до ишемии ЛСМА однократно внутривенно вводили соединение РУ-1355 (группа «ишемия/реперфузия +РУ-1355») в дозе 1,12 мг/кг, наблюдался в 1,7 раз более низкий подъем уровня маркера повреждения нейронов по отношению к контрольной группе «ишемия/реперфузия» ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.1).

При профилактическом однократном внутривенном введении зонипорида (1 мг/кг) и магния сульфата (90 мг/кг) и внутрибрюшинном введении глицина (800 мг/кг) уровень NSE в сыворотке крови оказался ниже в 2,3 ( $p > 0,05$ ), 1,7 ( $p < 0,05$ ),

2,1 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с показателями контрольной группы животных ИР.

Таблица 4.1. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на уровень нейронспецифической енолазы в сыворотке крови крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией ( $M \pm m$ ).

№	Группа	n	Нейронспецифическая енолаза через 6 ч. после окклюзии (NSE), нг/мл
1	Интактные	10	0,34±0,16
2	Ложнооперированные	8	0,78±0,22
3	Ишемия/реперфузия (ИР)	6	1,37±0,15*
4	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	8	0,82±0,11#
5	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	4	0,59±0,29
6	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	8	0,82±0,20
7	ИР + глицин (800 мг/кг)	13	0,64±0,12#

Примечание.

Различия статистически значимы по отношению к показателям группы соответствующего дня: \*-л/о, интактных; # - контроль ИР ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и водили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР+зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в вводили зонипорид дозе 1 мг/кг; «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/бр глицин в дозе 800 мг/кг.

Таким образом, было показано, что в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 24-ой реперфузией на модели фокальной ишемии у крыс соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 30 минут до

окклюзии ЛСМА в дозе 1,12 мг/кг, ограничивало рост концентрации маркера повреждения головного мозга NSE в сыворотке крови.

#### *4.1.2 Действие вещества РУ-1355 на неврологический дефицит*

Оценка неврологических нарушений включала в себя регистрацию параметров моторных функций и чувствительности. Однако в процессе исследования нами было выявлено, что некоторые тесты шкалы Гарсия не всегда полно отражали картину нарушений. Поэтому для получения более обширной информации совместно с оценкой неврологического дефицита по шкале Гарсия [García, 1995] были выполнены дополнительные тесты из других шкал. Для анализа неврологических нарушений использовали балльную оценку различий показателей на стороне повреждения и контрлатерально по каждому тесту. Тестирование проводилось до и через 24 часа после операции. За конечный результат принимали средний балл за все тесты соответствующего показателя.

При исследовании неврологического состояния в данной серии экспериментов до операции все животные «набрали» необходимый максимальный средний балл по каждому исследуемому показателю. Через сутки после операции при повторном тестировании наблюдали нарушения двигательной активности и координации движения, чувствительности, мышечного тонуса. и рефлексов.

Оценка показателя *двигательной активности и координации движения* включала в себя следующие тесты: спонтанная двигательная активность, симметричность предплечий, симметричность движения передних конечностей и координация движения. Было выявлено, что в группе контрольных животных, развились выраженные нарушения в соответствующих тестах.

Так при анализе спонтанной двигательной активности в группе контрольных животных с ИР наблюдали либо снижение активности передвижения по клетке, либо минимальное движение, или отсутствие движения.

При изучении теста симметричности вытягивания предплечий у животных группы «ишемия/реперфузия», наблюдали выраженные нарушения симметричности вытягивания передних лап при удерживании крысы за хвост. При оценке симметричности движения четырех конечностей у контрольных животных было показано либо более медленное, либо полное отсутствие движения с контралатеральной стороны. При исследовании координации движения наблюдали не способность животных удерживать позу на горизонтальной перекладине в течение положенного времени по сравнению с ложнооперированными животными. Средний балл по всем тестам составил  $1,58 \pm 0,12$  (рис. 4.1).

Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг оказало наиболее эффективное снижение проявления нарушения двигательной активности и координации у животных при ишемии реперфузии на 58% по сравнению с контрольной группой животных с ишемией/реперфузией ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.1).

При исследовании селективного ингибитора NHE-1 зонипорида (1 мг/кг), было выявлено улучшение неврологической симптоматики по балльной оценке ( $2,06 \pm 0,25$ ), которая статистически значимо отличалась от контрольных животных с ишемией/реперфузией на 30%.

При однократном профилактическом применении глицина (800 мг/кг) и магния сульфата (90 мг/ кг) наблюдали статистически значимое восстановление нарушения двигательной активности и координации движения на 37% и 39% соответственно по отношению к группе животных «ишемия/реперфузия» (рис. 4.1), приложение 5.

Изучение *мышечного тонуса* проводили с помощью следующей группы тестов: отдергивание передних конечностей, удержание на сетке, движение по вертикали и удержание груза. У экспериментальных животных контрольной группы с окклюзией ЛСМА наблюдали нарушение симметричности отдергивания передних лап с контралатеральной стороны и на стороне повреждения. Так же, была выявлена неспособность, удерживаться лапами в течение 3 секунд на сетке,

трудности с подъемом по стенке проволочной клетки, либо движение крысы были разобщены по сравнению с животными без патологии.

В группе контрольных животных после ишемического повреждения сформировались выраженные нарушения оцениваемого показателя. Средний балл по всем тестам составил  $1,37 \pm 0,24$ .

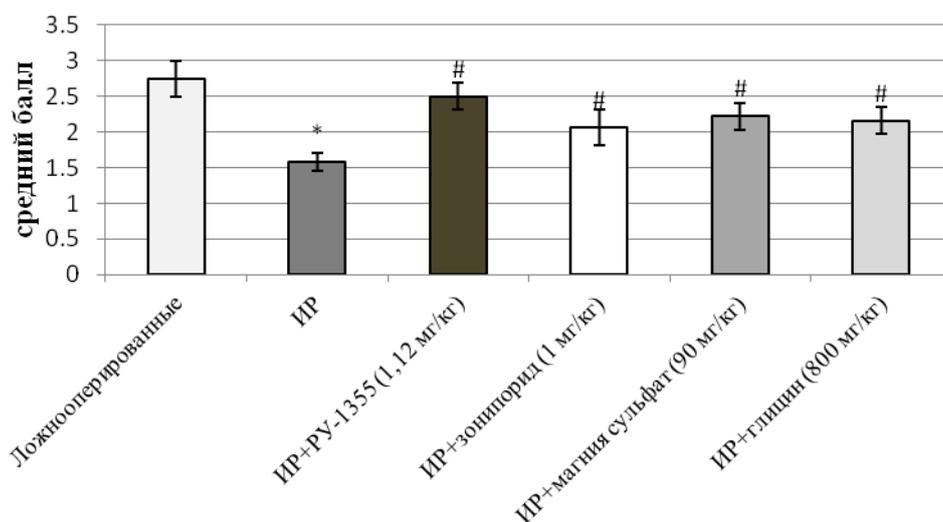


Рисунок 4.1. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на состояние двигательной активности крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА.

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

Исследуемое соединение РУ-1355 способствовало наиболее выраженной защите от повреждающего действия ишемии реперфузии у крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА. Средний балл показателя составил  $2,32 \pm 0,24$ , что способствовало восстановлению показателя мышечный тонус на 68% по сравнению с группой контрольных животных ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.2).

Введение селективного ингибитора NHE-1 способствовало восстановлению мышечного тонуса на 38% по сравнению с контрольной группой животных, но данные были статистически не значимы, средний балл составил  $1,90 \pm 0,19$ . При

применении магния сульфата и глицина наблюдали статистически значимое улучшение показателя на 59% ( $p>0,05$ ) и 56% ( $p<0,05$ ) соответственно по сравнению с группой животных «ишемия/реперфузия». Животные набрали  $2,18\pm 0,24$  и  $2,14\pm 0,20$  балла соответственно (рис. 4.2), приложение 6.

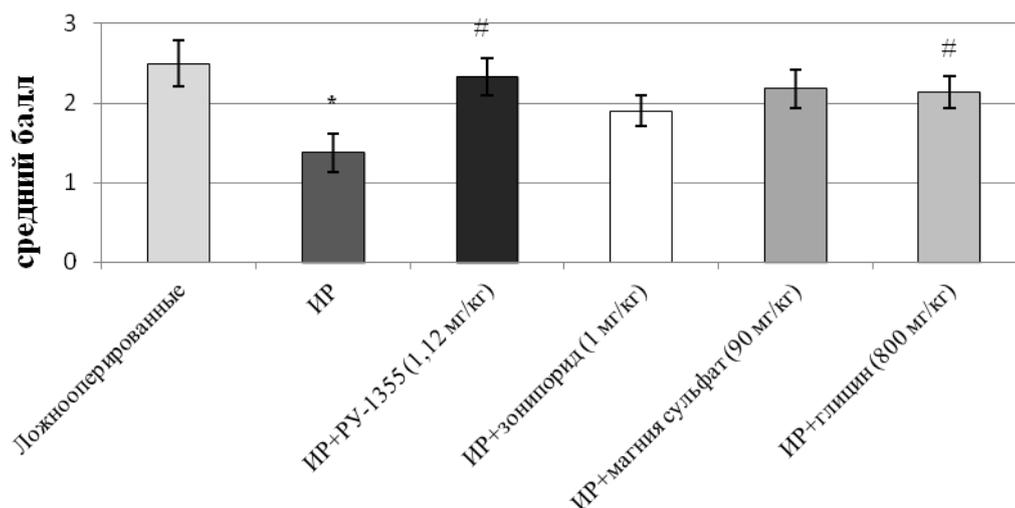


Рисунок 4.2. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на состояние мышечного тонуса крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА.

Примечание. Различия статистически значимы по отношению к группе: \*-ложнооперированных; #- ИР ( $p\leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Обозначение: ИР - контроль-ишемия/реперфузия.

На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА было изучено несколько физиологических рефлексов: реакция на звук, роговичный рефлекс, реакция на свет, болевая реакция и хватательный рефлекс. При исследовании было показано отсутствие изменений рефлексов, кроме хватательного, который оказался наиболее информативным тестом. У животных с окклюзией ЛСМА, не получавших исследуемые вещества, наблюдали статистически значимые нарушения хватательного рефлекса ( $1,92\pm 0,15$  баллов) по сравнению с эффектом в группе ложнооперированных.

Применение соединения РУ-1355 способствовало сохранению хватательного рефлекса наиболее эффективно на 40% по сравнению с группой «ишемия/реперфузия», средний бал составил  $2,69 \pm 0,13$  ( $p < 0,05$ ) рис. 4.3.

Глицин и магния сульфат при профилактическом введении способствовали сохранению хватательного рефлекса на 18% и 9% соответственно по сравнению с результатом в контрольной группе животных ( $p > 0,05$ ). Уменьшение нарушения хватательного рефлекса на 30% наблюдали при внутривенном введении зонипорида ( $2,50 \pm 0,15$  балла) животным с ишемией реперфузией по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), приложение 7.

При изучении *чувствительности* в тесте «реакция на прикосновение» у крыс после фокального ишемического реперфузионного повреждения развилось статистически значимое нарушение в контрольной группе ( $1,83 \pm 0,17$  балла) по сравнению с животными без патологии. Было показано снижение либо отсутствие ответа на стимул прикосновения с контрлатеральной стороны.

На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА наилучший результат по снижению нарушения чувствительности на прикосновение у крыс был получен при исследовании соединения РУ-1355. Средний балл в тесте составил  $2,31 \pm 0,14$ , что на 26% превышает показатель контрольной группы ИР ( $p < 0,05$ ) рис. 4.4.

Зонипорид способствовал восстановлению чувствительности животных ( $2,17 \pm 0,17$  балла) на 19%, но данные были статистически недостоверны по сравнению с группой «ишемия/реперфузия».

Введение глицина и магния сульфата способствовало восстановлению данного показателя на 9 % каждый ( $p > 0,05$ ), средний балл для обоих препаратов составил  $2,00 \pm 0,00$  (рис. 4.4), приложение 8.

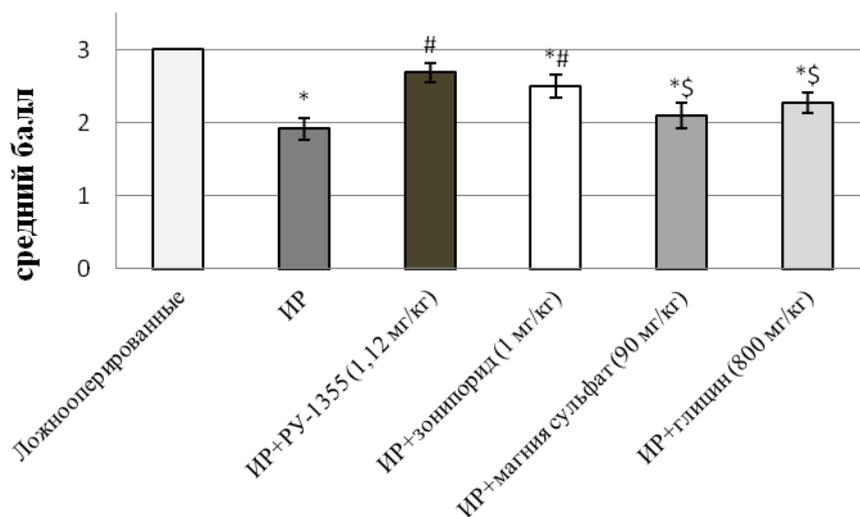


Рисунок 4.3. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на восстановление хватательного рефлекса крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА.

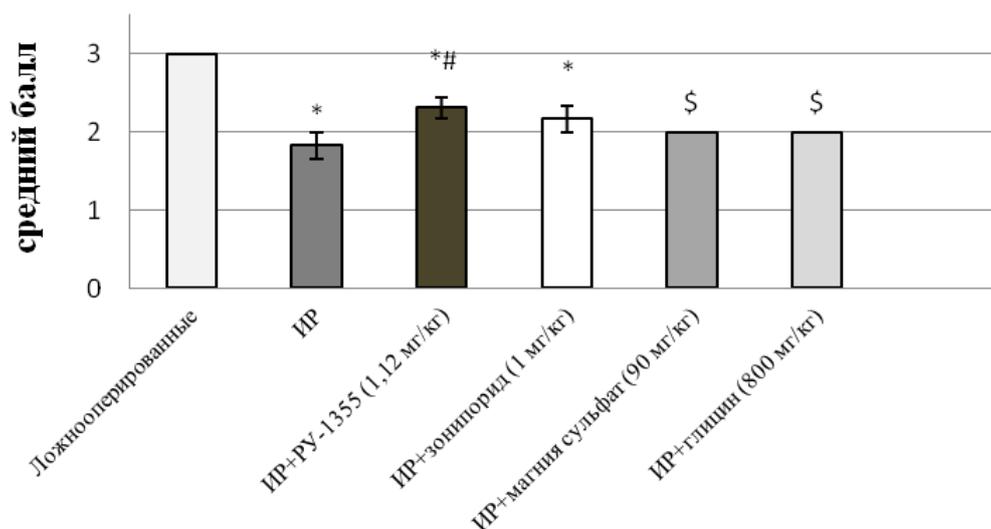


Рисунок 4.4. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на восстановление чувствительности при прикосновении у крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА.

Примечание. Различия статистически значимы по отношению к группе: \*-ложнооперированных; #- ИР; \$ - ИР+соединение РУ-1355 ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Обозначение: ИР - контроль-ишемия/реперфузия.

#### *4.1.3 Действие соединения РУ-1355 на зону некроза и отека головного мозга у крыс*

При однократном внутривенном применении препарата сравнения зонипорида в эквимолярной концентрации наблюдали уменьшение постреперфузионных повреждений головного мозга. Зона некроза при профилактическом применении составила 12,25%, что статистически значимо меньше в 1,6 раза по сравнению с показателями группы животных, без лечения (рис. 4.5, табл. 4.2).

Магния сульфат при профилактическом однократном внутривенном введении в дозе 90 мг/кг способствовал ограничению зоны ишемического повреждения головного мозга, которая составила 10,13% и была меньше в 1,9 раза чем у контрольных животных с окклюзией ЛСМА ( $p < 0,05$ ).

При внутрибрюшинном введении первичного нейропротектора глицина, зона составила 8,51%. В группе животных 4 – «ИР+глицин наблюдали статистически значимое уменьшение области повреждения мозга в 2,24 раза по сравнению с ишемизированными животными, не получавшими лечения ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.5, табл. 4.2).

Наиболее выраженное защитное действие при ишемии/реперфузии было выявлено при исследовании соединения РУ-1355 на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА. Так при внутривенном профилактическом применении соединения в дозе 1,12 мг/кг наблюдалось ограничение повреждения: зона некроза составила 8,49%, что в 2,3 раза (статистически значимо) меньше по сравнению с контрольной группой животных без лечения ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.5, табл. 4.2). В условиях отсутствия ишемическо-реперфузионного повреждения головного мозга у интактных животных полушария имели одинаковый размер, и коэффициент асимметрии приравнивался к 1 (рис. 4.6 А). При появлении очага повреждения происходило увеличение размера левого полушария за счет отека мозга и наблюдался рост данного коэффициента.



А Ложнооперированные

Б ИР

В ИР+Зонипорид

Г ИР+Соединение РУ-1355

Рисунок 4.5. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимолярных дозах на зоны повреждения головного мозга при окрашивании ТФТ 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.

Таблица 4.2. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения при однократном профилактическом введении на размеры зоны некроза и коэффициент асимметрии с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА ( $M \pm m$ ).

№	Группа	n	Зона некроза, Δ%	Коэффициент асимметрии (усл. ед.)
1	Интактные	10	0,00±0,00	1,00±0,00
2	Ложнооперированные	10	0,00±0,00	1,00±0,00
3	Ишемия/реперфузия (ИР)	11	19,07±2,04 <sup>*</sup>	1,18±0,02 <sup>*</sup>
4	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	14	8,49±1,58 <sup>*#</sup>	1,07±0,02 <sup>*#</sup>
5	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12	12,25±2,03 <sup>*#</sup>	1,14±0,03 <sup>*</sup>
6	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	9	10,13±2,58 <sup>*#</sup>	1,14±0,01 <sup>*</sup>
7	ИР + глицин (800 мг/кг)	10	8,51±1,61 <sup>*#</sup>	1,12±0,01 <sup>*#</sup>

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+ соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР +зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в вводили зонипорид дозе 1 мг/кг. «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/в магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин. до окклюзии ЛСМА в/бр глицин в дозе 800 мг/кг.

Наиболее выраженную асимметрию полушарий головного мозга наблюдали у животных группы 3 – «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» коэффициент, которых составил 1,18 усл. ед (рис. 4.6 Б).

При профилактическом внутривенном введении соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг было показано статистически значимое ограничение отека мозга на 61% по сравнению с контрольной группой животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения ( $p < 0,05$ ) и коэффициентом равным 1,07 усл. ед. (табл. 4.2).

В экспериментальной группе, получавшей за 30 мин. до ишемии зонипорид (1 мг/кг) наблюдали ограничение роста отека мозга на 22% по сравнению с показателями группы контрольных животных с патологией, однако данные оказались статистически не достоверны. Коэффициент составил 1,14 усл. ед. (табл. 4.2).

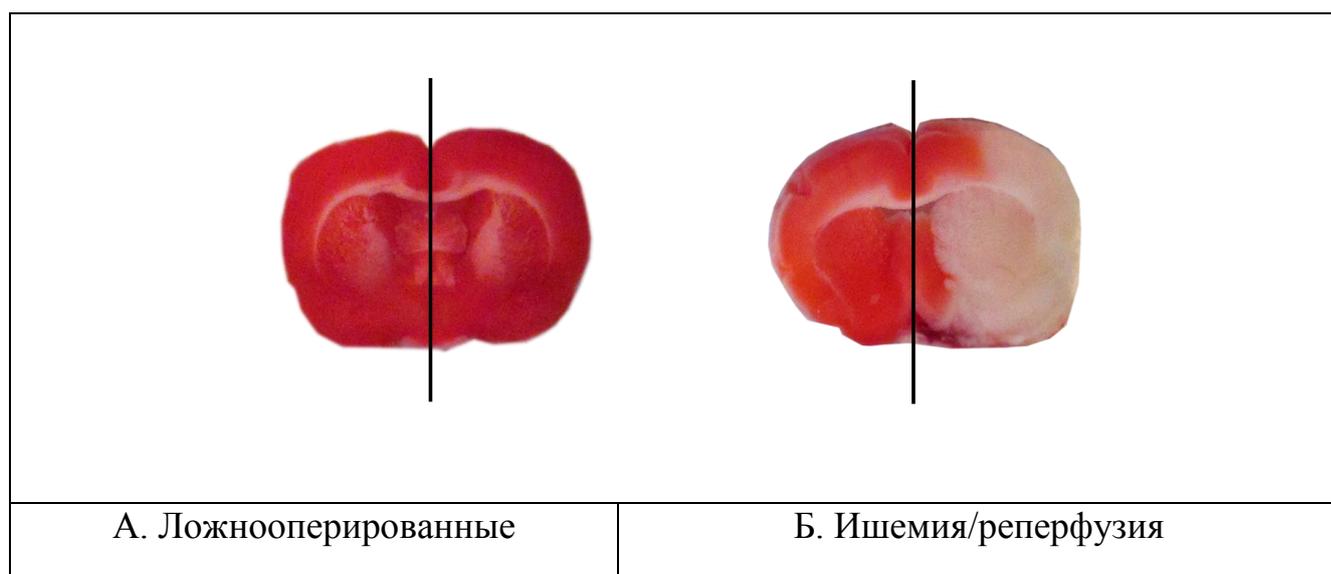


Рисунок 4.6. Пример срезов выраженности отека мозга у животных без окклюзии ЛСМА (А) и с окклюзией ЛСМА (Б) при окрашивании ТФТ.

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

При исследовании первичного нейропротектора магния сульфата в дозе 90 мг/кг на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА было показано уменьшение

постреперфузионного повреждения головного мозга на 22% относительно группы «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ( $p > 0,05$ ) (табл. 4.2).

При оценке влияния глицина в дозе 800 мг/кг на отек мозга было показано статистически достоверное ограничение роста коэффициента асимметрии на 33% по сравнению с контрольными животными ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.2).

Таким образом, было показано, что на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией у крыс, соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 30 минут до окклюзии в дозе 1,12 мг/кг ограничивало зону инфаркта в 2,3 раза и превосходило препарат сравнения зонипорид на 44%, магния сульфат на 19% и оказало эффект подобный первичному нейропротектору глицину. Соединение РУ-1355 ограничивало отек мозга на 61% и превосходило зонипорид, магния сульфат в 2 раза, глицин 1,7 раза.

## **Заключение**

Наиболее глубокие и выраженные повреждения головного мозга можно было отследить на модели 60 минутной ишемии. При более длительном использовании времени окклюзии как и также при ишемии превышающей 60 минут не наблюдалось увеличение области повреждения, в месте наложения клипсы. На общей сонной артерии может формироваться пристеночный тромб, что при снятии клипсы может стать причиной эмболии.

Поэтому изучение нейропротекторного действия производного 2-аминобензимидазола РУ-1355 было проведено в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 24-й реперфузией у крыс.

Соединение РУ-1355 ограничивало рост концентрации маркера повреждения головного мозга нейронспецифической енолазы в 1,67 раза по сравнению с контрольной группой животных, без лечения ( $p < 0,05$ ).

Так же, соединение РУ-1355 ограничивало размеры зоны некроза головного мозга. При окрашивании (ТФТ) и анализе срезов мозга, получаемых во фронтальной плоскости, зона некроза в данной группе составляла  $8,49 \pm 1,58\%$ . Так, было показано, что изучаемое соединение статистически достоверно ограничивало зону повреждения в 2,3 раза по сравнению с показателем контрольной группы животных. Так же соединение РУ-1355 способствовало ограничению отека мозга у крыс при ишемии реперфузии. Коэффициент асимметрии в группе «ИР +соединение РУ-1355» составил  $1,07 \pm 0,02$  усл.ед, что статистически значимо превосходит на 61% показатель контрольной группы животных «ишемия/реперфузия». На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА соединение РУ-1355 способствовало коррекции неврологических нарушений. Так исследуемое соединение уменьшало выраженность проявления нарушения двигательной активности и координации на 58% по отношению к группе животных «ишемия/реперфузия» ( $p < 0,05$ ). Соединение РУ-1355 снижало неврологические расстройства мышечного тонуса на 68% по сравнению с контрольными животными не получавшими лечения ( $p < 0,05$ ). Так же исследуемое соединение снижало нарушение хватательного рефлекса на 40% и 25% улучшало чувствительность по отношению к животным контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, на основании проведенных исследований *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.

