

На правах рукописи

Гурова Наталия Алексеевна

**«ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ - НОВЫЙ КЛАСС
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ»**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Волгоград – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Спасов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты:

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

Мирзоян Рубен Симонович, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», заведующий лабораторией фармакологии цереброваскулярных расстройств.

Митрохин Николай Михайлович, доктор биологических наук, профессор, Открытое акционерное общество "Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ", генеральный директор.

Ведущее учреждение:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "___" _____ 2015 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

по адресу: г.Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

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

Автореферат разослан "_____" _____ 2015 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Л.И. Бугаева

Актуальность темы исследования.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются значимой медико-социальной проблемой, поскольку занимают первое место в структуре заболеваемости и смертности [Баланова, 2013; Шальнова, 2013; Шляхто, 2013; Tamargo, 2009; Janssens, 2012; Liu, 2013; Thihalolipavan, 2014]. Среди летальных случаев в Российской Федерации на долю ишемической болезни сердца приходится 25,7%, инсультов - 21,4% [Моисеев, 2012; Оганов, 2012; Скворцова, 2013; Бойцов, 2014].

В основных положениях Постановления президиума РАМН «Развитие научных исследований и научной инфраструктуры в рамках задач платформы "Сердечно-сосудистые заболевания"» особо отмечается необходимость современных инноваций при лечении острых коронарных катастроф, а также "...важность дальнейших фундаментальных исследований, направленных на **создание новых лекарственных средств, модулирующих эндогенный потенциал органов сердечно-сосудистой системы**" [Дедов, 2012; Чазов, 2012; Шляхто, 2012]. Таким образом, усилилось внимание к поиску новых кардиопротекторных препаратов, а глобальной задачей лечения ССЗ является улучшение прогноза заболевания, предупреждение развития осложнений, увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества [Шляхто, 2005; Симоненко, 2011; Моисеев, 2012]. Особое значение для современной фармакотерапии имеет влияние кардиотропных препаратов на процессы торможения ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования [Арутюнов, 2002; Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010]. Поэтому поиск, изучение и создание новых кардиопротекторных средств является актуальной задачей в решении проблемы улучшения прогноза ССЗ.

Известно, что производные бензимидазолов обладают кардиотропной активностью [Спасов, 1999; Анисимова, 2002-2012; Bansal, 2012; Barot, 2013; Jain, 2013; Shah, 2013; Keri, 2014]. Среди них найдены соединения, тормозящие процессы ремоделирования миокарда и относящиеся к ингибиторам натрий-водородного обменника (NHE) [Zhang, 2007]; проявляющие признаки высокого сродства к ионным каналам [Анисимова, 2009; Галенко-Ярошевский, 2009, 2015; Поротиков, 2008], известны антиаритмические (афобазол и ритмидазол) [Кириллов, 1996; Шабашева, 1997; Спасов, 1999; Петров, 2003; Цорин, 2009; Кръжановский, 2012, 2013; Середенин, 2013] и инотропные (пимобендан и адибендан) [Gordon, 2006; Endoh, 2008; Rao, 2009; Boswood, 2010] препараты. Найдены противоишемические вещества, способные стабилизировать работу сердца в условиях гипоксии и снижать агрегацию тромбоцитов [Спасов, 1984; Панченко, 1990; Чернов, 1990]. Поэтому поиск потенциальных кардиопротекторных средств среди производных бензимидазола является целесообразным.

Степень научной разработанности проблемы.

Известно о значительном влиянии ремоделирования сердца на становление, развитие и прогрессирование ССЗ и их осложнений, в том числе смертности. Так, фиброз миокарда

(морфологическое ремоделирование) у больных с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью является аритмогенным фактором. Стойкая желудочковая тахикардия (ионное и электрофизиологическое ремоделирование) вызывает нарушение гемодинамики и способствует морфологическому ремоделированию сердца [Колбин, 2010; Шаваров, 2011; Моисеев, 2012].

В настоящее время хорошо описаны патофизиологические механизмы данного процесса на системном, органном, молекулярном уровнях, определены возможные мишени (ионные каналы, ферменты, обменники ионов и другие факторы, нарушения со стороны которых приводят к ремоделированию структур миокарда) для воздействия лекарственных препаратов. Так, роль 1 изоформы натрий-водородного обменника связана с участием в развитии «кальциевого парадокса», а ФДЭ кардиомиоцитов - с влиянием на цитоскелет и сократительные волокна.

Однако следует отметить недостаточную степень фармакологической разработанности данного направления. Не полностью изучены свойства известных лекарственных препаратов вызывать регрессию гипертрофии сердца, нормализацию геометрии камер сердца и восстановление электрофизиологической гомогенности миокарда [Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010]. Ведется поиск соединений, тормозящих процессы ремоделирования и вызывающих его обратное развитие. Используемые в России кардиопротекторы (триметазидин, этилметилгидроксипиридина сукцинат, милдронат) относятся к «метаболическим» и имеют недостаточно высокую клиническую эффективность [Петров, 2012; Мареев, 2013].

Известные свойства производных бензимидазола влиять на такие клеточные мишени, как трансмембранные ионные токи и Na^+/H^+ -обменник, активность ФДЭ, подтверждают целесообразность проведения направленного поиска кардиопротекторов среди соединений данного класса с последующим экспериментальным изучением их фармакологического потенциала.

Целью настоящего исследования является проведение направленного поиска веществ, оказывающих кардиопротекторное действие, среди новых производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, обладающих NHE-ингибирующими, антифосфодиэстеразными свойствами и блокирующими трансмембранные ионные токи.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие **задачи**:

1. Осуществить консенсусный прогноз наличия кардиопротекторных свойств у конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола с использованием иерархической системы целенаправленного поиска *in silico*.

2. Провести поиск соединений, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс, среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов и определить эффекты наиболее активного вещества на трансмембранные ионные токи *in vitro*.

3. Изучить влияние производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на активность натрий/водородного обменника (NHE-1) *in vitro* с последующей оценкой противоишемических свойств соединения-лидера *in vivo*.

4. Выполнить оценку данных об уровне антифосфодиэстеразного действия производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов и изучить влияние на сократительную активность изолированных предсердий крыс *in vitro* у эффективных представителей данного класса для выбора перспективного вещества.

5. Провести анализ *in silico* влияния базовой структуры бензимидазола и заместителей на уровни изучаемых фармакологических видов активностей.

6. Исследовать кардиопротекторные (антиремоделирующие) эффекты и механизм действия наиболее активного среди ингибиторов NHE-1 соединения РУ-1355 при коронарогенном и некоронарогенном повреждении миокарда.

7. Определить антиремоделирующие свойства амфедазола, наиболее активно увеличивающего продолжительность рефрактерного периода изолированных предсердий крыс.

8. Оценить кардиопротекторное действие наиболее активного в отношении сократимости изолированных предсердий крыс соединения РУ-539 среди ингибиторов ФДЭ при некоронарогенном повреждении миокарда.

9. Изучить кардиальные и некоторые экстракардиальные побочные эффекты соединений-лидеров.

Научная новизна.

Впервые проведен консенсусный прогноз перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (1393 структур) как источников веществ с кардиопротекторной активностью: в системе PASS для 19 видов биологической активности, релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию, и с помощью ИТ «Микрокосм» методом сходства к эталонам.

Впервые создана иерархическая система целенаправленного поиска *in silico* новых кардиопротекторных соединений с заданным механизмом действия среди производных привилегированной подструктуры бензимидазола – эффективных противоишемических, антиаритмических и кардиотонических корректоров; проведен многоэтапный итеративный виртуальный и экспериментальный скрининг этих соединений на различных моделях *in vitro* и *in vivo*. *In silico* найдены значимые признаки высокого уровня противоишемической и антиаритмической активностей для различных классов новых замещенных и незамещенных производных бензимидазола.

Впервые были получены данные о противоишемическом, антифибрилляторном и антиремоделирующем эффектах соединения РУ-1355 на моделях коронарогенного и некоронарогенного повреждения миокарда в сравнении с ингибитором NHE зонипоридом. Проведено сравнительное изучение антиремоделирующей активности амфедазола и препарата сравнения амиодарона, в том числе в условиях ишемии миокарда. Изучены инотропные и кардиопротекторные свойства ингибитора ФДЭ соединения РУ-539 на модели экспериментальной хронической сердечной недостаточности.

Изучены кардиальные и экстракардиальные побочные эффекты, а также острая токсичность высокоактивных соединений РУ-1355, амфедазола, РУ-539. Описаны клинические признаки интоксикации данными веществами.

Научно-практическая значимость.

В результате экспериментального поиска среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола новых веществ, ингибирующих NHE-1, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс и сократительную активность изолированных предсердий крыс у соединений с антифосфодиэстеразной активностью, была сформирована база данных соединений, изученных на предмет описанных видов активности.

Выявленные *in silico* значимые признаки высокого уровня NHE-ингибирующего и антифибрилляторного эффектов используются для направленного синтеза и поиска новых высокоактивных соединений.

Результаты расширенных фармакологических исследований *in vivo* соединения РУ-1355 с выраженной NHE-ингибирующей активностью, показавшего выраженные противоишемические и антиремоделирующие свойства; амфедазола, проявляющего свойства антиаритмического вещества III класса и демонстрирующего в ходе исследований выраженные антифибрилляторные и антиремоделирующие эффекты; соединения РУ-539 с антифосфодиэстеразной активностью, повышающего сократительную активность и функциональные резервы миокарда, свидетельствуют о необходимости проведения расширенных доклинических исследований.

Методология и методы исследования.

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Арзамасцев, 2012; Галенко Ярошевский, 2012; Тюренков, 2012; Чичканов, 2012], также с использованием современных высокоинформативных методов, имеющих в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ (ВолГМУ), НИИ фармакологии ВолГМУ и ГБУ "Волгоградский медицинский научный центр" (ГБУ ВМНЦ).

Эксперименты проведены на нелинейных половозрелых мышах, крысах, а также кроликах-самцах породы «Шиншилла».

Исходя из поставленных цели и задач исследования, были использованы современные методы *in silico* (системы PASS и ИТ Микрокосм, статистические методы теории распознавания образов), позволяющие с высокой степенью достоверности провести прогноз и выявить значимые признаки высокого уровня противоишемической и антиаритмической активностей. Выбранные экспериментальные модели коронарогенного и некоронарогенного повреждения миокарда и определяемые показатели позволили изучить влияние соединений на ионное, электрофизиологическое, гемодинамическое и морфологическое ремоделирование.

Реализация результатов исследования.

Данные об антиаритмическом, NHE-ингибирующем и инотропном эффектах соединений,

анализ влияния типа базовой структуры и заместителей на уровни активности в перспективных классах конденсированных и неконденсированных бензимидазолов используется при синтезе новых соединений в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Предложенная иерархическая система целенаправленного поиска *in silico* новых кардиопротекторных соединений используется в работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, кафедры фармакологии, кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, Волгоградского медицинского научного центра.

По результатам исследований соединений РУ-1355 и РУ-539 подготовлены и представлены заявки на формирование тематики работ в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по мероприятию «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств».

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедр фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедр фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, Воронежской государственной медицинской академии имени Н.Н. Бурденко, Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее перспективными для поиска новых кардиотропных соединений являются следующие дериваты бензимидазола: - веществ с антиаритмической активностью среди производных N⁹-ИМБИ и N¹-ИМБИ, содержащие в положении R₂ - фенильный и в положении R₃ - диэтиламиноэтильный заместители; - соединений с NHE-ингибирующей активностью в группе N¹-замещенных 2-аминобензимидазола, содержащие в положениях N¹ морфолиноэтильный значимый заместитель.

2. Соединение - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид - под лабораторным шифром РУ-1355 активно ингибирует NHE тромбоцитов кролика *in vitro* (IC₅₀=5,42x10⁻¹⁰ M) и значительно превосходит зонипорид (IC₅₀=2,7x10⁻⁸ M). Вещество РУ-1355 замедляет ионное, гемодинамическое и морфологическое ремоделирование миокарда: статистически достоверно в 1,8 раза уменьшает размер зоны некроза миокарда, ограничивает рост тропонина I в плазме крови в 2,5 раза; снижает тяжесть постреперфузионных нарушений ритма (p<0,05); увеличивает порог электрических фибрилляций по сравнению с эффектами у животных контрольной группы; ограничивает повреждение миокарда и улучшает его сократимость у животных с изопротереноловой ХСН.

3. Соединение - 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – амфедазол интенсивно влияет на рефрактерность изолированных предсердий ($M\dot{E}K=1,60 \times 10^{-5}M$) и превосходит амиодарон по величине $M\dot{E}K$ в 10 раз. Оно блокирует трансмембранные ионные токи: в дозе $5 \times 10^{-5}M$ калиевый ток уменьшился на 60%, токи натрия и кальция - на 34% каждый. Амфедазол препятствует электрофизиологическому ремоделированию миокарда: на моделях фибрилляций ишемического и неишемического генеза превосходит препарат сравнения амиодарон по величине $E\dot{D}_{50}$ в 9 раз и более; увеличивает порог электрических фибрилляций желудочков, по снижению тяжести ишемического повреждения превосходит амиодарон в 1,5 раза.

4. Соединение - 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия бромид - под лабораторным шифром РУ-539 в концентрации $1 \times 10^{-4}M$ снижает активность ФДЭ кардиомиоцитов кролика на 66,7%; увеличивает сократимость изолированных предсердий ($IC_{50}=4,2 \times 10^{-7}M$) и превосходит амрион в 6 раз. Соединение РУ-539 ограничивает гемодинамическое ремоделирование миокарда: на модели некоронарогенного некроза миокарда *in vivo*: повышает сократительную активность и функциональные резервы сердца.

5. Величина LD_{50} исследуемых производных бензимидазола составляет для соединений: РУ-1355 - 342,7 мг/кг, амфедазола - 60,0 мг/кг, РУ-539 - 118 мг/кг, то есть они являются умеренно токсичными.

