



УДК 617.7-073.178:615.076.9:547.856.1

ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА НА Na^+/H^+ -ОБМЕННИК И ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС

© 2023 г. А. С. Таран*, **, #, Л. В. Науменко*, Ю. А. Говорова*, Н. А. Гурова*, А. А. Спасов*, **, А. А. Озеров*, **, Д. В. Мережкина*

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

**ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

На основании данных о роли Na^+/H^+ -обменника (NHE) в модуляции внутриглазного давления, выступающего основным фактором развития глаукомы, и ранее проведенных разными авторами исследований, доказывающих наличие ингибирующей NHE-1 активности у производных хиनाзолина, было синтезировано девять новых соединений этого класса. Изучено влияние полученных производных хиназолина на ингибирование Na^+/H^+ -обменника и внутриглазное давление (ВГД) крыс в сравнении с зонипоридом (ингибитор NHE) и тимололом (препарат для снижения ВГД, используемый в клинической практике). Среди исследованных соединений *in vitro* все производные хиназолина в концентрации 1 нМ угнетали активность NHE-1, наиболее активным было производное хиназолинацетилгуанидина. Однако не все соединения проявили ВГД-снижающую активность *in vivo* на крысах. Так, наиболее активными из хиназолиновых производных выступают 4-оксохиназолинацетилгуанидин, его бромированное в положении С6 производное и хиназолинпропионилгуанидин. Анализ структура–активность показал, что наличие атома Вг в положении С6 производного 4-оксохиназолинацетилгуанидина приводит к максимальному снижению ВГД при инстилляционной раствору исследуемого соединения.

Ключевые слова: Na^+/H^+ -обменник (NHE), внутриглазное давление (ВГД), глаукома, хиназолин, биоизостеры мелатонина

DOI: 10.31857/S0132342323020215, EDN: PGNDUV

ВВЕДЕНИЕ

Глаукома — одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, характеризующаяся постоянным или периодическим повышением внутриглазного давления (ВГД), без должного лечения приводящая к слепоте и слабовидению. На данный момент ВГД — единственный контролируемый фактор прогрессирования глаукомы. В связи с этим актуальным остается поиск соединений, которые способны понижать внутриглазное давление, препятствуя развитию нейропатии зрительного нерва и сопряженных с этим явлением состояний [1]. В последнее время в литературе обсуждается появление новых мишеней для офтальмогипотензивных соединений, одна из которых — Na^+/H^+ -обменник-1 (NHE-1) [2, 3].

NHE-1 контролирует внутриклеточный pH и активность гликолитических ферментов — гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, а его экспрессия и активность повышаются, например, при сахарном диабете. NHE-1-зависимая регуляция гликолиза, в условиях ингибирования (хрусталик) или недостаточной активации (сетчатка) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, лежит в основе отвода избыточного гликолитического потока в сторону нескольких путей, способствующих окислительному стрессу, причинному фактору диабетического катарактогенеза и ретинопатии. Доказано, что активация NHE-1 способствует формированию диабетической катаракты, а также окислительно-нитратному стрессу и апоптозу сетчатки [4].

Многочисленные доклинические испытания, проведенные на крысах, кроликах и обезьянах, а также клинические испытания на людях подтверждают снижение ВГД при применении ингибиторов Na^+/H^+ -обменника (NHE) [5, 6]. Так, в ис-

Сокращения: NHE — Na^+/H^+ -обменник; ВГД — внутриглазное давление; ПБогТ — плазма, богатая тромбоцитами.
Автор для связи: (тел.: +7 (996) 511-05-08; эл. почта: taran-a.s@yandex.ru).

следовании блокирования Na^+/H^+ - и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменников карипоридом, амилоридом и этил-изопропил-амилоридом было показано, что данные воздействия в культуре клеток бычьего пигментного и беспигментного эпителия цилиарного тела препятствуют поглощению этими клетками ионов Na^+ , необходимых для секреции внутриглазной жидкости. В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета [6, 7] были выявлены соединения, ингибирующие NHE.

NHE-1 экспрессируется и активен в цилиарном пигментированном эпителии цилиарного тела, где он вместе с антипортером $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ АЕ2 способствует поглощению NaCl из стромы цилиарного отростка, что выступает решающим этапом для образования водянистой влаги. Кроме того, натрийуретические пептиды, которые локально синтезируются в цилиарном теле, ингибируют активность NHE-1, что, возможно, приводит к снижению ВГД. Кроме того, было показано, что активность NHE-1 регулируется соматостатином, который вырабатывается в этом эпителии и активирует Р13К/АКТ и эндотелиальный NO-синтазный путь. В непигментированном эпителии базолатеральные NHEs (возможно, NHE-1 и NHE-4) ингибируются NO, который, вероятно, действует через cGMP и протеинкиназу G [8]. Взятые вместе, эти результаты указывают на возможную роль ингибирования NHE1 в снижении внутриглазного давления. Соответственно, ингибиторы NHE снижают ВГД и могут рассматриваться как потенциальные фармакологические агенты.