## 4.2 Нейропротекторные свойства соединения РУ-1355 и глицина при курсовом введении

Известно, что ингибиторы NHE при курсовом введении статистически значимо способны уменьшать повреждение нейронов головного мозга на фоне ишемии/реперфузии [Horikawa, 2001]. Однако у зонипорида при курсовом введении были выявлены нейротоксические свойства, что существенно ограничивало его применение [Pettersen, 2008].

Согласно федеральному руководству по использованию лекарственных средств (формулярная система) [2014] на сегодняшний день в качестве первичного нейропротектора в большой степени выделяют глицин. Соответственно в данной серии эксперимента в качестве препарата сравнения был выбран естественный агонист глицинового участка NMDA-рецептора глутаматергических структур мозга. Введение соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и глицина (800 мг/кг) проводили за 10 мин до реперфузии и в течение последующих 7 дней после ишемии 1 раз/сутки (внутрибрюшинно). Для оценки нейропротекторных свойств был использован неврологический дефицит, поведенческие реакции и уровень NSE в сыворотке крови.

### 4.2.1 Действие соединения РУ-1355 на неврологический дефицит у крыс

Восстановление двигательных функций после перенесенного ишемического повреждения головного мозга происходит в основном в более ранние сроки, чем моторной функции языка и чувствительности.

Неврологические расстройства на модели фокальной ишемии при курсовом введении исследуемых веществ оценивали на основании шкалы Гарсия с использованием дополнительных тестов, а так же адгезивного теста [Sughrue, 2006] и теста вытягивания языка [Gulyaeva, 2003.]. Поэтому целесообразно было изучить нарушения двигательной активности, координации и мышечного тонуса

и болевой чувствительности на 1, 3 и 7 сутки, а нарушение моторной функции языка и тактильной чувствительности в течение 28 дней.

*Анализ неврологических нарушений на основании шкалы Гарсия с использованием дополнительных тестов*

При оценке неврологического дефицита все животные до проведения ишемии/реперфузии набрали максимальный средний балл по исследуемым тестам.

Через сутки после операции у всех животных (группа 2-4) наблюдали разницу показателей неврологического дефицита.

Так, при сравнении данных оценки неврологических нарушений с результатами тестирования ложнопериорированных животных было показано, что у крыс контрольной группы «ишемия/реперфузия» наблюдали выраженные изменения, и средний балл неврологического статуса составил только 76% от данного показателя у животных без патологии.

У животных, получивших однократно соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и глицин (800 мг/кг) за 10 мин до реперфузии внутрибрюшинно, неврологический дефицит был менее выраженным. Неврологический статус составил 89% и 87% по сравнению с результатами ложнопериорированных животных соответственно, что на 17% и 16% выше данных у крыс с ишемией/реперфузией ( $p < 0,05$ ) табл.4.3.

Таблица 4.3. Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения глицин, на динамику изменения неврологического дефицита у крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей реперфузией ( $M \pm m$ ).

№	Группа	Неврологический дефицит, общий балл		
		1 сутки измерения	3 сутки измерения	7 сутки измерения
1	Ложнооперированные	2,47±0,13	2,47±0,13	2,47±0,13
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	1,87±0,07*	1,95±0,06*	2,24±0,09
3	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	2,19±0,08*#	2,30±0,09#	2,40±0,12
4	ИР + глицин (800 мг/кг)	2,16±0,07*#	2,30±0,09#	2,39±0,12

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

При оценке неврологического статуса у животных через 3 суток было показано, что курсовое введение соединения РУ-1355 и глицина способствовало более быстрому восстановлению неврологических функций у животных с ишемией/реперфузией. Так, к 3 суткам наблюдали почти полное восстановление всех неврологических нарушений. Средний балл неврологического статуса в обеих экспериментальных группах составил 93% от данных показателя ложнооперированных. В группе животных с окклюзией с ЛСМА, не получавших лечения, неврологическая симптоматика сохранялась на прежнем уровне.

Различие показателей неврологического дефицита животных получавших и не получавших лечение в течение 3 суток составило 18% ( $p < 0,05$ ).

На 7 сутки наблюдали полное восстановление мышечного тонуса, координации движения, двигательной активности и чувствительности во всех экспериментальных группах.

Таким образом, у животных с ишемией/реперфузией ЛСМА, которые получали в течение 7 суток исследуемое соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) внутрибрюшинно наблюдали более быстрое восстановление двигательной активности, увеличение силы мышц, ориентировочного движения на проволочной клетке, восстановление симметричности движения конечностей, особенно движение лапы на стороне контралатеральной повреждению за весь период наблюдения.

#### *«Адгезивный тест»*

Координационные односторонние нарушения оценивали при помощи адгезивного теста на 1, 3, 7, 14, 21, 28 сутки. До операции во всех группах животных показатели теста были сходными: коэффициент тактильной асимметрии  $K_{та}$  был близок к единице. Достоверное снижение соматосенсорной чувствительности правой лапки у крыс наблюдали на протяжении всего послеоперационного периода в контрольной группе «ишемия/реперфузия» по сравнению с результатами животных без ишемии (рис. 4.7). До окончания

периода наблюдения за животными (28 суток) полного восстановления функции не произошло.

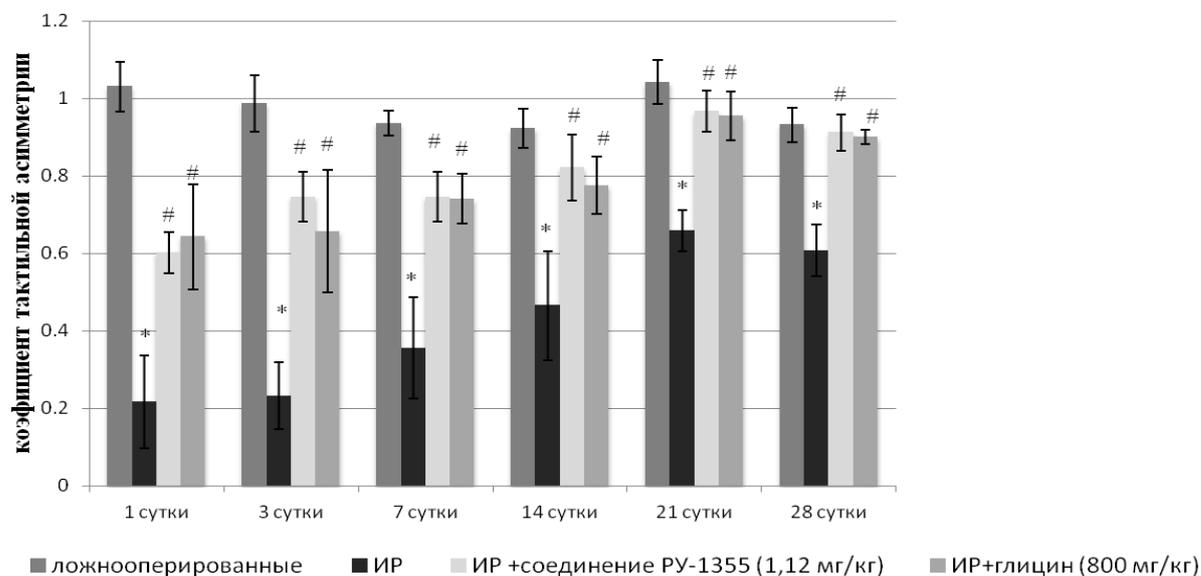


Рисунок 4.7. Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения глицин при курсовом введении животным с 60-ти минутной эндovasкулярной окклюзией ЛСМА на восстановление тактильной чувствительности в адгезивном тесте.

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса соответствующего дня)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

ИР - контроль-ишемия/реперфузия

При курсовом введении соединения РУ-1355 и глицина за 10 мин до реперфузии ЛСМА и в течение последующих 7 дней было показано статистически значимое восстановление нарушения чувствительности и моторной функции лапы с контрлатеральной стороны на всем протяжении наблюдения по сравнению с группой животных с ишемическо-реперфузионными повреждениями головного мозга.

Наиболее выраженные результаты оценки неврологического теста в обеих опытных группах были получены на 1 и 3 сутки наблюдения. Так, в группе животных, получавших соединение РУ-1355 и глицин на 1 сутки коэффициент тактильной асимметрии, превосходил соответствующий показатель в контрольной группе животных с ишемией/реперфузией в 3 и 3,2 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) рис. 4.7.

На 3 сутки в группах животных ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и ИР + глицин (800 мг/кг) коэффициент тактильной асимметрии превосходил в 3,75 и 3,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой животных с патологией, не получавших лечения ( $p < 0,05$ ) рис. 4.7, приложение 9.

#### *Тест «Вытягивание языка»*

Окклюзия ЛСМА приводит к дискординации языка, что проявляется достоверным снижением двигательной функции языка в группе «ишемия/реперфузия» по сравнению с группой ложнопериорированных животных ( $p < 0,05$ ). Полного восстановления функции языка за весь период наблюдения в группе животных с патологией, которые не получали соединения РУ-1355 и глицин не произошло.

Курсовое введение соединения РУ1355 и препарата сравнения животным оказывало благоприятное воздействие и на всех сроках постреперфузионного периода статистически значимо уменьшало расстройство функции языка по сравнению с группой контрольных животных ИР, не получавших исследуемые соединения. Наиболее выраженный эффект был показан на 1 и 3 сутки введения исследуемых соединений. В группе ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и ИР + глицин (800 мг/кг) на 1 сутки наблюдали восстановление двигательной активности языка в 10,5 и 7,5 раза соответственно по сравнению с результатами контрольной группы ИР ( $p < 0,05$ ). На 3 сутки при курсовом введении соединения РУ-1355 и глицина наблюдали снижение выраженности нарушения функции языка в 9 и 6,3 раза соответственно по сравнению с группой ИР ( $p < 0,05$ ) рис. 4.8. (приложение 10).

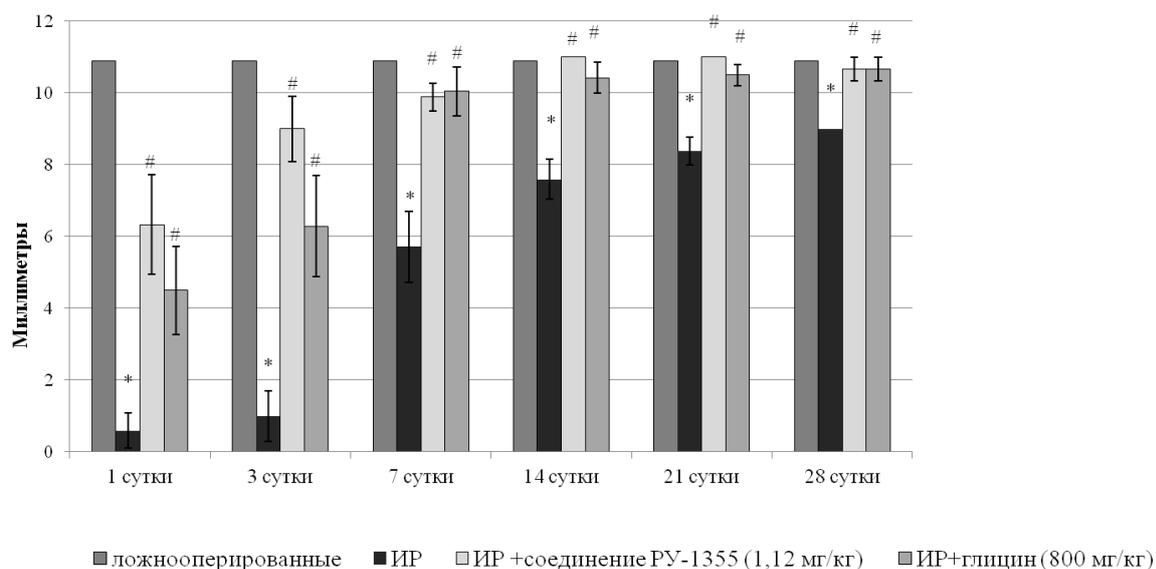


Рисунок 4.8. Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения глицин при курсовом введении животным с 60-ти минутной эндovasкулярной окклюзией ЛСМА на глубину съеденного столбика масла на разных сроках наблюдения.

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса соответствующего дня).

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и водили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

ИР - контроль-ишемия/реперфузия

#### 4.2.2 Влияние соединения РУ-1355 на поведенческие реакции животных

Практически у всех групп животных до операции ориентировочно-исследовательские и защитно-оборонительные реакции имели сходные данные

Оценка поведенческих реакций после ишемическо-реперфузионного повреждения проводили на 1, 7, 14, 21 и 28 сутки.

Таблица 4.6. Влияние соединения РУ-1355 и глицина на показатели двигательной активности в тесте «Открытое поле» у крыс после 60-ти мин. эндоваскулярной окклюзии ЛСМА и последующей реперфузией при курсовом введении (M±m).

№	Сутки	«Горизонтальная активность» (число пересеченных горизонтальных линий)			
		Ложнооперированные	Ишемия/реперфузия (ИР)	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	ИР +глицин (800 мг/кг)
До операции		57,49±7,95	59,00±8,48	60,6±10,70	49,8 ±5,50
1	1	51,80±11,08	19,00±5,77* <sup>&amp;</sup>	23,58±5,20 <sup>&amp;</sup>	37,17±8,71
2	7	49,00±10,30	35,43±7,73	55,33±14,13	41,10±8,06
3	14	48,40±7,84	38,60±2,65	45,80±6,65	59,86±18,14
4	21	45,00±9,62	26,60±3,44 <sup>&amp;</sup>	50,50±3,8 <sup>#</sup>	53,25±8,05 <sup>#</sup>
5	28	39,40±5,43	19,00±1,68* <sup>&amp;</sup>	55,67±6,36 <sup>#</sup>	53,0±5,13 <sup>#</sup>
«Движение на месте» (количество возникновения движений на месте)					
До операции		0,60±0,40	0,40±0,24	0,60±0,24	0,80±0,37
1	1	0,80±0,37	3,75 ±1,45	1,25±0,30	1,33 ±0,41
2	7	1,20±0,2	1,71±0,64	1,22±0,40	0,8±0,25
3	14	1,40±0,40	2,20±1,20	0,60±0,40	0,57±0,43
4	21	0,80±0,37	3,00±0,71* <sup>&amp;</sup>	0,75±0,48 <sup>#</sup>	0,50±0,29 <sup>#</sup>
5	28	1,20±0,20	4,50±1,32 <sup>&amp;</sup>	0,33±0,33 <sup>#</sup>	0,33±0,33 <sup>#</sup>
«Сидения на месте» (частота прекращения сидения в неподвижном состоянии)					
До операции		3,80±0,97	3,20±0,66	3,80±1,16	3,40±1,21
1	1	3,40±1,03	1,67±0,59	1,67±1,22	1,33±0,36
2	7	3,20±0,73	2,29±0,57	3,4±0,65	0,80±0,33* <sup>#</sup> <sup>\$</sup>
3	14	2,20±0,58	0,40±0,24* <sup>&amp;</sup>	3,8±0,49 <sup>#</sup>	1,14±0,77 <sup>\$</sup>
4	21	3,40±1,03	1,60±0,40	3,5±0,65 <sup>#</sup>	0,5±0,50* <sup>\$</sup>
5	28	3,20±0,97	2,00±0,41	3,0±0,58	0,33±0,33* <sup>#</sup> <sup>\$</sup>

Различия статистически значимы (P<0,05) по отношению к группе соответствующего дня: \* - л/о, интактных; # - контроль ИР; \$ - ишемия+РУ-1355 (p<0,05, критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна), по сравнению с: &- исходом своей группы (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05). Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и водили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

### *Оценка двигательной активности крыс*

У всех животных с ишемией/реперфузией ЛСМА наблюдали снижение двигательной активности, что проявлялось уменьшением показателя горизонтальной активности, увеличением частоты движения на месте и снижением частоты прекращения сидения неподвижно (табл.4.6). За весь период наблюдения (28 суток) полного восстановления двигательной активности в контрольной группе животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения, не наблюдали.

При курсовом введении соединения РУ-1355 выраженные нарушения поведенческих реакций двигательной активности были показаны через 24 после окклюзии ЛСМА. Начиная, с 7 дня наблюдали восстановление всех тестируемых показателей двигательной активности. Достоверное уменьшение частоты движения на месте и повышение частоты прекращения сидения на месте и восстановление горизонтальной активности наблюдали к концу 3 недели по сравнению с животными контрольной группы животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения.

Препарат сравнения глицин по показателям двигательной активности не уступал исследуемому соединению. Начиная с 7 дня, глицин способствовал полному восстановлению горизонтальной активности и показателя движения на месте и достоверные результаты по данным тестам так же наблюдали к 3 и 4 недели исследования по сравнению с группой животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения (табл.4.6).

### *Оценка исследовательской активности*

Оценка исследовательской активности проводили по следующим показателям: количество заглядывания в норку, количество актов обнюхивания и частота вставания в вертикальную стойку.

Таблица 4.7. Влияние соединения РУ-1355 и глицина на показатели исследовательской активности в тесте «Открытое поле» у крыс после 60-ти мин. эндоваскулярной окклюзии ЛСМА и последующей реперфузией при курсовом введении (M±m).

Экспериментальные группы					
№	Сутки	Ложнооперированные	Ишемия/реперфузия (ИР)	ИР + соединение РУ-1355	ИР + глицин
<b>«Норка»</b> (число заглядываний в отверстия)					
До операции		8,40±1,21	8,40±1,17	8,00±1,38	8,20±0,58
1	1	7,40±1,14	0,83±0,32 <sup>*&amp;</sup>	2,58±1,10 <sup>*&amp;</sup>	1,08±0,60 <sup>*&amp;</sup>
2	7	6,20±1,32	1,43±0,61 <sup>*&amp;</sup>	2,78±0,68 <sup>&amp;</sup>	1,90±0,57 <sup>*&amp;</sup>
3	14	5,80±0,58	1,40±0,40 <sup>*&amp;</sup>	3,20±0,97 <sup>&amp;</sup>	3,43±0,92 <sup>&amp;</sup>
4	21	7,40±1,14	0,40±0,24 <sup>*&amp;</sup>	3,75±0,63 <sup>#&amp;</sup>	4,25±1,11 <sup>#&amp;</sup>
5	28	8,00±1,38	0,50±0,50 <sup>*&amp;</sup>	4,00±0,58 <sup>#&amp;</sup>	5,0±1,15 <sup>#</sup>
<b>«Обнюхивание»</b> (число актов принюхивания)					
До операции		8,40±1,21	7,8±0,8	7,6±0,68	7,4±0,51
1	1	8,40±0,93	0,67±0,22 <sup>*&amp;</sup>	1,83±0,47 <sup>#&amp;</sup>	1,67±0,43 <sup>*&amp;</sup>
2	7	9,00±1,05	3,29±0,87 <sup>*&amp;</sup>	3,78±0,52 <sup>*&amp;</sup>	3,20±0,53 <sup>*</sup>
3	14	10,60±1,21	5,80±1,20 <sup>*</sup>	6,20±1,46 <sup>*</sup>	4,86±0,51 <sup>*</sup>
4	21	8,40±0,93	5,60±1,89	6,25±1,31	4,25±0,48 <sup>*</sup>
5	28	7,80±0,86	5,00±2,04	8,33±3,33	5,33±0,67
<b>«Вертикальная стойка»</b> (число вставаний на задние лапы)					
До операции		4,20±0,66	4,00±0,71	4,40±1,47	3,80±1,36
1	1	3,80±1,62	0,0±0,00 <sup>&amp;</sup>	0,17±0,17 <sup>&amp;</sup>	0,92±0,57
2	7	3,00±1,38	0,57±0,57 <sup>&amp;</sup>	0,56±0,29 <sup>&amp;</sup>	0,50±0,31
3	14	2,80±0,86	0,20±0,20 <sup>*&amp;</sup>	1,40±0,98	1,71±0,75
4	21	3,80±1,62	0,20±0,20 <sup>&amp;</sup>	3,5±1,04 <sup>#</sup>	2,0±0,41 <sup>#</sup>
5	28	4,40±1,47	0,25±0,25 <sup>*&amp;</sup>	5,33±1,45 <sup>#</sup>	4,67±0,88 <sup>#</sup>

Различия статистически значимы по отношению к группе соответствующего дня: \* - л/о, интактных; # - контроль ИР ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна), по сравнению с: & - исходом своей группы (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p \leq 0,05$ ). Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и водили физ. р-р в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР+глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

В контрольной группе животных с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА, не получавших лечения, отмечали резкое снижение исследовательской активности по всем показателям. Восстановление нарушений соответствующих показателей в контрольной группе животных за весь период исследования не наблюдали.

При курсовом введении соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и глицина (800 мг/кг) животным с ишемией/реперфузией было получены выраженные нарушения поисковой активности во всех показателях на 1 сутки. Однако, начиная с 2 недели исследования, наблюдали частичное восстановление показателей поисковой активности в группе животных «ИР + соединение РУ-1355» и «ИР + глицин». К окончанию 4 недельного наблюдения было показано восстановление исследовательской активности по всем тестам в группах получавших соединение РУ-1355 и препарат равнения на 83,3% и 77,6% соответственно (табл.4.7).

#### *Оценка эмоциональной активности*

Исследование эмоционального статуса проводили по следующим показателям: частота стойки с упором, количество возникновения фризинга и груминга.

Так, в контрольной группе животных с окклюзией ЛСМА, не получавших лечения, наблюдали повышение показателей тревожности: увеличение количество возникновения актов фризинга, повышение частоты стойки с упором и уменьшение актов длительного груминга начиная с 7 дня наблюдения по сравнению с животными без патологии. Уменьшение проявления тревожности на протяжении всего периода наблюдения не выявлено по отношению к группе ложнооперированных животных.

Курсовое введение соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и глицина (800 мг/кг) животным с ишемией/реперфузией способствовало снижению проявления тревожности по всем показателям по сравнению с контрольной группой животных с окклюзией ЛСМА без лечения. Статистически значимое уменьшение нарушений наблюдали только в тесте груминг к 3 и 4 неделе наблюдения, табл.4.8.

Таблица 4.8. Влияние соединения РУ-1355 и глицина на показатели эмоциональной активности в тесте «Открытое поле» у крыс после 60-ти мин. эндоваскулярной окклюзии ЛСМА и последующей реперфузией при курсовом введении (M±m).

Экспериментальные группы					
№	Сутки	Ложнооперированные	Ишемия/реперфузия (ИР)	ИР + соединение РУ-1355	ИР + глицин
<b>«Грумминг»</b> (количество актов вылизывания и почесывания)					
До операции		5,40±1,25	6,00±1,14	5,60±1,03	5,40±0,93
1	1	5,00±1,26	1,75 ±0,79	1,92±0,40 <sup>&amp;</sup>	1,67±0,54 <sup>&amp;</sup>
2	7	6,40±1,08	2,43±0,61 <sup>*</sup>	3,78±0,86	3,80±0,36
3	14	8,60±1,08	2,40±0,60 <sup>*</sup>	4,80±1,07 <sup>*</sup>	4,43±0,30 <sup>*</sup>
4	21	6,00±0,84	2,40±0,51 <sup>*</sup>	5,50±0,29 <sup>#</sup>	4,25±0,48 <sup>#</sup>
5	28	6,20±1,02	1,50±0,96 <sup>*&amp;</sup>	5,33±0,67 <sup>#</sup>	5,00±0,58 <sup>#</sup>
<b>«Фризинг»</b> (количество актов замиранья)					
До операции		0,40±0,24	1,40±0,40	1,00±0,32	0,80±0,37
1	1	0,80±0,37	0,75±0,41	0,50±0,34	0,75±0,45
2	7	1,00±0,32	1,86±0,88	1,00±0,50	0,80±0,55
3	14	1,00±0,45	4,80±2,33	1,00±0,45	0,43±0,30
4	21	1,20±0,37	3,00±1,38	2,00±1,41	0,0±0,00 <sup>*</sup>
5	28	1,40±0,60	3,50±1,50	1,67±0,88	0,0±0,00
<b>«Стойка с упором»</b> (количество вертикальных стоек на задних лапах с упором передними в стенку)					
До операции		3,00±0,55	2,40±0,75	2,60±0,51	2,20±0,20
1	1	4,80±0,80	1,00±0,44 <sup>*</sup>	1,50±0,66 <sup>*</sup>	1,25±0,52 <sup>*</sup>
2	7	4,60±0,24	3,71±1,29	3,22±1,02	3,30±1,02
3	14	2,60±0,51	4,80±1,53	1,20±0,80	2,86±0,80
4	21	2,20±0,37	3,20±0,92	3,0±0,71	3,25±0,48
5	28	2,60±0,68	3,50±1,04	3,67±0,33	2,67±0,33

Различия статистически значимы по отношению к группе соответствующего дня: \* - л/о, интактных; # - контроль ИР ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна). по сравнению с: & - исходом своей группы (непараметрический метод Фризмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и водили физ. р-р в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

### *4.2.3 Действие вещества РУ-1355 на уровень нейронспецифической енолазы в сыворотке крови у крыс*

По различным литературным данным было выявлено, что значительное повышение уровня нейронспецифической енолазы в сыворотке крови при повреждении нейронов наблюдается и в более поздние периоды времени. Так, высокие значения уровня NSE определяли и на 1 и на 3 сутки после повреждения нервной ткани [Семененко, 2013; Цыган, 2013].