Степень достоверности и апробация результатов.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на нелинейных половозрелых мышцах (174) и крысах (860) обоего пола, 60 кошках обоего пола, 15 кроликах-самцах породы «Шиншилла»; с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования и специфических маркеров в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению противоишемического (антиангинального) действия [Чичканов, 2012], кардиотонической активности лекарственных средств [Тюренок, 2012], антиаритмических лекарственных средств [Галенко-Ярошевский, 2012], а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на IV Международном славянском конгрессе по электростимуляции и клинической электрофизиологии сердца, Санкт-Петербург, 2000 г.; IV, V Международных научно-практических конференциях "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: материалы", Ростов-на-Дону, 2011, 2012 гг.; Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина «Современные проблемы химической науки и фармации» Чебоксары, 2014; V Всероссийском научно-практическом семинаре «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 2013 г.; XVII, XVIII, XIX, XIX Российских национальных конгрессах «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО», Москва, 2009, 2010, 2011, 2012 гг.; III съезде фармакологов России «Фармакология – практическому здравоохранению», Санкт-Петербург, 2007;

IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 2012 г.; Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, Москва, 2013 г.; Втором международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» Москва, 2010 г.; 5-th International Symposium "Methods and Applications of Computational Chemistry", Kharkiv, Ukraine, 2013; 20th EuroQSAR Understanding Chemical-Biological Interactions St-Peterburg, 2014; 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.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 47 печатных работ, в том числе 19 статей, из которых 16 - статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получено 6 патентов на изобретения.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста, иллюстрирована 40 таблицами, 34 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VI), обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и приложений. Список литературы включает 208 отечественных и 272 иностранных источника.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме.

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах решения поставленных задач: при проведении экспериментального скрининга антифибрилляторной, ННЭ-ингибирующей и кардиотонической активности конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, исследований *in silico*, изучении *in vitro* и *in vivo* фармакологической и токсикологической активности соединений-лидеров, статистической обработке, обсуждению результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций, оформлении рукописи.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, обосновывающий перспективность производных бензимидазола для поиска кардиопротекторных средств. *В первом разделе* главы подтверждается, что бензимидазол - активное гетероциклическое азотсодержащее соединение - является "привилегированной подструктурой" - базовой структурой с универсальными связывающими свойствами, способной обеспечить эффективные и высокоселективные лиганды для целого ряда различных биологических мишеней за счет модификации функциональных групп. Оптимизация заместителей вокруг ядра бензимидазола привело к созданию ряда активных лекарственных препаратов, применяемых в настоящее время в

клинике. Описан спектр биологической активности конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. *Второй раздел* литературного обзора посвящен анализу кардиотропного потенциала производных бензимидазола. Представлены прямые (влияние на трансмембранные ионные токи нейронов прудовика и трабекул лягушки) и косвенные (местноанестезирующая, противосудорожная активности) признаки высокого сродства к ионным каналам, трансмембранным ионным обменникам, позволяющие предположить антиаритмические, антифибрилляторные, инотропные свойства. Показано наличие антиоксидантной, метаболитной, гемореологической активностей и антитромбогенного потенциала, свидетельствующих о возможном противоишемическом и антиремоделлирующем эффектах. *В заключительном разделе* обзора было показано наличие у производных бензимидазола кардиопротекторных свойств с учетом релевантных механизмов, связанных с влиянием на трансмембранные ионные токи, активность мембранных ферментов и ионных обменников, метаболизм, ремоделирование структур миокарда. На основании знаний о **высокой эффективности кардиотропных препаратов** для улучшения прогноза СС заболеваний и предупреждения развития осложнений; литературных данных о **большом кардиопротекторном потенциале производных бензимидазола**; учитывая накопленные экспериментальные данные, в том числе базы данных кафедры фармакологии ВолгГМУ, обоснована целесообразность проведения **целенаправленного поиска перспективных соединений, влияющих на ионное** (ингибиторов NHE), **электрофизиологическое** (на трансмембранные ионные токи и рефрактерность миокарда), **гемодинамическое** (среди ингибиторов ФДЭ) и **морфологическое ремоделирование** с последующим экспериментальным изучением их фармакологического потенциала.

Во **второй** главе представлены результаты проведения поиска соединений, обладающих кардиопротекторной активностью, в ряду производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов. Для поиска соединений, обладающих кардиопротекторной активностью, были использованы экспериментальные исследования и методы компьютерной обработки информации.

Методы экспериментального изучения фармакологической активности. В настоящем исследовании использовали 540 химических структур различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (N¹-бензимидазолы; 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы; N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N¹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолы; 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы, N¹,N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы), синтезированные к.х.н. В.А. Анисимовой, к.х.н. О.Н. Жуковской, к.х.н. Т.А. Кузьменко¹ (лаборатория органического синтеза НИИ физической и органической химии, Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону).

¹ выражаем благодарность и глубокую признательность к.х.н. В.А. Анисимовой, к.х.н. О.Н. Жуковской, к.х.н. Т.А. Кузьменко за предоставленные субстанции.

Исследования проводили на 504 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г, 15 кроликах-самцах массой 2,5-3,5 кг, содержащихся в условиях вивария (температура 22-24°C) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92) [1993]. Все животные были доставлены из питомников: ООО «Питомник РАМН» (г.Москва), ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово). Исследование проводили в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правилами лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Эксперименты выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [2012]. Все исследования были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года).

Экспериментальный поиск соединений, влияющих на **рефрактерность миокарда (увеличивающих продолжительность рефрактерного периода)**, проводили на изолированных предсердиях крыс и оценивали по усвоению навязанного ритма [Зайдлер, 1967] (изотонический датчик, установка для работы на изолированных органах *Ugo Basile*, Италия), в диапазоне концентрации (10^{-5} - 10^{-3} М). В качестве препарата сравнения использовали антиаритмический препарат амиодарон (5% раствор для инъекций (KRKA, Словения)).

Влияние на **трансмембранные ионные токи** было изучено в лаборатории биовозбудимых мембран НИИ по БИХС (Россия, Купавна) и под руководством д.б.н. В.И. Пороतिकова на изолированных трабекулах предсердий лягушки *Rana Ridibunda* с фиксацией тока и напряжения в системе с двойным сахарозным мостиком в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Поиск веществ, обладающих **блокирующей активностью в отношении NHE обменника**, проводили на тромбоцитах кролика [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002] в диапазоне концентраций 1×10^{-10} - 1×10^{-6} М (лазерный агрегометр «БИОЛА-220 ЛА», Россия). В качестве препарата сравнения использовали селективный ингибитор NHE-1 - зонипорид (SIGMA, США).

Изучение **противоишемических свойств ингибитора NHE соединения PY-1355** и зонипорида проводили на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60 минутной реперфузией у крыс [Чичканов, 2012]. Эффект соединений оценивали по подъему сегмента ST (электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» «Нейрософт», Россия), размеру зоны некроза (методом двойного окрашивания синим Эвансом и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом) и уровню тропонина I (набором реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (cTn-I) фирмы CUSABIO BIOTECH CO., LTD. (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 (Bio-Tek Instruments, Inc, США)).

Влияние соединений на фосфодиэстеразу сердца было изучено *in vitro* по методу Kincaid [1981] в лаборатории метаболизма сердца НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН д. м. н. Н. П. Ларионовым, к. м. н. И. А. Феоктистовым, Е.Б. Червяковым.

Исследование влияния соединений на **сократительную активность** проводили на изолированных предсердиях крыс (изометрический датчик, установка для изолированных органов (UGO BASILE, (Италия)) в диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-5} М. В качестве препарата сравнения был использован негликозидный кардиотонический препарат ингибитор ФДЭ - амринон (SIGMA, США).

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

Методы компьютерной обработкой информации. Теоретическое обоснование перспективности изучения кардиопротекторных свойств различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов для поиска высокоактивных веществ проводили в программах PASS Professional Extended 2010 (версия SAR-базы 2012 г.)^{*}, разработанной в НИИ БМХ РАМН (Москва) [Филимонов, 2006] и ИТ «Микрокосм» (ВолГМУ, версия 5.2, 2012 г.) [Васильев, 2005, 2009, 2011, 2012] с использованием баз данных по структуре известных лекарственных и биологически активных веществ. **Кластерный анализ** проводился вероятностным методом гисторамм и геометрическим методом расстояний [Мандель, 1988]. Для выявления QSAR-закономерностей между биологической активностью и химической структурой производных бензимидазола были использованы: **метод подструктурного анализа** [Васильев, 2011], основанный на статистическом подходе в теории распознавания образов [Горелик, 1984]; методы **медианных и супремальных**, а также **средних ранговых оценок** уровня активности. Расчеты проводили в программе Excel 2007 (MS Office XP, США), с использованием дополнительного пакета анализа данных. Построение потенциальных 2D-фармакофоров проводили с помощью модуля FarmFor (версия 2006 г.) ИТ «Микрокосм» 5.2 (версия 2012) по матрице QL-дескрипторов, содержащей информацию о числе дескрипторов различного вида и типа в структуре каждого активного или неактивного соединения [Спасов, 2007; Васильев, 2013]. При анализе химических структур и конструировании скаффолдов использовались стандартные средства обработки химической информации (ChemDraw StandAlone 2004).

В настоящей главе на **первом этапе** был проведен консенсусный **прогноз *in silico* перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов**

^{*} Программа PASS Professional Extended 2010 любезно предоставлена заведующим лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств ГУ НИИ БМХ РАМН им. В. Н. Ореховича, д. б. н., к. ф.-м. н., проф. В. В. Поройковым и главным научным сотрудником этой же лаборатории, к. ф.-м. н. Д. А. Филимоновым.

как источников веществ с кардиопротекторной активностью в системах PASS для 19 видов биологической активности, релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию и с помощью ИТ Микрокосм по сходству к референсным препаратам на основе модифицированного коэффициента Танимото (рис. 1). При сравнении интегральных показателей перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на наличие кардиопротекторной активности показано, что для ряда в 1393 соединений в PASS наиболее характерны кардиотоническая > антиаритмическая > противоишемическая, в ИТ Микрокосм - антиаритмическая > ФДЭ-3-ингибирующая \geq NHE-1-ингибирующая активности, а класс производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов является перспективным для проведения экспериментального поиска кардиопротекторов.

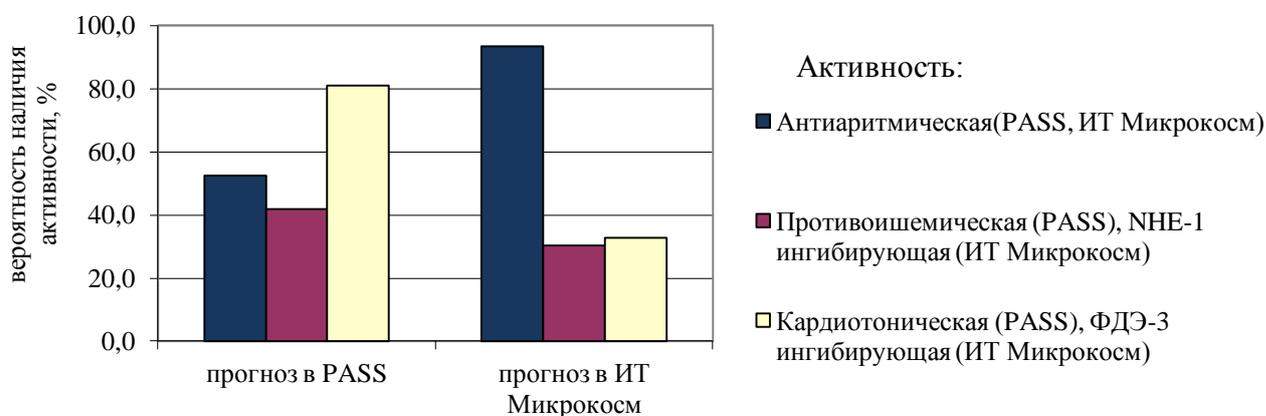


Рис. 1. Консенсусный прогноз перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов как источников веществ с кардиопротекторной активностью.

Для проверки данного предположения на втором этапе в исследованиях *in silico* и *in vitro* был проведен направленный поиск среди производных бензимидазола соединений с антиаритмической, противоишемической и инотропной активностями.

При проведении поиска соединений, обладающих способностью влиять на рефрактерность изолированных предсердий крыс (антиаритмическая активность), выполнены ретроспективный анализ активных и неактивных структур, экспериментальная проверка компьютерного прогноза, расширенный комплексный анализ *in silico*, выявлены определенные закономерности влияния типа базовой структуры (ядра), различных заместителей и их положения на высокий уровень активности, построены целевые скаффолды.

В данном исследовании были изучены соединения 10 классов производных бензимидазола (N^1 -бензимидазолы; 2,3-дигидро- N^1 -бензимидазолы; N^9 -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы; N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы; N^1 -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы; N^1 -2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы; N^4 -пиразоло[1,5-*a*]-бензимидазолы; пиролло-[1,2-*a*]-бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]-бензимидазолы, N^1, N^9 -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы).

При проведении ретроспективного анализа влияния типа базовой структуры на рефрактерность миокарда (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) предсердий крыс 301 ранее изученного соединения [Спасов, 1984; Грецкая, 1987; Чернов, 1990] методом кластерного анализа были определены границы классов активности («высокоактивные» – $MЭК < 7,25 \cdot 10^{-5} M$; умеренноактивные – $7,25 \cdot 10^{-5} \leq MЭК < 2,79 \cdot 10^{-4} M$; низкоактивные – $MЭК \geq 2,79 \cdot 10^{-4} M$) и выявлены химические классы, представляющие наибольший интерес для дальнейшего изучения (производные N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N⁴-пиразоло[1,5-а]-бензимидазола, N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола и N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола).

С использованием данных по структуре и активности испытанных оригинальных производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов был проведен виртуальный скрининг с помощью ИТ «Микрокосм» неиспытанных соединений перспективных классов и классов, эффективность которых требовала уточнения [Васильев, 2009] и выполнен блок собственных исследований - экспериментальный поиск *in vitro* соединений, влияющих на рефрактерность (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) изолированных предсердий крыс среди 167 неиспытанных соединений. По результатам экспериментального скрининга повторно проведен кластерный анализ и определены новые границы классов («очень высокоактивные» – $MЭК < 3,74 \cdot 10^{-5} M$; «высокоактивные» – $3,74 \cdot 10^{-5} < MЭК < 1,04 \cdot 10^{-4} M$; «прочие»: $MЭК > 1,04 \cdot 10^{-4} M$), то есть выявлен принципиально новый класс активности: «очень высокий». Проведен расширенный подструктурный анализ влияния типа базовой структуры на уровни антиаритмической активности (рис. 2).