Цель настоящего исследования – получение новых гуанидиновых производных хиназолина и изучение их возможного влияния на Na^+/H^+ -обменник и внутриглазное давление у крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гетероциклических производных хиназолинового ряда. Производные хиназолина представляют собой биоизостеры мелатонина, который, согласно многочисленным исследованиям [9], не только корректирует нарушенные циркадные ритмы, сон и настроение, но и выступает перспективным соединением для патогенетической терапии глаукомы [6].

N-Алкилирование исходных оснований бензильным эфиром хлоруксусной кислоты и изопропиловым эфиром α -хлорпропионовой кислоты, а также аминирование промежуточных сложных эфиров хиназолинилкарбоновых кислот гуанидином и аминоксидом осуществляли по разработанной ранее методике [10]. В резуль-

тате было синтезировано девять новых пиримидиновых производных хиназолина (I–IX).

Фармакологические свойства синтезированных соединений. NHE-ингибирующая активность *in vitro*. При физиологическом значении pH NHE-1 имеет низкую активность. Во время возникновения внутриклеточного ацидоза происходит накопление внутриклеточных протонов, которые выводятся из клеток через сарколеммный NHE-1 в обмен на вход ионов Na^+ . Возрастание внутриклеточного содержания ионов Na^+ активирует $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -реверсивный обмен через сарколемму, инициируя вход ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Возникает “ Ca^{2+} -перегрузка” [11, 12].

В контрольной серии экспериментов при добавлении к 200 мкл плазмы, богатой тромбоцитами (ПБогТ), раствора Кребса наблюдали увеличение светопропускания в среднем на 30–40% от исходного уровня калибровки. При добавлении к 200 мкл ПБогТ для снижения внутриклеточного pH 600 мкл пропионатного буфера (контрольная серия) происходила активация NHE-1, увеличивался приток Na^+ , связанный с выделением цитозольного H^+ , что приводило к отеку (сферуляции) тромбоцита в результате аккумуляции воды в цитоплазме. При этом наблюдали облегчение светопропускания до 60–70%.

В опытных исследованиях после предварительной инкубации ПБогТ с новыми соединениями или препаратом сравнения зонипоридом происходило снижение уровня светопропускания по отношению к контрольным исследованиям только с натрий-пропионатным буфером. Это свидетельствует о том, что исследуемые соединения ингибируют NHE-1 и уменьшают вероятность сферуляции тромбоцитов. Полученные результаты согласуются с литературными данными [11, 13, 14].

В исследовании *in vitro* все производные хиназолина в концентрации 1 нМ статистически значимо по отношению к контрольным исследованиям ($p < 0.05$) вызывали угнетение активности NHE-1. Соединения (II), (IV–VI) и (VIII) превосходили препарат сравнения зонипорид, однако статистически значимые различия с зонипоридом были только в отношении соединения (VIII) (табл. 1).

Офтальмогипотензивные свойства. Офтальмогипотензивную активность исследуемых соединений и препаратов сравнения изучали методом тонометрии на белых беспородных интактных крысах. Животные были разделены на опытные группы, которым в правый (тестовый) глаз инстиллировали (вводили в конъюнктивальный мешок) исследуемые соединения, и группы препаратов сравнения, которым в тестовый глаз инстиллировали тимолол и зонипорид. Левый

Таблица 1. Влияние новых соединений и препаратов сравнения на активность Na^+/H^+ -обменника и показатели внутриглазного давления у интактных крыс

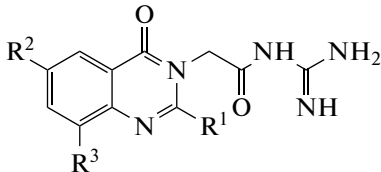
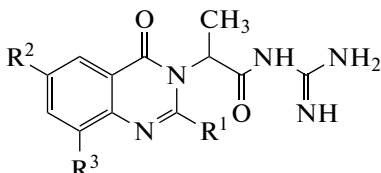
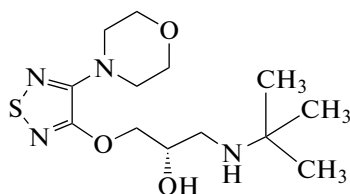
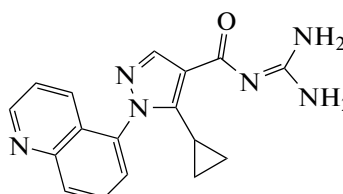
Соединение/ препарат	NHE-ингибирующая активность в дозе 1 нМ ($\Delta\%$), $M \pm m$	Максимальное изменение ВГД, %	Время максимального снижения ВГД, ч	Влияние на ВГД коллатерального глаза	R1	R2	R3
Производные хиназолина с линейным гуанидиновым фрагментом							
Группа 1							
				Базовая структура 4-оксохинолинацетилгуанидина			
(I)	34.2 ± 11.8	-26.2^*	2	–	–	–	–
(III)	$48.3 \pm 3.8^*$	6.5	ВГД не снижалось	+	CH_3	–	–
(IX)	$47.1 \pm 9.2^*$	8.6	ВГД не снижалось	–	–	CH_3	–
(VII)	$46.1 \pm 8.6^*$	5.3	ВГД не снижалось	+	–	Cl	–
(IV)	$57.6 \pm 8.9^*$	$-41.0^{*,\#}$	2	–	–	Br	–
(VIII)	$74.5 \pm 7.1^{*,**}$	-2.6	2	–	CH_3	Br	–
(VI)	$56.7 \pm 12.0^*$	-15.8^*	2	–	–	Br	Br
Группа 2							
				Базовая структура 4-оксохинолалинпропионилгуанидина			
(II)	$56.2 \pm 12.91^*$	-21.1^*	1	–	–	–	–
(V)	$68.9 \pm 10.9^*$	2.9	ВГД не снижалось	+	–	Br	–
Препараты сравнения							
Тимолол	Не исследовали	-24.4^*	2	+	 (S)-1-(<i>трет</i> -Бутиламино)-3-[(4-морфолино-1,2,5-тиадиазол-3-ил)окси]-2-пропанол (гемигидрат или малеат)		