В качестве референтного значения концентрации фермента NSE использовали показатель группы интактных и ложнопериорированных животных.

При анализе динамики концентрации NSE в сыворотке крови у животных всех экспериментальных групп с ишемией ЛСМА наблюдали повышение уровня маркера в течение всего эксперимента. Однако между исследуемыми группами статистически значимых различий не выявили.

У животных контрольной группы («ишемия/реперфузия») на 1 и 3 сутки наблюдали рост уровня биомаркера в сыворотке крови по сравнению с животными без патологии на 26 и 73 % соответственно ( $p>0,05$ ) табл. 4.9.

При курсовом введении соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицина в дозе 800 мг/кг животным с ишемии/реперфузией наблюдали на 1 и 3 сутки более низкий подъем уровня маркера повреждения нейронов на 23% и 39,5% соответственно по отношению к группе «ишемия/реперфузия» ( $p>0,05$ ) (табл. 4.9). На 3 сутки определения концентрации NSE в сыворотке крови было показано ограничение роста маркера у животных, получавших исследуемое соединение РУ-1355 и глицин, на 32,7% и 23,1% соответственно по сравнению с результатами группы животных ИП ( $p>0,05$ ).

Таблица 4.9. Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения на уровень нейронспецифической енолазы в сыворотке крови крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей реперфузией ( $M \pm m$ ).

№	Группа	Уровень нейронспецифической енолазы (NSE), нг/мл	
		1 сутки	3 сутки
1	Интактные	0,35±0,03	0,30±0,07
2	Ложнооперированные	0,34±0,04	0,29±0,05
3	Ишемия/реперфузия (ИР)	0,43±0,09	0,52±0,21
4	ИР +соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	0,33±0,04	0,35±0,08
5	ИР +глицин (800 мг/кг)	0,26±0,02	0,40±0,11

Примечание:

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна.

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

### 4.3 Заключение

При комплексной оценке неврологических, биохимических, морфометрических и поведенческих изменений у животных с окклюзией ЛСМА, получавших соединение РУ-1355, было выявлено первичное нейропротекторное действие.

При однократном введении изучаемого соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА было показано ограничение роста маркера повреждения головного мозга нейронспецифической енолазы в 1,67 раза по сравнению с контрольной группой животных, без лечения ( $p < 0,05$ ), уменьшение выраженности проявления нарушения двигательной активности и координации на 58%, мышечного тонуса на 68%, снижение нарушения

хвотального рефлекса на 40% и 25% улучшение чувствительности по отношению к животным контрольной группы ( $p < 0,05$ ), а так же ограничение зоны некроза в 2,3 раза и отека мозга на 59% по сравнению с контрольной группы животных «ишемия/реперфузия», не получавших лечения ( $p < 0,05$ ). По совокупности эффектов исследуемое соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг превосходило препарат сравнения первичный нейропротектор глицин (800 мг/кг), магния сульфат (90 мг/кг) и селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (1 мг/кг).

При курсовом исследовании соединения РУ-1355 в дозе (1,12 мг/кг) в условиях эндоваскулярной окклюзией ЛСМА наблюдали менее выраженные неврологические нарушения по шкале Гарсия, дополненной тестами из других шкал на всем периоде наблюдения по сравнению с контрольной группой ИР. Так, исследуемое соединение через 24 часа после окклюзии ЛСМА способствовало снижению неврологической симптоматики на 17% по сравнению с группой контрольных животных с ишемией/реперфузией без лечения ( $p < 0,05$ ). К 3 суткам наблюдали почти полное восстановление всех неврологических показателей в группе животных с соединением РУ-1355, что на 18% превосходило данные группы животных с ишемией/реперфузией без лечения ( $p < 0,05$ ). На 7 сутки было показано полное восстановление мышечного тонуса, координации движения, двигательной активности и чувствительности во всех экспериментальных группах. Подобная тенденция наблюдалась и в группе животных «ИР+глицин» (800 мг/кг).

При курсовом введении соединения РУ-1355 наблюдали статистически значимое восстановление чувствительности и моторной функции лапы с контрлатеральной стороны на всем протяжении исследования по сравнению с группой животных с ишемическо-реперфузионными повреждениями головного мозга, не получавших лечения. Наиболее выраженные результаты были получены в группе животных, получавших исследуемое соединение, были показаны на 1 и 3 сутки наблюдения. При курсовом введении соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) было получено, что коэффициент тактильной асимметрии на 1 и 3 сутки достигал

нормы и превосходил соответствующий показатель в группе животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения, в 3 и 3,75 раза ( $p < 0,05$ ).

Курсовое введение соединения РУ-1355 животным при ишемическо-реперфузионном повреждении статистически значимо уменьшало расстройство функции языка в тесте «вытягивания языка» по сравнению с группой контрольных животных ишемия/реперфузия, не получавших лечения. Наиболее выраженный эффект наблюдали также на 1 и 3 сутки введения исследуемого соединения. Так, на 1 сутки наблюдали восстановление двигательной активности языка в 10,5 раза по сравнению контрольной группой ИР, не получавших исследуемые соединения ( $p < 0,05$ ). На 3 сутки при курсовом введении соединения РУ-1355 было показано снижение выраженности нарушения функции языка в 9 раз по сравнению с группой ИР ( $p < 0,05$ ).

При исследовании поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» было показано, что курсовое введение исследуемого соединения в дозе 1,12 мг/кг способствовало, начиная с 7 дня частичному восстановлению всех показателей поведения. Так, к 4 неделе исследования наблюдали полное восстановление всех поведенческих реакций, по сравнению с животными с ишемией/реперфузией, не получавшими лечения ( $p > 0,05$ ). Подобный эффект был показан и в группе животных, которые получали препарат сравнения глицин (800 мг/кг).

Также при курсовом применении соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг наблюдалось ограничение роста концентрации NSE в сыворотке крови на 1 и 3 сутки определения на 23% и 32,7% по сравнению с контрольной группой животных ИР, без лечения ( $p > 0,05$ ). Уменьшение показателей концентрации на 1 и 3 сутки маркера повреждения нейронов наблюдали и при курсовом применении препарата сравнения глицин в дозе 800 мг/кг на 39,5% и 23,1% соответственно по сравнению с контрольной группой ИР ( $p > 0,05$ ). По совокупности эффектов исследуемое соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг превосходило либо было подобно препарату сравнения первичному нейропротектору глицину.

Предположительный нейропротекторный механизм действия производного 2-аминобензимидазола РУ-1355 – ингибирование NHE-1, что в свою очередь предотвращает избыточное поступление кальция внутрь нейронов. Впоследствии прерывание глутамат-кальциевого каскада способствует коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем.

## **ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ЗОНИПОРИД НА ТРОМБОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ВЯЗКОСТЬ КРОВИ**

Нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и реологических свойств крови играют очень важную роль в развитии и прогрессировании ишемических состояний головного мозга [Щепанкевич, 2011].

Комплекс гемореологических нарушений может быть рассмотрен как синдром гипервязкости крови. К факторам, определяющим повышение вязкости крови, условно относят макрореологические (гематокрит, вязкость плазмы) и микрореологические (агрегация и деформируемость эритроцитов) [Муравьев, 2009]. Течение ишемического повреждения головного мозга зависит от активации эндотелиальных клеток и тромбоцитов (адгезивно-агрегационная активность тромбоцитов и внутрисосудистая активность тромбоцитов) [Танашян, 2013; Медведев, 2009].

Ишемическое повреждение различного генеза является универсальным механизмом нарушения клеточных мембран клеток крови [Андрианова, 2008]. Адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов принадлежит ведущая роль в развитии первичного гемостаза. В норме тромбоциты имеют характерную дискоидную форму и практически гладкую поверхность, что является одним из важнейших факторов, препятствующих развитию внутрисосудистого тромбоза. Патологические состояния приводят к активации тромбоцитов и перестройки из дискоцита в дискоэхиноцит, т.е. дискоцит, у которого на поверхности появляются отростки, и далее в сфероцит или сфероэхиноцит. У последнего не только форма становится все более сферичной, но и возрастает число отростков [Медведев, 2014]. Повышение тромбогенного потенциала приводит к усугублению течения острого периода ишемического осложнения и повышению риска повторных тромботических событий [Плотников, 2005].

В норме эритроцит при прохождении по сосудистому руслу постоянно находится в деформируемом состоянии, т.е. обладает способностью обратимо изменять размер и форму для движения через кровеносные капилляры [Зинчук, 2001]. При повышении деформируемости эритроцитов перенос кислорода в ткани увеличивается, при снижении - уменьшается. Патологическая агрегация эритроцитов сопровождается их повреждением и превращением части дискоцитов в эхиноциты с последующим выделением в кровь эритроцитарных факторов свертывания и возникновению гиперкоагуляции. В результате длительного склеивания эритроцитов, происходит нарушение тканевого метаболизма [Ройтман, 2001; Pribush, 2000; Spengler, 2001].

Известно, что NHE-1 экспрессируется не только в различных структурах головного мозга, но и в клетках крови: эритроцитах и тромбоцитах [Pedersen, 2006]. Так, NHE -1 в клетках крови в норме выполняют различные функции: в эритроцитах регулирует сродство и насыщение гемоглобина  $O_2$ , в тромбоцитах, эритроцитах и лимфоцитах отвечает за объем и pH клетки [Chang, 2015]. В условиях ишемическо-реперфузионного повреждения происходит активация NHE-1, что приводит к повышению образования агрегатов эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов [Ichard, 2011], таким образом, изменение функциональной активности NHE-1 способствует повышению тромбогенного потенциала и нарушению гемореологических свойств крови.

В настоящее время имеются данные о возможности ингибиторов NHE первой изоформы, таких как карипорид, амилорид и зонипорид уменьшать тромбогенный потенциал крови на экспериментальных моделях ишемии/реперфузии [Lee, 2006; Gumina, 2011].

К современным стратегическим направлениям в лечении цереброваскулярных патологий относится не только защита нейрона от повреждающего действия ишемии, но и восстановление гемобиологических свойств крови.

Поэтому целесообразно было провести комплексную оценку воздействия соединения РУ-1355 на различные гемореологические показатели: агрегацию тромбоцитов, вязкость крови и агрегацию эритроцитов условиях активации NHE-1 ишемической и неишемической природы.

## **5.1 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на различные звенья гемостаза в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий**

### *5.1.1 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию тромбоцитов*

В физиологических условиях  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник первой изоформы тромбоцитов участвует в электронейтральном обмене ионов  $\text{Na}^+$  на ионы  $\text{H}^+$  и его основная физиологическая роль состоит в регуляции рН и объема клетки. [Chang, 2015]. При понижении изменении рН происходит активация NHE и запуск каскада реакций, приводящий к активации и агрегации тромбоцитов [Ruffin, 2014; Leng, 2014].

#### *5.1.1.1 Исследование влияния соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию тромбоцитов у ложнооперированных животных*

При оценке АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на двухканальном лазерном анализаторе в группе животных без патологии, которые не получали исследуемые соединения, степень агрегации тромбоцитов составила  $28,41 \pm 1,89$ .

В группе животных, без патологии, получавших соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорид (1 мг/кг) в/в, не выявлено каких либо изменений % светопропускания плазмы богатой тромбоцитами при сравнении с результатами группы ложнооперированных животных.

Таким образом, при введении соединения РУ-1355 и селективного ингибитора NHE-1 зонипорида животным агрегация тромбоцитов, вызванная индуктором АДФ, не изменялась (табл. 5.1).

Таблица 5.1. 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 ( $M \pm m$ ).

№	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 ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе:

\*-л/о; # - контроль ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса).

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без билатеральной окклюзии ОСА; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым через 10 мин. после реперфузии в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР+зонипорид» - группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили зонипорид в дозе 1 мг/кг.

#### *5.1.1.2 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию тромбоцитов крови крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий*

При формировании глобальной ишемии/реперфузии головного мозга путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий с контролируемой гипотензией в контрольной группе, не получавшей исследуемые вещества, наблюдаюсь

статистически значимое ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов ( $46,69 \pm 3,41$ ) на 64% по сравнению с результатами ложнооперированных животных ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.1).

Наиболее выраженное ограничение роста агрегации тромбоцитов наблюдали при однократном в/в введении через 10 мин после реперфузии исследуемого соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг ишемизированным животным. Так было показано достоверное уменьшение степени агрегации на 45,7% по сравнению с группой контрольных животных, не получавших исследуемые соединения (табл. 5.1).

Зонипорид в дозе 1 мг/кг при в/в через 10 мин. после реперфузии в условиях повреждения головного мозга также способствовал статистически значимому снижению АДФ–индуцированной агрегации тромбоцитов на 65% по сравнению с результатами группы животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)».

Таким образом, снижение исследуемыми соединениями АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, может способствовать уменьшению вероятности возникновения тромбогенных осложнений.

### *5.1.2 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на вязкость крови*

При ишемическом повреждении головного мозга синдром повышенной вязкости крови может приводить к различным расстройствам в системе микроциркуляции, способствует нарушению кислородтранспортной функции крови, замедлению потока крови и развитию тромбоза [Танашян, 2010; Tsuda, 2010].

Повышение вязкости крови при малых скоростях сдвига свидетельствует о повышении агрегации в веноулярных отделах микроциркуляции. Если происходит повышение данного показателя при больших скоростях сдвига, то это означает нарушение структуры и функции эритроцита.

У контрольной группы животных с ишемией/реперфузией, не получавшей исследуемые соединения, было выявлено стойкое повышение вязкости крови при различных скоростях сдвига по сравнению с группой ложнооперированных животных ( $p < 0,05$ ), что является следствием увеличения агрегации и уменьшения деформируемости эритроцитов.

При исследовании влияния соединения РУ-1355 и препарата сравнения зонипорида при однократном в/в введении на вязкость крови крыс в условиях глобальной ишемии/реперфузии мозга было показано уменьшение гемореологических нарушений при низких скоростях сдвига  $50\text{с}^{-1}$ ,  $20\text{с}^{-1}$  и  $10\text{с}^{-1}$ . Наиболее выраженный эффект наблюдали при введении соединения РУ-1355 при скорости сдвига  $10\text{с}^{-1}$  на 24,5% по отношению к группе животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ( $p < 0,05$ ), так же наблюдали снижение индекса агрегации эритроцитов на 21% по сравнению с контрольной группой животных ИР, однако данные были статистически недостоверны. При сравнении с исследуемым соединением, зонипорид практически не оказывал влияния на показатели вязкости крови при низких сдвиговых скоростях и на индекс агрегации эритроцитов (табл. 5.2).

### *5.1.3 Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на агрегацию эритроцитов крови*

Известно, что в крупных сосудах в норме эритроциты могут собираться в «монетные столбики», но данные агрегаты нестабильны, впоследствии эритроциты способны не повреждаясь, отделяться друг от друга [Мороз, 2012].

Подобную тенденцию образования нестабильных агрегатов наблюдали в группе животных без ишемического-реперфузионного повреждения головного мозга.

Таблица 5.2. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида при однократном внутривенном введении на вязкость крови крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий и в условиях нормы ( $M \pm m$ ).

Группа животных	Показатель вязкости крови (мПа*с) при скорости сдвига						ИАЭ, у.е
	300с <sup>-1</sup>	200с <sup>-1</sup>	100с <sup>-1</sup>	50с <sup>-1</sup>	20с <sup>-1</sup>	10с <sup>-1</sup>	
Ложнооперированные	3,42±0,09	3,55±0,09	4,14±0,09	4,95±0,14	6,5±0,2	7,91±0,32	2,31± 0,11
Ишемия/реперфузия (ИР)	3,89±0,08*	4,08±0,02*	4,88±0,13*	6,05±0,18*	8,5±0,31*	11,09±0,56*	2,85± 0,45
ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	3,71±0,18	3,86±0,18	4,63±0,26*	5,40±0,30	7,3±0,55	8,40±0,63 <sup>#</sup>	2,26± 0,34
ИР + зонипорид (1 мг/кг)	3,78±0,10	3,96±0,11*	4,69±0,13*	5,78±0,18*	7,96±0,36*	10,58±0,44* <sup>\$</sup>	2,80± 0,06

Примечание:

ИАЭ – индекс агрегации эритроцитов (отношение вязкости крови при скорости сдвига 10с-1 к вязкости крови при 300с-1)

Различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе:

\*-л/о; # - контроль ИР; \$ - соединение РУ-1355 ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без билатеральной окклюзии ОСА; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым через 10 мин. после реперфузии в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР+зонипорид» - группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили зонипорид дозе 1 мг/кг.

При исследовании показателя агрегации отмытых эритроцитов крыс в контрольной группе животных с ишемией/реперфузией было показано статистически значимое повышение степени агрегации эритроцитов и среднего числа эритроцитов в агрегате в 3,3 и 1,7 раза соответственно по сравнению с результатами ложнооперированных животных (табл. 5.3).

Соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении через 10 мин после начала реперфузии крысам с экспериментальной ишемией/реперфузией головного мозга приводило к снижению степени агрегации эритроцитов на 43% и размера агрегатов на 23% по сравнению с контрольной группой животных, получавших физиологический раствор ( $p < 0,05$ ).

Зонипорид также оказался эффективным в отношении исследуемых показателей агрегации. Так, степень агрегации и средний размер агрегатов зонипорид снижал на 32% и 28% соответственно по сравнению с группой животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.3).

Полученные данные коррелируют с результатами снижения вязкости крови при введении соединения РУ-1355 животным с билатеральной окклюзией ОСА.

## **5.2 Антитромбогенный эффект соединения РУ-1355 и зонипорида**

В условиях повреждения эндотелия сосудов происходит обнажение субэндотелиального коллагена и фактора фон Виллебранда, который связывается с тромбоцитарными рецепторами и запускает каскад активации тромбоцитов. В период первичного или тромбоцитарного гемостаза происходит выделение целого ряда активных веществ: тромбина, АДФ, серотонина, тромбоксана А<sub>2</sub> и др. [Голухова, 2013]. Выделившиеся вещества приводят к активации NHE -1 тромбоцитов и агрегации кровяных пластинок [Gende, 1991]. Поэтому предположительно применение ингибитор NHE-1 способно снижать тромбогенный потенциал крови, что имеет большое значение в патогенезе ишемических состояний.

Таблица 5.3. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида при однократном внутривенном введении на показатели агрегации эритроцитов крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий и в условиях нормы ( $M \pm m$ ).

№	Группы животных	Степень агрегации (отношение числа агрегатов к количеству эритроцитов)	Средний размер агрегата (отношение среднего числа эритроцитов, приходящихся на один агрегат)
1	Ложнооперированные	0,17±0,03	2,20±0,09
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	0,56±0,08*	3,54±0,21*
3	ИР + соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	0,32±0,04*#	2,72±0,05*#
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	0,38±0,02*#	2,56±0,05*#

Примечание:

Различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе:

\*-л/о; # - контроль ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без билатеральной окклюзии ОСА; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым через 10 мин. после реперфузии в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР+зонипорид» - группы животных, которым однократно через 10 мин. после реперфузии в/в вводили зонипорид дозе 1 мг/кг.

Артериальный тромбоз, вызванный аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) приводит к свободно радикальному повреждению сосудистой стенки вследствие взаимодействия железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы. Обработка общей сонной артерии крыс раствором хлористого железа (III) приводит к образованию тромба, показателями которого является время полной окклюзии сосуда (остановка кровотока) [Vestrick, 2007].

В связи с этим была проведена оценка воздействия на активацию тромбоцитов соединения РУ-1355 и препарата сравнения селективного ингибитора NHE-1 зонипорида с учетом влияние различных факторов определяющих процесс внутрисосудистой агрегации тромбоцитов в условиях артериального тромбоза.

Среднее время окклюзии сонной артерии в контрольной группе животных, которым вводился физиологический раствор, составило 15,8 минут. При введении внутрь крысам препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты в дозе ED<sub>50</sub> (114,74 мг/кг), антитромбоцитарный эффект, который обусловлен ацетилированием и необратимым ингибированием циклооксигеназы (ЦОГ) или простагландин Н синтетазы, являющиеся начальным ферментом в синтезе простагландинов – превращении арахидоновой кислоты в простагландин Н, статистически значимо на модели артериального тромбоза продлевало время образования тромба на 54 % по сравнению с интактными животными. Исследуемое соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (1 мг/кг) при внутривенном введении способствовали пролонгированию времени образования тромба на 14 и 21% соответственно, однако полученные данные были статистически недостоверны по отношению к группе интактных животных (табл. 5.4).

Таблица 5.4. Влияние соединения РУ-1355 на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) ( $M \pm m$ ).

№	Группа животных	Время наступления окклюзии, мин.
1	Интактные	15,8± 0,22
2	Контроль-ацетилсалициловая кислота (114,74 мг/кг)	24,25±0,73*
3	Соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг)	18,00± 1,83
4	Зонипорид (1 мг/кг)	19,20±1,78

Примечание:

Различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе:

\*-интактным ( $p \leq 0,05$ , критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна)

### 5.3 Заключение

Таким образом, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при внутривенном введении крысам через 10 мин. после реперфузии с билатеральной окклюзией ОСА приводит к коррекции гемореологических нарушений.

У ложнооперированных соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг не оказывает на влияния на  $Na^+/H^+$  – обменник клеток. При активации NHE-1 в условиях патологии исследуемое соединение способствует его ингибированию.

Так, при исследовании влияния соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) на свойства тромбоцитарного гемостаза у крыс в условиях глобальной ишемии/реперфузии было получено достоверное снижение АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов на 45,7% по сравнению с группой животных ИР, превосходя по активности препарат сравнения зонипорид.

Изученное соединение нормализовало вязкость крови при низких скоростях сдвига  $50c^{-1}$ ,  $20c^{-1}$  и  $10c^{-1}$ , однако наиболее выраженное статистически значимое действие на вязкость крови соединение РУ-1355 оказало при скорости сдвига  $10c^{-1}$  на 24,5% по отношению к группе животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о воздействии исследуемого вещества в большей степени на агрегационный компонент данного показателя, что подтверждается снижением индекса агрегации

эритроцитов на 21% по сравнению с группой животных ИР ( $p>0,05$ ). Менее эффективные результаты восстановления гемореологических показателей были выявлены при введении препарата сравнения селективного ингибитора зонипорида животным с билатеральной окклюзией ОСА.

При микроскопии образцов крови у крыс выявлено, что соединение РУ-1355 достоверно снижает степень агрегации эритроцитов и уменьшает средний размер эритроцитарных агрегатов на 43 и 23 % соответственно по сравнению с группой животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)». Причем результаты коррелируют с данными по исследованию вязкости крови.

Так же на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III), которая учитывает влияние не только тромбоцитов, но и внутрисосудистых факторов было показано, что соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) зонипорид удлиняют время образования тромба на 14 % и 21 % соответственно по сравнению с интактными животными ( $p>0,05$ ).

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение РУ-1355 и селективный ингибитор NHE-1 зонипорид снижают вероятность тромбогенных осложнений, уменьшая активацию и агрегацию тромбоцитов, эритроцитов и улучшая реологические свойства крови. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что соединение РУ-1355 способствует блокированию NHE-1 форменных элементов крови, предположительно, предотвращая избыточное внутриклеточное содержание кальция.