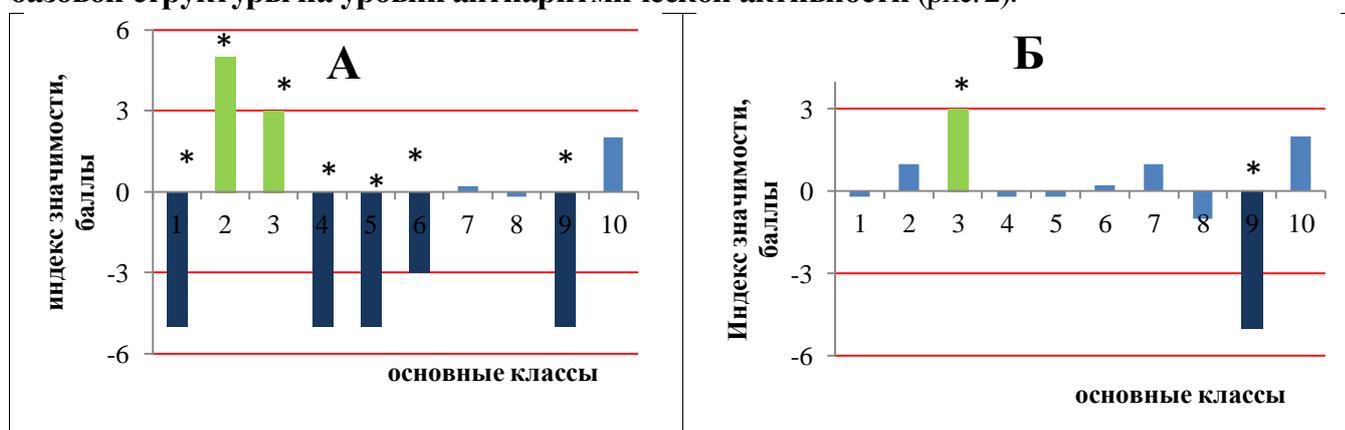


Рис. 2. Влияние типа базовой структуры (ядра) на «очень высокий»¹ (А) и «высокий»² (Б) уровни антиаритмической активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (расширенный анализ). Примечание: нумерация столбцов: 1 - N¹-бензимидазолы (n=73); 2 - N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (n=220); 3 - N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (n=38); 4 - N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (n=14); 5 - 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы (n=29); 6 - N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (n=23); 7 - пиримидо[1,2-а]бензимидазолы (n=18); 8 - N¹,N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (n=2); 9 - пирроло[1,2-а]бензимидазолы (n=27); 10 - N⁴-пиразоло[1,5-а]бензимидазолы (n=24). Индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).

¹ $MЭК < 3,74 \cdot 10^{-5} M$

² $3,74 \cdot 10^{-5} < MЭК < 1,04 \cdot 10^{-4} M$

Путем обобщения результатов *in silico* расширенного подструктурного анализа влияния типа ядра на «очень высокий» и «высокий» уровни активности (рис. 2), а также результатов анализа по средним и супремальным оценкам (рис. 3), были выявлены некоторые важные закономерности. В первую очередь, было показано, что перспективным базовым ядром для создания целевого скаффолда соединений с антиаритмической активностью, является структура бензимидазола, модифицированная путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей. Среди различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых антиаритмических соединений с антифибрилляторной активностью, поскольку для них характерно проявление «очень высокой» способности влиять на рефрактерность изолированных предсердий.

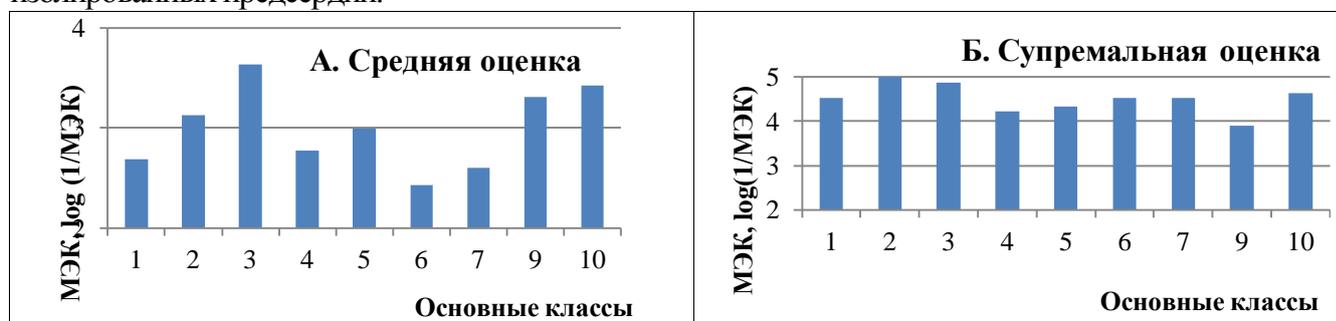


Рис. 3. Оценка перспективности базовой структуры производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием средних и супремальных оценок уровня антиаритмической активности. Примечание: нумерация столбцов: 1 - N¹-бензимидазолы; 2 - N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 3 - N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 4 - N¹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 5 - 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолы; 6 - N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 7 - пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы; 9 - пирроло[1,2-*a*]бензимидазолы; 10 - N⁴-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы.

Они могут быть отнесены к принципиально новому классу ($MЭК < 3,74 \cdot 10^{-5}$ М) антиаритмических соединений, поскольку по результатам кластеризации по активности в данный класс не попадают такие известные антиаритмические препараты, изученные на этой модели, как амиодарон, этмозин (морицизин), хинидина сульфат. Обращает на себя внимание тот факт, что для базового ядра N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола характерно проявление преимущественно «очень высокой» активности. Тогда как базовая структура N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности с высокой лабильностью химической структуры, поскольку этот признак устойчиво воспроизводится как для уровня активности «очень высокий», так и для уровня «высокий». Производные N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются перспективными как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на модификацию базовой структуры (заместители и их положение). По совокупности статистических характеристик базовая структура N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола превосходит ядро N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола.

У производных N⁴-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола, проявивших в ретроспективном

анализе достоверно высокую активность, по общей совокупности результатов снизилась значимость ($p > 0,05$) базового ядра на уровень "очень высокой" способности влиять на возбудимость изолированных предсердий, что, вероятно, свидетельствует о существенной роли заместителей. Достоверно показано что, для производных классов N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, N¹-бензимидазолов, пирроло[1,2-*a*]бензимидазолов, 2,3-дигидро-N¹-бензимидазолов, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов не характерна способность влиять на рефрактерность изолированных предсердий.

В результате расширенного подструктурного анализа влияния заместителей на «очень высокий» уровень антиаритмической активности удалось выявить заместители, значимо детерминирующие в рядах N¹- и N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов влияние на рефрактерность изолированных предсердий. Общими для них являются в положении C² (R₂) - фенил - (Ind=+5 и +4, соответственно) и соответственно в положениях или N¹ или N⁹ (R₃) - диэтиламиноэтил - (Ind=+5 у обоих классов). Поскольку ядро N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности, а также обладает высокой лабильностью химической структуры (признак устойчиво воспроизводится как для уровня «очень высокий», так и «высокий»), на его основе построен целевой скаффолд¹ соединений с высокой способностью увеличивать рефрактерность изолированных предсердий (рис. 14).

Среди производных N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола было найдено соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол - амфедазол, которое максимально соответствует как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам «обобщенному образу» активного антиаритмического соединения. Оно полностью включает целевой скаффолд (рис. 14). Амфедазол в исследованиях *in vitro* уменьшает возбудимость изолированных предсердий, что является косвенным показателем удлинения эффективного рефрактерного периода миокарда (МЭК=1,60x10⁻⁵М). Соединение превосходит амиодарон по величине МЭК в 10 раз, по условному терапевтическому индексу – в 2,2 раза (табл. 1).

Таблица 1

Влияние амфедазола на возбудимость изолированных предсердий крыс (МЭК), острая токсичность (LD₅₀, внутривенно, мг/кг) и условный терапевтический индекс исследуемых веществ (УТИ)

| № | Препарат | МЭК, М/л | МЭД, мг/кг | LD ₅₀ , мг/кг | УТИ (LD ₅₀ /МЭД) |
|----|-----------|----------------------|------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1. | Амфедазол | 1,6*10 ⁻⁵ | 6,5 | 17,0 | 2,6 |
| 2. | Амиодарон | 1,7*10 ⁻⁴ | 115,9 | 135,5* | 1,2 |

* - по данным Beckers (1987)

При изучении влияния на трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки амфедазол показал сложное мембранотропное действие. Выявлено выраженное дозозависимое

¹ Скаффолд (медицинская химия) – базовая молекула (ядро, «кор» - *англ.*), модифицированная некоторыми структурными фрагментами (например, заместителями), присутствие которых может определять наличие или высокий уровень заданного вида биологической активности.

блокирующее влияние на выходящие токи калия. Так при введении амфедазола в дозе $1 \cdot 10^{-6}$ М калиевый ток уменьшился на 39%, а уже в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ М был заблокирован на 60%. В отношении быстрого Na^+ и медленного Ca^{2+} ионных токов дозозависимого блокирующего эффекта не наблюдалось.

Таким образом, было показано, что амфедазол увеличивает продолжительность рефрактерного периода изолированных предсердий крыс, обладает сложным мембранотропным амиодароноподобным эффектом в исследованиях по влиянию на трансмембранные ионные токи, что дает возможность предположить наличие у него свойств антиаритмиков III класса, в том числе антиремоделирующего действия.

При поиске противоишемических соединений с NHE-1-ингибирующей активностью также проведены собственные экспериментальные исследования *in vitro* и комплексный анализ зависимости структура-активность *in silico*, найдены определенные закономерности влияния типа ядра, различных заместителей и их положения на высокий уровень активности, построен целевой скаффолд. В исследованиях *in vitro* на тромбоцитах кролика проведен поиск веществ с NHE-1-ингибирующей активностью среди 59 соединений различных классов производных бензимидазола (аминобензимидазолы; N⁹-имидазо-[1,2-*a*]бензимидазолы; N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы; N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы) в сравнении с ингибитором NHE-1 зонипоридом. Методом кластерного анализа определены границы классов NHE-1-ингибирующей активности *in vitro* среди изученных веществ для каждой из исследуемых доз ($1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$ М) и для IC₅₀, рассчитан средний балл активности. 34 соединения по среднему баллу превосходили зонипорид (табл. 2). При проведении подструктурного анализа влияния типа ядра на «высокий» уровень NHE-1-ингибирующей активности, а также анализа по средним и супремальным оценкам были выявлены следующие закономерности (рис. 4).

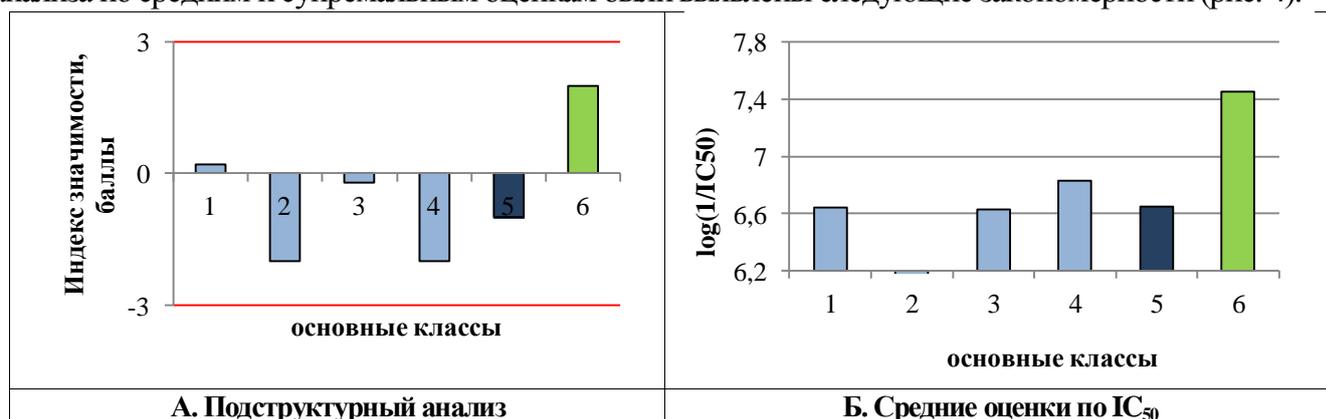


Рис. 4. Влияние типа базовой структуры на высокий уровень NHE-1-ингибирующей активности. Примечание: нумерация столбцов соответствует нумерации химических классов. Обозначения классов: 1 - N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 2 - N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 3 - N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 4 - N¹-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 5 - все имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 6 - N¹-замещенные 2-аминобензимидазолы.

Наиболее перспективным как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на ее модификацию оказалась базовая структура 2-аминобензимидазола. В результате

подструктурного анализа влияния заместителей был выявлен значимый заместитель в положении N¹: морфолиноэтильный. Построен целевой скаффолд соединений с высокой NHE-ингибирующей активностью (рис. 14).

Таблица 2

Распределение производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, обладающих NHE-1-ингибирующей активностью, по классам активности с учетом результатов кластерного анализа

| № | шифр | Активность в дозах (баллы) | | | | | № | шифр | Активность в дозах (баллы) | | | | |
|----|---------|----------------------------|----------------------|----------------------|--|------------|----|-----------|----------------------------|----------------------|----------------------|--|------------|
| | | 1x10 ⁻⁸ М | 1x10 ⁻⁷ М | 1x10 ⁻⁶ М | IC ₅₀ log(1/IC ₅₀) | Средний | | | 1x10 ⁻⁸ М | 1x10 ⁻⁷ М | 1x10 ⁻⁶ М | IC ₅₀ log(1/IC ₅₀) | Средний |
| 1 | РУ-1200 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3,0 | 18 | РУ-1364 | 1 | 3 | - | 2 | 2,0 |
| 2 | РУ-1390 | 3 | 3 | - | 3 | 3,0 | 19 | РУ-1370 | 1 | 3 | - | 2 | 2,0 |
| 3 | РУ-273 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2,8 | 20 | РУ-1184 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0 |
| 4 | РУ-295 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2,8 | 21 | РУ-504 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2,0 |
| 5 | РУ-1199 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2,8 | 22 | РУ-285 | - | 2 | 3 | 1 | 2,0 |
| 6 | РУ-1355 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2,8 | 23 | РУ-66 | - | 2 | 3 | 1 | 2,0 |
| 7 | РУ-1369 | 3 | 2 | - | 3 | 2,7 | 24 | РУ-36 | - | 2 | 2 | - | 2,0 |
| 8 | РУ-13 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,5 | 25 | РУ-376 | - | 2 | - | - | 2,0 |
| 9 | РУ-67 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,5 | 26 | РУ-354 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 10 | РУ-284 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,5 | 27 | РУ-355 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 11 | РУ-720 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,5 | 28 | РУ-505 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 12 | РУ-1190 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,5 | 29 | РУ-574 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 13 | РУ-1183 | 2 | - | 3 | 2 | 2,3 | 30 | РУ-122 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 14 | РУ-474 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2,3 | 31 | РУ-1191 | - | - | 2 | - | 2,0 |
| 15 | РУ-602 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2,3 | 32 | РУ-17 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1,8 |
| 16 | РУ-1356 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2,3 | 33 | РУ-293 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1,8 |
| 17 | РУ-1365 | 2 | 3 | - | 1 | 2,0 | 34 | Зонипорид | 2 | 2 | - | 1 | 1,7 |

Примечание: Класс активности (баллы): 3 – высокий; 2 – умеренный; 1 – низкий; "-" - не изучалось. Границы классов NHE-1 ингибирующей активности. В концентрации 1*10⁻⁸ М: высокоактивные Δ(10⁻⁸)>54,0%; умеренно активные 54,0%≥Δ(10⁻⁸)>42,0%; низкоактивные Δ(10⁻⁸)<42,0%. В концентрации 1*10⁻⁷ М: высокоактивные Δ(10⁻⁷)>55,0%; умеренно активные 55,0%≥Δ(10⁻⁷)>30,0%; низкоактивные Δ(10⁻⁷)<30,0%. В концентрации 1*10⁻⁶ М: высокоактивные Δ(10⁻⁶)>63,0%; умеренно активные 63,0%≥Δ(10⁻⁶)>41,0%; низкоактивные Δ(10⁻⁶)<41,0%. В дозе IC₅₀: высокоактивные IC₅₀>6,54*10⁻⁹ М; умеренно активные 6,54*10⁻⁹ М ≤ IC₅₀ <5,94*10⁻⁸ М; низкоактивные IC₅₀≥5,94*10⁻⁸ М.