Таблица 1. Окончание

Соединение/ препарат	NHE-ингибирующая активность в дозе 1 нМ ($\Delta\%$), $M \pm m$	Максимальное изменение ВГД, %	Время максимального снижения ВГД, ч	Влияние на ВГД коллатерального глаза	R1	R2	R3
Зонипорид	$41.5 \pm 8.1^*$	$-46.5^{*, \#}$	3	—			



[1-(Хинолин-5-ил)-5-циклопропил-1H-пиразол-4-карбонил]гуанидина гидрохлорид моногидрат

* Различие достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

Различие достоверно относительно показателей группы тимолола ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

** Различие достоверно относительно показателей группы зонипорида ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

(контрольный, коллатеральный) глаз служил для оценки возможного резорбтивного действия исследуемых соединений. Так, тимолол при инстиляции снижал офтальмотонус через 30 мин на 24% и достигал максимального эффекта через 1 ч (рис. 1а), ВГД-снижающий эффект сохранялся в течение 3 ч, что соответствует литературным данным и подтверждается в терапии. Зонипорид проявлял ВГД-снижающую активность через 60 мин (-27.9%) и достигал максимального эффекта к третьему часу (-46.5%) (рис. 1б).

При изучении влияния ингибиторов NHE на ВГД было выявлено, что из девяти синтезированных пиримидиновых производных хиназолина в различной степени снижали ВГД только четыре соединения – производные (I), (II), (IV) и (VI), остальные пять соединений не проявляли активность.

Соединение (VI) снижало ВГД максимально на 15.8% по отношению к исходному значению ко второму часу исследования, без тенденции к дальнейшему снижению ВГД. У соединения (II) максимальный офтальмогипотензивный эффект был достигнут к первому часу, ВГД было снижено на 21.1%, с последующим уменьшением оказываемого эффекта. Высокую активность, превосходящую препарат сравнения тимолол, проявили соединения (IV) и (I), максимум ВГД-снижающего эффекта в обоих случаях достигался к началу второго часа исследования и составлял 41.0 и 26.3% соответственно. В ходе исследования зонипорида установлено, что ВГД к третьему часу снижается на 46.5%, превосходя препарат сравнения тимолол.

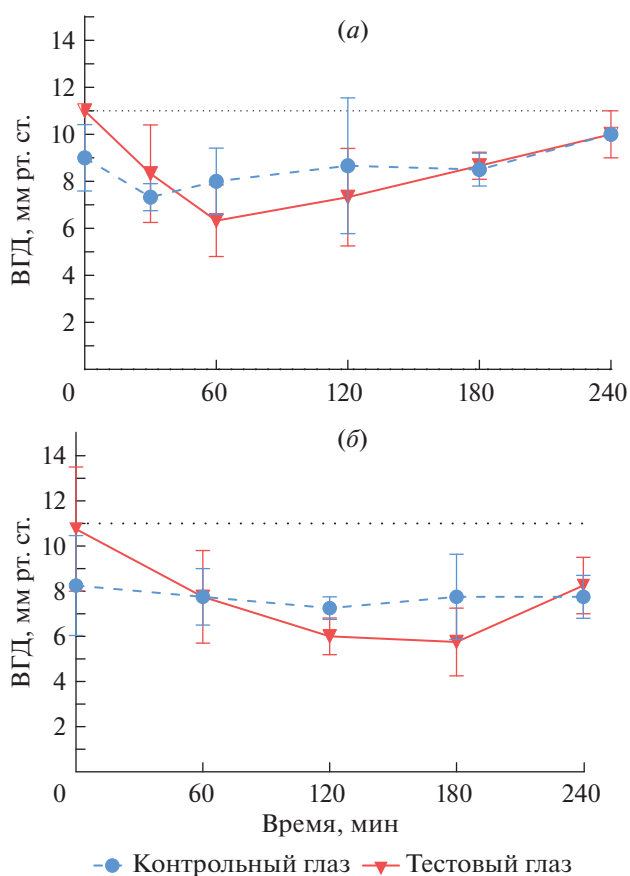


Рис. 1. Влияние тимолола (а) и зонипорида (б) на внутриглазное давление у крыс при однократной инстиляции в концентрации 0.2%.