## ГЛАВА 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 С РАЗЛИЧНЫМИ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫМИ СИСТЕМАМИ

NHE-1 участвует в регулировании внутриклеточного рН и локализован в различных клетках центральной нервной системы: во всех изученных типах нейронов, эндотелиальных клетках сосудистой стенки, астроцитах и клетках микроглии. Соответственно NHE-1 может образовывать взаимодействие с различными нейромедиаторами и оказывать косвенное влияние на нейротрансмиссию в ЦНС [Pedersen, 2006; Rocha, 2008].

На сегодняшний день существуют данные о том, что известные ингибиторы NHE способны взаимодействовать и с иными рецепторными мишенями. Так, неселективный ингибитор  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - обменника амилорид оказывает влияние на серотониновые и ГАМК-рецепторы [Jang, 2006; Goñi-Allo, 2007]. Селективный ингибитор NHE-1 зонипорид проявляет активность в отношении никотиновых рецепторов [Santos-Torres, 2011].

Поэтому необходимо проведение фармакологического анализа на возможность проявления иных нейромедиаторных взаимодействий.

### 6.1 Влияние на моноаминергическую систему головного мозга

*Действие соединения РУ-1355 на стереотипное поведение, вызванное фенамином*

Фенамин при введении животным увеличивает спонтанную двигательную активность, что предположительно может быть обусловлено не прямой стимуляцией  $\text{D}_2$ -рецепторов и, как следствие, усилением дофаминергической нейротрансмиссии в мезолимбической системе мозга [Островская, 2012]. Однако нельзя исключать влияние исследуемого соединения и на другие механизмы повышения двигательной активности у животных, учитывая, то, что фенаминовая стереотипия может быть обусловлена воздействием на норадренергическую и серотонинергическую передачу в нервных окончаниях [Robertson, 2009; Kleijn, 2012].

В контрольной группе животных под влиянием фенамина наблюдали возникновение беспокойства и стереотипного поведения (табл. 6.1).

Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при внутрибрюшинном введении не оказывало влияния на фенамин-индуцированные поведенческие проявления. Однако в дозе 5 мг/кг наблюдали статистически достоверное укорочение латентного периода беспокойства и увеличение длительности стереотипии в 2 раза по сравнению с контрольной группой крыс ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6.1. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на эффекты фенамина ( $M \pm m$ ).

Показатель	Группа 1 Контроль (физ.раствор + 5,0 мг/кг фенамин) n=6	Группа 2 РУ-1355 (1,12 мг/кг+5,0 мг/кг фенамин) n=6	Группа 3 РУ-1355 (5,0 мг/кг+ 5,0 мг/кг фенамин) n=6
Латентный период беспокойства (мин)	7,3±1,20	7,2±0,54	4,3±0,62 <sup>#</sup>
Длительность беспокойства (мин)	8,2±0,91	5,2±0,83	7,2±0,95
Длительность стереотипии (мин)	283,2±9,39	340,0±13,84	579,2±10,47*

Примечание:

-\* - достоверно по отношению к контролю (физ.раствор + фенамин) ( $p \leq 0,05$ , критерий Краски Уолиса с постобработкой тестом Данна)

# - достоверно по отношению к РУ-1355 (1,12 мг/кг)+фенамин ( $p \leq 0,05$ , критерий Краски Уолиса с постобработкой тестом Данна).

Таким образом, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг не оказывало влияния на эффекты фенамина. При введении исследуемого соединения в дозе 5,0 мг/кг наблюдали статистически значимые изменения фенамин-индуцированных проявлений: укорочение латентного периода беспокойства и увеличение длительности стереотипии в 2 раза по сравнению результатами контрольной группы животных ( $p < 0,05$ ).

*Воздействие соединения РУ-1355 на гиперкинез, вызванный 5 гидрокситриптофаном у мышей*

Активация серотонинергической системы ЦНС при помощи предшественника серотонина — 5-гидрокситриптофана при внутрибрюшинном введении у мышей проявляется характерным гиперкинезом в виде резких встряхиваний головой. [Островская, 2012]. Соответственно при наличии у вещества тропности к серотонинергической системе будет наблюдаться изменения выраженности и длительности данного эффекта.

В контрольной группе животных максимальное количество встряхиваний головой отмечали в течение всего периода наблюдения после введения индуктора в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно, с постепенным последующим снижением эффекта (табл. 6.2).

При однократном приеме соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до введения индуктора, не наблюдали воздействия на стимулирующие эффекты 5-гидрокситриптофана. При увеличении дозы соединения РУ-1355 (5,0 мг/кг) была выявлена тенденция к потенцированию эффектов 5-ГТФ на 10 и 20 минуте. Однако данные были статистически недостоверны (табл. 6.2).

Таким образом, было показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 1,12 мг/кг не оказывало влияния на эффекты индуктора серотонинергической системы. В дозе превышающей эффективную (5 мг/кг) наблюдали тенденцию к потенцированию эффектов 5-ГТФ.

*Действие соединения РУ-1355 на стереотипное поведение, вызванное апоморфином*

Апоморфин - агонист пресинаптических дофаминовых рецепторов - в дозе 1 мг/кг подкожно приводит к возникновению стереотипного поведения у животных [Островская, 2012].

В группе контрольных животных на 30 и 60 минуте после введения дофаминового агониста наблюдали развитие постоянной и интенсивной стереотипии, в дальнейшем было показано постепенное снижение эффектов апоморфина (табл. 6.3).

При введении исследуемого соединения РУ-1355 в дозе 1,12 и 5,0 мг/кг внутрибрюшинно за 30 минут до начала наблюдения не выявлено изменения выраженности апоморфинового ответа у животных (табл. 6.3).

Таблица 6.2. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на гиперкинез, вызванный 5-гидрокситриптофаном в дозе 300 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Мин.	Группа №1 Контроль (физ.раствор + 5- ГТФ) n=6	Группа №2 РУ-1355 (1,12 мг/кг) + 5-ГТФ n=6	Группа №3 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + 5-ГТФ n=6
Количество встряхиваний головой до введения 5-ГТФ			
0	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
Количество встряхиваний головой после введения 5-ГТФ			
10	9,7±0,88	8,3±0,88	17,8±3,61
20	11,7±0,67	9,0±1,53	18,17±3,14
30	17,0±2,52	15,3±1,76	16,5±2,22
40	16,0±1,16	16,7±3,71	14,3±2,01
50	10,0±1,00	11,7±2,33	12,0±1,48
60	6,0±2,08	11,3±2,60	6,7±1,59

Примечание:

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа с посттестом Ньюмана-Кеулса.

Обозначение: 5ГТФ - 5-гидрокситриптофан

Таблица 6.3. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у крыс на апоморфиновую стереотипию в дозе 1 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Выраженность стереотипии, баллы			
Мин.	Группа 1 Контроль	Группа 2 РУ-1355 (1,12 мг/кг)	Группа 3 РУ-1355 (5,0 мг/кг)
30	2,9±0,08	2,5±0,22	2,5±0,22
60	3,0±0,00	2,8±0,17	2,8±0,25
90	0,5±0,50	1,2±0,54	0,8±0,40
120	0,0±0,00	0,2±0,17	0,0±0,00

Примечание:

Статическая обработка проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с постобработкой тестом Бонферони.

#### *Влияние соединения РУ-1355 на каталептогенный эффект галоперидола*

Галоперидол - блокатор дофаминовых  $D_2$  - рецепторов на уровне стриарной системы в дозе 1 мг/кг при внутрибрюшинном введении [Воронина, 2012] индуцирует развитие состояния каталепсии, проявляющееся в застывании животного в непривычной позе.

В контрольной группе животных был показан максимальный каталептогенный эффект, который сохранялся на протяжении всего периода наблюдения и составил 3 балла (табл. 6.4).

Исследуемое соединение РУ-1355 в изучаемых дозах при внутрибрюшинном введении не вызывало статистически значимых изменений каталептогенных свойств галоперидола у крыс (табл. 6.4).

Таким образом, по результатам двух тестов можно сказать, что соединение РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг не оказывало существенного влияния на дофаминергическую нейротрансмиссию в ЦНС.

Таблица 6.4. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у крыс на галоперидоловую каталепсию в дозе 1 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Выраженность каталепсии, баллы			
Мин.	Группа 1 Контроль (физ.раствор + галоперидол)	Группа 2 РУ-1355 (1,12 мг/кг) + галоперидол	Группа 3 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + галоперидол
15	3,0±0,00	3,0±0,00	2,8±0,17
30	3,0±0,00	3,0±0,00	2,8±0,17
45	3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00
60	3,0±0,00	3,0±0,00	2,8±0,17
120	3,0±0,00	3,0±0,00	2,8±0,17

Примечание:

Статическая обработка проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с постобработкой тестом Бонферони.

#### *Влияние соединения РУ-1355 на гипотермический эффект клофелина*

Данный тест позволяет изучать влияние исследуемых соединений на различные адренергические нейрохимические механизмы, в основе которых лежит активация пресинаптических  $\alpha_2$ -адренорецепторов клофелином. При этом наблюдается угнетение симпатической импульсации из ЦНС, что сопровождается выраженным снижением секреции норадреналина из нервных окончаний, и в конечном итоге приводит к гипотермии и уменьшению двигательной активности [Андреева, 2005].

Так,  $\alpha_2$ -адреномиметик – клофелин в дозе 0,1 мг/кг в контрольной группе животных уже на 30 минуте индуцировал значительное снижение ректальной температуры. Максимальное снижение наблюдали на 60 минуте исследования 2,5°С по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.5).

При комбинированном применении соединения РУ-1355 в исследуемых дозах (1,12 мг/кг и 5,0 мг/кг) с клофелином было показано препятствие гипотермии, вызванной индуктором на 30 минуте эксперимента, однако данные были статистически незначимы (табл. 6.5).

### Влияние соединения РУ-1355 на гипотермический эффект резерпина

Механизм действия резерпина основан на истощении запасов норадреналина, дофамина, серотонина в нейронах мозга, за счет нарушения способности везикул, которые содержат медиаторы, захватывать, сохранять биогенные амины. Резерпин оказывает угнетающее влияние на структуры мозга животных, вызывая уменьшение двигательной активности, гипотермию, блефароптоз и другие эффекты [Воронина, 2012]. В ходе данного исследования было показано, что в группе интактных животных показатель ректальной температуры не изменялся на всем протяжении наблюдения. У животных контрольной группы, которым вводили симпатолитик в дозе 2,5 мг/кг внутрибрюшинно, отмечали снижение температуры на 1,17 и 0,9°C через 4 и 4,5 часа соответственно по сравнению с результатами группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Исследуемое вещество РУ-1355 в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении не влияло на гипотермические эффекты резерпина (табл.6.6).

Таблица 6.5. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на гипотермию, вызванную клофелином в дозе 0,1 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Ректальная температура, °C				
Время измерения, мин	Группа 1 Интактный контроль (физ. раствор) n=6	Группа 2 Контроль (клофелин) n=6	Группа 3 РУ-1355 (1,12 мг/кг) + клофелин n=6	Группа 4 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + клофелин n=6
0(исход)	37,8±0,30	37,9±0,16	38,0±0,14	38,2±0,16
30	37,8±0,20	36,3±0,31*	37,0±0,33	37,2±0,27
60	37,8±0,22	35,3±0,27*	36,2±0,45*	36,6±0,52#
90	37,7±0,25	35,6±0,28*	36,2±0,42*	36,5±0,37*
120	37,7±0,25	36,0±0,33*	36,3±0,39*	36,4±0,46*

Примечание:\* - достоверно по отношению к контролю с физ.раствором ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферони)

# - достоверно по отношению к контролю с клофелином ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферони).

Таблица 6.6. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на гипотермию вызванную резерпином в дозе 2,5 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Ректальная температура, °С				
Время измерения	Группа 1 Интактный контроль (физ.раствор)	Группа 2 Контроль (резерпин)	Группа 3 РУ-1355 (1,12 мг/кг) + резерпин	Группа 4 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + резерпин
0 (исход)	37,65±0,26	37,52±0,18	37,42±0,17	37,38±0,17
4 часа	37,27±0,30	36,1±0,14 <sup>*#</sup>	35,8±0,25 <sup>*#</sup>	36,03±0,18 <sup>*#</sup>
4,5 часа	37,25±0,14	36,35±0,21 <sup>*#</sup>	36,44±0,06 <sup>*#</sup>	36,63±0,22

Примечание:

\* - достоверно по отношению к контролю с физ.раствором ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферони)

# - статистически значимо по отношению к своему исходу ( $p \leq 0,05$ , парный t-тест).

По совокупности двух тестов можно сделать вывод, что исследуемое соединение в дозе 1,12 и 5,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении оказывало не существенное влияние на эффекты адренергических анализаторов нейромедиаторных систем.

#### *Действие соединения РУ-1355 на эффекты L-ДОФА*

Моноаминоксидаза (МАО) — фермент, осуществляющий метаболизм основных медиаторов ЦНС (норадреналина, дофамина, серотонина). Предшественник дофамина L-ДОФА позволяет выявлять МАО-ингибирующие эффекты у исследуемых соединений. Известно, что в больших дозах предшественник дофамина L-ДОФА (500 мг/кг) в отличие от малых (100-150 мг/кг) способен приводит к повышению двигательной активности у животных с элементами стереотипного поведения. Соответственно, соединение со свойствами ингибиторов МАО будут потенцировать эффекты малых доз индуктора, что будет проявляться поведенческими движениями, характерными для высоких доз L-ДОФА. У контрольных животных 1 группы, которым вводили индуктор в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно нарушения со стороны поведения (стереотипия) не наблюдали в течение 90 минут. При увеличении дозы L-ДОФА

(500 мг/кг) наблюдали постоянную и интенсивную стереотипию, которая достигала 3 баллов (табл. 6.7).

Таблица 6.7. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на эффекты L-ДОФА ( $M \pm m$ ).

Выраженность стереотипии, баллы				
Мин	Группа 1 Контроль 1 (физ.раствор + L-ДОФА 100 мг/кг)	Группа 2 Контроль 2 (физ.раствор + L-ДОФА 500 мг/кг)	Группа 3 РУ-1355 (1,12 мг/кг) +L-ДОФА 100 мг/кг	Группа 4 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + L-ДОФА 100 мг/кг
30	0,0±0,00*	3,0±0,01	0,0±0,00*	0,0±0,00*
60	0,0±0,00*	1,8±0,48	0,0±0,00*	0,0±0,00*
90	0,0±0,00	0,9±0,2	0,0±0,00*	0,0±0,00*

Примечание:

\* - достоверно по отношению к контролю 2 (физ. раствор +L-ДОФА 500 мг/кг) ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферони).

Соединение РУ-1355 в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении за 30 мин. до исследования не изменяло эффектов малых доз L-ДОФА (табл. 6.7).

Таким образом, вероятно, соединение РУ-1355 не проявило MAO-ингибирующее свойство, которое основано на модулирующем влиянии на дофаминергическую нейротрансмиссию.

## 6.2 Взаимодействие с ГАМК-ергической системой мозга

### *Влияние соединения РУ-1355 на судорожный эффект пикротоксина*

Пикротоксин - антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в дозе 2,5 мг/кг способствует возникновению тремора и судорог [Воронина, 2005].

В контрольной группе животных латентный период до возникновения тремора составил более 8 минут (табл. 6.8), а первый приступ клонических судорог (латентный период до возникновения судорог) возник через 10 минут после введения индуктора.

Таблица 6.8. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на эффекты пикротоксина в дозе 2,5 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Показатель	Группа 1 Контроль (физ.р-р + пикротоксин) n=6	Группа 2 РУ-1355 (1,12 мг/кг) +Пикротоксин n=6	Группа 3 РУ-1355 (5,0 мг/кг) + Пикротоксин n=6
Латентное время возникновения тремора (сек)	538,0±69,05	390,0±37,15	460,0±33,47
Латентное время возникновения судорог (сек)	606,0±61,61	506,7±35,28	493,3±29,96
Количество судорог (ед.)	3,8±0,79	5,8±1,33	6,6±1,23

Примечание: Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна.

В ходе данного исследования количество судорожных приступов у животных контрольной группы составило более 3-х повторений.

В группах животных, которым предварительно за 30 минут до начала исследования вводили соединение РУ-1355 в/бр в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг не выявлено значимого влияния на эффекты антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов (табл. 6.8).

### 6.3 Влияние на холинергическую систему

#### *Воздействие соединения РУ-1355 на ареколиновый тремор*

Центральные холиномиметики, такие как ареколин, оксотреморин способны вызывать тремор, гипотермию и гиперкинез, поэтому данный тест можно использовать для выявления возможных центральных М-холинергических свойств [Андреева, 2005].

В контрольной группе животных у мышей ареколин - стимулятор М-холинорецепторов ЦНС при внутрибрюшинном введении в дозе 25 мг/кг способствует возникновению гиперсаливации и тремора. Латентный период

возникновения тремора в контрольной группе животных составил около 1 минуты (табл. 6.9). Продолжительность тремора была более 8 минут.

При однократном введении соединения РУ-1355 в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до введения индуктора холинергической системы не выявлено влияния на латентный период возникновения ареколинового эффекта. При применении исследуемого соединения в дозе 5 мг/кг за 30 мин до введения ареколина наблюдалась тенденция к уменьшению периода до возникновения тремора и увеличению длительности тремора, но полученные данные были статистически недостоверны (табл. 6.9).

Таблица 6.9. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении у мышей на длительность вызванного ареколином тремора в дозе 25 мг/кг ( $M \pm m$ ).

Показатель	Группа №1 Контроль физ.раствор + ареколин	Группа №2 РУ-1355 1,12 мг/кг +ареколин	Группа №3 РУ-1355 5,0 мг/кг +ареколин
Латентный период возникновения тремора (сек.)	47,50±3,60	49,50±5,61	34,17±4,68
Длительность тремора (сек.)	498,0±59,94	549,3±19,28	588,0±64,95

Примечание: Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна.

#### *Влияние соединения РУ-1355 на никотиновый тремор*

Введение никотина в различных дозах позволяет оценить влияние исследуемых веществ на Н-холинорецепторы [Андреева, 2005]. В контрольной группе 1 при введении никотина в минимальной дозе 2 мг/кг мышам внутрибрюшинно наблюдали развитие только тремора, что связано с усилением нервно-мышечной передачи (табл. 6.4). Животным 2 контрольной группы вводили высокие дозы никотина 4 мг/кг, что способствовало возникновению судорог у всех животных в изучаемой группе.

При применении соединения РУ-1355 однократно в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг за 30 минут до введения индуктора не наблюдали усиление эффектов малой дозы никотина, что проявлялось отсутствием возникновения судорог (табл. 7).

Таблица 7. Влияние соединения РУ-1355 при однократном в/бр введении в дозе 1,12 мг/кг и 5,0 мг/кг у крыс на выраженность тремора и судорог, вызванных никотином.

Показатель	Группа 1 Контроль 1 (физ.раствор + никотин 2 мг/кг)	Группа 2 Контроль 2 (физ.раствор + никотин 4 мг/кг)	Группа 3 РУ-1355 (1,12 мг/кг) +никотин 2 мг/кг	Группа 4 РУ-1355 (5 мг/кг) + никотин 2 мг/кг	Группа 5 РУ-1355 (1,12 мг/кг) + никотин 4 мг/кг	Группа 6 РУ-1355 (5 мг/кг)+ никотин 4 мг/кг
Возникновение тремора (%)	100	100	100	100	100	100
Возникновение судорог (%)	0	100 <sup>#</sup>	0	0	100 <sup>#</sup>	100 <sup>#</sup>

Примечание:

# – данные статистически значимы по отношению к контрольной группе №1 ( $p \leq 0,05$ , критерий Хи-квадрат)

Соединение РУ-1355 в исследуемых дозах не изменяло возникновение судорожных припадков при введении никотина в дозе 4 мг/кг. Таким образом, соединение РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг не изменяло стимулирующее действие на холинергическую систему никотина (табл. 7).

Таким образом, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг не оказывало влияние на индукторы холинергической системы. В дозе 5,0 мг/кг, превышающей эффективную, соединение РУ-1355 способствовало незначительному увеличению эффектов арколина ( $p > 0,05$ ).

#### **6.4 Заключение**

В результате изучения влияния соединения РУ-1355 в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг на нейромедиаторные системы были показаны возможные нейрхимические закономерности его действия.

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

При применении исследуемого соединения в дозе 5,0 мг/кг наблюдали взаимодействие с различными модуляторами. Так, в тесте, изучающем фенаминовую стереотипию, было выявлено, что соединение РУ-1355 в дозе 5,0 мг/кг статистически значимо потенцирует эффекты индуктора у мышей по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили только фенамин. Данные результаты предположительно могут указывать на способность исследуемого соединения оказывать воздействие на дофаминовую нейротрансмиссию в мезолимбической системе мозга. Однако, известно, что фенаминовая стереотипия может быть обусловлена воздействием и на норадренергическую и на серотонинергическую передачу в нервных окончаниях ЦНС [Robertson, 2009; Kleijn, 2012]. Что подтверждается влиянием соединения РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозе 5,0 мг/кг на серотонинергическую систему в

тесте с использованием 5ГТФ. Была показана тенденция к потенцированию эффектов индуктора серотонинергической системы на 10 и 20 минуте наблюдения. Так же, при применении исследуемого соединения РУ-1355 в дозе 5,0 мг/кг было показано препятствие гипотермии, вызванной клофелином на 30 минуте эксперимента, однако данные были статистически незначимы.

В дозе, превышающей эффективную, соединение РУ-1355 способствовало незначительному увеличению эффектов центрального холиномиметика ареколина ( $p > 0,05$ ), .

Было выявлено, что тестируемое вещество в дозе 5,0 мг/кг не оказывало влияния на эффекты дофаминергических, гамкергических анализаторов нейромедиаторных систем, не проявило MAO-ингибирующее свойство и не изменяло стимулирующее действие на холинергическую систему никотина.

## **ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355**

В настоящее время известно 10 изоформ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника [Verma, 2015], которые широко представлены в организме и в том числе в ЦНС, косвенно предположить влияние или отсутствие влияния на них соединения лидера РУ-1355 можно с помощью многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin, 1964]. Для оценки широты терапевтического действия проводили изучение острой токсичности на мышах.

### **7.1 Изучение острой токсичности соединения РУ-1355**

Исследование острой токсичности соединения РУ-1355 проводили при однократном внутрибрюшинном введении в диапазоне доз 80-400 мг/кг белым неинбредным мышам обоего пола с соответствующим норме внешним видом, без отклонений в поведенческих реакциях и двигательной активности (см. главу 2.12).

При исследовании острой токсичности веществ РУ-1355, были установлены уровни летальных доз для животных и характерные признаки интоксикации. Также была выявлена зависимость длительности и выраженности токсических эффектов от дозы вещества. Признаки интоксикации животных развивались у животных через 10-15 минут после внутрибрюшинного введения доз соединения РУ-1355, превышающих терапевтические. В субтоксических дозах наблюдали угнетение поведенческой активности, с седацией, нарушением ритма дыхания, снижением болевой и тактильной чувствительности. Восстановление поведенческой и рефлекторной активности у мышей отмечали в течение первых суток исследования. Гибели животных обнаружено не было.

При ведении высоких доз соединения РУ-1355 были выявлены характерные признаки отравления: ограничение подвижности, снижение болевой и тактильной чувствительности, частое поверхностное дыхание. Непосредственной гибели

животных предшествовали явления глубокой седации, угнетения дыхания, боковое положение с редкими клоническими судорогами.

У животных, оставшихся в живых, восстановление дыхательной, поведенческой, пищевой и рефлекторной активностей наблюдали на вторые сутки после введения соединения. При последующих наблюдениях за животными в течение двух недель отдаленной гибели не отмечали.

По результатам исследования был определен показатель  $LD_{50}$ , который для соединения РУ-1355 при внутрибрюшинном введении составил 342,7 мг/кг. Ориентируясь на классификацию токсичности веществ [ГОСТ 12.1.007–76, 1976], исследуемое соединение можно отнести к группе умеренно токсичных веществ.

## **7.2 Изучение нейротоксикологических свойств соединения РУ-1355 с использованием схемы многотестового наблюдения по Ирвину**

Изучение общетоксикологических свойств соединения РУ-1355 в эффективных дозах и в дозах превышающих эффективные, позволит выявить неблагоприятные эффекты.