По результатам поиска *in vitro* и *in silico* найдено соединение 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид - под лабораторным шифром РУ-1355, которое относится к наиболее перспективному классу N¹-замещенных 2-аминобензимидазола, полностью включает целевой скаффолд. Оно активно ингибировало NHE-1 тромбоцитов кролика и по IC₅₀ превосходило препарат сравнения зонипорид (табл. 3).

Активация сарколемного NHE-1 кардиомиоцитов является одним из повреждающих факторов в период ишемии и реперфузии [Зверев, 2003; Спасов, 2013в; Masereel, 2003; Malo, 2006; Luo1, 2007; Fliegel, 2009]. Во время ишемии/реперфузии развивается «Ca²⁺-перегрузка», что

приводит к ухудшению функции проводящей системы и сократительного миокарда, ремоделированию желудочков, активации апоптоза, гибели клеток. Поэтому для подтверждения действия *in vivo* был проведен комплексный анализ противоишемических свойств соединения РУ-1355. На модели длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг (эквивмолярной зонипориду) уменьшало тяжесть ишемического повреждения миокарда, о чем свидетельствует статистически значимое снижение подъема сегмента ST на 32% по отношению к контролю и 43,3% по отношению к ишемии 50 минут (табл. 4).

Таблица 3

Влияние соединения РУ-1355 на активность NHE-1 в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (IC₅₀), острая токсичность (LD₅₀, внутрибрюшинно, мг/кг)

| № | Вещество | IC ₅₀ M | LD ₅₀ , мг/кг |
|----|--------------------|------------------------|--------------------------|
| 1. | Соединение РУ-1355 | 5,42x10 ⁻¹⁰ | 342,7 |
| 2. | Зонипорид | 2,70x10 ⁻⁸ | 250* |

* - Tracey, 2003.

Таблица 4

Влияние соединения РУ-1355 на динамику подъема сегмента ST на этапах 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии (в мВ, M±m)

| № | Вещество | n | Исход | Ишемия, 50 минут ¹ | Реперфузии | |
|----|--------------------------------|----|-----------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| | | | | | 5 минут | 60 минут |
| 1. | Ложно-оперированные | 6 | 0,10±0,03 | 0,11±0,03 | 0,12±0,03 | 0,12±0,09 |
| 2. | Ишемия/реперфузия | 12 | 0,08±0,03 | 0,68±0,08* | 0,52±0,05* | 0,50±0,03* ^{\$} |
| 3. | Зонипорид, 1 мг/кг | 14 | 0,10±0,03 | 0,66±0,07* | 0,48±0,06* ^{\$} | 0,36±0,05* [#] ^{\$} |
| 4. | Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг | 12 | 0,12±0,04 | 0,60±0,08* | 0,62±0,09* | 0,34±0,04* [#] ^{\$} |

Примечания: ¹ - время введения вещества. Различия статистически значимы по сравнению с: * - исходом, \$ - с ишемией 50 минут в своей группе (парный тест Вилкоксона, p<0,05); # - к группе "ишемия/реперфузия" (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

Наблюдалось достоверное сокращение зоны инфаркта в группе животных, получавших соединение РУ-1355, по сравнению с показателями контрольной группы животных с ишемией в 1,8 раза и зонипоридом в 1,3 раза (рис. 5; табл. 5). Изучаемое вещество ограничивало рост тропонина I в плазме крови. Его уровень оказался ниже в 2,5 раза контрольных животных (p<0,05) и на 19% зонипорида (табл. 5).

Таким образом, соединение РУ-1355 является ингибитором NHE-1, способно ограничивать ишемические и постреперфузионные повреждения сердца, вероятно, предотвращая избыточное поступление кальция внутрь кардиомиоцитов. Оно максимально соответствует, как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам *in vitro* и *in vivo* «обобщенному образу» активного противоишемического соединения – ингибитора NHE-1.

Влияние соединения РУ-1355 на основные показатели кардиопротекторного действия на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии (M±m)

| № | Группа | n | Зона риска (% от левого желудочка) | Зона некроза (% к зоне риска) | Уровень тропонина I (пкг/мл) |
|----|--------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1. | Ложнооперированные | 6 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 136,65±38,03 |
| 2. | Ишемия/реперфузия | 6 | 53,20±4,99 [#] | 44,36±3,79 [#] | 528,32±81,32 [#] |
| 3. | Зонипорид, 1 мг/кг | 7 | 47,25±3,82 [#] | 31,18±2,98 ^{*#} | 252,76±72,05 ^{*#} |
| 4. | Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг | 7 | 46,33±3,20 [#] | 24,10±1,47 ^{*\$#} | 211,88±60,14 ^{*#} |

Примечания: Различия статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна, $p < 0,05$) по сравнению с: * - контролем патологии, [#] - ложнооперированными, ^{\$} - зонипоридом.

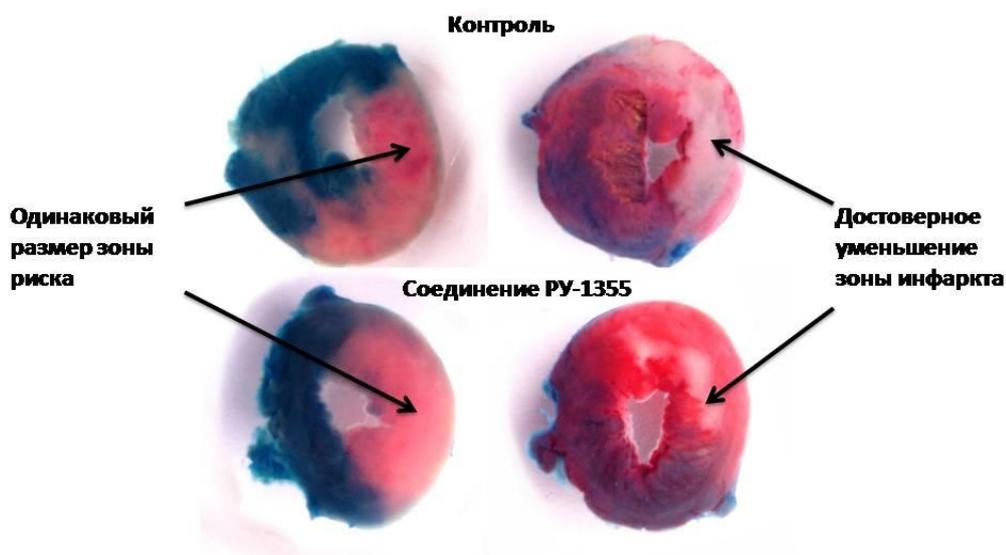


Рис. 5. Влияние соединения РУ-1355 на зоны риска и инфаркта миокарда на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении в дозе, эквивалентной зонипориду, (1,12 мг/кг) за 10 минут до реперфузии. Примечание: метод двойного окрашивания синим Эвансом и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом: темносиние участки - зона здорового миокарда, розовая - зона риска, белые участки - зоны некроза.

В дальнейшем был проведен поиск инотропных соединений с кардиопротекторными свойствами среди ингибиторов ФДЭ. В исследованиях *in vitro* было определено влияние 60 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на наличие антифосфодиэстеразной активности (в присутствии кальмодулина и без него) [Анисимова, 2002, 2005, 2006]. Для соединений с высокой антифосфодиэстеразной активностью были проведены уточняющие исследования влияния на сократительную активность изолированных предсердий

крыс (табл. 6). Полученные данные по трем показателям были переведены в ранговую форму. Оценку активности соединений рассчитывали как средний ранг (табл. 6). Соединение 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия бромид - под лабораторным шифром РУ-539 значительно превосходит по средней ранговой оценке (6,7) остальные изученные соединения (>14,3).

Таблица 6

Сравнительный анализ антифосфодиэстеразной активности и влияния на сократительную активность изолированных предсердий производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов методом средних ранговых оценок¹

| № | Вещество | Влияние на активность ФДЭ миокарда (ингибирование) | | | | Влияние на сократительную активность изолированных предсердий IC ₅₀ | | Ранговая оценка, средняя величина |
|-----|----------|--|--------------------|----------------------------|--------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| | | Без кальмодулина | | В присутствии кальмодулина | | М | Ранг ¹⁾ | |
| | | % | Ранг ¹⁾ | % | Ранг ²⁾ | | | |
| 1. | РУ-539 | -66,67 | 11 | -7,78 | 4 | 4,20x10 ⁻⁷ | 5 | 6,7 |
| 2. | РУ-284 | -66,67 | 11 | -47,07 | 25 | 1,00x10 ⁻⁶ | 7 | 14,3 |
| 3. | РУ-458 | -89,48 | 2 | -60,80 | 40 | 1,00x10 ⁻⁶ | 7 | 16,3 |
| 4. | РУС-94 | -54,55 | 21 | -21,24 | 14 | 1,83x10 ⁻⁵ | 15 | 16,7 |
| 5. | РУ-534 | -56,00 | 19 | -49,21 | 26 | 7,00x10 ⁻⁷ | 6 | 17,0 |
| 6. | РУ-467 | -56,00 | 19 | -55,56 | 31 | 1,00x10 ⁻⁶ | 7 | 19,0 |
| 7. | РУ-451 | -96,00 | 1 | -84,93 | 57 | 3,00x10 ⁻⁷ | 1 | 19,7 |
| 8. | РУС-98 | -81,82 | 5 | -64,71 | 44 | 1,70x10 ⁻⁶ | 11 | 20,0 |
| 9. | РУ-503 | -80,00 | 6 | -78,58 | 53 | 3,70x10 ⁻⁷ | 3 | 20,7 |
| 10. | РУ-616 | -54,29 | 22 | -52,77 | 27 | 3,70x10 ⁻⁶ | 13 | 20,7 |
| 11. | РУ-541 | -64,00 | 13 | -60,00 | 38 | 6,60x10 ⁻⁶ | 14 | 21,7 |
| 12. | РУ-597 | -71,43 | 9 | -80,91 | 55 | 3,50x10 ⁻⁷ | 2 | 22,0 |
| 13. | РУ-576 | -48,57 | 23 | -55,78 | 32 | 1,90x10 ⁻⁶ | 12 | 22,3 |
| 14. | РУ-619 | -60,00 | 16 | -62,82 | 42 | 1,10x10 ⁻⁶ | 10 | 22,7 |
| 15. | РУ-502 | -76,00 | 7 | -85,72 | 59 | 3,90x10 ⁻⁷ | 4 | 23,3 |
| 16. | РУС-38 | -58,33 | 18 | -69,03 | 46 | 2,00x10 ⁻⁵ | 16 | 26,7 |

Примечание. ¹⁾ - Ранжирование по возрастанию активности; ²⁾ - Ранжирование по убыванию активности.

В исследованиях *in vitro* на гомогенате сердца кролика соединение РУ-539 в концентрации 1·10⁻⁴М снижало активность ФДЭ на 66,7%. В диапазоне концентраций 1x10⁻⁷-1x10⁻⁵М оказывало дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения изолированных предсердий крыс. По влиянию на сократительную активность соединения РУ-539 оказалось эффективнее амринона и превосходило его как по величине IC₅₀ (4,2x10⁻⁷М) - в 6 раз, так и по терапевтическому индексу – в 1,8 раза (табл. 7). Структура соединения РУ-539 позиционирована как скаффолд для последующего конструирования новых высокоактивных инотропных веществ (рис. 14).

¹ представлены данные для соединений, изученных на все указанные виды активности.

Влияние соединения РУ-539 и амринона на сократительную активность изолированных предсердий, острая токсичность (LD₅₀, внутривенно, мг/кг) и условный терапевтический индекс (УТИ)

| № | Препарат | IC ₅₀ , М | LD ₅₀ , мг/кг | УТИ (LD ₅₀ /IC ₅₀) |
|----|-------------------|----------------------|--------------------------|---|
| 1. | Соединение РУ-539 | 4,2×10 ⁻⁷ | 118 | 561,46 |
| 2. | Амринон | 2,5×10 ⁻⁶ | 150* | 320,51 |

* - по данным Trends in Pharmacological Sciences. [Vol. 1, Pg. 143, 1980.]

На *третьем этапе* были выявлены некоторые общие закономерности между химическим строением производных бензимидазола и кардиопротекторной активностью в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической). В исследованиях при сопоставлении всех трех полученных скаффолдов между собой действительно удалось построить интегральный системный скаффолд, детерминирующий высокий уровень кардиопротекторной активности, применительно к антиаритмической, NHE-1-ингибирующей и кардиотонической активностям (рис. 14).

Общая базовая структура представлен структурой бензимидазола, модифицированного либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей. Данный скаффолд может отражать взаимоотношение трех видов активности между собой, опосредованных общей химической структурой. То есть отражать не оптимальное влияние структуры химических соединений на уровень конкретной фармакологической активности, а сцепленности этих видов активности между собой посредством общей химической структуры, характерной для высокоактивных соединений. Он может быть использован для поиска новых кардиотропных веществ, обладающих высокой кардиопротекторной активностью, и сбалансированных по трем изучаемым видам действия.

При сравнительной оценке влияния на смежные виды изучаемых активностей (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода, NHE-1-ингибирующей, инотропной) *in vitro* было показано, что найденные соединения-лидеры проявляют умеренновыраженные эффекты других классов кардиопротекторных соединений. Наличие данных видов активности может быть связано с общностью химического строения и наличия структурных компонентов, ответственных за высокий уровень кардиотропного эффекта в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической).

В дальнейшем с целью выявления фрагментов скаффолда, ответственных за возможное фармакофорное взаимодействие с биомишенью, был проведен фармакофорный¹ анализ соединений

¹ 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.