Влияние исследуемых соединений на ВГД коллатерального глаза исследовали с целью выявления системного действия при попадании в кровоток и в дальнейшем прогнозирования возможных побочных эффектов. Таким образом, наиболее активные соединения (IV), (I), (II) и (VI) не вызывают изменения ВГД коллатерального глаза, в отличие от препарата сравнения тимолола, а значит, не проявляют резорбтивный эффект.

Для наиболее активных соединений определяли продолжительность изучаемого эффекта. Так, соединение (IV) через 60 мин после инстилляций снижало ВГД относительно исходного уровня на 36%, через 120 мин – на 41%, но к 180 мин исследуемый показатель возвращался к исходному значению (рис. 2а). Соединение (I) через 60 мин после инстилляций снижало ВГД на 16% относительно исходного уровня, к 120 мин эффективность возрастала до 26%, а к 180 мин гипотензивный эффект не наблюдался (рис. 2б). При инстиляции соединения (II) максимальное снижение ВГД наступало через 60 мин (21%), в дальнейшем активность снижалась: через 2 ч – до 15%, а через 3 ч – до 10% (рис. 2в).

Влияние на коллатеральный глаз у исследуемых соединений (I), (II) и (IV) не было обнаружено и находилось в пределах уровня ошибки.

Зависимость проявляемых фармакологических эффектов от химической структуры исследуемых соединений. По результатам исследования был проведен анализ зависимости ВГД-снижающей активности от химической структуры изучаемых соединений. Все исследуемые производные хиनाзолина были разделены на две группы (табл. 1): группа 1 включает в себя ацетилгуанидиновые производные хиназолина, группа 2 – пропионилгуанидиновые производные хиназолина.

В группу 1 входят производные хиназолина, в которых гетероцикл соединен с линейным гуанидиновым фрагментом посредством ацетильного линкера. Соединение (I), проявляющее среднюю активность и снижающее ВГД на 26.32%, представляет собой базовую структуру для всех изучаемых в данном исследовании соединений. Замещение атома Н на атом Вг в положении С6 (IV) приводит к увеличению активности и наибольшему снижению ВГД (–41%), тогда как дальнейшее бромирование в положение С8 (VI), создающее дополнительные электронные и стерические эффекты, снижает изучаемую активность (до –15.79%). В то же время наличие одного, но более электроотрицательного атома С1 в положении С6 (VII) приводит к обратному эффекту – незначительному повышению ВГД на 5.26%. Такой же эффект обеспечивает и введение метильной группы в положения С2 (III) и С6 (IX) – ВГД возрастает на 6.45 и 8.57% соответственно. Модификация структуры (IX) и последующее введение ато-

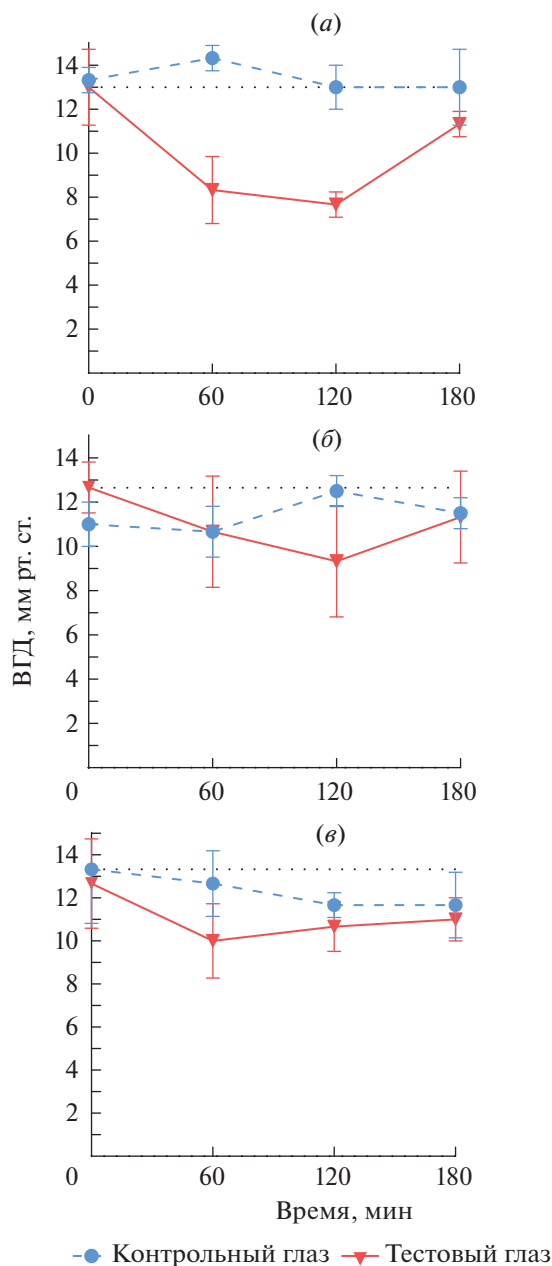


Рис. 2. Влияние соединений (IV) (а), (I) (б) и (II) (в) на внутриглазное давление у крыс при однократной инстиляции в концентрации 0.2%.