Изучение действия соединения РУ-1355 проводили при однократном внутрибрюшинном введении в арифметически возрастающих дозах на интактных лабораторных мышах. Наблюдение проводили в течение двух часов после введения вещества.

### **7.2.1 Действие соединения РУ-1355 на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы**

Оценку эмоционального статуса животных проводили на основании наличия или отсутствия вокализации, пугливости (во время касания мыши корнцангом), агрессии, страха (громкий хлопок).

В эффективных дозах 1,12 и 5 мг/кг изменение со стороны эмоциональной активности животных не наблюдали. В высоких дозах (25-250 мг/кг) было выявлено дозозависимое угнетение эмоционального статуса.

Влияние соединения РУ-1355 на нервно-мышечную возбудимость мышей проводили с помощью следующих исследований: наблюдения за наличием или отсутствием проявления синдрома Штрауба, тремора, парезов, судорог. Изменение со стороны нервно-мышечной возбудимости у животных не было отмечено ни в одной из групп животных.

Так же оценивали выраженность рефлексов: слухового, роговичного и ипсилатерального сгибательного. Тонус скелетных мышц, который исследовали по отдергиванию задней лапки (ипселатеральный сгибательный рефлекс) при ее захватывании, снижался в разной степени выраженности и данные изменения зависели от дозы исследуемого соединения. Так, нарушение ипселатерального рефлекса было выявлено лишь в высоких дозах в течении двух часов исследования (табл. 7.1). В дозе 25 мг/кг и 125 мг/кг наблюдали снижение ипселатерального сгибательного рефлекса у 16,7% животных на 60 и 120 мин. после введения соединения. В максимальной дозе 250 мг/кг соединение РУ-1355 снижало данный показатель у 16,7% животных через 60 мин после введения и на 32,3% – через 120 мин. После введения исследуемых доз соединения РУ-1355 угнетение роговичного рефлекса не наблюдали. Снижение интенсивности реакции отдергивания головы после раздражения слухового прохода было выявлено в дозах 125 мг/кг и 250 мг/кг у 32,3% животных через 60 и 120 мин после введения РУ-1355 (табл. 7.1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что введение соединения РУ-1355 в эффективных дозах 1,12 и 5 мг/кг внутрибрюшинно не влияет на функциональную активность высшей нервной деятельности и не приводит к нарушению нервно-мышечной возбудимости и рефлексов.

Таблица 7.1. Влияние соединения РУ-1355 на рефлексы (сохранение) при внутрибрюшинном введении мышам ( $M \pm m$ ).

№	Доза соединения РУ-1355, мг/кг	n	Ответ на раздражение слухового прохода			Ипсилатеральный сгибательный		
			исход	60 мин	120 мин	исход	60 мин	120 мин
1	Контроль (физ. р-р)	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2	1,12	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	5	6	100%	100%	100%	100%	100%	100
4	25	6	100%	100%	100%	100%	83,4%	83,4%
5	125	6	100%	67,7%	67,7%	100%	83,4%	83,4%
6	250	6	100%	67,7%	67,7%	100%	83,4%	67,7%

Примечание: n – количество животных в группе.

### 7.2.2 Влияние соединения РУ-1355 на двигательную активность, координацию движений и реактивность

Оценку влияния соединения РУ-1355 на двигательную и мышечную координацию (миорелаксантное действие) выполняли с помощью следующих тестов: наблюдение за изменением позы (положение тела в пространстве, походки), двигательной (расстройство равновесия, дискоординация, тонус конечностей, «Ротарод тест»), и мышечной («тест удержания на проволоке и сетке») координацией, регистрация реактивности (время начала движения животного с места) и спонтанной двигательной активности (актометр).

При введении животным соединения РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 1,12 и 5 мг/кг изменения позы и тонуса конечностей, нарушения равновесия, развитие дискоординации не наблюдали на протяжении всего исследования.

Начиная, с дозы 25 мг/кг (1/14 LD<sub>50</sub>) были выявлены нарушения со стороны двигательной координации и мышечного тонуса. Так в тесте «Ротарод» было показано, что к 60 и 120 минуте происходило снижение двигательной координации на 18,9% и 11,1% соответственно по отношению к контрольной группе ( $p > 0,05$ ). При оценке мышечного тонуса в тесте удержание на проволоке

наблюдалось снижению данного показателя к 60 и 120 минуте на 33,3 и 20,8% соответственно ( $p < 0,05$ ), в тесте удержание на сетке, актометре отмечалась тенденция к снижению эффекта по отношению к группе с физиологическим раствором. При исследовании походки и реактивности животных статистически значимых изменений не выявлено.

При введении дозы 125 мг/кг ( $1/3 LD_{50}$ ) была получена подобная тенденция в тесте «Ротарод», снижение движения через 60 мин. - на 16,6% и через 120 мин. - на 15,6 % по сравнению с результатами контрольной группы животных ( $p > 0,05$ ). В тесте удержания на проволоке наблюдали статистически значимое уменьшение мышечного тонуса (60 и 120 минута) на 37,5 и 29,25 % по сравнению с контрольной группой животных.

В дозе 250 мг/кг ( $>1/2 LD_{50}$ ) было выявлено снижение мышечного тонуса в тесте удержание на проволоке на 37,5 и 30 % через 60 и 120 минут после введения вещества соответственно ( $p > 0,05$ ). Статистически значимое уменьшение двигательной координации в тесте «Ротарод» наблюдали (60 и 120 минута) на 38 и 54,7 % соответственно, по сравнению с контрольной группой животных.

При введении соединения РУ-1355 в дозах 125 и 250 мг/кг отмечалась тенденция к снижению эффекта в актометре по отношению к группе с физиологическим раствором.

При оценке результатов реактивности животных и удержания на сетке изменений не наблюдали во всех экспериментальных группах.

В дозах 25, 125 мг/кг наблюдали изменение походки в 50% случаев. В максимальной дозе нарушение возникало в 66,6 и 80% случаев (табл. 7.2).

Таким образом, было показано, что соединение РУ1355 при однократном внутрибрюшинном введении в эффективных дозах 1,12 и 5 мг/кг не вызывает статистически значимых изменений двигательной активности, мышечной координации и реактивности. В дозах, превышающих эффективные, соединение РУ-1355 проявляло мышечно-расслабляющую активность. Наблюдали снижение как групповой спонтанной активности (Актометр), так и двигательной координации (тест «Ротарод» и удержание на проволоке), по сравнению с

результатами контрольной группы животных. При введении исследуемого вещества в дозах 25 и 125 мг/кг наблюдали изменение походки в 50% случаев. В максимально изучаемой дозе (250 мг/кг) изменения составили 80%. Вероятнее всего данные нарушения связаны со снижением тонуса передних лап (табл. 7.2).

Таким образом, было показано, что при однократном внутрибрюшинном введении в эффективной дозе 1,12 и 5 мг/кг исследуемое вещество статистически достоверных изменений двигательной активности, мышечной координации и реактивности не вызывало. Соединение РУ-1355 проявляло мышечно-расслабляющую активность в дозе 25, 125 и 250 мг/кг. Наблюдалось снижение как групповой спонтанной активности (Актометр), так и двигательной координации (тест «Ротарод» и удержание на проволоке), по сравнению с группой контроля. В 50% случаев изменение походки наблюдали в 25, 125 и 250 мг/кг, в дозе 250 мг/кг нарушение возникало в 66,6 и 80% случаев, вероятно, это связано со снижением тонуса передних лап.

Таблица 7.2. Влияние соединения РУ-1355 (при внутрибрюшинном введении мышам) на двигательную координацию и мышечный тонус ( $M \pm m$ ).

Группы	Время измерения (минуты)	«Ротарод» (секунды)	Удержание на сетке (баллы)	Удержание на проволоке (баллы)	Актометр		Реактивность (секунды)	Изменение походки (%)
					суммарное количество	%		
					Контроль 1 (физ. р-р в дозе 0,1 мл/10 г)	Исход		
	60	30,00±0,00	3,83±0,18	4,00±0,00	81	43,65	7,83±2,99	0
	120	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	103	55,38	6,16±2,11	0
Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг	Исход	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	240	100	3,17±0,59	0
	60	30,00±0,00	3,67±0,37	4,00±0,00	123	51,30	3,17±1,56	0
	120	27,50±1,17	3,83±0,18	3,50±0,37	14	11,02	4,67±1,19	0
Соединение РУ-1355 в дозе 5 мг/кг	Исход	30±0,0	4,0±0,00	4±0,00	180	100	6,5±2,31	0
	60	24,3±5,5	4,0±0,00	4,0±0,00	36	20	5,00±2,91	0
	120	24,5±4,5	3,83±0,18	3,67±0,23	90	50	6,83±3,59	0
Соединение РУ-1355 в дозе 25 мг/кг	Исход	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	127	100	5,66±1,54	0
	60	24,33±3,18	3,83±0,18	2,67±0,37 <sup>*#</sup>	106	44,20	8,67±5,07	50
	120	26,67±3,65	4,00±0,00	3,17±0,34 <sup>*#</sup>	27	21,20	6,67±0,97	50
Соединение РУ-1355 в дозе 125 мг/кг	Исход	30,00±0,00	3,83±0,18	3,17±0,44	201	100	6,83±1,98	0
	60	25,0±3,74	3,67±0,37	2,5±0,24 <sup>*#</sup>	41	20,4	7,5±1,52	50
	120	25,3±3,25	4,0±0,00	2,83±0,44 <sup>#</sup>	14	6,97	13,5±5,93	50
Соединение РУ-1355 в дозе 250 мг/кг	Исход	23,8±4,54	4,0±0,00	3,67±0,23	199	100	5,67±0,96	0
	60	18,6±5,75 <sup>#</sup>	4,0±0,00	2,6±0,76	32	16	7,61± 1,66	80
	120	13,6±5,03 <sup>#</sup>	4,0±0,00	2,8±0,66	41	20,6	8,83± 0,79*	80

\* - статистически значимо по отношению к исходному; # - группе контроль ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони).

### 7.2.3 Изучение влияния соединения РУ-1355 на поведенческие реакции мышей в тесте «открытое поле»

Для оценки влияния соединений на поведенческие реакции (ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования) животных применялся метод «открытого поля» [Воронина, 2005].

При введении соединения РУ-1355 в дозе 1,12 и 5 мг/кг ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных не изменялся.

В дозе 25 мг/кг наблюдалось статистически значимое угнетение горизонтальной активности (60 и 120 минута) на 73,2% и 57,1% соответственно, вертикальной активности (60 и 120 минута) на 89,4% и 96,7% соответственно и поисковой активности на 82,8% через 60 минут после введения ( $p < 0,05$ ), а так же снижение краткосрочного груминга и количество выходов в центр ( $p < 0,05$ ) (табл. 7.3).

При повышении дозы до 125 мг/кг были выявлены статистически значимые нарушения в различных тестах. Так, наблюдали угнетение горизонтальной активности на 79,9 и 75,3% через 60 и 120 мин соответственно после введения вещества, так же на 97,8 и 93,6% угнетение вертикальной активности (60 и 120 минута) и нарушение в поисковой активности на 60 минуте на 93,2% по сравнению с результатами контрольной группы животных и полное отсутствие груминга ( $p < 0,05$ ).

При введении максимальной дозы (250 мг/кг) наблюдали статистически значимое уменьшение горизонтальной активности (60 и 120 минута) на 98% и 97,7% соответственно, отсутствие вертикальной (60 и 120 минута) активности, угнетение поисковой на 87,6% через 60 минут и полное отсутствие через 120 минут после введения вещества ( $p < 0,05$ ) (табл. 7.3).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективные дозы соединения РУ-1355 (1,12 и 5 мг/кг) не изменяют поведенческие реакции в тесте «открытое поля». А введение высоких доз (от 25

до 250 мг/кг) исследуемого соединения приводят к угнетению активности животных (горизонтальной, вертикальной и поисковой активностей) а также оказывает влияния и на эмоциональный статус животных.

#### **7.2.4 Действие соединения РУ-1355 на функции вегетативной нервной системы мышей**

В период исследования влияния соединения РУ-1355 на функцию вегетативной нервной системы наблюдали за динамикой ректальной температуры, изменением цвета кожи, наличием или отсутствием птоза, экзофтальма, реакцией зрачка на свет, частотой дыхательных движений, изменением болевой чувствительности.

Так, при введении соединения РУ-1355 в дозах 1,12, 5 и 25 мг/кг статистически значимых изменений не выявлено. В данных группах животных вегетативные эффекты (птоз, экзофтальм, реакция зрачка на свет) были в норме. Появление цианоза кожи не наблюдали. Болевая чувствительность при зажиме основания хвоста мышам не снижалась по сравнению с результатами контрольных животных. Ректальная температура у животных статистически значимо не менялась. Достоверных нарушений со стороны дыхания у мышей не наблюдалось.

Однако при введении высоких доз (125 и 250 мг/кг) было показано снижение болевой чувствительности при зажиме основания хвоста мышам 1,63 и 2,10 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) табл. 7.4 и нарушение ритма дыхания.

Таким образом, было установлено, что токсическое действие вещества РУ-1355 на функциональную активность вегетативной нервной системы было выявлено в отношении болевой чувствительности только в дозах 125 и 250 мг/кг.

Таблица 7.3. Влияние соединения РУ-1355 (при внутрибрюшинном введении мышам) на поведенческие реакции (M±m).

Группы	Время измерения (минуты)	Тест «Открытое поле»						
		Горизонтальная активность (количество пересеченных квадратов)	Вертикальная активность (количество вертикальных стоек)	Поисковая активность (количество заглядываний в норку)	Грумминг (частота возобновления действий)	Выходы в центр (количество)	Болюсы (количество)	Уринация (количество совершенных актов)
Контроль 1 Физ. р-р в дозе 0,1 мл/10 г	Исход	39,50±4,26	5,00±2,06	4,67±1,22	0,83±0,52	0,67±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	29,83±3,12	7,83±1,68	4,83±1,37	1,67±0,37	1,50±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	17,50±6,36*	5,17±2,03	1,33±0,46*	1,17±0,34	1,17±0,44	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг	Исход	43,83±9,65	10,67±3,57	7,17±2,34	1,00±0,28	0,83±0,34	0,00±0,00	0,17±0,18
	60	26,33±4,16	7,83±4,11	3,17±0,66	1,00±0,40	1,83±1,28	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	23,83±9,67	5,5± 0,73	1,17±0,66*	0,83±0,44	0,8±0,59	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 5 мг/кг	Исход	31,33±1,49	6,67±0,97	5,83±0,72	1,33±0,23	1,5±0,55	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	17,67±10,43	1,83±2,01	1,33±0,97	1,83±1,04	0,5±0,55	0,167±0,182	0,00±0,00
	120	15,66±2,62*	3,16±0,87	1,17±0,18	1,33±0,67	0,17±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 25 мг/кг	Исход	28,00±2,67	3,66±1,05	3,16±0,52	1,33±0,92	1,17±0,44	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	8,00±4,49*#	0,83±0,71#	0,83±0,59*#	0,00±0,00#	0,00±0,00*#	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	7,50±4,46*#	0,17±0,18*#	1,00±0,69	0,00±0,00#	0,00±0,00*#	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 125 мг/кг	Исход	26,3± 2,4	4,5±1,08	4,5±0,84	0,16±0,18	0,17±0,18	0,167±0,182	0,00±0,00
	60	6,0±4,65#	0,17±0,18*#	0,33±0,23*#	0,00±0,00#	0,17±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	4,33±2,86*	0,33±0,23*#	0,83±0,44*	0,00±0,00*#	0,33±0,37	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 250 мг/кг	Исход	29,83±2,92	5,66±1,12	3,66±0,88	0,33±0,23	1,5±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	0,4±0,44*#	0,00±0,00*#	0,6±0,67*#	1,4±1,3	0,00±0,00*#	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	0,4±0,44*#	0,00±0,00*#	0,00±0,00*#	0,00±0,00*#	0,4±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00

\* - статистически значимо по отношению к исходному; # - группе контроль ( $p \leq 0,05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Бонферрони).

Таблица 7.4. Влияние соединения РУ-1355 (при внутрибрюшинном введении мышам) на болевую чувствительность ( $M \pm m$ ).

<b>Болевая чувствительность, сек.</b>						
Время измерения	Контроль 1 (физ. р-р в дозе 0,1 мл/10 г)	Исследуемые дозы соединения РУ-1355, мг/кг				
		1,12	5	25	125	250
<b>Исход</b>	1,67±0,37	1,00±0,00	1,00±0,00	1,17±0,18	1,17±0,18	2,5±0,24
n		6	6	6	6	6
<b>Время после введения соединения</b>						
<b>60 минут</b>	1,33±0,23	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	2,33±0,33	2,8±0,22
<b>120 минут</b>	1,33±0,23	1,00±0,00	1,00±0,00	1,17±0,18	2,17±0,18 <sup>#</sup>	2,8±0,22 <sup>#</sup>

Примечание: n – количество животных в группе.

При введении соединения РУ-1355 помимо неблагоприятных и токсических эффектов наблюдали также и гибель животных. Так, было выявлено, что в дозах 1,12, 5 и 25 мг/кг летальность у мышей не наблюдали.

Введение высоких доз 125 и 250 мг/кг соединения РУ-1355 приводило к гибели животных в течение 24 часов наблюдения. Так, при введении дозы 125 мг/кг смерть наступила у 1 животного из 6, а при исследовании максимальной дозы смерть наступила у 2 животных из 6.

### 7.3 Заключение

Таким образом, было показано, что соединение РУ-1355 при его однократном внутрибрюшинном введении в дозах 1,12 и 5 мг/кг не оказывает влияния на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не приводит к изменениям со стороны вегетативной нервной системы.

В дозах, превышающих эффективные (25, 125 и 250 мг/кг), было выявлено нарушение двигательной, мышечной координации, поведенческих реакций, изменения со стороны вегетативной нервной системы и рефлексов и при введении максимально изучаемых доз наблюдали гибель животных.

## ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цереброваскулярные заболевания находятся на третьем месте в мире после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний среди причин смертности и инвалидизации взрослого населения [Муравьева, 2014]. В России инсульт занимает второе место, что составляет около 39% в структуре смертности от болезней системы кровообращения после инфаркта миокарда [Сергеев, 2010; Путилина, 2013; Зухурова, 2013; Клочихина, 2014; Григорова, 2015; Полуэктов, 2015; Go, 2013].

Терапия острого периода церебрального инсульта включает следующие критерии: базисная терапия, реперфузия, нейропротекция, мультидисциплинарная реабилитация и профилактика повторных нарушений мозгового кровообращения [Скворцова, 2001; Шамалов, 2012; Анисимов, 2012; Мясоедов, 2014; Warach, 2002; Secades, 2006].

Одним из важных направлений в стратегии лечения ишемического инсульта является нейропротекция. Нейропротекция приводит к прерыванию или замедлению последовательных повреждающих биохимических и молекулярных процессов либо способствует активации защитных свойств нейронов, эндотелиальных и глиальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга [Мельникова, 2012; Евтушенко, 2013; Полуэктов, 2015; Ginsberg, 2009].

К настоящему времени разработаны и изучены в экспериментальных условиях несколько десятков соединений, обладающих нейропротекторной активностью [Бачурин, 2008; Мирзоян, 2012; Тюренков, 2015; Ху, 2013]. Однако в клинической практике лечения больных с церебральным инсультом нашли применения лишь единичные препараты [Петров, 2011; Середенин, 2013; Peter, 2008].

В ишемическом повреждении головного мозга принимают участие большое количество факторов. Важную роль в патогенезе данной патологии отводят энергетическому дефициту, который способствует активации NHE и развитию так называемого глутамат-кальциевого каскада, способствующего избыточному

высвобождению возбуждающих нейромедиаторов глутамата и аспартата [Green, 2008] и чрезмерному внутриклеточному накоплению ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), что в конечном итоге приводит к развитию «кальциевого парадокса» и смерти клетки [Хуе, 2009]. Несмотря на обилие механизмов, приводящих к перегрузке кальцием и гибели клетки, NHE является одним из основных факторов регуляции гомеостаза в условиях ишемии/реперфузии [Lee, 2009].

Наиболее активно изучена и широко распространена NHE-1 изоформа, которая была первой клонирована из тканей человека [Donowitz, 2013]. Помимо кардиомиоцитов, эритроцитов и тромбоцитов NHE-1 [Pedersen, 2006] широко экспрессируется в различных структурах мозга: во всех изученных типах нейронов, глиальных клетках, эндотелиальных клетках мозговых капилляров и в эпителиальных клетках сосудистой оболочки [Lee, 2009]. NHE-1 принимает участие в патогенезе многих заболеваний ЦНС: церебральной ишемии [Luo, 2007], болезни Альцгеймера [Rönicke, 2009] и эпилепсии [Verma, 2015].

На сегодняшний день ведется постоянно поиск новых ингибиторов NHE-1. Производные бензоилгуанидина рассматриваются как наиболее перспективные агенты для лечения ишемии-реперфузии головного мозга вследствие их селективности в отношении NHE-1 и превосходной растворимостью, резорбцией и биодоступностью [Хуе, 2010]. В последнее время разработаны новые молекулы в качестве потенциальных ингибиторов NHE - производные индолоилгуанидина (SM-20220, SM-20550), которые также способствовали уменьшению негативных последствий церебральной ишемии [Kitayama, 2001]. В настоящее время наиболее активным селективным ингибитором NHE-1 является производное бензоилгуанидина - зонипорид [Tracey, 2003]. В экспериментальных исследованиях он способствовал ограничению повреждения головного мозга (уменьшал выраженность отека и зоны некроза) и восстановлению неврологических нарушений [Lee, 2009].

Появились данные о наличии способности ингибировать  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменник у производных бензимидазола, отличительной особенностью которых является наличие как встроенной в цикл, так и свободной гуанидиновой группы [Zhang,

2007]. В базе данных Thomson Reuters Integrity находится 293 соединения, производных гуанидина и бензимидазола, проявляющие NHE-ингибирующую активность и имеющие отношение к той или иной терапевтической группе. Среди них большее количество соединений входят в возможные терапевтические группы для лечения стенокардии, нарушений ритма сердечных сокращений, нарушений мозгового кровотока и лечения сердечной недостаточности [база данных Thomson Reuters Integrity, 2011].

Таким образом, можно сделать вывод, что производные конденсированных и неконденсированных бензимидазолов могут быть перспективными в исследованиях нейропротекторных свойств, а присутствие свободной или встроенной гуанидиновой группы в цикл представляет интерес для поиска специфических свойств у ингибиторов NHE-1.

В настоящее время особое внимание уделяют сочетанной сосудистой патология головного мозга и сердца, которая является не редким явлением в клинической практике и рассматривается как осложнение инсульта или инфаркта миокарда, с очень высокой летальностью больных. Однако не все известные препараты, обладающие нейропротекторным действием, проявляют цереброваскулярную активность при сочетанных нарушениях коронарного и мозгового кровообращения. Что указывает на перспективность развития такого направления исследования [Мирзоян, 2009].

В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии ВолгГМУ было найдено соединение РУ-1355 с предположительным NHE-ингибирующим действием, проявляющимся в исследованиях *in vivo* противоишемическим, противоаритмическим, антифибрилляторным и антигипертрофическим свойствами, что и определяет его кардиопротекторный эффект [Гурова, 2015].

На первом этапе была изучена NHE-1-ингибирующая активность 25 соединений производных циклических гуанидинов под лабораторными шифрами «РУ», из которых 21 производных N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой и 4 - 2-аминобензимидазола с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой.

В качестве препарата сравнения был исследован селективный ингибитор NHE-1 – зонипорид. Исследование *in vitro* проводили на тромбоцитах кролика по методу D. Roskopf et.al. [1991] и K. Kusumoto [2002], модифицированному Гуровой Н.А. [2011].

Изучаемые соединения проявили NHE-1-ингибирующую активность различной степени выраженности. Производные N<sup>9</sup>-замещенные 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 EC<sub>50</sub>. Производные N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола - соединения РУ-17, РУ-293 и РУ-374 проявили эффект в концентрации того же порядка, что и зонипорид. Остальные соединения уступали препарату сравнения по NHE-1-ингибирующей активности.

По результатам EC<sub>50</sub> изученные соединения можно расположить в следующем порядке - РУ-1355>РУ-1199>РУ-1390>РУ-1200>РУ-273>РУ-67>РУ-284 зонипорид.

На следующем этапе была проведена оценка зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М от их химической структуры.