с высокими антиаритмическим, NHE-1-ингибирующим и антифосфодиэстеразным уровнями активностей (порог значимости $p < 0,05$). Были выявлены потенциальные 2D-фармакофоры¹ соединений, обладающих высокими уровнями активности, релевантных кардиопротекторной (соединений, увеличивающих рефрактерность изолированных предсердий крыс, с NHE-1-ингибирующей и антифосфодиэстеразной активностью), которые являются фрагментами интегрального скаффолда и могут быть ответственными за взаимодействие с биомолекулами. Можно предположить, что интегральный скаффолд есть суперпозиция возможных фармакофорных фрагментов исследованных соединений по трем различным видам активностей, релевантных кардиопротекторной.

Поскольку понятие кардиопротекции связано с профилактикой отдаленных последствий ССЗ, позволяющей улучшить прогноз заболевания, в дальнейшем **было проведено углубленное изучение кардиопротекторных свойств соединений РУ-1355, амфедазола, РУ-539.**

В третьей главе были изучены антиремоделлирующие (замедление ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования) свойства соединения РУ-1355 с NHE-ингибирующей активностью в условиях экспериментальной ишемии и сердечной недостаточности.

Исследования проводили на белых неинбредных крысах: 96 самцах массой 280–450 г и 50 самках массой 220–300 г. Влияние соединения РУ-1355 **на развитие и тяжесть экспериментальных нарушений ритма** ишемического генеза изучали на моделях длительной и кратковременной ишемии [Галенко-Ярошевский, 2012]. *Длительную ишемию миокарда* моделировали у крыс-самок в течение 60-ти минут с последующей 60-тиминутной реперфузией. Тяжесть аритмий оценивали с помощью балльной системы [Цорин, 2004]. Антифибрилляторный эффект *при кратковременной 7 минутной ишемии миокарда* с последующей 5-ти минутной реперфузией изучали у крыс-самцов. Наличие эффекта оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов - отсутствие, 1 – наличие лечебного действия. Изучение влияния соединения на **порог электрических фибрилляций** желудочков проводили на крысах-самцах [Крыжановский, 2010]. “Эктопический очаг” возбуждения создавали электрической стимуляцией электростимулятором HSE Stimulator II (Hugo Sach Elektronik, Германия). Кроме того, определяли время до восстановления нормального ритма. Изучение влияния соединений **на основные параметры электрокардиограммы** (ЭКГ) проводили у интактных крыс-самок. Оценивали продолжительность P, PQ, QRS, QT, QT_c, RR в секундах, высоту R в мВ, ЧСС уд/мин. **Модель хронической изопротереноловой интоксикации формировали** по методам, описанным [Ennis, 2003; Shibata, 2011], у крыс внутрибрюшинным введением L-изопротеренола (Sigma-Aldrich, США) по 2,5 мг/кг 2 раз в сутки в течение 4 недель. Эффект соединений оценивали по изменению функциональных резервов сердца (с использованием нагрузочных проб) [Меерсон, 1984; Тюренков, 2012]

¹ 2D-фармакофор представляет собой фрагмент структурной формулы, общий для активных соединений, который содержит несколько фармакофорных групп, соединенных между собой цепочками связей различной длины.

электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт.ст.) с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Москва, Россия); уровню тропонина I (метод определения описан выше) и малонового альдегида (в тканях сердца в тесте с тиобарбитуровой кислотой [Андреева, 1988] на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония)), объемной плотности соединительной ткани и образованию коллагеновых волокон¹ (окраска: 1) гематоксилином и эозином, 2) по Массону; степень выраженности очагов соединительной ткани оценивали в баллах от 0 до 5; препараты документировали цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США) с помощью теста Колмогорова-Смирнова, параметрического однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с посттестом Данна, непараметрических парного теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уоллиса, метода Фридмана с посттестом Данна.

В условиях ишемии нарушается гомогенность миокарда и развивается ионное и электрофизиологическое ремоделирование. Поэтому представляло интерес изучить антиаритмические и антифибрилляторные свойства ингибиторов NHE-1 - соединения РУ-1355 и зонипорида. Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг, введенное за 10 минут до реперфузии, статистически достоверно в 1,5 раза снижало выраженность постреперфузионных нарушений ритма после длительной 60-ти минутной ишемии, подобно зонипориду (рис. 6А).

Соединение РУ-1355, введенное за 5 минут до 7-ми минутной ишемии, предотвращало развитие фибрилляции желудочков (рис. 6Б). ЕД₅₀ составила 1,25 мг/кг.

Вещество увеличивало порог электрических фибрилляций желудочков по отношению к исходным данным на 110,4% и на 90,6% по отношению к контрольным исследованиям (рис. 6В). Оно статистически достоверно сокращало время до восстановления ритма как по отношению к исходным, так и контрольным величинам на 42,8 и 33,3% соответственно. При этом соединение РУ-1355 превосходило зонипорид по способности увеличивать порог электрических фибрилляций на 20%, по возможности сокращать время до восстановления нормального ритма - на 6% (p>0,05).

Поскольку NHE является электронейтральной системой, ее ингибирование непосредственно не затрагивает сердечную электрическую деятельность. Анализ влияния соединений на ЭКГ позволяет косвенно исключить воздействие ингибитора натрий-водородного обменника на потенциалзависимые каналы проводящей системы. Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (ЕД₅₀ на модели кратковременной ишемии/реперфузии) не влияло на параметры ЭКГ наркотизированных крыс при однократном введении.

В условиях хронической изопротереноловой интоксикации миокарда выделяются прогипертрофические факторы, стимулирующие в том числе активность NHE-1 [Karmazyn, 2008].

¹ - Выражаем благодарность и глубокую признательность зав. кафедрой патологической анатомии ВолГМУ, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

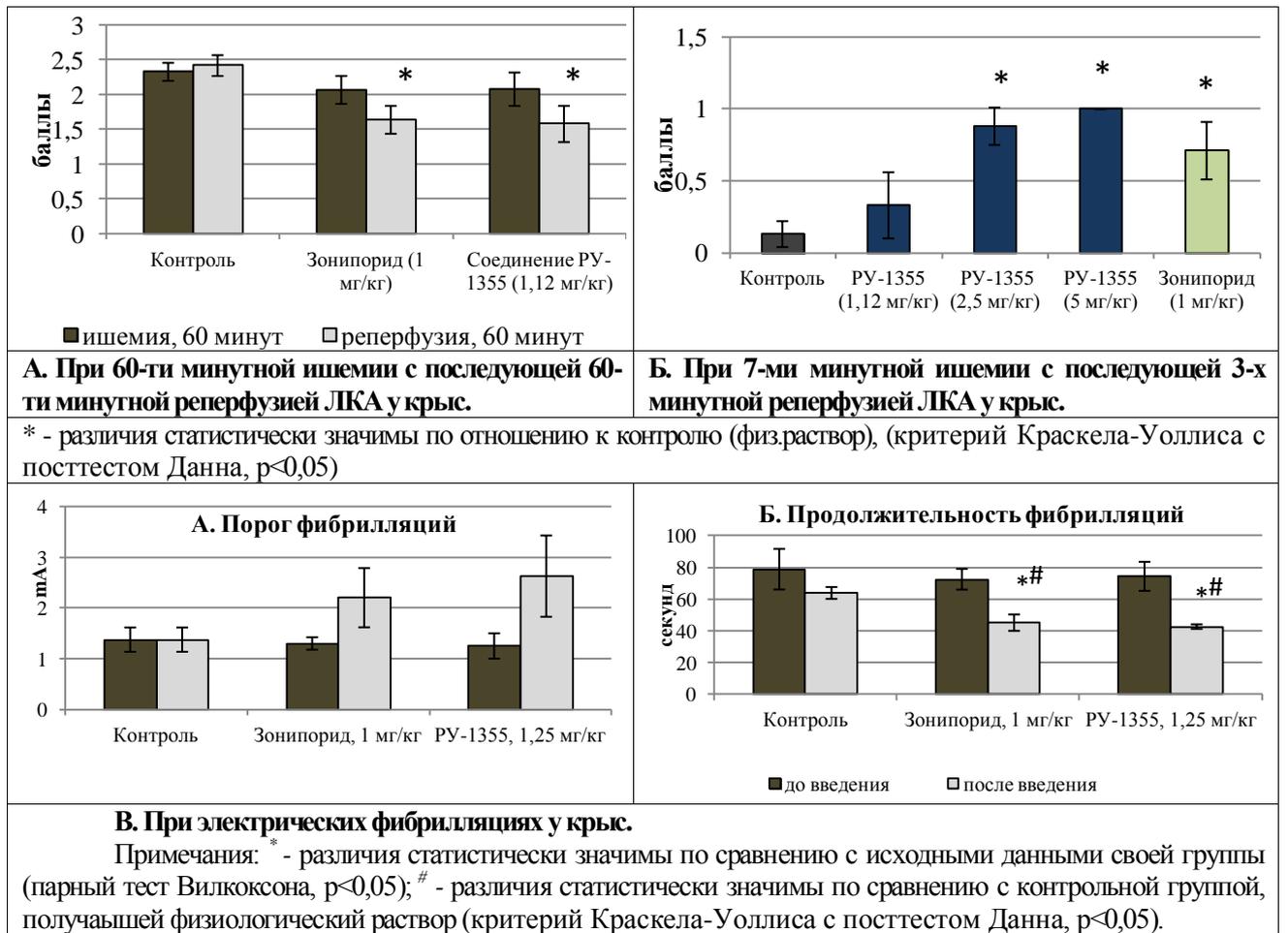


Рис. 6. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на тяжесть нарушений ритма при однократном внутривенном введении.

У животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (ИЗО 2,5 мг/кг 2 раза/сутки) при увеличении пред- и постнагрузки соединение РУ-1355 после курсового введения (31 день) в диапазоне доз 1,25-5 мг/кг/сутки улучшало сократительную активность и функциональные резервы миокарда. В условиях нагрузки объемом (преднагрузки) увеличение ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС в группе «ИЗО+РУ-1355 1,25 мг/кг» в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно превосходило аналогичные показатели контрольной группы с ИЗО ($p < 0,05$) (рис. 7). При повышении дозы вводимого соединения наблюдался значимый ($p < 0,05$) рост $dp/dt-$ и МИФС в 4,6 и 1,5 раза по сравнению с эффектом у животных, получавшими меньшую дозу. При сравнении с результатами препаратов, применяемых в качестве кардиопротекторов, соединение РУ-1355 оказывало действие, подобное милдронату, и превосходило предуктал.

В условиях максимальной изометрической нагрузки (постнагрузки) соединение РУ-1355 (в диапазоне доз 1,25-5 мг/кг/сутки) улучшало сократимость миокарда животных с СН, вызванной ИЗО, и сохраняло ее на достаточно высоком уровне. Сохранность эффекта (значение площади под фармакодинамическими кривыми прироста показателей сократимости ($dp/dt+$, $dp/dt-$)) в группе «ИЗО+РУ-1355 1,25 мг/кг» статистически значимо превосходила результаты у контрольных животных с ИЗО в 2,7 и 2,1 раза (рис. 8).

При сравнительной оценке эффектов выявлено, что соединение РУ-1355 оказывало действие подобное предукталу и превосходило милдронат по способности длительно удерживать нагрузку.

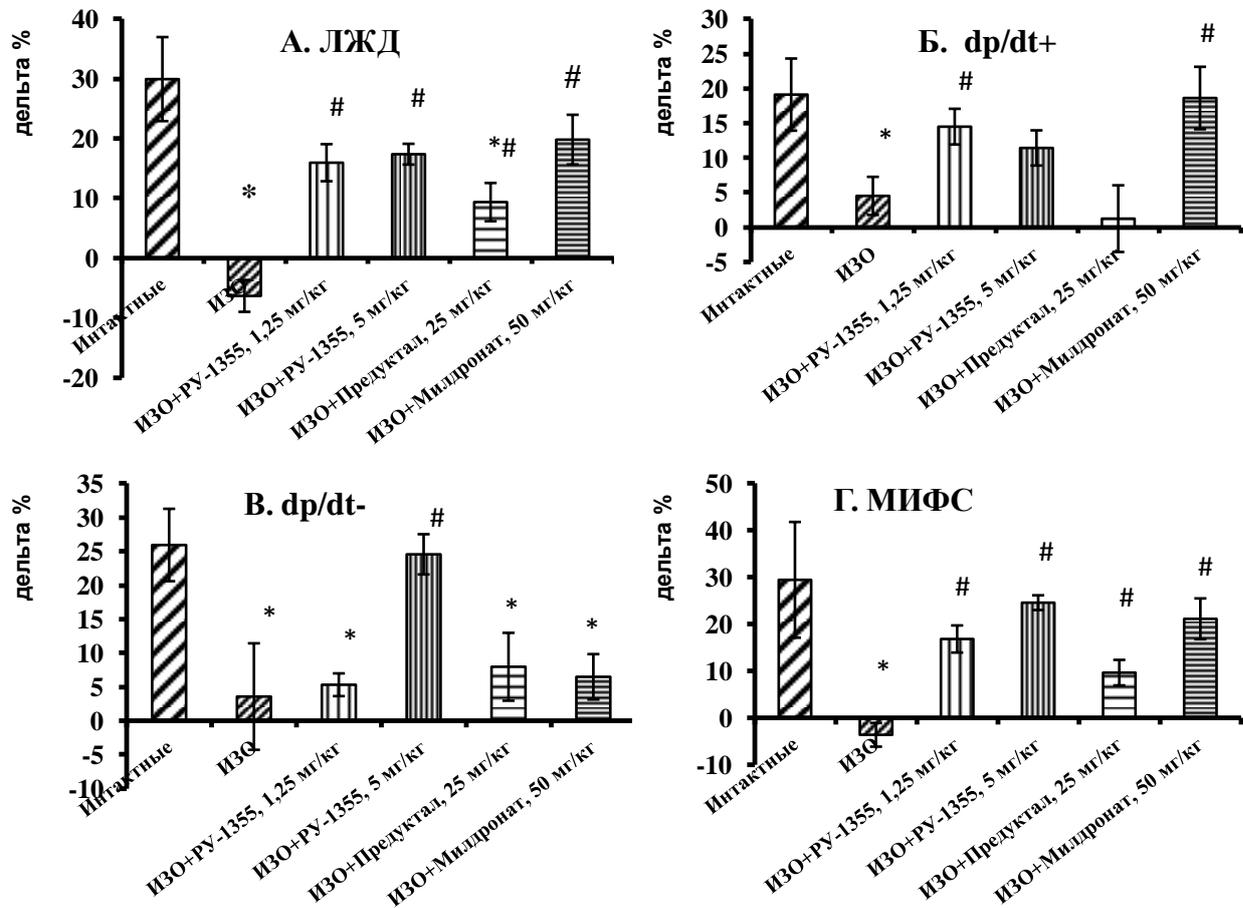


Рис. 7. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на максимальные показатели кардиодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопроterenолом.