ма Вг в положение С6 (VIII) приводит к незначительному проявлению активности и снижению офтальмотонуса.

В группу 2 входят гуанидиновые производные хиназолина, у которых линкер представлен пропионильным фрагментом. Обнаружено, что включение в ацетильный линкер базового соединения (I) дополнительной метильной группы (II) почти не влияет на снижение ВГД (–21.1%). Однако дальнейшее бромирование в положение С6 (V), так же как и в случае С2-метилирования,

приводит к инверсии эффекта, и это соединение, наоборот, повышает офтальмотонус на 2.94%.

По результатам ННЭ-ингибиторной активности также был проведен анализ, отображающий связь химических структур изучаемых соединений и проявления фармакологического эффекта. Так, среди производных 4-оксохиназолинацетилгуанидина соединение (I), выступающее базовой структурой для всех изучаемых в данном исследовании соединений, проявляло наименьшую ННЭ-ингибирующую активность (34.21%). Электроотрицательный атом хлора в положении С6 (VII) приводит к увеличению ННЭ-ингибирующего действия до 46.12%, а замена Cl^{*} на метильную группу (IX) повышает активность до 47.05%. Наличие метильного заместителя в положении С2 (III) повышает изучаемую активность до 48.31%. Если же ввести два атома Вг в положения С6 и С8 (VI), ННЭ-ингибиторная активность повышается до 56.70%, сопоставимым эффектом (57.56%) обладает соединение (IV) только с одним атомом Вг в положении С6, а замещение атома Н^{*} на метильную группу в положении С2 (VIII) приводит к максимальному среди исследуемых соединений увеличению ННЭ-ингибирующей активности — до 74.50%.

Среди производных 4-оксохиназолинпропионилгуанидина соединение (II), не имеющее заместителей в хиназолиновом скаффолде, проявляет высокую ННЭ-ингибирующую активность (56.23%), но введение атома Вг в положение С6 (V) повышает активность до 68.85%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гетероциклических производных хиназолинового ряда. Все реагенты получали от компаний Sigma-Aldrich (США), AcrosOrganics (Бельгия) и использовали без дополнительной очистки. ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 400 (Bruker, Германия; 400 МГц для ¹H и 100 МГц для ¹³C) в DMSO-*d*₆ с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Температуру плавления определяли в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исходные основания — хиназолин-4(3H)-он и 2-метилхиназолин-4(3H)-он — коммерчески доступные соединения. 6-Бромхиназолин-4(3H)-он, 2-метил-6-бромхиназолин-4(3H)-он и 6,8-дибромхиназолин-4(3H)-он получали в соответствии с опубликованными методиками [15, 16].

N-[2-[4-Оксохиназолин-3(4H)-ил]ацетил]гуанидин (I). *А. Бензиловый эфир [хиназолин-3(4H)-ил]уксусной кислоты.* Перемешивали 2.00 г (13.7 ммоль) хиназолин-4(3H)-она и 4.00 г (28.9 ммоль) безводного карбоната калия в 40 мл безводного диметилформамида при 80–85°C в течение

15 мин, добавляли раствор 3.25 г (14.2 ммоль) бензилового эфира бромуксусной кислоты в 10 мл диметилформамида и перемешивали при той же температуре в течение 1 ч. Реакционную массу охлаждали, фильтровали, фильтрат упаривали на роторном испарителе при остаточном давлении 10 мм рт. ст. при температуре бани 90–95°C, остаток охлаждали, растирали с 25 мл воды, фильтровали, промывали на фильтре холодной водой (2 раза по 10 мл), сушили на воздухе в течение суток и кристаллизовали из 50 мл изопропилового спирта. Получили 3.30 г (82%) светло-желтого кристаллического вещества. Т. пл. 116–117°C.

Б. N-[2-[4-Оксохиназолин-3(4H)-ил]ацетил]гуанидин (I). К кипящему раствору 2.00 г (6.80 ммоль) бензилового эфира [хиназолин-3(4H)-ил]уксусной кислоты и 0.75 г (7.85 ммоль) гуанидина гидрохлорида в 50 мл безводного метилового спирта добавляли в один прием 0.50 г (8.04 ммоль) гранулированного калия гидроксида и кипятили в течение 30 мин. Горячий раствор фильтровали, отделяя образовавшийся осадок калия хлорида, фильтрат охлаждали и выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Выделившийся осадок отфильтровывали, промывали холодным метиловым спиртом (2 раза по 10 мл), 10 мл диэтилового эфира, сушили на воздухе в течение суток при комнатной температуре. Получили 1.45 г (87%) белого кристаллического вещества. Т. пл. 240–242°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 4.39 (с, 2H, CH₂), 7.50 (т, 1H, J 8, H⁶), 7.54 (уш. с, 4H, NH), 7.65 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.78 (т, 1H, J 8, H⁷), 8.12 (д, 1H, J 8, H⁵), 8.22 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 49.50, 121.95, 126.32, 127.05, 127.27, 134.37, 148.31, 149.29, 158.95, 160.59, 171.65.