В результате исследования зависимости NHE-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М от химической структуры соединения было выявлено, что наибольшей активностью обладают соединения, имеющие в положении N<sup>9</sup> следующие радикалы: морфолиноэтильный и пиперидиноэтильный. В положении C<sup>2</sup>: фенильный, метоксифенильный или бромфенильный заместители.

Анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола от их химической структуры не проводили ввиду их низкой вариабельности.

На последнем этапе была изучена зависимость NHE-1-ингибирующей активности производных N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2-

аминобензимидазола в концентрациях  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$  М от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров.

Методом дискриминантного анализа проведена оценка зависимости NHE-ингибирующей активности от данных показателей.

Был выявлен общий показатель (второе электронное окружение  $Q_2$  от центрального атома углерода), который статистически значимо влиял во всех изученных концентрациях на электронные параметры гуанидиновой группы и предположительно обеспечивал устойчивое наличие NHE-1-ингибирующей активности. Наиболее статистически значимые результаты были получены для концентрации  $1 \cdot 10^{-8}$  М, что, скорее всего, связано с наибольшей селективностью NHE-1 ингибирующей активности.

В результате дискриминантного анализа было выявлено, что соединения, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу обладают более высокой NHE-ингибирующей активностью. Центрированные на гуанидиновый фрагмент электронные параметры соединений с полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой статистически значимо отличаются от веществ с частично встроенной.

Таким образом, на основании исследования *in vitro* соединение РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид, статистически значимо превосходило зонипорид и изученные соединения по  $EC_{50}$  и с помощью методов *in silico* была подтверждена высокая NHE-ингибирующей активностью.

Церебропротекторные свойства ингибиторов NHE-1 реализуются за счет противоишемического и гемореологического действия [Ichard, 2011; Verma, 2015].

Противоишемический эффект исследовали на модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА при однократном и при курсовом введении соединения РУ-1355 в эффективной дозе 1,12 мг/кг.

Так, известно, что максимальная активность NHE-1 приходится на период реперфузии [Luo, 2007], однако первоначальная активация обменника

осуществляется на этапе снижения рН клетки [Писаренко, 2004; Cuomo, 2015], поэтому актуальным вопросом является и профилактическое изучение веществ и лечебное.

Изучение нейропротекторных свойств нового производного 2-аминобензимидазола соединения РУ-1355 при однократном введении было проведено в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 24-й реперфузией у крыс. Профилактическое внутривенное введение исследуемого вещества изучали в молярной массе эквивалентной зонипориду за 30 минут до ишемии. Был использован системный подход исследования повреждения головного мозга: определение уровня NSE в сыворотке крови, изучение неврологического дефицита (шкала Гарсия), а так же размеров зоны некроза и отека головного мозга.

Соединение РУ-1355 ограничивало рост маркера повреждения головного мозга NSE. в 1,67 раза по сравнению с контрольной группой животных, без лечения ( $p < 0,05$ ). Так же, соединение РУ-1355 ограничивало размеры зоны некроза головного мозга. При окрашивании (ТФТ) и анализе срезов мозга, получаемых во фронтальной плоскости, зона некроза в данной группе составила  $8,49 \pm 1,58\%$ . Было выявлено, что изучаемое соединение статистически значимо ограничивало зону повреждения в 2,3 раза по сравнению с показателем контрольной группы животных и превосходило препараты сравнения зонипорид, магния сульфат и оказало эффект подобный глицину. Соединение РУ-1355 способствовало ограничению отека мозга у крыс при ишемии и реперфузии. Коэффициент асимметрии в группе «ИР +соединение РУ-1355» составил  $1,07 \pm 0,02$  усл.ед, что статистически значимо превосходило на 61% показатель контрольной группы животных «ишемия/реперфузия» и показатели групп с препаратами сравнения. На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА соединение РУ-1355 в исследуемой дозе способствовало коррекции неврологических нарушений. Так соединений РУ-1355 уменьшало выраженность проявления нарушения двигательной активности и координации на 58% по отношению к группе животных «ишемия/реперфузия» ( $p < 0,05$ ). Соединение РУ-

1355 снижало неврологические расстройства мышечного тонуса на 68% по сравнению с контрольными животными не получавшими лечения ( $p < 0,05$ ). Так же исследуемое соединение снижало нарушение хватального рефлекса на 40% и 25% улучшало чувствительность по отношению к животным контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, на основании полученных результатов *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 того чтобы оценить лечебное действие, скорость восстановления нарушений и токсикологические свойства исследуемого вещества в терапевтической дозе на фоне ишемии/реперфузии было проведено изучение соединения РУ-1355 на модели эндоваскулярной окклюзии при курсовом введении за 10 мин до реперфузии. Соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и глицина (800 мг/кг) вводили течение 7 дней после ишемии 1 раз/сутки (внутрибрюшинно). Оценку нейропротекторных свойств проводили с помощью неврологического дефицита, поведенческих реакций и уровня NSE в сыворотке крови. При курсовом исследовании соединения РУ-1355 в дозе (1,12 мг/кг) с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА наблюдали менее выраженные неврологические нарушения по шкале Гарсия, дополненной тестами из других шкал на всем протяжении наблюдения по сравнению с результатами контрольной группой ИР. Через 24 часа после операции исследуемое соединение способствовало снижению неврологических нарушений на 17% по сравнению с результатами контрольной группы животных с ишемией/реперфузией без лечения ( $p < 0,05$ ). К 3 суткам наблюдали почти полное восстановление всех неврологических показателей в группе животных, получавших соединение РУ-1355, что на 18% превосходило данные группы животных с ишемией/реперфузией без лечения ( $p < 0,05$ ). На 7 сутки наблюдали полное восстановление всех неврологических показателей, тестируемых с помощью шкалы Гарсия:

мышечного тонуса, координации движения, двигательной активности и чувствительности во всех экспериментальных группах. Соединение РУ-1355 оказало эффект подобный препарату сравнения глицин. При исследовании чувствительности и моторной функции лапы в адгезивном тесте с контралатеральной стороны в данной серии экспериментов соединение РУ-1355 статистически значимо восстанавливало нарушения соответствующих показателей на всем протяжении наблюдения по сравнению с результатами контрольной группой животных с ишемическо-реперфузионными повреждениями головного мозга, не получавших лечения. Наиболее выраженные результаты при оценке неврологических нарушений в группе животных получавших исследуемое соединение были получены на 1 и 3 сутки наблюдения. При курсовом введении соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) было выявлено, что коэффициент тактильной асимметрии в адгезивном тесте на 1 и 3 сутки превосходил соответствующий показатель в группе животных с ишемией/реперфузией, не получавших лечения, в 3 и 3,75 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Так же соединение РУ-1355 статистически значимо уменьшало расстройство функции языка в тесте «вытягивания языка» по сравнению с результатами контрольной группы животных ИР. Наиболее выраженный эффект был получен на 1 и 3 сутки введения исследуемого соединений. Так, на 1 сутки наблюдали восстановление двигательной активности языка в 10,5 раза по сравнению контрольной группой ИР ( $p < 0,05$ ). На 3 сутки соединение РУ-1355 снижало выраженность нарушений функции языка в 9 раз по сравнению с группой ИР ( $p < 0,05$ ). Начиная с 7 дня, в группе ИР+РУ-1355 наблюдали, частичное восстановление всех показателей поведенческих реакций в тесте «Открытое поле». К 4 недели исследования было получено полное восстановление всех поведенческих нарушений, по сравнению с результатами контрольной группы животных с ишемией/реперфузией ( $p > 0,05$ ). Подобный эффект наблюдали при курсовом исследовании препарата сравнения глицин (800 мг/кг). В данной серии экспериментов соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг также ограничивало рост 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 ( $p > 0,05$ ). Подобную тенденцию наблюдали и при применении глицина.

Таким образом, по совокупности эффектов соединение РУ-1355 при курсовом введении за 10 мин до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг способствовало наиболее быстрому восстановлению нарушенных функций после ишемии/реперфузии по сравнению с первичным нейропротектором глицином и исследуемое соединение продемонстрировало лечебное действие.

Предположительный нейропротекторный механизм действия производного 2-аминобензимидазола РУ-1355 – ингибирование NHE-1, т. е. прерывание быстрых механизмов приводящих к гибели клеток головного мозга: предотвращение перегрузке кальцием клетки и коррекция дисбаланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов.

К современным стратегическим направлениям в лечении цереброваскулярных патологий относится не только защита нейрона от повреждающего действия ишемии, но и восстановление гемобиологических свойств крови. Известно, что NHE-1 экспрессируется не только в различных структурах головного мозга, но и в клетках крови: эритроцитах и тромбоцитах [Pedersen, 2006]. Исследование коррекции гемореологических нарушений соединения РУ-1355 проводили в дозе 1,12 мг/кг при внутривенном введении крысам через 10 мин. после реперфузии с билатеральной окклюзией ОСА с контролируемой гипотензией. Группе животных, которым не моделировали патологический процесс, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг не оказывало влияния на NHE-1 клеток. При активации обменника в условиях патологии исследуемое соединение способствовало его ингибированию. Так, в условиях билатеральной окклюзии ОСА соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) достоверно снижало АДФ – индуцированную агрегацию тромбоцитов на 45,7% по сравнению с результатами контрольной группы животных ИР, превосходя по активности препарат сравнения зонипорид. Изученное соединение также способствовало нормализации вязкости крови при низких скоростях сдвига  $50\text{с}^{-1}$ ,  $20\text{с}^{-1}$  и  $10\text{с}^{-1}$ , однако наиболее выраженный статистически значимый эффект на вязкость крови

соединение РУ-1355 был получен при скорости сдвига  $10\text{c}^{-1}$  на 24,5% по сравнению с результатами группы «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ( $p < 0,05$ ). На основании полученных результатов исследуемое вещество в большей степени воздействует на агрегационный компонент данного показателя, что подтверждается снижением индекса агрегации эритроцитов на 21% по сравнению с группой животных ИР ( $p > 0,05$ ). Соединение РУ-1355 достоверно снижает степень агрегации эритроцитов и уменьшает средний размер эритроцитарных агрегатов на 43 и 23% соответственно по сравнению с группой животных «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)». Причем результаты коррелируют с данными по исследованию вязкости крови. Менее эффективные результаты восстановления гемореологических показателей по сравнению с исследуемым соединением были выявлены при введении препарата сравнения селективного ингибитора зонипорида животным с билатеральной окклюзией ОСА.

На модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III), которая учитывает влияние не только тромбоцитов, но и внутрисосудистых факторов тромбообразования было выявлено, что соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорид (1 мг/кг) удлиняют время образования тромба на 14% и 21% соответственно по сравнению с результатами интактных животных ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг при однократном в/в введении на модели глобальной ишемии/реперфузии снижает вероятность тромбогенных осложнений: уменьшает активацию и агрегацию тромбоцитов, эритроцитов и улучшает реологические свойства крови. В условиях внутрисосудистой агрегации тромбоцитов на модели артериального тромбоза было выявлено, что соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) удлиняет время образования тромба.

Механизм действия соединения РУ-1355 вероятно связан с блокированием NHE-1 форменных элементов крови, предотвращая избыточное внутриклеточное накопление кальция. Таким образом, соединение РУ-1355 в эффективной дозе способствует не только защите нейронов от повреждающего действия ишемии и

реперфузии, но и приводит к коррекции гемобиологических нарушений в условиях патологии.

NHE-1 участвует в регулировании внутриклеточного pH и широко представлен в центральной нервной системе. Соответственно NHE-1 может взаимодействовать с различными нейромедиаторами и оказывать косвенное влияние на нейротрансмиссию в ЦНС [Pedersen, 2006; Rocha, 2008]. Так, имеются данные, что известные ингибиторы NHE могут проявлять активность в отношении серотониновых, никотиновых и ГАМК-рецепторов [Jang, 2006; Goñi-Allo, 2007; Santos-Torres, 2011].

Изучение взаимодействия соединения РУ-1355 с различными нейромедиаторными системами проводили при внутрибрюшинном введении в дозах 1,12 и 5,0 мг/кг.

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

При исследовании соединения в дозе 5,0 мг/кг наблюдали взаимодействие с различными индукторами. При изучении фенаминовой стереотипии, было показано, что соединение РУ-1355 в дозе 5,0 мг/кг статистически значимо потенцирует эффекты индуктора у мышей по сравнению с результатами контрольной группы животных, которым вводили только фенамин. Известно, что фенамин воздействует не только на дофаминовую нейротрансмиссию в мезолимбической системе мозга, но и на норадренергическую и на серотонинергическую передачу в нервных окончаниях ЦНС [Robertson, 2009; Kleijn, 2012]. Что подтверждается влиянием соединения РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозе 5,0 мг/кг на серотонинергическую систему в тесте с использованием 5ГТФ. Наблюдали тенденцию к потенцированию эффектов индуктора серотонинергической системы на 10 и 20 минуте наблюдения. Так же, в дозе 5,0 мг/кг было показано, что соединение РУ-1355 препятствует гипотермии, вызванной индуктором норадренергической системы клофелином на 30 минуте эксперимента, однако данные были статистически

незначимы. В дозе, превышающей эффективную, соединение РУ-1355 незначительно оказывало потенцирующее действие центрального холиномиметика ареколина ( $p > 0,05$ ). Исследуемое соединение в дозе 5,0 мг/кг не влияло на эффекты дофаминергических, ГАМКергических анализаторов нейромедиаторных систем, не проявило MAO-ингибирующее свойство и не изменяло стимулирующее действие на холинергическую систему никотина.

Изучение общепармакологических свойств с помощью многотестового наблюдения на мышах по С. Ирвину [Irwin, 1964] 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.

NHE-1 участвует во многих патофизиологических процессах, которые включают в себя клеточную миграцию, апоптоз, нарушение экспрессии различных структурных белков ЦНС, гипертрофию, эндотелиальную дисфункцию, ишемическое и реперфузионное повреждение, повышение тромбогенного потенциала и нарушению гемореологических свойств крови [Luo, 2007; Koliakos, 2008; Verma, 2015]. Поэтому регуляция данной мишени может оказывать положительный эффект при профилактике и лечении таких

заболеваний, как: инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, нарушение мозгового кровообращения, развитие злокачественных опухолей [Malo, 2006; Slepков, 2007], болезни Альцгеймера и эпилепсии [Verma, 2015].

NHE-1 является одним из основных факторов, приводящих и запускающих процесс перегрузки кальцием, способствующих высвобождению возбуждающих нейромедиаторов и гибели клетки на фоне ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга [Xue, 2009; Lee, 2009; Verma, 2015].

Многочисленные данные указывают на возможность селективных ингибиторов в условиях *in vitro* и *in vivo* снижать повреждение головного мозга на фоне ишемии/реперфузии за счет уменьшения выраженности отека и зоны некроза головного мозга и восстановления неврологических показателей [Lee, 2009; Xue, 2010].

Таким образом, на основании исследования *in vitro* и по совокупности данных *in silico* было найдено соединение РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид с высокой NHE-ингибирующей активностью.

В исследования *in vivo* было подтверждено первичное нейропротекторное действие соединения РУ-1355. На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей реперфузией при однократном и курсовом введении соединение РУ-1355 эффективной дозе (1,12 мг/кг) уменьшало тяжесть постреперфузионного повреждения головного мозга: ограничивало рост маркера повреждения нейронов NSE сыворотке крови, зону некроза и выраженность отека мозга, снижало проявление неврологических нарушений по шкале Гарсия, в адгезивном и в тесте вытягивания языка, а так же восстанавливало показатели поведенческих реакций в тесте «Открытое поле». По совокупности эффектов соединение РУ-1355 превосходило исследуемые препараты сравнения первичные нейропротекторы глицин и магния сульфат и селективный ингибитор NHE-1 зонипорид. В эффективной дозе не оказывало токсического действия.

На модели глобальной ишемии/реперфузии при однократном введении в

дозе 1,12 мг/кг снижало вероятность тромботических осложнений: уменьшало активацию и агрегацию тромбоцитов, эритроцитов и улучшало реологические свойства крови, по совокупности полученных результатов исследуемое вещество превосходило препарат сравнения зонипорид. В условиях артериального тромбоза соединение РУ-1355 в эффективной дозе не удлиняло время образования тромба.

В результате проведенных фармакологических исследований у соединения РУ-1355 было показано ННЭ-ингибирующее действие, проявляющегося на моделях *in vivo* противоишемическую и, улучшая гемореологическую активность, что предполагает перспективность поиска и дальнейшего изучения фармакологических свойств среди производных циклических гуанидинов с целью планирования расширенных доклинических исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что NHE-1 ингибирующая активность в ряду производных циклических гуанидинов N<sup>9</sup> 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 EC<sub>50</sub>.

В эффективной дозе (1,12 мг/кг) при однократном введении на модели фокальной 60-ти ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией у крыс ограничивало рост 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 нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, уменьшало выраженность неврологических нарушений и восстанавливало поведенческие реакции. По совокупности эффектов 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<sup>9</sup>-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, 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 общепармакологических 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.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

5-ГТФ - 5-гидрокситриптофан

АДФ - аденозин-5-дифосфорная кислота

АТФ - аденозинтрифосфат

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ИАЭ – индекс агрегации эритроцитов

ИР - ишемия/реперфузия

ЛСМА – левая средняя мозговая артерия

ОСА - общие сонные артерии

РУ - лабораторный шифр соединения

NCE -  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  - обменник

NHE-1 –  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник первой изоформы

NSE - нейронспецифическая енолаза

QSAR/SAR – количественное/качественное соотношение структура-свойство  
(*Quantitative Structure-Property Relationship/Structure-Activity Relationship*)

ТФТ - 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акарачкова, Е.С. Роль магния в процессах нейропротекции и нейропластичности [Текст] / Е.С. Акарачкова, С.В. Вершинина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 2013. - №2. - С. 80-83.
2. Андреева, Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ [Текст] / Н.И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.
3. Андрианова, Е.Н. Гемомикроциркуляция и гемореология: характеристика, клиническое значение, методы исследования [Текст] / Е.Н. Андрианова, А.И. Рывкин // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2008. - Т. 13. - №1-2. – С. 80-85.
4. Анисимов, К.В. Тромболитическая терапия у пациентов с ишемическим инсультом в вертебрально-базиллярной системе [Текст] / К.В. Анисимов, А.Ю. Вишнякова, Г.Р. Рамазанов [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2012. - №3. – С. 29-34.
5. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств [Текст] / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 13-24.
6. Багметова, В.В. Нейропротекторные эффекты метилового эфира фенибута и его композиций с органическими кислотами при коррекции психоневрологических нарушений, вызванных судорожной патологией [Текст] / В.В. Багметова, И.Н. Тюренков, Л.Е. Бородкина [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. - №3. – С. 22-26.
7. Баланова, Ю.А. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования [Текст] / С.А. Бойцов, Е.И. Чазов, Е.В. Шляхто [и др.] // Профилактическая медицина. - 2013. - Т. 16. - № 6. - С. 27-34.
8. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта [Текст] / М. Л. Беленький. – Рига: Изд-во АН Латв. ССР, 1963. – С. 60–72.

9. Блинов, Д.В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболевания ЦНС / Д.В. Блинов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2013. – Т. 5. - №3. — С. 65-75.
10. Бурещ, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения [Текст] / Я. Бурещ, О. Бурешова, Дж.П. Хьюстон. - М.: Наука, 1992. — 250 с.
11. Воронина, Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия [Текст] / Т.А. Воронина // Фарматека. - 2009. - №6. – С. 35-38.
12. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112. - №12. – С. 86-90.
13. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью [Текст] / Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман, Л.Н. Неробкова, И.Г. Капица // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под общ. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 219-233.
14. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.С. Гузевых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. - С. 197–218.
15. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ [Текст] / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 277-295.
16. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов [Текст] / З.А. Габбасов, Б.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов [и др.] // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 15-18.
17. Гацура, В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ [Текст] / В.В. Гацура. - М.: Медицина, 1974. – 147 с.
18. Голухова, Е.З. Современные аспекты антиагрегантной терапии [Текст] / Е.З. Голухова, М.Н. Рябина // Креативная кардиология. - №1. – 2013. – С. 46-58.

19. ГОСТ 12.1.007–76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [Текст]. – Введ. 1977-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 2007
20. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия [Текст]. – Введ. 1994-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1994.
21. Григорова, И.А. Кардиогенные инсульты. Клинико-патогенетические, терапевтические и профилактические особенности [Текст] / И.А. Григорова, О.А. Тесленко, С.Н. Григоров // Международный неврологический журнал. – 2015. - № 1(71). – С. 132-140.
22. Гурова, Н.А. Метод изучения влияния новых соединений на активность натрий/водородного обменника [Текст] / Н.А. Гурова, А.А. Спасов, А.С. Питерсен // Вестник ВолгГМУ. - 2011. - №2. - С. 70-72.
23. Гурова, Н.А. Производные бензимидазолов - новый класс кардиопротекторных средств [Текст]: дисс. . . . док. мед. наук: 14.03.06 / Гурова Наталия Алексеевна. – Волгоград, 2015. – 340 с.
24. Гусев, Е.И. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы [Текст] / Е.И. Гусев, М. Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов // Доктор. Ру. – 2013. - №5(83). – С. 7-12.
25. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга [Текст] / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2001. – 328 с.
26. Гусев, Е.И. Нейропротективная терапия при ишемическом инсульте [Текст] / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2009. - №2. - С. 13.
27. Дерягин, О.Г. Нейропротекция при ишемическом инсульте: роль АТФ-зависимых калиевых каналов и системы оксида азота [Текст] / О.Г. Дерягин, С.А. Гаврилова, А.В. Голубева [и др.] // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. АЛМАЗОВА. – 2012. - №5. – С. 9-15.
28. Добровольский, Н.А. Анализатор вязкости крови [Текст] / Н.А. Добровольский, Ю.М. Лопухин, А.С. Парфенов [и др.] // Реологические исследования в медицине: Сб. науч. тр. - М.: НИЦХРАМН, 1998. – С.45-51.
29. Евтушенко, И.С. Ноотропы и нейропротекторы в современной нейрофармакологии [Текст] / И.С. Евтушенко // Международный неврологический журнал. – 2013. - № 3(57). – С. 20-27.

30. Заутнер, Н.А. Клинический опыт применения цитиколина при ишемическом инсульте [Текст] / Н.А. Заутнер, О.Е. Ваизова, В.М. Алифирова // Неврологический журнал. – 2014. - №1. – С. 44-48.
31. Зверев, Я. Ф. Ингибирование  $Na^+/H^+$  обмена как новый подход к защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения [Текст] / Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2. - №3. – С. 16–34.
32. Зинчук, В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты [Текст] / В.В. Зинчук // Физиол. чел. – 2001. - №2. – С. 154-160.
33. Зухурова, М.А. Оценка нейропротективных свойств L-теанина с помощью неврологических и поведенческих тестов на разных сроках постишемического периода [Текст] / М.А. Зухурова, А.С. Дайнеко, Д.С. Лупан [и др.] // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. АЛМАЗОВА. – 2013. - №1(18)–С. 39-51.
34. 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.
35. Ключихина, О.А. Анализ эпидемиологических показателей инсульта по данным территориально-популяционных регистров 2009–2012 гг. [Текст] / О.А. Ключихина, Л.В. Стаховская // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 2014. – Т. 114. - №6. – С. 63–69.
36. Макаров, В.А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / Макаров В.А., Спасов А.А., Плотноков М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М. и др. под общей редакцией Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012.- 944 с.
37. Медведев, И.Н. Методические подходы к оценке агрегации и поверхностных свойств тромбоцитов и эритроцитов [Текст] / И.Н. Медведев, С.Ю. Завалишина, Е.Г.Краснова // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 10. – С. 117-120.
38. Медведев, И.Н. Методологические подходы к исследованию реологических свойств крови при различных состояниях [Текст] / И.Н.Медведев, А.П. Савченко, С.Ю. Завалишина [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2009. - № 5(79). – С. 1-3.