Примечание: различия, статистически значимы (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, $p < 0,05$) по отношению: * - к интактным животным, # - к группе «ИЗО». Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» («изопроterenолом») - животные, которым вводили изопроterenолом в дозе 2,5 мг/кг 2 раза/день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+Предуктал», «ИЗО+Милдронат» - группы животных с хроническим повреждением миокарда изопроterenолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день)

Повышение уровня вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов - МДА - у животных с СН свидетельствует об усиленном образовании активных форм кислорода и формировании окислительного стресса в самом сердце и сосудистой системе [Капелько, 2010; Сажин, 2011; Новиков, 2013; Писаренко, 2013]. Изучаемое вещество снижало уровень МДА подобно предукталу и милдронату (рис. 9 I). По сравнению с показателями животных контрольной группы значение МДА в ткани миокарда животных с ИЗО, получавших вещество в дозах 1,25 и 5 мг/кг/сутки, был в 1,7 и 1,9 раза ниже соответственно ($p < 0,05$). Соединение РУ-1355 статистически значимо ограничивало рост концентрации маркера повреждения миокарда тропонина I в плазме крови по отношению к группе животных с ИЗО без лечения. В дозе 1,25 мг/кг наиболее активно

превосходило предуктал и милдронат по его снижению в 2,2 и 2,5 раза соответственно (рис. 9 II).

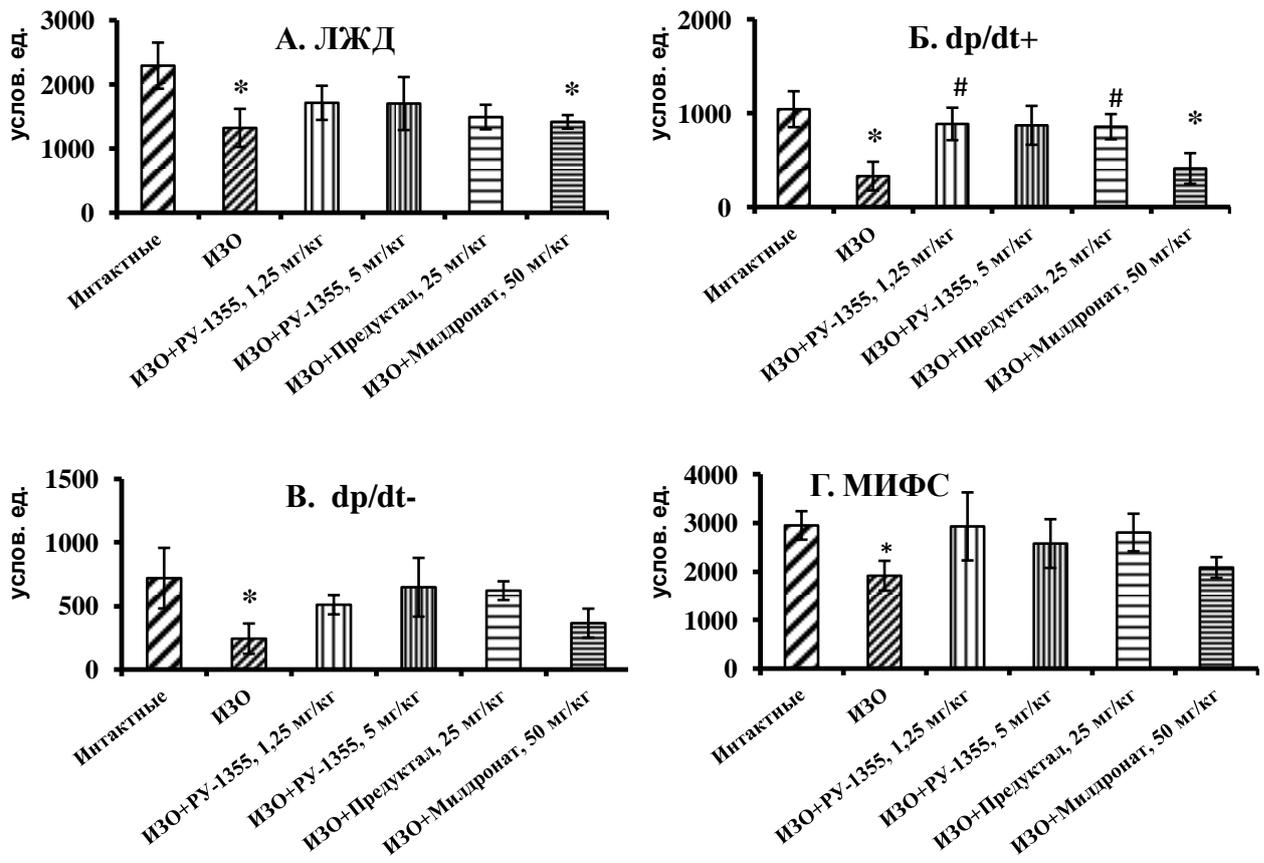


Рис. 8. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на гемодинамические показатели по приросту площадей под фармакодинамическими кривыми при максимальной изометрической нагрузке. Примечание: различия, статистически значимы (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, $p < 0,05$) по отношению: * - к интактным животным, # - к группе «ИЗО». Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» («изопроterenол») – животные, которым вводили изопроterenол в дозе 2,5 мг/кг 2 раза день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+Предуктал», «ИЗО+Милдронат» – группы животных с хроническим повреждением миокарда изопроterenолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день).

При проведении морфологических исследований показано, что при курсовом введении исследуемого соединения снижается образование соединительной ткани (в том числе коллагена) (рис. 10). Наиболее активно соединение РУ-1355 ограничивало фиброзирование левого желудочка в дозе 5 мг/кг. По выраженности эффекта вещество оказалось подобно предукталу и превосходило милдронат.

Таким образом, соединение РУ-1355 обладает кардиопротекторным действием. Оно ограничивает процессы ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования, что обеспечивает противоишемические, противоаритмические, антифибрилляторные и антигипертрофические свойства. Предполагаемый механизм действия связан с ограничением избыточного поступления кальция внутрь кардиомиоцитов при

ишемическом и неишемическом повреждении миокарда, а также с ограничением активации профибротических факторов.

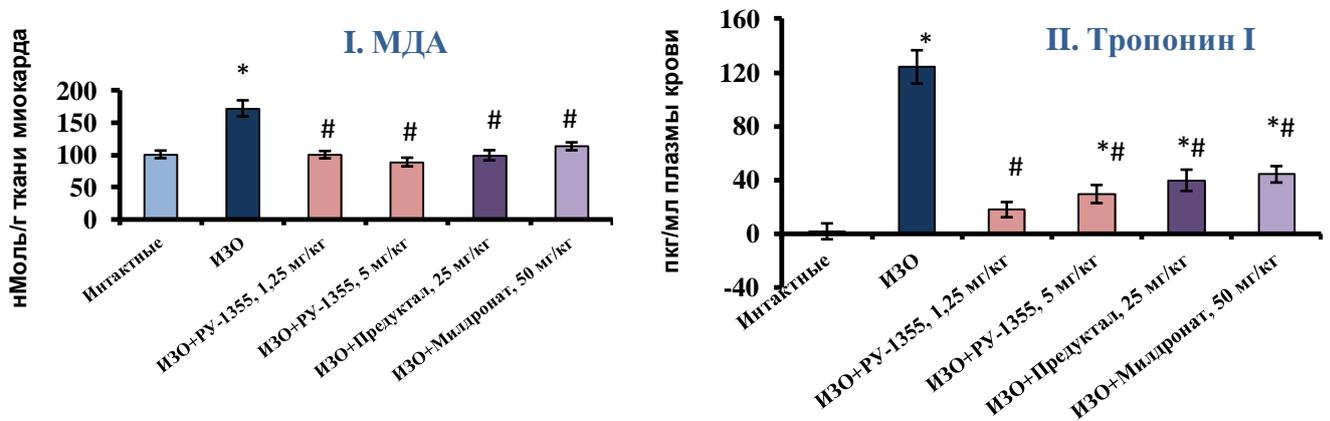


Рис. 9. Влияние РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) на уровень МДА в миокарде и тропонина I при хроническом повреждении изопротеренолом. Примечание: различия уровня тропонина I статистически достоверные (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, $p < 0,05$) по отношению к группе: * - «интактные»; # - «ИЗО (изопротеренол)»; различия уровня МДА статистически достоверные (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна, $p < 0,05$) по отношению к группе: * - «интактные»; # - «изопротеренол».

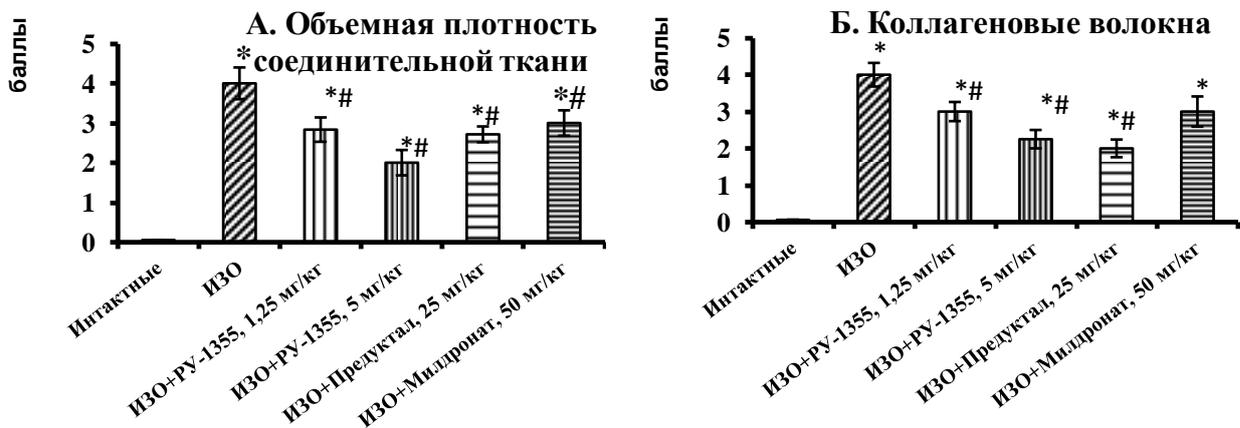


Рис. 10. Влияние РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) на морфологические изменения в миокарде при хроническом повреждении изопротеренолом. Примечание: различия статистически достоверны (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна, $p < 0,05$) по отношению к группе: * - «интактные»; # - «ИЗО (изопротеренол)».

В четвертой главе были изучены антиремоделирующие свойства амфедазола, в том числе в условиях ишемии миокарда.

Методика изучения влияния на трансмембранные ионные токи более подробно описана выше. Исследования *in vivo* проводили на 106 белых неинбредных крысах-самцах массой 200-400 г и 40 кошках обоего пола 2,5-3,5 кг. Влияние амфедазола на электрические фибрилляции предсердий [Самвелян, 1981] изучали на кошках. «Эктопический очаг» возбуждения создавали электрической стимуляцией импульсным током (электростимулятор ЭС-50-01, Россия). Изучение

влияния амфедазола на **желудочковые нарушения ритма, вызванные аконитином** [Генденштейн, 1961], проводили на крысах. Модель **кратковременной ишемии /реперфузии миокарда** описана ранее. В качестве **препарата сравнения** амфедазолу в исследованиях, описанных выше, использовали амиодарон по аналогичной схеме введения. Влияние амфедазола на **максимально воспроизводимую частоту и порог фибрилляций желудочков**, вызванных электрической стимуляцией изучали на кошках [Бердяев, 1986, 1990; Breithardt, 1994]. "Эктопический очаг" возбуждения создавали электрической стимуляцией (электростимулятор ЭС-50-01, Россия). Препаратом сравнения был выбран лидокаин (2% раствор для инъекций ("Мосхимфармпрепараты", Россия)) в дозе 5 мг/кг. Влияние соединений **на толерантность миокарда к ишемии и на течение ишемического повреждения миокарда** изучали на кошках по суммарному подъему сегмента ST эпикардальной электрограммы (электрокардиограф ЭК-6Т-02, Россия). Дозированная ишемия миокарда проводилась по методу, описанному Кавериной Н.В. [1980].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США) с помощью теста Колмогорова-Смирнова, непараметрических критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, метода Фридмана с посттестом Данна. Для исследуемого веществ были определены величины ED_{50} с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excel (пакет Office XP, Microsoft, США).

При сравнительном изучении влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи было показано сложное амиодароноподобное мембранотропное действие, отличное от других известных антиаритмических препаратов: выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция. Как уже отмечалось, при введении амфедазола в дозе $1 \cdot 10^{-6}$ М калиевый ток уменьшался на 39%, в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ М был заблокирован на 60%. Угнетение калиевого тока в присутствии амфедазола было подобно эффекту хинидина, а эффективные концентрации одного порядка (для хинидина $3 \cdot 10^{-6}$ М) [Анисимова, 2009]. Амиодарон оказывает подобное влияние на калиевые токи в близких веществу концентрациях [Вахтон, 1982].

В исследованиях *in vivo* на моделях суправентрикулярных и вентрикулярных фибрилляций, в том числе при ишемическом повреждении миокарда, амфедазол оказывал выраженный антифибрилляторный эффект и превосходил по активности препарат сравнения амиодарон (табл. 8). На модели фибрилляций предсердий, вызванных электростимуляцией, вещество при внутривенном введении (МЭК=0,91 мг/кг) в 100% случаев восстанавливало синусовый ритм, превосходило амиодарон как по показателям минимальной эффективной дозы (в 8,5 раза), так и по величине терапевтического индекса. При внутривенном введении аконитина амфедазол проявил антифибрилляторный эффект и оказался активнее амиодарона по величине ED_{50} (0,3 мг/кг) в 33,3 раза, по терапевтическому индексу - в 4,2 раза. Вещество предотвращало развитие постреперфузионных аритмий при профилактическом введении на модели кратковременной

ишемии/реперфузии миокарда ($ED_{50} = 0,2$ мг/кг) и оказалось активнее амиодарона как по величине ED_{50} в 9 раз, так и по терапевтическому индексу.