Остальные соединения получали аналогичным образом.

N-[2-[2-Метил-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (III). Белое кристаллическое вещество, выход 80%. Т. пл. 262–264°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 2.46 (с, 3H, CH₃), 4.69 (с, 2H, CH₂), 6.80 (уш. с, 4H, NH), 7.45 (т, 1H, J 8, H⁶), 7.58 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.76 (т, 1H, J 8, H⁷), 8.07 (д, 1H, J 8, H⁵). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 26.23, 52.62, 123.22, 129.44, 129.58, 129.84, 137.58, 150.60, 159.02, 164.51, 165.83, 180.77.

N-[2-[6-Метил-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (IX). Белое кристаллическое вещество, выход 81%. Т. пл. 267–270°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 2.44 (с, 3H, CH₃), 4.35 (с, 2H, CH₂), 7.55 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.61 (д, 1H, J 8, H⁷), 7.62 (уш. с, 4H, NH), 7.92 (с, 1H, H⁵), 8.16 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 21.16, 49.40, 121.87, 125.64, 127.20, 135.49, 136.53, 146.49, 148.62, 159.14, 160.41, 171.48.

N-[2-[6-Хлор-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VII). Белое кристаллическое веще-

ство, выход 76%. Т. пл. 244–247°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 4.36 (с, 2H, CH₂), 7.56 (уш. с, 4H, NH), 7.67 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.80 (д, 1H, J 8, H⁷), 8.04 (с, 1H, H⁵), 8.26 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 52.61, 126.30, 128.33, 132.71, 134.29, 137.44, 150.23, 152.93, 162.16, 162.53, 174.33.

N-[2-[6-Бром-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (IV). Белое кристаллическое вещество, выход 89%. Т. пл. 242–244°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 4.37 (с, 2H, CH₂), 7.47 (уш. с, 4H, NH), 7.60 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.90 (д, 1H, J 8, H⁷), 8.17 (с, 1H, H²), 8.28 (с, 1H, H⁵). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 52.66, 122.47, 126.60, 131.44, 132.83, 140.17, 150.44, 152.98, 162.08, 162.41, 174.31.

N-[2-[2-Метил-6-бром-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VIII). Белое кристаллическое вещество, выход 83%. Т. пл. 281–284°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 2.46 (с, 3H, CH₃), 4.47 (с, 2H, CH₂), 7.51 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.60 (уш. с, 4H, NH), 7.88 (д, 1H, J 8, H⁷), 8.13 (с, 1H, H⁵). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 23.24, 47.76, 118.44, 121.86, 128.56, 129.20, 137.14, 146.53, 156.98, 159.13, 160.22, 170.91.

N-[2-[6,8-Дибром-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VI). Светло-желтое кристаллическое вещество, выход 81%. Т. пл. 313–316°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 4.36 (с, 2H, CH₂), 7.58 (уш. с, 4H, NH), 8.18 (с, 1H, H⁷), 8.30 (с, 1H, H⁵), 8.38 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 52.80, 122.24, 126.55, 127.46, 131.41, 142.56, 148.20, 153.87, 161.91, 162.21, 173.70.

N-[2-[4-Оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидин (II). Белое кристаллическое вещество, выход 78%. Т. пл. 268–270°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 1.57 (д, 3H, J 8, CH₃), 5.17 (кв, 1H, J 8, CH), 7.50 (т, 1H, J 8, H⁶), 7.61 (уш. с, 4H, NH), 7.66 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.80 (т, 1H, J 8, H⁷), 8.13 (д, 1H, J 8, H⁵), 8.29 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 21.30, 56.91, 124.82, 129.56, 129.94, 130.29, 137.36, 150.74, 151.00, 162.14, 163.36, 177.08.

N-[2-[6-Бром-4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидин (V). Белое кристаллическое вещество, выход 84%. Т. пл. 264–267°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц): 1.56 (д, 3H, J 8, CH₃), 5.13 (кв, 1H, J 8, CH), 7.58 (уш. с, 4H, NH), 7.60 (д, 1H, J 8, H⁸), 7.92 (д, 1H, J 8, H⁷), 8.20 (с, 1H, H⁵), 8.23 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 21.24, 57.28, 122.33, 126.38, 131.65, 132.78, 140.23, 150.02, 151.40, 162.20, 162.28, 176.56.