39. Мельникова, Е.В. Нейропротекция при ишемии головного мозга [Текст] / Е.В. Мельникова, А.А. Шмонин // Фарматека. – 2012. - №9. – С. 36-42.
40. Мирзоян, Р.С. ГАМК-ергический компонент в механизме цереброваскулярного противоишемического эффекта докозагексаеновой кислоты [Текст] / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, А.В. Гнездилова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. - Т. 78. - №1. - С. 16-20.
41. Мирзоян, Р.С. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ [Текст] / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Часть первая: под общ. ред. А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. — С. 478 -485.
42. Мирзоян, Р.С. Нимодипин и сочетанные нарушения мозгового и коронарного кровообращения в эксперименте [Текст] / Р.С. Мирзоян, Н.А. Хайлов, И.Б. Цорин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72. - №2. - С. 24– 28.
43. Мирзоян, Р.С. Производное адамантана усиливает кровоснабжение ишемизированного мозга [Текст] / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, Д.В. Масленников [и др.] // Экспер. и клин. фармакология. - 2012. - Т. 75. №6. – С. 27-30.
44. Мороз, В.В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях [Текст] / В.В. Мороз, А.М. Голубев, А.В. Афанасьев [и др.] // Общая реаниматология. – 2012. – Т. VIII. - №1. - С. 53-60.
45. Муравьев, А.В. Гемореологические профили у пациентов с артериальной гипертензией в сочетании с синдромом гипервязкости [Текст] / А.В. Муравьев, В.В. Якусевич, Л.Г. Зайцев, А.М. Сироткина [и др.] // Физиология человека. – 1998. - №2. - С. 113-117.
46. Муравьев, А.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) [Текст] / А.В. Муравьев, С. В. Чепоров. – Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 с.
47. Муравьев, А.В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] / А.В. Муравьев // Мат. научно-практ. конференции «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». – СПб, 2003. – С. 78–80.
48. Муравьева, В.Н. Современные представления о факторах риска и профилактики ОНМК (обзор литературы) [Текст] / В.Н. Муравьева, Е.Н. Карпова // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. - №3. – С. 59-64.

49. Мясоедов, Н.Ф. Пептидные биорегуляторы семакс и селанк в компенсации нарушенных когнитивных функций и межполушарной асимметрии у приматов [Текст] / Н.Ф. Мясоедов, Т.Н. Соллертинская, М.В. Шорохов [и др.] // Асимметрия. – 2014. – Т. 8. - №14 – С. 53-65.
50. Никонов, В.В. Результаты лечения острого ишемического инсульта в первые часы заболевания / В.В. Никонов, И.Б. Савицкая, Л.В. Бутко // Медицина неотложных состояний. – 2013. - №5(52). - С. 82-85.
51. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств [Текст] / Р.У. Островская, К.С. Раевский, Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под общ. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 251-263.
52. Парфенов, А.С. Анализатор крови реологический АКР-2. Определение реологических свойств крови (Метод. Рекомендации) [Текст] / А.С. Парфенов, А.В. Пешков, Н.А. Добровольский // НИИ Физико-химической медицины. Москва. - 1994. - С. 15.
53. Пат. 2340342 Российская Федерация, А61К31/4427. Средство для лечения острых и хронических нарушений мозгового кровообращения, в том числе инсульта, на основе гидрированных пиридо[4,3-*b*]индолов (варианты), фармакологическое средство на его основе и способ его применения [Текст] / Бачурин С.О. — № 2006143332/15 ; заявл. 07.12.2006 ; опубл. 20.06.2008, Бюл. № 34. — 11 с.
54. Петров, В.И. Влияние фармакологической нейропротекции на степень повреждения головного мозга при ишемии-реперфузии в эксперименте [Текст] / В.И. Петров, Э.А. Пономарев, С.С. Маскин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. - Т. 74. - №8. - С. 13-16.
55. Писаренко, О.И. Ингибиторы  $Na^+/H^+$  обмена – новый класс кардиопротекторов [Текст] / О.И. Писаренко // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90. – №9. – С. 1103–1110.
56. Плотников, М.Б. Влияние комплекса ацетилсалициловой кислоты и диквертина на агрегацию тромбоцитов и гемореологические параметры у крыс с ишемией головного мозга [Текст] / М.Б. Плотников, Н.А. Тюкавкина, О.И. Алиев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. - №2. - С. 33-35.

57. Полуэктов, М.Г. Дополнительные возможности восстановления больных, перенесших ишемический инсульт [Текст] / М.Г. Полуэктов, С.Л. Центерадзе // Эффективная фармакотерапия. - 2015. - №13. - С. 20-26.
58. Путилина, М.В. Роль нейропротекции в ранней реабилитации пациентов после инсульта с позиций доказательной медицины / М.В. Путилина // Лечебное дело. – 2013. - №2. – С. 23-30.
59. Расулова, Х.А. Некоторые молекулярные механизмы развития ишемического инсульта [Текст] / Х.А. Расулова // Международный медицинский журнал. – 2013. - №3. – С. 22-29.
60. Ройтман, Е.В. Биореология. Клиническая гемореология. Фундаментальные основы, показатели, приборы [Текст] / Е.В. Ройтман // Клинич. лаб. диагностика. – 2001. - №5. – С. 25-32.
61. Семененко, А.И. Влияние инфузионных растворов на динамику активности нейрон-специфической энлазы и белка S 100 у крыс в условиях острого нарушения мозгового кровообращения [Текст] / А.И. Семененко, Б.А. Кондрацкий, Ю.Ю. Кобеляцкий // Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». – 2013. - №4. - С. 38-39.
62. Сергеев, Д.В. Нейропротекция при ишемическом инсульте: оправданы ли надежды? [Текст] / Д.В. Сергеев // РМЖ. - 2010. – Т. 18. - №26. - С. 1521-1525.
63. Середенин, С.Б. К механизму противоишемического действия препарата "афобазол" [Текст] / С.Б. Середенин, И.Б. Цорин, М.Б. Випитнова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. - Т. 155. - №6. - С. 723-727.
64. Скворцова В.И., Алексеева Г.С., Трифонова Н.Ю. Анализ медико-организационных мероприятий по профилактике инсультов и реабилитации постинсультных состояний на современном этапе [Текст] / В.И.Скворцова, Г.С. Алексеева, Н.Ю. Трифонова // Социальные аспекты здоровья населения. - 2013. - Т. 29. - №1. - С. 2.
65. Скворцова, В.И. Возможности расширения реабилитационного потенциала больных с церебральным инсультом [Текст] / В.И. Скворцова, Г.Е. Иванова, Л.В. Стаховская // Русский медицинский журнал. - 2011. - Т. 19. - № 9. - С. 579-583.
66. Спасов, А.А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция активности [Текст] / А.А. Спасов, Н.А. Гурова, М.В. Харитоновна // Экспер. и клин. фармакол. – 2013. – Т. 76.- №1. – С. 43–48.

67. Танащян, М.М. Сосудистые заболевания головного мозга и метаболический синдром [Текст] / М.М. Танащян, О.В. Лагода, С.В. Орлов [и др.] // Терапевтический архив. - 2013. - Т. 85. - №10. - С. 34-42.
68. Тимофеева, А.С. Фармакологические свойства производных циклических гуанидинов – ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена [Текст]: дисс. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Тимофеева Анна Самовна. – Волгоград, 2015. – 190 с.
69. Тюренков, И.Н. Нейропротективные свойства, антиоксидантная система, нейроглютам [Текст] / И.Н. Тюренков, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин [и др.] // Бюлл. Эксп. биол. и мед. - 2015. – Т. 159. - №3. - С. 344-347.
70. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XV. // под редакцией А.Г. Чучалина, В.В. Яснецова — М: "ЭХО", 2014. — 944 с.
71. Халафян А.А. Statistica 6: Статистический анализ данных. – М.: Бином-Пресс, 2007. – 512 с.
72. Цыган, Н.В. Повреждение головного мозга и нейротрофические механизмы его защиты на модели острой церебральной гипоксии [Текст] / Н.В. Цыган, А.П. Трашков // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2013 – Т. 3. – №43. - С. 1-9.
73. Черний, В.И. Диагностика тяжести ишемического инсульта методом определения уровня маркеров повреждения центральной нервной системы [Текст] / В.И. Черний, Г.А. Городник, С.Е. Куглер // Медицина неотложных состояний. – 2014. - №3(58). - С. 80-82.
74. Шамалов, Н.А. Современные подходы к реперфузионной терапии при ишемическом инсульте [Текст] / Н.А. Шамалов, В.И. Скворцова, Г.Р. Рамазанов [и др.] // Неврология и Психиатрия. – 2012. - №2. - С. 14-18.
75. Шляхто, Е.В. Национальные рекомендации по определению риска и профилактике внезапной сердечной смерти (сокращённая версия) [Текст] / Е.В. Шляхто, Г.П. Арутюнов, Ю.Н. Беленков // Архив внутренней медицины. - 2013. - № 4. - С. 5-15.
76. Щепанкевич, Л.А. Ишемический инсульт: оценка параметров сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в остром периоде заболевания [Текст] / Л.А. Щепанкевич, П.И. Пилипенко // Вестн. неврологии, психиатрии и нейрохирургии. — 2011. — №1. — С. 11–13.

77. Anand, N. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review [Text] / N. Anand, L.G. Stead // *Cerebrovasc Dis.* – 2005. - Vol. 20. – №4. - P. 213-219.
78. Annunziato, L. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia [Text] / L. Annunziato, F. Boscia, G. Pignataro // *J Cereb. Blood Flow Metab.* - 2013. - Vol. 33. - №7. - P. 969-82.
79. Ayoub, I.M. Zoniporide preserves left ventricular compliance during ventricular fibrillation and minimizes postresuscitation myocardial dysfunction through benefits on energy metabolism [Text] / I.M. Ayoub, J.D. Kolarova [et al.] // *Crit Care Med.* – 2007. – Vol. 35. – № 10. – P. 2329 – 2336.
80. Barone, F.C. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia [Text] / F.C. Barone, R.K. Clark, W.J. Price [et al.] // *Brain Res.* – 1993. - Vol. 623. – №1. – P. 77-82.
81. Belayev, L. Effect of delayed albumin hemodilution on infarction volume and brain edema after transient middle cerebral artery occlusion in rats [Text] / L. Belayev, R. Busto, W. Zhao [et al.] // *J Neurosurg.* - 1997. - Vol. 87. – №4. – P. 595-601.
82. Boedtkjer, E. Physiology, pharmacology and pathophysiology of the pH regulatory transport proteins NHE1 and NBCn1: similarities, differences, and implications for cancer therapy [Text] / E. Boedtkjer, L Bunch, S.F. Pedersen // *Curr Pharm Des.* – 2012. - Vol. 18. - №10. - P. 1345-71.
83. Born, G.V. The effect of 5-hydroxytryptamine in a smooth muscle and in connective tissue [Text] / G.V. Born // *J. Physiol.* – 1962. – P. 160-174.
84. Castañeda-Corral, G. Blockade of peripheral and spinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger increases formalin-induced long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia in rats [Text] / G. Castañeda-Corral, H.I. Rocha-González, C.I. Araiza-Saldaña [et al.] // *Brain Res.* - 2012. - №1475. – P. 19–30.
85. Castañeda-Corral, G. Role of the spinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in formalin-induced nociception [Text] / G. Castañeda-Corral, H.I. Rocha-González, B. Godínez-Chaparro [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2011. - Vol. 501 - №1 - P. 4–9.
86. Chang, E. Shear stress and 17-estradiol modulate cerebral microvascular endothelial Na<sup>+</sup>- K-Cl cotransporter and Na/H exchanger protein levels [Text] / E. Chang, M.E. O'Donnell, A.I. Barakat // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2008. – Vol. 294. - №1. - P. 363–71.

87. Chang, H.B. Na(+)/H(+) exchanger in the regulation of platelet activation and paradoxical effects of cariporide [Text] / H.B. Chang, X. Gao, R. Nepomuceno [et al.] // *Exp Neurol.* – 2015. - Vol. 272 - №2. - P. 11-16.
88. Cingolani, H.E. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain [Text] / H.E. Cingolani, I.L. Ennis, E.A. Aiello [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2011. – V. 462. - №1. – P. 29 – 38.
89. Cingolani, H.E. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain [Text] / H.E. Cingolani, I.L. Ennis, E.A. Aiello, N.G. Pérez // *Pflugers Arch.* – 2011. – V. 462. – № 1. – P. 29 – 38.
90. Conant, R. Therapeutic applications of citicoline for stroke and cognitive dysfunctions in the elderly: a review of the literature [Text] / R. Conant, A. Schauss // *Alternative Med. Rev.* — 2004. — Vol. 9. — P. 17-31.
91. Cuomo, O. Ionic homeostasis in brain conditioning [Text] / O. Cuomo, A. Vinciguerra, P. Cerullo [et al.] // *Front Neurosci.* – 2015. - Vol. 9. - №277. – P. 1-15.
92. Damaj, M.I. Pharmacological Characterization of Nicotine-Induced Seizures in Mice / M. I. Damaj, W. Glassco, M. Dukat, B. R. Martin // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic.* – 1999. – Vol. 291. – №3. – P. 1284-1291.
93. Diering, G.H. Regulation of dendritic spine growth through activity-dependent recruitment of the brain-enriched Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE5 [Text] / G.H. Diering, F. Mills, S.X. Bamji [et al.] // *Mol Biol Cell.* – 2011. - Vol. 22. - №13. – P. 2246-57.
94. Donowitz, M. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers [Text] / M. Donowitz, C. Ming Tse, D. Fuster // *Mol Aspects Med.* – 2013. - Vol. 34(2-3). - P. 236-51.
95. Durukan, A. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia [Text] / A. Durukan, T. Tatlisumak // *Pharmacol Biochem Behav.* 2007. - Vol. 87. - №1. - 179-197.
96. Farooqui A., Horrocks L., Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation to membranes, functions, and involvement in neurological disorders [Text] / A. Farooqui, L. Horrocks, T. Farooqui // *Chem. Phys. Lipids.* — 2000. — Vol. 106. - №1. — P. 1-29.
97. Fliegel, L. Regulation of the Na(+)/H(+) exchanger in the healthy and diseased myocardium [Text] / L. Fliegel // *Expert Opin Ther Targets.* – 2009. – Vol. 13. - №1. – P. 55 – 68.

98. Garbern, J.Y. A mutation affecting the sodium/proton exchanger, SLC9A6, causes mental retardation with tau deposition [Text] / J.Y. Garbern, M. Neumann, J.Q. Trojanowski [et al.] // *Brain*. – 2010. - Vol. 133. - №5. - P. 1391–402.
99. Garcia, J.H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation [Text] / J.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu [et. al.] // *Stroke*. – 1995. - Vol. 26. - №4. - P. 627-63.
100. Gende, O.A. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger role in the intracellular pH regulation of human platelets [Text] / O.A. Gende, H.E. Cingolani // *Arch Int Physiol Biochim Biophys*. – 1991. - Vol.99. - №1. – P. 95-98.
101. Ginsberg, M.D. Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia. Synoptic Overview [Text] / M.D. Ginsberg // *Stroke*. - 2009. - Vol. 40, Issue 3. – P. 111—114.
102. Ginsberg, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future [Text] / M.D. Ginsberg // *Neuropharmacology*. – 2008. - №55 (3). – P. 363–389.
103. Go, A.S. Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association [Text] / A.S. Go, D. Mozaffarian, V.L. Roger [et al.] // *Circulation*. – 2013. - №127(1). - P. e6-e245.
104. Goñi-Allo, B. Studies on the mechanisms underlying amiloride enhancement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletion in rats [Text] / B. Goñi-Allo, E. Puerta, I. Hervias [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2007. - Vol. 562, Issue 3. - P. 198-207.
105. Green, A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly [Text] / A.R. Green // *Br J Pharmacol*. - 2008. - Vol. 153. - P. 325-338.
106. Gulyaeva, N. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats / N. Gulyaeva // *Journal of Neuroscience Methods* — 2006. — №151. — P. 83–89.
107. Gulyaeva, N. Tongue protrusion: a simple test for neurological recovery in rats following focal cerebral ischemia [Text] / N. Gulyaeva // *Journal of Neuroscience Methods*. — 2003. — Vol. 125. — P. 183–193.
108. Gumina, R.J. Effect on ex vivo platelet aggregation and in vivo cyclic flow with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition [Text] / R.J. Gumina, P.J. Newman, G.J. Gross // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2011. – Vol. 31, Issue 4. - P. 431-435.

109. Guzman-Perez, A. Discovery of zoniporide: A potent and selective sodium–hydrogen exchanger type 1 (NHE-1) inhibitor with high aqueous solubility1 [Text] / A. Guzman-Perez, R.T. Wester, M.C. Allen [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2001. - Vol. 11. - №6. – P. 803-807.
110. Hom, S. Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats [Text] / S. Hom, M.A. Fleegal, R.D. Egletton [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2007. - Vol. 292, Issue 5. - P. 1881–92
111. Horikawa, N. Relationship between the neuroprotective effect of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor SM-20220 and the timing of its administration in a transient middle cerebral artery occlusion model of rats [Text] / N. Horikawa, Y. Kuribayashi, K. Matsui [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2001. - Vol. 24. - №7. - P. 767-771.
112. Ichard, J. Effect on ex vivo platelet aggregation and in vivo cyclic flow with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition [Text] / J.G. Ichard, J.N. Peter, J.G. Garrett [et al.] // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2011. – Vol. 31. - Issue 4. - P. 431-435.
113. Irwin, S. Determination of variability in drug response [Text] / S. Irwin // *Psychosomatics*. – 1964. – V.5. – P. 174 -179.
114. Jang, I.S. The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger is a major pH regulator in GABAergic presynaptic nerve terminals synapsing onto rat CA3 pyramidal neurons [Text] / I.S. Jang, M.S. Brodwick, Z.M. Wang [et al.] // *Neurochem*. – 2006. - №99(4). – P. 1224-1236.
115. Karmazyn, M. NHE-1: still a viable therapeutic target / M. Karmazyn // *Rev Bras Cir Cardiovasc*. – 2013 – №61. – P. 77 – 82.
116. Kleijn, J. Effects of amphetamine on dopamine release in the rat nucleus accumbens shell region depend on cannabinoid CB1 receptor activation [Text] / J. Kleijn, J. Wiskerke, T.I. Cremers [et al.] // *Neurochem. Int*. – 2012. - Vol. 60 Issue 8. – P. 791-798.
117. Koizumi, J. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Experimental studies of ischemic brain edema [Text] / J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa [et al.] // *I. Jpn. J. Stroke*. - 1986. - №8. – P. 1–8.
118. Koliakos, G. NHE-1: a molecular target for signalling and cell matrix interactions [Text] / G. Koliakos, K. Paletas, M. Kaloyianni // *Connect. Tissue Res*. – 2008. – V. 49. – № 3. – P. 157 – 161.
119. Koliakos, G. NHE-1: a molecular target for signalling and cell matrix interactions [Text] / G. Koliakos, K. Paletas, M. Kaloyianni // *Connect. Tissue Res*. – 2008. – V. 49. – № 3. – P. 157 – 161.

120. Kumar, P. Prediction of Upper Limb Motor Recovery after Subacute Ischemic Stroke Using Diffusion Tensor Imaging: A Systematic Review and Meta-Analysis [Text] / P. Kumar, P. Kathuria, P. Nair [et al.] // *Stroke*. - 2016. – Vol. 18. - №1. – P. 50-59.
121. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [Text] / K.D. Kurz, B.W. Main, G.E. Sandusky // *Thromb.Res.* - 1990. - Vol. 60. – №4. - P. 269-280.
122. Kusumoto, K. In vitro and in vivo pharmacology of a structurally novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor, T-162559 [Text] / K. Kusumoto, H. Igata, A. Abe [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. - 2002. - №135. – P. 1995-2003.
123. Lee, B.K. Effects of KR-33028, a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitor, on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct [Text] / B.K. Lee, D.H. Lee, S. Park [et al.] // *Brain Res.* – 2009. - Vol. 1248. - №6. - P. 22 – 30.
124. Lee, K.S. Anti-platelet activity of KR-32560, a novel sodium/hydrogen exchanger-1 inhibitor [Text] / K.S. Lee, Y.R. Jin, J.J. Lee [et al.] // *Pharmacol Res.* – 2006. - Vol.53. - №3 - 265-270.
125. Lee, S.H. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [Text] / S.H. Lee, T. Kim // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – №2. – P. 20 – 26.
126. Leng, T. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke? [Text] / T. Leng, Y. Shi, Z.G. Xiong [et al.] // *Prog. Neurobiol.* - 2014. - Vol. 115. - №2. - P. 1–21.
127. Liu, Y. Activation of microglia depends on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange-mediated H<sup>+</sup> homeostasis [Text] / Y. Liu, D.B. Kintner, V. Chanana [et al.] // *J Neurosci.* – 2010. - Vol. 30. - №45. - P. 15210–15220.
128. Longa, E.Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [Text] / E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson [et al.] // *Stroke*. – 1989. - Vol. 20. – №1. – P. 84-91.
129. Luo, J. Physiology and pathophysiology of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange isoform 1 in the central nervous system [Text] / J. Luo, D. Sun // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2007. – V. 4. – №3. – P. 205 – 215.
130. Malo, M. E. Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [Text] / M. E. Malo, L. Fliegel // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 84. - №11. – P. 1081 – 1095.
131. Martinez-Vila, E. Current status and perspectives of neuroprotection in ischemic stroke treatment [Text] / E. Martinez-Vila, P. Sieir // *Cerebrovasc Dis.* – 2001. - №11. - P. 60—70.

132. MarvinSketch: Официальный сайт компании ChemAxon Kft. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/> (дата обращения 04.03.2015).
133. Morrow, E.M. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry [Text] / E.M. Morrow, S.Y. Yoo, S.W. Flavell [et al.] // *Science*. – 2008. - №321. - P. 218–23.
134. Murphy, E. Why did the NHE inhibitor clinical trials fail? / E. Murphy, D.G. Allen [Text] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2009. - №46(2) - P. 137-41.
135. Myron, D. Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia. Synoptic Overview [Text] / D. Myron, M.D. Ginsberg // *Stroke*. – 2009. – №40(3). – P. 111—114.
136. O'Collins, V.E. 1026 experimental treatments in acute stroke [Text] / V.E. O'Collins, M.R. Macleod, G.A. Donnan [et al.] // *Ann Neurol*. – 2006. – №59. - P. 467—77.
137. O'Donnell, M.E. Intravenous HOE-642 reduces brain edema and Na uptake in the rat permanent middle cerebral artery occlusion model of stroke: evidence for participation of the blood-brain barrier Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [Text] / M.E. O'Donnell, Y.J. Chen, T.I. Lam [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2013. - Vol. 33. - №2. - P. 225–234.
138. Ohgaki, R. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE6 in the endosomal recycling system is involved in the development of apical bile canalicular surface domains in HepG2 cells [Text] / R. Ohgaki, M. Matsushita, H. Kanazawa [et al.] // *Mol Biol Cell*. – 2010. - Vol. 21. - №7. - P. 1293–304.
139. Orłowski, J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers [Text] / J. Orłowski, S. Grinstein // *Compr Physiol*. - 2011. - 1(4). - P. 2083-100.
140. Park, S.L. The effect of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger-1 inhibition by sabiporide on blood-brain barrier dysfunction after ischemia/hypoxia in vivo and in vitro [Text] / S.L. Park, D.H. Lee, S.E. Yoo [et al.] // *Brain Res*. – 2010. - №1366. - P. 189–196.
141. Pedersen, S. F. Physiology and pathophysiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -2Cl<sup>-</sup> cotransport in the heart, brain, and blood [Text] / S.F. Pedersen, M.E. O'Donnell, S.E. Anderson [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2006. - Vol. 291, Issue 1. - P. 1-25.
142. Pedersen, S.F. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death [Text] / S.F. Pedersen // *Pflugers Arch*. – 2006. - Vol. 452, Issue 3. - P. 249-59.
143. Peter, A. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008 [Electronic resource] : A. Peter / The European Stroke Organization (ESO) Executive Committee and the

ESO Writing Committee [Data Base]. - URL: <http://www.eso-stroke.org/recommendations> (дата обращения: 20.03.2015).

144. Pettersen, J.C. Neurotoxic effects of zonisamide: a selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 [Text] / J.C. Pettersen, L. Chouinard, R.L. Kerlin [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2008. - №36(4). – P. 608-19.

145. Philip, M. Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials [Text] / M. Philip, M. Benatar, M. Fisher [et al.] // *Stroke.* – 2009. - Vol. 40. - №2. – P. 577—81.

146. Pribush, A. Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation-disaggregation in quiescent and flowing blood [Text] / A. Pribush, H.J. Meiselman, D. Meyerstein [et al.] // *Biorheology.* – 2000. – Vol. 37. – № 5-6. – P. 429–441.