Таблица 8

Антифибрилляторная активность амфедазола

| № | Вид исследования или модель нарушения ритма | Амфедазол | | Амиодарон | |
|----|---|---------------------|-------|---------------------|-------|
| | | активность | УТИ* | активность | УТИ* |
| 1. | Влияние на возбудимость изолированных предсердий крыс, МЭК, М/л | $1,6 \cdot 10^{-5}$ | 2,6** | $1,7 \cdot 10^{-4}$ | 1,2** |
| 2. | Фибрилляции, вызванные электрической стимуляцией предсердий у кошек, МЭД, мг/кг | $0,9 \pm 0,16$ | 18,7 | $7,7 \pm 0,66$ | 17,6 |
| 3. | Фибрилляции, вызванные внутривенным введением аконитина у крыс, ED_{50} , мг/кг | 0,3 | 56,7 | 10,0 | 13,5 |
| 4. | Постреперфузионные желудочковых нарушения ритма у крыс, ED_{50} , мг/кг | 0,2 | 85,0 | 1,8 | 75,3 |

* - $УТИ = ЛД_{50}/МЭД$ (или ED_{50}) ** - $МЭД$ (мг/л) = $МЭК$ (моль/л) \times $Мг_{соединения}$ (мг/моль)

Высокая способность увеличивать порог фибрилляций желудочков и снижать максимально воспроизводимую частоту косвенно свидетельствует о влиянии на эффективный рефрактерный период и возбудимость миокарда. В дозах, эквивалентных 1/5-1/6 LD_{50} , амфедазол повышал электрический порог фибрилляций желудочков и превосходил лидокаин как по абсолютной величине в 3 раза (рис. 11А), так и по длительности эффекта в 3-4 раза. Кроме того, вещество статистически достоверно снижало максимально воспроизводимую частоту сердцебиений на 40% подобно лидокаину (рис. 11Б) и превосходило его по продолжительности действия в 2 раза.

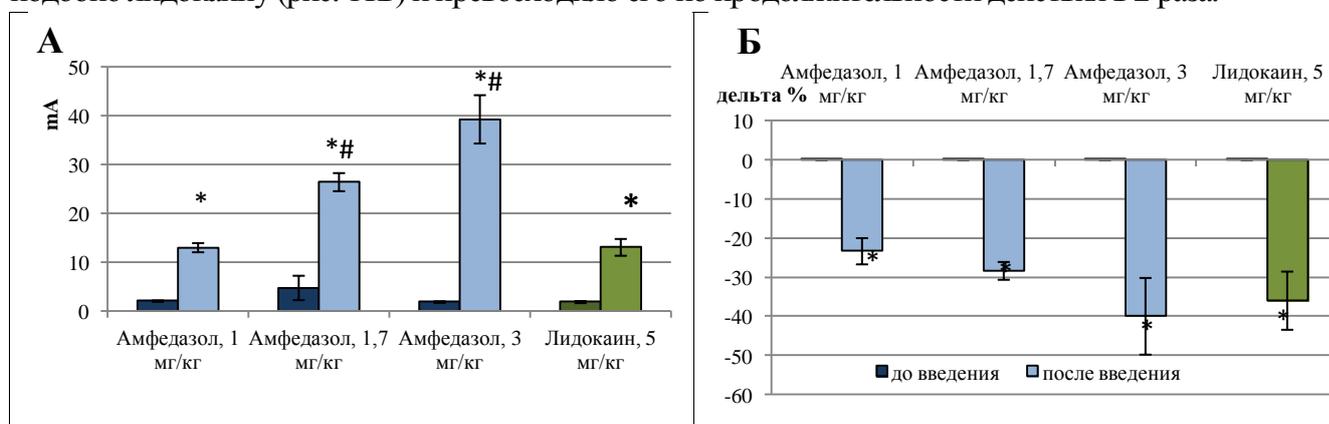


Рис. 11. Влияние амфедазола и лидокаина на порог электрических фибрилляций желудочков (А) и максимально воспроизводимую частоту сердечных сокращений (Б) наркотизированных кошек при однократном внутривенном введении (в Δ % по отношению к контролю). Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: * - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, $p < 0,05$); # - «лидокаину» (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, $p < 0,05$).

Кроме антифибрилляторной активности в экспериментах по изучению влияния на течение ишемического повреждения миокарда при дозируемой окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии амфедазол проявил противоишемический эффект. Изучаемое вещество

превосходит амиодарон по величине ED_{40} (2,1 мг/кг) в 12 раз, по терапевтическому индексу – в 1,5 раза.

При анализе полученных результатов можно предположить, что амфедазол ограничивает электрофизиологическое ремоделирование. Об этом свидетельствуют: непосредственное дозозависимое блокирующее влияние на калиевые токи *in vitro*, выраженная антифибрилляторная активность на моделях суправентрикулярных и вентрикулярных фибрилляций, в том числе при ишемическом повреждении миокарда, высокая способность увеличивать порог электрических фибрилляций желудочков и снижать максимально воспроизводимую частоту, противоишемическое действие. Вещество может быть отнесено к III классу антиаритмических препаратов.

Способность препарата улучшать сократимость и при этом сохранять функциональные резервы миокарда в условиях его повреждения может рассматриваться как фактор кардиопротекции. Поэтому в пятой главе были изучены инотропные свойства соединения РУ-539 в условиях острой интоксикации изопротеренолом. В основе острого изопротеренолового (ИЗО) повреждения миокарда лежат некоронарогенный некроз миокарда [Назипова, 1998; Казаченко, 2008; Scheuer, 1999; Senthil, 2007; Osadchii, 2007a,b; Mehdizadeh, 2013]. Исследования проводили на 24 белых неинбредных крысах-самках. Метод изучения влияния на сократительную активность и функциональные резервы [Меерсон, 1984; Тюренков, 2012] описан выше (в главе 3). Соединение РУ-539 и препарат сравнения амринон вводили внутривенно в дозе, эквивалентной 2 IC_{50} , рассчитанной в исследованиях на изолированных предсердиях (табл. 6).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США) с помощью теста Колмогорова-Смирнова, непараметрических парного теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна.

При увеличении преднагрузки (нагрузка объемом) соединение РУ-539 (0,42 мг/кг, однократно) улучшало сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией (рис. 12). Об этом свидетельствует статистически значимое увеличение ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, а также $AD_{сист}$, $AD_{диаст}$, $AD_{ср}$ в 2,7; 2,6; 2,4; 4,2; 2,4; 2,3 раза соответственно в группе животных, получавших вещество по сравнению с контрольной группой с ИЗО. Соединение РУ-539 превосходило амринон по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,9%, по скорости увеличения сократимости миокарда – на 17,0% и по скорости его расслабления – на 74,1%, по динамике МИФС – на 70,9%.

При проведении постнагрузки (максимальной изометрической нагрузки) по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости сокращения, ЧСС и МИФС соединение РУ-539 оказало эффект, подобный амринону, и превосходило его по способности сохранять сократимость миокарда у животных с изопротереноловой ишемией на достаточно высоком уровне (рис. 13). По основным показателям сократимости (ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$) к концу нагрузки изучаемое вещество статистически значимо превосходило контрольных животных с изопротеренолом в 2,9; 15,0; 4,4 раза. Изучаемое вещество при введении животным с изопротереноловой ишемией миокарда

способствовало увеличению функциональных резервов сердца без увеличения ЧСС, улучшало диастолическую функцию.

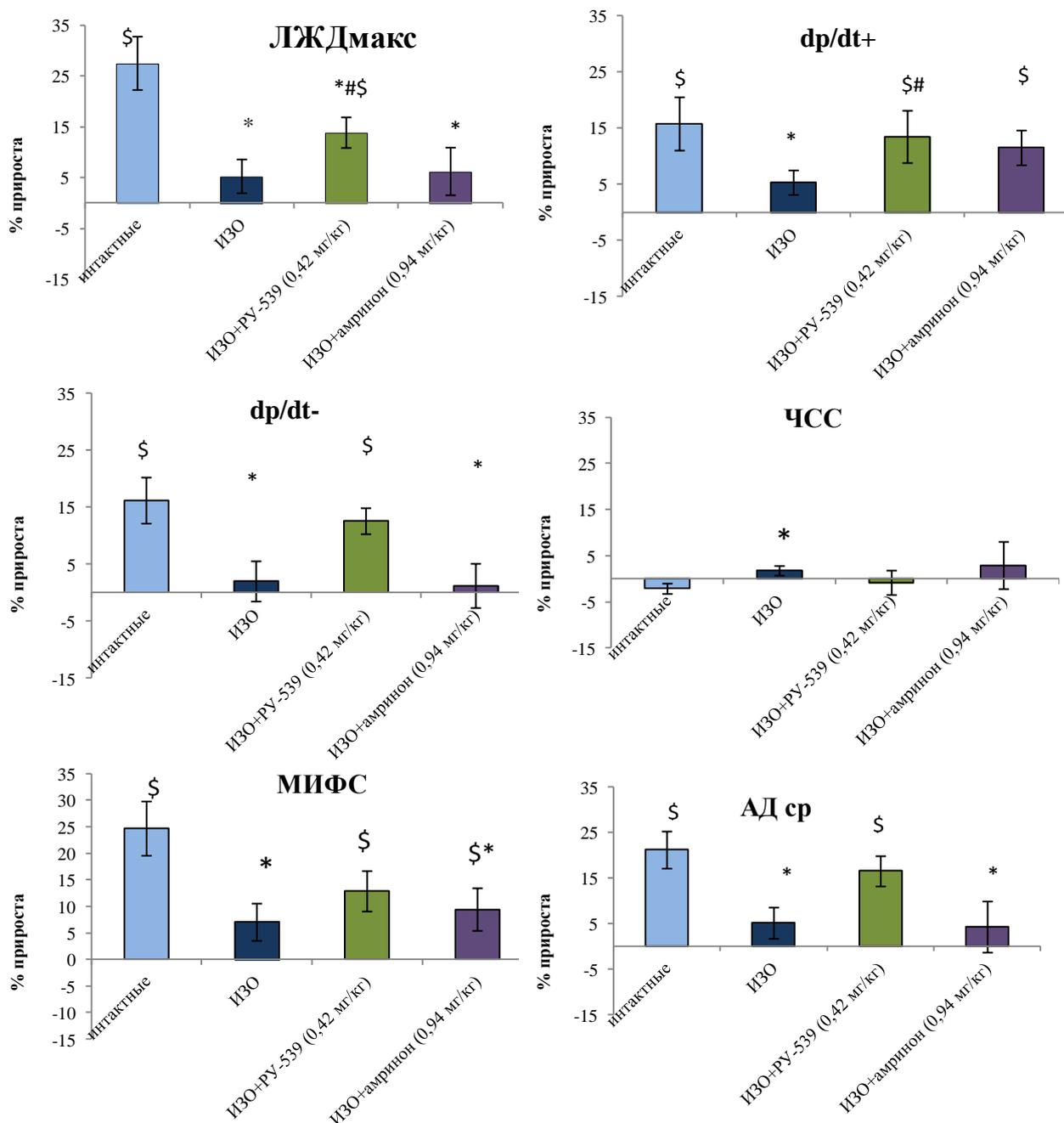


Рис. 12. Влияние соединения РУ-539 (0,42 мг/кг) и амринона (0,94 мг/кг) на показатели кардио- и гемодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с острой интоксикацией изопроterenолом. Примечания: \$ - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными своей группы (парный тест Вилкоксона, $p < 0,05$); различия статистически значимы к * - интактным животным, # - группе «ИЗО (изопроterenол)» (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, $p < 0,05$). *Обозначения:* «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса; «изопроterenол (ИЗО)» - животные, которым вводили изопроterenол в дозе 80 мг/кг (2 дня); «ИЗО+РУ-539 (0,42 мг/кг)», «ИЗО+амринон (0,94 мг/кг)»- группы животных с острым повреждением миокарда изопроterenолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (однократно внутривенно).

В тесте на адренореактивность соединение РУ-539 у животных с изопроterenоловым

повреждением миокарда значительно ограничивало чрезмерный рост ЧСС и МИФС по отношению к контрольным исследованиям, что может расцениваться как кардиопротекторное действие. Вещество превосходило амринон по максимальным значениям прироста таких показателей сократимости миокарда, как ЛЖД и dp/dt - в 1,4 и 2,4 раза соответственно.

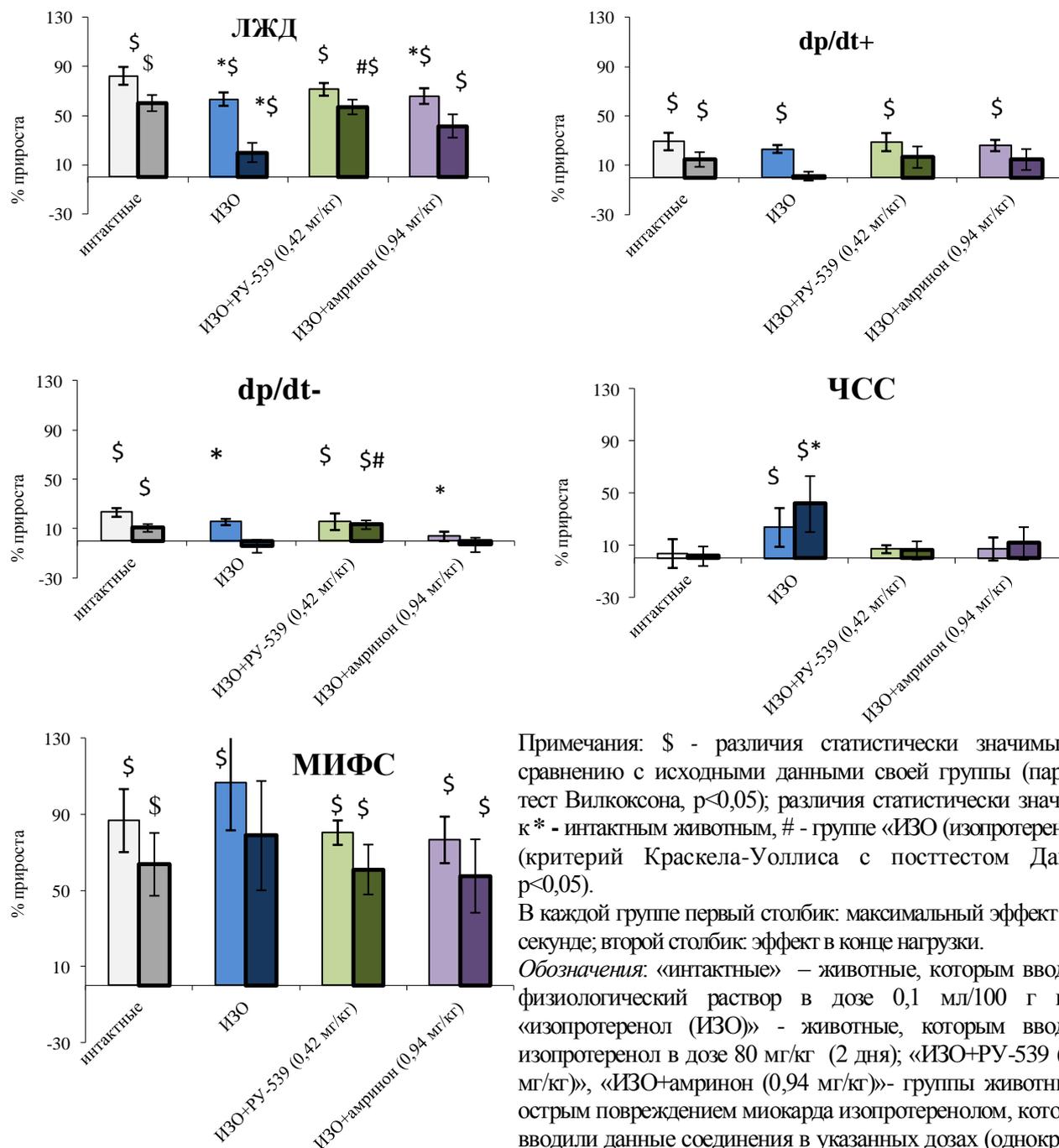


Рис. 13. Влияние соединения РУ-539 (0,42 мг/кг) и амринона (0,94 мг/кг) на показатели кардиодинамики в тесте с максимальной изометрической нагрузкой у животных с острой интоксикацией изопротеренолом.