Фармакологические свойства синтезированных соединений. NHE-ингибирующая активность in vitro. Влияние соединений на активность Na⁺/H⁺-обменника изоформы 1 (NHE-1) изучали *in vitro* по методу D. Roskopf et al. (1991) [13] и K. Kusumoto (2002) [14] с модификациями [11] с использовани-

ем лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (ООО НПФ “БИОЛА”, Россия; программное обеспечение AGGR 2.00, Россия). Для эксперимента были выбраны тромбоциты кролика (исследования выполнены на пяти кроликах-самцах весом 3.0–4.0 кг (Филиал “Электрогорский” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, ветеринарное свидетельство 250 № 36969458 от 08.09.2015), поскольку на них активно экспрессирует NHE-1. В основу метода положены изменения светопропускания при изменении формы тромбоцита в условиях, имитирующих ишемию. Светопропускание ПБогТ принимали за 0%, раствора Кребса – за 100%.

Из краевой вены уха кролика забирали кровь в пробирки с 3.8%-ным раствором цитрата натрия (в соотношении 1 : 10). Кровь центрифугировали в течение 12 мин (Multi Centrifuge CM 6M, Латвия) при 1000 об/мин. Забирали надосадочную жидкость – плазму, богатую тромбоцитами (ПБогТ).

Контрольные измерения изменений светопропускания проводили без соединений. В условиях отсутствия активности NHE-1 (рН 7.4) к 200 мкл ПБогТ добавляли 600 мкл раствора Кребса (в мМ: NaCl – 120, KCl – 4.8, KH₂PO₄ – 1.2, MgSO₄ – 2.5, NaHCO₃ – 25, CaCl₂ – 2.6, глюкоза – 5.4; рН 7.4, 37°C). Для активации NHE-1 снижали рН: к 200 мкл ПБогТ добавляли 600 мкл буферного раствора, содержащего натрия пропионат (в мМ: натрия пропионат – 135, HEPES – 20, CaCl₂ – 1, MgCl₂ – 1, глюкоза – 10; рН 6.7, 37°C).

В опытных измерениях изменений светопропускания в кювету к 200 мкл ПБогТ предварительно добавляли изучаемые соединения или препарат сравнения в концентрации 1 нМ и объеме 10 мкл, предварительно инкубировали 5 мин до добавления раствора пропионатного буфера. Все пробы инкубировали при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (800 об/мин, 37°C). В качестве препарата сравнения использовали селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (Sigma, США).

Дельта % ингибирования рассчитывали по формуле:

$$\Delta\% = (B \times 100) / A - 100,$$

где А – разница светопропускания между контрольными замерами с пропионатным буфером и раствором Кребса; В – разница светопропускания между замерами с пропионатным буфером в условиях добавления соединений в пробу (опыт) и без них (контроль).

Статистические расчеты проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

Офтальмогипотензивные свойства. Изучение влияние на внутриглазное давление проводили на беспородных интактных крысах обоих полов мас-

сой 220–400 г, возрастом 2 месяца (питомник “Рапполово”, Ленинградская область). Все животные были разделены на опытные группы и группы препаратов сравнения по шесть животных в каждой. В 9:00 утра у животных всех групп измеряли исходное ВГД в обоих глазах. Для определения ВГД использовали ветеринарный тонометр ICARE Tonovet (Финляндия) для ранней диагностики глаукомы в ветеринарии [6, 17]. После измерения животным опытных групп проводили инстилляцию 0.2%-ных водных растворов изучаемых соединений в объеме 50 мкл в правый глаз (тестовый). Животным групп препаратов сравнения в тестовый глаз инстиллировали тимолол (лекарственное средство, снижающее ВГД, применяемое в клинической практике; Тимолол-СОЛОфарм 0.5%, Гротекс, Россия) и 0.2%-ный раствор зонипорида (стандартный ингибитор ННЭ; Sigma, США). Левый глаз (контрольный, коллатеральный) служил для определения возможного резорбтивного эффекта. ВГД в тестовом и коллатеральном глазах измеряли через 30, 60, 120, 180 и 240 мин.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office и Graph Pad Prizm (GraphPad Software, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано девять новых пиримидиновых производных хиназолина, изучено их влияние на ингибирование Na^+/H^+ -обменника и внутриглазное давление (ВГД) крыс в сравнении с зонипоридом (ингибитор ННЭ) и тимололом (препарат для снижения ВГД, используемый в клинической практике). Показано, что соединение (IV) – бромированное в положении С6 производное 4-оксохиназолинацетилгуанидина – выступает ингибитором ННЭ-1 и обладает высокой офтальмогипотензивной активностью у крыс, превосходящей препарат сравнения тимолол, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения его возможных антиглаукомных свойств, а также детализации механизма действия в отношении внутриглазного давления.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования выполнены в рамках проекта Российского научного фонда от 25 марта 2022 года № 22-15-20025 (“Синтез и исследование эффективности биоизостеров мелатонина”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальную работу проводили в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной

практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации в соответствии с ГОСТ Р 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики” и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”, с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балалин С.В., Фокин В.П. // Клиническая офтальмология. 2019. Т. 19. С. 43–48. <https://doi.org/10.21689/2311-7729-2019-19-1-43-48>
2. Avila M. Y., Seidler R. W., Stone R. A., Civan M. M. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. V. 43. P. 1897–1902.
3. Mandal A., Shahidullah M., Delamere N. A., Terán M. A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. V. 297. P. C111–C120. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00539.2008>
4. Lupachyk S., Stavniichuk R., Komissarenko J., Drel V., Obrosova A., El-Remessy B., Pacher P., Obrosova I. // Int. J. Mol. Med. 2012. V. 29. P. 989–998. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.933>
5. Fidzinski P., Salvador-Silva M., Choritz L., Geibel J., Coca-Prados M. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. V. 287. P. C655–C663. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00552.2003>
6. Spasov A., Ozerov A., Vassiliev P., Kosolapov V., Gurova N., Kucheryavenko A., Naumenko L., Babkov D., Sirotenko V., Taran A., Litvinov R., Borisov A., Klochkov V., Merezhkina D., Miroshnikov M., Uskov G., Ovsyankina N. // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03722-w>
7. Спасов А.А., Гурова Н.А., Тимофеева А.С., Сорокин С.М. // Эксперим. и клинич. фармакология. 2014. Т. 77. № 6. С. 13–17.
8. Pedersen S. F., Counillon L. // Physiol. Rev. 2019. V. 99. P. 2015–2113. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2018>
9. Gubin D., Neroev V., Malishevskaya T., Cornelissen G., Astakhov S., Kolomeichuk S., Yuzhakova N., Kabitskaya Y., Weinert D. // J. Pineal Res. 2021. V. 70. P. e12730. <https://doi.org/10.1111/jpi.12730>
10. Озеров А.А., Новиков М.С., Глухова Е.Г. // Усп. соврем. естествознания. 2016. № 2. С. 53–56.
11. Гурова Н.А., Спасов А.А., Питерсен А.С. // Вестник Волгоград. гос. мед. ун-та. 2011. № 2. С. 70–72.
12. Спасов А.А., Гурова Н.А., Харитонов М.В. // Эксперим. и клинич. фармакология. 2013. Т. 76. № 1. С. 43–48.
13. Roszkopf D., Morgenstern E., Scholz W., Osswald U., Siffert W. // J. Hypertens. 1991. V. 9. № 3. P. 231–238.

14. Kusumoto K., Igata H., Abe A., Ikeda S., Tsuboi A., Imamiya E., Fukumoto S., Shiraishi M., Watanabe T. // *Br. J. Pharmacol.* 2002. V. 135. P. 1995–2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704647>
15. Солодунова Е.А., Новиков М.С., Озеров А.А. // *Волгоград. научно-мед. журн.* 2015. № 3. С. 36–38.
16. Солодунова Г.Н., Волкова А.О., Коршенинникова А.С., Кучеренко А.Р., Скороход Е.Д., Толкачева В.И., Турченко К.В., Турченко Л.В. // *Волгоград. научно-мед. журн.* 2018. № 2. С. 20–22.
17. Marcus A.J., Iezhitsa I., Agarwal R., Vassiliev P., Spasov A., Zhukovskaya O., Anisimova V., Ismail N.M. // *Data Brief.* 2018. V. 18. P. 523–554. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.019>

Effect of Guanidine Derivatives of Quinazoline on Na^+/H^+ -Exchanger and Intraocular Pressure

A. S. Taran*, **, #, L. V. Naumenko*, Ju. A. Govorova*, N. A. Gurova*, A. A. Spasov*, **, A. A. Ozerov*, **, and D. V. Merezhkina*, #

Phone: +7 (996) 511-05-08; e-mail: taran-a.s@yandex.ru

*Volgograd State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

**Volgograd Medical Scientific Center, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

Based on the data of the role of Na^+/H^+ -exchanger (NHE) in the modulation of intraocular pressure, which is the main factor in the development of glaucoma, and previously conducted studies by various authors proving the presence of inhibitory NHE-1 activity in quinazoline derivatives, nine new compounds belonging to this class were synthesized. The effect of the obtained quinazoline derivatives on the inhibition of Na^+/H^+ -exchanger and their on intraocular pressure (IOP) in comparison with zoniporide (NHE inhibitor) and timolol (a drug for lowering IOP used in clinical practice) was studied. Among the compounds studied *in vitro*, all quinazoline derivatives at a concentration of 1 nM inhibited the activity of NHE-1, the most active compound was a derivative of quinazoline acetylguanidine. However, not all compounds showed IOP-reducing activity *in vivo* in rats. So the most active of the quinazoline derivatives are 4-oxoquinazoline acetylguanidine, its brominated derivative at position C6 and quinazoline propionylguanidine. The structure–activity analysis showed that the presence of the Br atom at the C6 position of the 4-oxoquinazoline acetylguanidine derivative leads to a maximum decrease in IOP during instillation of the solution of the compound.

Keywords: Na^+/H^+ -exchanger (NHE), intraocular pressure (IOP), glaucoma, quinazoline, melatonin bioisosters