147. Ringleb, P.A. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008 [Text] / P.A. Ringleb, W. Hacke, M.G. Bousser [et al.] // *Cerebrovascular Diseases.* - 2008. - Vol. 25. - №5. - C. 457-507.

148. Ro, H.A. pH microdomains in oligodendrocytes [Text] / H.A. Ro, J.H. Carson // *J Biol Chem.* – 2004. - Vol. 279. - №35. – P. 37115–37123.

149. Robertson, N.J. Methyl-isobutyl amiloride reduces brain Lac/NAA, cell death and microglial activation in a perinatal asphyxia model [Text] / N.J. Robertson, T. Kato, A. Bainbridge, M. Chandrasekaran [et al.] // *J Neurochem.* – 2013. - Vol. 124, Issue 5. - P. 645–657.

150. Robertson, S.D. A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters [Text] / S.D. Robertson, H.J. Matthies, A. Galli // *Mol. Neurobiol.* – 2009. - Vol. 39, Issue 2. – P. 73-80.

151. Rocha, M.A. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger inhibition modifies dopamine neurotransmission during normal and metabolic stress conditions [Text] / M.A. Rocha, D.P. Crockett, L.Y. Wong [et al.] // *J Neurochem.* - 2008. - Vol. 106, Issue 1. – P. 231-243.

152. Rönicke, R. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger modulates long-term potentiation in rat hippocampal slices [Text] / R. Rönicke, U.H. Schröder, K. Böhm [et al.] // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2009. - Vol. 379. - №3. - P. 233–239.

153. Roskopf, D. Rapid determination of the elevated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay [Text] / D. Roskopf, E. Morgenstem, W. Scholz [et al.] // *Journal of Hypertension*. – 1991. - № 9. – P. 231-238.
154. Ruffin, V.A. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons [Text] / V.A. Ruffin, A.I. Salameh, W.F. Boron [et al.] // *Front Physiol*. – 2014. - Vol. 5, №43. - P. 1-11.
155. Saavedra, J.M. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities [Text] / J.M. Saavedra // *Cell Mol Neurobiol*. – 2005. - №25(3-4). - P. 485-512.
156. Santos-Torres, J. Cross-reactivity of acid-sensing ion channel and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger antagonists with nicotinic acetylcholine receptors [Text] / J. Santos-Torres, M.A. Ślimak, S. Auer [et al.] // *J Physiol*. - 2011. - Vol. 589, Issue 21. - P. 5109-5123.
157. Secades, J.J. Citicoline in intracerebral haemorrhage: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentre pilot study [Text] / J.J. Secades, J. Alvarez-Sabin [et al.] // *Cerebrovasc. Dis*. — 2006. — Vol. 21. — P. 380-385.
158. Selin, A.A. Mechanism underlying the protective effect of glycine in energetic disturbances in brain tissues under hypoxic conditions [Text] / A.A. Selin, N.V. Lobysheva, O.N. Vorontsova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 153. - №1. - P. 44-47.
159. Slepkov, E. R. Structural and functional analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [Text] / E.R. Slepkov, J.K. Rainey, B.D. Sykes [et al.] // *Biochem J*. – 2007. – V. 401. – № 3. – P. 623 – 633.
160. Spengler, M.I. Influence of plasma proteins on erythrocyte aggregation in three mammalian species [Text] / M.I. Spengler, M. Rasia // *Vet Res Commun*. - 2001. - №25(7). - P. 591-599.
161. Spugnini, E.P. Proton channels and exchangers in cancer [Text] / E.P. Spugnini, P. Sonveaux, C. Stock, M. Perez-Sayans [et al.] // *Biochim Biophys*. – 2015. - Vol. 1848, Issue 10, Part B. - P. 2715-26.
162. Stewart, J.J. MOPAC2009 [Electronic resource]: Official website Stewart Computational Chemistry. – URL: <http://openmopac.net> (дата обращения 07.03.2011).
163. Sughrue, M.E. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats [Text] / M.E. Sughrue // *Journal of Neuroscience Methods* — 2006. — №151. — P. 83–89.
164. Thomson Reuters Integrity: Официальный сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://integrity.thomson-pharma.com> (дата обращения 01.05.2011).

165. Torres-López, J.E. Role of NHE1 in Nociception [Text] / J.E. Torres-López, C.G. Guzmán-Priego, H.I. Rocha-González [et al.] // *Pain Res Treat.* – 2013. - Vol. 2013. - P. 1-8.
166. Tracey, W.R. Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1) [Text] / W.R. Tracey, M.C. Allen [et al.] // *Cardiovasc. Drug. Rev.* – 2003. – V.21. – №1. – P. 17–32.
167. Trott, O. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches [Electronic resource]: Official website AutoDock Vina. – Molecular Graphics Lab. – URL: <http://vina.scripps.edu> (дата обращения 07 03 2011).
168. Tsuda, K. Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation [Text] / K. Tsuda // *Int. Heart J.* — 2010. — Vol. 51 (2). — P. 121-124.
169. Verma, V. Implications of sodium hydrogen exchangers in various brain diseases [Text] / V. Verma, A. Bali, N. Singh [et al.] // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* – 2015. - Vol. 26, №5. - P. 417-26.
170. Vestrick, R.J. Murine Models of Vascular Thrombosis [Text] / R.J. Vestrick, M.E. Winn, D.T. Eitzman // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* - 2007. - Vol.27. - P. 2079-2093.
171. Wang, J. IgE stimulates human and mouse arterial cell apoptosis and cytokine expression and promotes atherogenesis in Apoe<sup>-/-</sup> mice [Text] / J. Wang, X. Cheng, M.X. Xiang [et al.] // *J Clin Invest.* - 2011. - Vol. 121. - №9. - P. 3564-77.
172. Wang, Y. Gene inactivation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 attenuates apoptosis and mitochondrial damage following transient focal cerebral ischemia [Text] / Y. Wang, J. Luo, X. Chen [et al.] // *Eur J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. - №1. - P. 51–61.
173. Warach, S. Dose dependent reduction in infarct growth with citicoline treatment: evidence of neuroprotection in human stroke? [Text] / S. Warach, K. Hamett // *Stroke.* — 2002. — Vol. 33. — P. 354.
174. Xu, H. Loss of NHE8 expression impairs ocular surface function in mice [Text] / H. Xu, Y. Zhao [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2015. – №1. – P. 79–87
175. Xu, SY. The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy [Text] / S.Y. Xu, S.Y. Pan // *Med Sci Monit Basic Res.* – 2013. - Vol. 19. – P. 37-45.
176. Xue, J. New strategies in stroke intervention [Text] / J. Xue, G.G. Haddad New York: Springer, 2009. - P. 123–125.

177. Yang, Y. Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat [Text] / Y. Yang, Q. Li, F. Ahmad [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2000. - Vol. 285. - №2. – P. 119-22.
178. Yao, W. Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms [Text] / W. Yao, F. Ji, Z. Chen [et al.] // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43. - №8. – P. 2212-2220.
179. Zhang, R. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury [Text] / R. Zhang, L. Lei [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17. - №9. – P. 2430–2433.
180. Zhang, Z. Upregulation of TRPM7 channels by angiotensin II triggers phenotypic switching of vascular smooth muscle cells of ascending aorta [Text] / Z. Zhang, M. Wang, X.H. Fan [et al.] // *Circ Res.* – 2012. - Vol. 111. - №9. - P. 1137–1146.

Центрированные на гуанидиновый фрагмент заряды циклических гуанидинов,  
испытанных на NHE-1 ингибирующую активность

Соединение	Q <sub>0</sub>	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	Q <sub>3</sub>	Q <sub>4</sub>	Q <sub>5</sub>	Q <sub>6</sub>	Q <sub>7</sub>
ПУ-0017	0,323	-1,008	0,056	-0,483	-0,967	-0,518	-0,700	-0,264
ПУ-0035	0,324	-1,005	0,054	-0,468	-0,960	-0,501	-0,910	-0,075
ПУ-0064	0,322	-0,998	0,009	-0,470	-0,963	-0,489	-1,046	
ПУ-0066	0,324	-1,005	-0,093	-0,473	-0,946	-0,531	-0,567	-0,339
ПУ-0067	0,323	-1,020	0,069	-0,565	-0,818	-0,781	-0,294	-0,586
ПУ-0087	0,324	-1,019	0,062	-0,662	-0,812	-0,785	-0,255	-0,744
ПУ-0185	0,325	-1,029	0,021	-0,077	-1,050	-0,266	-1,193	-0,455
ПУ-0273	0,324	-1,006	0,055	-0,484	-0,924	-0,567	-0,232	-0,103
ПУ-0284	0,324	-1,015	-0,163	-0,466	-0,945	-0,631	-0,230	-0,391
ПУ-0285	0,324	-1,013	0,012	-0,465	-0,901	-0,679	-0,051	-0,492
ПУ-0292	0,315	-1,017	0,045	-0,624	-0,433	-0,851	-0,615	-0,315
ПУ-0293	0,312	-1,018	0,080	-0,715	-0,351	-1,275	-0,433	-0,580
ПУ-0294	0,316	-1,034	0,048	-0,620	-0,416	-1,365	0,199	-0,704
ПУ-0374	0,322	-1,027	0,025	-0,467	-1,023	-0,395	-0,373	-0,846
ПУ-0376	0,342	-1,060	0,044	-0,555	-0,646	-0,690	-0,541	-0,428
ПУ-0474	0,324	-1,015	0,013	-0,466	-0,945	-0,631	-0,230	-0,391
ПУ-1189	0,319	-1,011	0,066	-0,484	-1,006	-0,280	-0,768	-0,452
ПУ-1191	0,324	-1,012	-0,139	-0,455	-0,923	-0,643	-0,098	-0,463
ПУ-1193	0,324	-1,007	0,055	-0,477	-0,937	-0,538	-0,863	-0,103
ПУ-1199	0,510	-1,458	-0,075	-0,068	-1,339	-0,334	-1,028	-0,049
ПУ-1200	0,510	-1,459	-0,078	-0,066	-1,323	-0,439	-0,572	-0,171
ПУ-1204	0,324	-1,012	0,057	-0,514	-0,878	-0,670	-0,349	-0,445
ПУ-1205	0,316	-1,034	0,048	-0,620	-0,416	-1,365	0,013	-0,314
ПУ-1355	0,510	-1,459	-0,077	0,115	-1,503	-0,439	-0,572	-0,171
ПУ-1390	0,508	-1,461	-0,079	-0,062	-1,346	-0,305	-1,378	0,217

Спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность в  $10^{-8}$

Соединение	$Q_0$	Ранг	$Q_1$	Ранг	$Q_2$	Ранг	$Q_3$	Ранг	$Q_4$	Ранг	$\Sigma$
РУ-0017	0,323	0	-1,008	0	0,056	0	-0,483	0	-0,967	0	0
РУ-0035	0,324	0	-1,005	0	0,054	1	-0,468	0	-0,960	0	1
РУ-0064	0,322	0	-0,998	0	0,009	1	-0,470	0	-0,963	0	1
РУ-0066	0,324	0	-1,005	0	-0,093	1	-0,473	0	-0,946	0	1
РУ-0067	0,323	0	-1,020	0	0,069	0	-0,565	0	-0,818	0	0
РУ-0087	0,324	0	-1,019	0	0,062	0	-0,662	0	-0,812	0	0
РУ-0185	0,325	0	-1,029	0	0,021	1	-0,077	1	-1,050	0	2
РУ-0273	0,324	0	-1,006	0	0,055	0	-0,484	0	-0,924	0	0
РУ-0284	0,324	0	-1,015	0	-0,163	1	-0,466	0	-0,945	0	1
РУ-0285	0,324	0	-1,013	0	0,012	1	-0,465	0	-0,901	0	1
РУ-0292	0,315	0	-1,017	0	0,045	1	-0,624	0	-0,433	0	1
РУ-0293	0,312	0	-1,018	0	0,080	0	-0,715	0	-0,351	0	0
РУ-0294	0,316	0	-1,034	0	0,048	1	-0,620	0	-0,416	0	1
РУ-0374	0,322	0	-1,027	0	0,025	1	-0,467	0	-1,023	0	1
РУ-0376	0,342	0	-1,060	0	0,044	1	-0,555	0	-0,646	0	1
РУ-0474	0,324	0	-1,015	0	0,013	1	-0,466	0	-0,945	0	1
РУ-1189	0,319	0	-1,011	0	0,066	0	-0,484	0	-1,006	0	0
РУ-1191	0,324	0	-1,012	0	-0,139	1	-0,455	0	-0,923	0	1
РУ-1193	0,324	0	-1,007	0	0,055	0	-0,477	0	-0,937	0	0
РУ-1199	0,510	1	-1,458	1	-0,075	1	-0,068	1	-1,339	1	5
РУ-1200	0,510	1	-1,459	1	-0,078	1	-0,066	1	-1,323	1	5
РУ-1204	0,324	0	-1,012	0	0,057	0	-0,514	0	-0,878	0	0
РУ-1205	0,316	0	-1,034	0	0,048	1	-0,620	0	-0,416	0	1
РУ-1355	0,510	1	-1,459	1	-0,077	1	0,115	1	-1,503	1	5
РУ-1390	0,508	1	-1,461	1	-0,079	1	-0,062	1	-1,346	1	5
Граничное условие	> 0,394		< - 1,187		< 0,054		> -0,279		< -1,110		

Спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность в  $10^{-7}$

Соединение	$Q_0$	Ранг	$Q_1$	Ранг	$Q_2$	Ранг	$Q_3$	Ранг	$Q_4$	Ранг	$\Sigma$
РУ-0017	0,323	0	-1,008	0	0,056	0	-0,483	0	-0,967	0	0
РУ-0035	0,324	0	-1,005	0	0,054	1	-0,468	0	-0,960	0	1
РУ-0064	0,322	0	-0,998	0	0,009	1	-0,470	0	-0,963	0	1
РУ-0066	0,324	0	-1,005	0	-0,093	1	-0,473	0	-0,946	0	1
РУ-0067	0,323	0	-1,020	0	0,069	0	-0,565	0	-0,818	0	0
РУ-0087	0,324	0	-1,019	0	0,062	0	-0,662	0	-0,812	0	0
РУ-0185	0,325	0	-1,029	0	0,021	1	-0,077	1	-1,050	0	2
РУ-0273	0,324	0	-1,006	0	0,055	0	-0,484	0	-0,924	0	0
РУ-0284	0,324	0	-1,015	0	-0,163	1	-0,466	0	-0,945	0	1
РУ-0285	0,324	0	-1,013	0	0,012	1	-0,465	0	-0,901	0	1
РУ-0292	0,315	0	-1,017	0	0,045	1	-0,624	0	-0,433	0	1
РУ-0293	0,312	0	-1,018	0	0,080	0	-0,715	0	-0,351	0	0
РУ-0294	0,316	0	-1,034	0	0,048	1	-0,620	0	-0,416	0	1
РУ-0374	0,322	0	-1,027	0	0,025	1	-0,467	0	-1,023	0	1
РУ-0376	0,342	0	-1,060	0	0,044	1	-0,555	0	-0,646	0	1
РУ-0474	0,324	0	-1,015	0	0,013	1	-0,466	0	-0,945	0	1
РУ-1189	0,319	0	-1,011	0	0,066	0	-0,484	0	-1,006	0	0
РУ-1191	0,324	0	-1,012	0	-0,139	1	-0,455	0	-0,923	0	1
РУ-1193	0,324	0	-1,007	0	0,055	0	-0,477	0	-0,937	0	0
РУ-1199	0,510	1	-1,458	1	-0,075	1	-0,068	1	-1,339	1	5
РУ-1200	0,510	1	-1,459	1	-0,078	1	-0,066	1	-1,323	1	5
РУ-1204	0,324	0	-1,012	0	0,057	0	-0,514	0	-0,878	0	0
РУ-1205	0,316	0	-1,034	0	0,048	1	-0,620	0	-0,416	0	1
РУ-1355	0,510	1	-1,459	1	-0,077	1	0,115	1	-1,503	1	5
РУ-1390	0,508	1	-1,461	1	-0,079	1	-0,062	1	-1,346	1	5
Граничное условие	> 0,394		< - 1,187		< 0,054		> - 0,279		< - 1,110		

Спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1 ингибирующую активность в  $10^{-6}$  М

Соединение	$Q_2$	Ранг
РУ-0017	0,056	0
РУ-0035	0,054	0
РУ-0064	0,009	0
РУ-0066	-0,093	0
РУ-0067	0,069	0
РУ-0087	0,062	0
РУ-0185	0,021	0
РУ-0273	0,055	0
РУ-0284	-0,163	0
РУ-0285	0,012	0
РУ-0292	0,045	0
РУ-0293	0,080	1
РУ-0294	0,048	0
РУ-0374	0,025	0
РУ-0376	0,044	0
РУ-0474	0,013	0
РУ-1189	0,066	0
РУ-1191	-0,139	0
РУ-1193	0,055	0
РУ-1199	-0,075	0
РУ-1200	-0,078	0
РУ-1204	0,057	0
РУ-1205	0,048	0
РУ-1355	-0,077	0
РУ-1390	-0,079	0
Граничное условие	> 0,072	

Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на неврологический дефицит у крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией

Двигательная активность и координация движения ( $M \pm m$ )

№	Группа	n	Баллы			
			Симметричность движений	Спонтанная активность	Симметричность предплечий	Координация движения
1	Ложнооперированные	5	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	2,00±0,00
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	12	1,83±0,17*	1,58±0,26*	1,67±0,19*	1,25±0,18*
3	ИР + соединение РУ-1355, (1,12 мг/кг)	13	2,69±0,13 <sup>#</sup>	2,69±0,14 <sup>*#</sup>	2,69±0,13 <sup>#</sup>	1,92±0,08 <sup>#</sup>
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12	2,17±0,17*	2,33±0,31*	2,42±0,19 <sup>*#</sup>	1,33±0,14*
5	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	10	2,50±0,17 <sup>*#</sup>	2,20±0,13 <sup>*#</sup>	2,50±0,17 <sup>*#</sup>	2,00±0,15
6	ИР + глицин (800 мг/кг)	11	2,45±0,16 <sup>*#</sup>	2,36±0,15 <sup>*#</sup>	2,18±0,12 <sup>*#</sup>	1,64±0,15*

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+ соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР +зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили в зонипорид дозе 1 мг/кг, «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/бр глицин в дозе 800 мг/кг.

Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на неврологический дефицит у крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией

Мышечный тонус (M±m)

№	Группа	n	Мышечный тонус, баллы			
			Отдергивание передних лапок	Удержание на сетке	Удержание груза	Движение по вертикали
1	Ложнооперированные	5	3,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	3,00±0,00
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	12	2,00±0,21*	1,08±0,19*	0,92±0,15*	1,50±0,19*
3	ИР + соединение РУ-1355, (1,12 мг/кг)	13	2,62±0,15 <sup>#</sup>	2,00±0,00 <sup>#</sup>	1,58±0,17 <sup>#</sup>	2,85±0,11 <sup>#</sup>
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12	2,33±0,14*	1,58±0,19*	1,58±0,19 <sup>#</sup>	2,08±0,23*
5	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	10	2,30±0,21*	1,90±0,10 <sup>#</sup>	1,70±0,21 <sup>#</sup>	2,80±0,20 <sup>#</sup>
6	ИР + глицин (800 мг/кг)	11	2,27±0,14*	1,91±0,09 <sup>#</sup>	1,73±0,14 <sup>#</sup>	2,64±0,15 <sup>#*</sup>

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+ соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР +зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили зонипорид дозе 1 мг/кг, «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/бр глицин в дозе 800 мг/кг.

Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на неврологический дефицит у крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией

Рефлексы (M±m)

№	Группа	n	Рефлексы, баллы				
			Реакция на звук	Роговичный рефлекс	Болевой рефлекс	Реакция на свет	Хватательный рефлекс
1	Ложнооперированные	5	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	3,00±0,00
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	12	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	1,92±0,15*
3	ИР + соединение РУ-1355, (1,12 мг/кг)	13	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,69±0,13 <sup>#</sup>
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,50±0,15 <sup>*#</sup>
5	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	10	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,10±0,18*
6	ИР + глицин (800 мг/кг)	11	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,27±0,14 <sup>*#</sup>

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+ соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР +зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили зонипорид в дозе 1 мг/кг, «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/бр глицин в дозе 800 мг/кг.

Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения на неврологический дефицит у крыс с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА и последующей 24 часовой реперфузией

Чувствительность ( $M \pm m$ )

№	Группа	n	Реакция на прикосновение, баллы
1	Ложнооперированные	5	3,00±0,00
2	Ишемия/реперфузия (ИР)	12	1,83±0,17*
3	ИР + соединение РУ-1355, (1,12 мг/кг)	13	2,31±0,14*#
4	ИР + зонипорид (1 мг/кг)	12	2,17±0,17*
5	ИР + магния сульфат (90 мг/кг)	10	2,00±0,00*
6	ИР + глицин (800 мг/кг)	11	2,00±0,00*

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постробработкой тестом Ньюмана-Кеулса)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 30 мин., до окклюзии ЛСМА в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+ соединение РУ-1355» группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг; «ИР +зонипорид» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили зонипорид в дозе 1 мг/кг, «ИР +магния сульфат» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили магния сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР +глицин» - группы животных, которым однократно за 30 мин, до окклюзии ЛСМА в/в вводили глицин в дозе 800 мг/кг.

Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения глицин при курсовом введении животным с 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзией ЛСМА на восстановление тактильной чувствительности в адгезивном тесте

(M±m)

№	Сутки	Экспериментальные группы			
		Ложнооперированные	Ишемия/реперфузия (ИР)	ИР + соединение РУ-1355	ИР + глицин
Коэффициент тактильной чувствительности лап					
1	1	1,03±0,06	0,42±0,34	0,79±0,06	0,57 ±0,18
2	3	0,99±0,07	0,00±0,00*	0,87±0,14 <sup>#</sup>	1,02±0,19 <sup>#</sup>
3	7	0,94±0,03	0,40±0,14*	0,61±0,13*	0,66±0,12
4	14	0,92±0,05	0,47±0,14*	0,82±0,11	0,58±0,12
5	21	1,04±0,06	0,70±0,08*	0,95±0,07	0,95±0,06 <sup>#</sup>
6	28	0,93±0,04	0,61±0,07*	0,91±0,05 <sup>#</sup>	1,0±0,02 <sup>#</sup>

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса соответствующего дня)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7 дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7 дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до реперфузии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7 дней).

Влияние соединения РУ-1355 и препарата сравнения на глубину съеденного столбика масла на разных сроках после 60-ти минутной эндоваскулярной окклюзии ЛСМА и последующей реперфузией при курсовом введении ( $M \pm m$ )

№	Сутки	Экспериментальные группы			
		Ложнооперированные	Ишемия/реперфузия (ИР)	ИР + соединение РУ-1355	ИР + глицин
Миллиметры стандартного стеклянного цилиндра					
1	1	10,90±0,10	0,60±0,49*	6,33±1,38 <sup>#</sup>	4,50±1,20
2	3	10,90±0,10	1,00±0,71*	9,00±0,91 <sup>#</sup>	6,29±1,41 <sup>*#</sup>
3	7	10,90±0,10	5,71±0,99*	9,89±0,39 <sup>*#</sup>	10,05±0,68 <sup>#</sup>
4	14	10,90±0,10	7,60±0,55*	11,00±0,00 <sup>#</sup>	10,43±0,43 <sup>#</sup>
5	21	10,90±0,10	8,38±0,39*	11,00±0,00 <sup>#</sup>	10,50±0,29 <sup>#</sup>
6	28	10,90±0,10	9,00±0,00*	10,67±0,33 <sup>#</sup>	9,67±1,33

Примечание: различия статистически значимы по отношению к группе:

\* - ложнооперированных; # - ИР ( $p \leq 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с постобработкой тестом Ньюмана-Кеулса соответствующего дня)

Обозначения: «ложнооперированные» – животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА и ввели физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (7дней); «ишемия/реперфузия (ИР)» - животные, которым за 10 мин., до окклюзии ЛСМА в/бр. вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г (7дней); «ИР+ соединение РУ-1355» и «ИР +глицин» - группы животных, которым за 10 мин. до окклюзии ЛСМА в/бр. вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг и глицин в дозе 800 мг/кг (7дней).