Таким образом, у животных с некоронарогенной изопротереноловой ишемией сердца соединение РУ-539 при проведении функциональных тестов способствовало улучшению

сократимости миокарда в систолу и скорости его расслабления в диастолу. Соединение РУ-539 при проведении функциональных тестов не только улучшало сократительную активность миокарда, но и способствовало сохранению функциональных резервов, о чем свидетельствует увеличение МИФС без дополнительного увеличения ЧСС. Данный эффект, вероятно, связан с ограничением ионного и, следовательно, гемодинамического ремоделирования миокарда.

В шестой главе были проведены исследования общетоксикологических и кардиальных побочных свойств в эффективных дозах, а также острой токсичности соединений-лидеров. Изучение **общетоксикологических свойств** проводили с использованием схемы многотестового наблюдения по Irwin [1964]: у соединения РУ-1355 - на мышцах-самцах, у амфедазола - на крысах-самцах. **Острую токсичность** определяли в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Арзамасцев, 2012]. **Кардиальные побочные свойства** в эффективных концентрациях регистрировали на протяжении всех фармакодинамических исследований при сравнении наличия нарушений ритма сердца, влияния на проводимость и сократимость миокарда у животных, получавших или не получавших соединения (главы 3-5), а также при проведении общетоксикологических исследований. **Острую ишемию** миокарда моделировали у кошек путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии в верхней ее трети на 30 минут. **Инфаркт миокарда** формировался окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии в течение 90 минут с последующей реперфузией в течение 48 часов. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США) с помощью теста Колмогорова-Смирнова, параметрического однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с посттестом Данна, непараметрических парного теста Вилкоксона, парного теста - U-критерий Манна-Уитни, критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, метода Фридмена с посттестом Данна.

При изучении общетоксикологических свойств было показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутрибрюшинном введении в эффективных дозах (1 и 5 мг/кг) не оказывало нейротоксического действия, не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. Кардиодепрессивных и аритмогенных свойств не выявлено. В накопительной дозе 8,75 мг/кг (выше эффективной) наблюдалось увеличение продолжительности зубца Р, интервала PQ, комплекса QRS и, соответственно, снижение ЧСС ($p < 0,05$).

Амфедазол при внутрибрюшинном введении в течение 30 дней в диапазоне эффективных доз (0,17-0,85 мг/кг) не вызывал изменений со стороны вегетативной нервной системы, нервно-мышечной возбудимости, двигательной активности, мышечной координации и не влиял на эмоциональное поведение животных. Амфедазол снижал частоту сердечных сокращений у крыс при длительном введении, что, вероятно, связано с влиянием на эффективный рефрактерный период миокарда. В средней эффективной дозе 0,6 мг/кг изучаемое вещество не влияет на показатели

сократимости сердца у интактных кошек, а в условиях коронарогенного повреждения миокарда снижает их, однако данные изменения в 1,5-2 раза менее выражены, чем у препарата сравнения амиодарона. Уменьшение насосной функции ишемизированного сердца при применении амфедазола и амиодарона в определенных пределах может быть благоприятным фактором, так как уменьшение нагрузки на миокард приводит к снижению потребления кислорода.

При изучении кардиотоксичности выявлено, что соединение РУ-539 у интактных животных в дозе, равной двум эффективным при некоронарогенном повреждении миокарда (0,84 мг/кг), в условиях проведения гемодинамических нагрузок, не угнетало сократимость миокарда.

Для оценки широты терапевтического действия, позволяющей варьировать диапазон доз и обеспечивать хорошую переносимость, была изучена острая токсичность. По величине ЛД₅₀ в соответствии с классификацией токсичности веществ по Березовской [2003, 2010] исследуемые производные бензимидазола (соединения РУ-1355, амфедазол, РУ-539) можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс) (табл. 9.).

Таблица 9

Данные острой токсичности наиболее активных веществ с кардиопротекторным действием, производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (ЛД₅₀)

| № | Вещество | Животные | Путь введения | Доза ЛД ₅₀ , мг/кг |
|----|--------------------|-------------|----------------|-------------------------------|
| 1. | Соединение РУ-1355 | Мыши-самцы | внутрибрюшинно | 342,7 |
| 2. | Амфедазол | Крысы-самцы | внутривенно | 17,0 |
| | | Мыши-самцы | внутрибрюшинно | 60,0 |
| 3. | Соединение РУ-539 | Мыши-самцы | внутрибрюшинно | 118,0 |

В главе "обсуждение" проведен комплексный анализ полученных результатов. Данные исследований *in vitro*, виртуального скрининга, подструктурных анализов влияния типа ядра и заместителей на высокие уровни активности, анализа по средним и супремальным оценкам, ранговым исследованиям *in silico*, в совокупности с литературными данными позволяют с достаточно высокой степенью вероятности утверждать, что производным бензимидазола присущи кардиопротекторные свойства. Механизмы реализации защиты миокарда связаны со способностью влиять на трансмембранные ионные токи и увеличивать продолжительность рефрактерного периода предсердий, ингибировать NHE-1 или ФДЭ кардиомиоцитов (рис. 14).

При этом в качестве базовой структуры найденных нами противоишемических, антифибрилляторных и инотропных соединений с кардиопротекторной активностью рассматривается привилегированная молекула бензимидазола. Данная подструктура является основным фрагментом химической структуры активного соединения. При ее модификации либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей, возможно построить скаффолды соединений с высокой избирательной активностью в отношении трансмембранных ионных токов, NHE-1, ФДЭ.

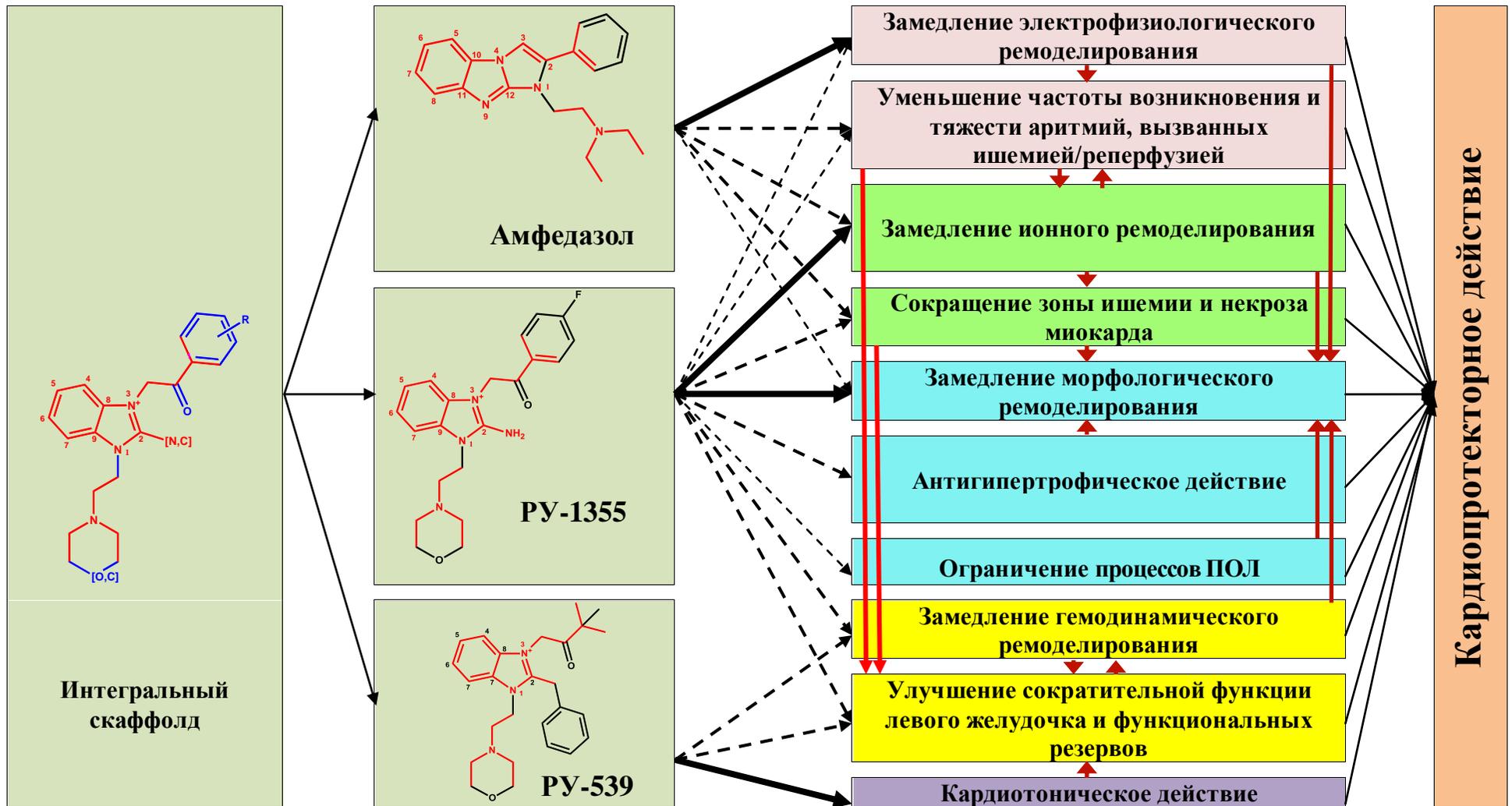


Рисунок 14. Интегральный скаффолд соединений с кардиопротекторной активностью. Основные кардиопротекторные эффекты (→) и механизмы их реализация (---> - наиболее значимые и -> значимые эффекты) производными бензимидазола

Кардиопротекторная универсальность базовой структуры бензимидазола, вероятно, обусловлена особенностями связывания с биомишенями соединений, содержащих привилегированные подструктуры. На первом этапе происходит фиксация привилегированного фрагмента в так называемом «привилегированном подкармане» [Bondensgaard, 2004]. Характер такого связывания неспецифический, он лимитируется в основном гидрофобными и стерическими взаимодействиями, обеспечивает прочную фиксацию лиганда на белке и не приводит к появлению внешней активности. На втором этапе происходит взаимодействие переменной части молекулы со специфическим карманом сайта связывания [Bywater, 2006]. В сравнении с привилегированным подкарманом, специфический карман по аминокислотному составу менее консервативен, он характеризуется большей энтропией, обеспечивает селективное взаимодействие лиганда с биомишенью и обуславливает проявление внешней активности. Таким образом, интегральный скаффолд кардиопротекторной активности включает в себя как привилегированный, «фиксирующий» фрагмент бензимидазола, так и специфическую, «активирующую» часть действующего соединения. На основе скаффолда возможен синтез комбинаторных библиотек для выявления наиболее привлекательного по своим динамическим, кинетическим и токсикологическим параметрам соединения.

При построении комбинаторных библиотек для дальнейшего направленного поиска веществ с антиаритмической (антифибрилляторной) активностью среди конденсированных бензимидазолов наиболее предпочтительными выглядят группы производных N⁹-ИМБИ и N¹-ИМБИ. Достоверными общими для них признаками высокой активности являются в положении R₂ - фенильный и в положении R₃ - диэтиламиноэтильный заместители. Для дальнейшего поиска веществ с ННЭ-ингибирующей активностью среди бензимидазолов наиболее перспективной представляется группа 2-амино-бензимидазола, содержащая в положении N¹ (R₃) морфолиноэтильный заместитель.

Результаты расширенных фармакологических исследований соединения РУ-1355 с выраженным ННЭ-ингибирующим действием, проявляющего на моделях *in vivo* антиремоделирующие свойства, делают перспективным его использование для модификации молекулы с целью увеличения активности. Данные экспериментальных исследований амфедазола, проявляющего свойства антиаритмического вещества III класса - блокатора калиевых каналов, и демонстрирующего в ходе исследований *in vivo* выраженные антиремоделирующие эффекты, позволяют рассматривать данное вещество как перспективную основу для оптимизации молекулы по данному виду активности. Фармакологические исследования соединения РУ-539 с антифосфодиэстеразной активностью, повышающего *in vivo* сократительную активность и функциональные резервы миокарда, позволяют рассматривать данное вещество в качестве основы для улучшения химической структуры молекулы.

Совместное использование методов медицинской химии и фармакологии позволяет перевести направленный поиск новых биологически активных соединений в классе

конденсированных и неконденсированных производных БИ на качественно новый уровень системного поиска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях *in silico* для 1393 соединений конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, имеющих в базе данных кафедры фармакологии, с помощью системы PASS и ИТ Микрокосм по сходству к референсным препаратам была подтверждена перспективность изучения у них кардиопротекторных свойств.

Среди 540 структур, синтезированных к.х.н. В.А. Анисимовой, к.х.н. О.Н. Жуковской, к.х.н. Т.А. Кузьменко (лаборатория органического синтеза НИИ физической и органической химии, Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону), выбраны перспективные классы для поиска антиаритмических веществ, увеличивающих рефрактерность миокарда (производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола), ингибиторов NHE-1 (N¹-замещенные 2-аминобензимидазола), определены значимые заместители, определяющие высокий уровень этих видов активности. Найдено соединение РУ-539 с положительной инотропной активностью, ингибирующее ФДЭ.

Соединение РУ-1355 относится к наиболее перспективному классу N¹-замещенных 2-аминобензимидазолов, *in vitro* ингибирует NHE-1; *in vivo* проявляет кардиопротекторное (противоишемическое, антиаритмическое и антифибрилляторное, антигипертрофическое) действие у животных с коронарогенными и некоронарогенными поражениями миокарда.

Амфедазол относится к наиболее перспективному классу N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола; *in vitro* интенсивно влияет на возбудимость изолированных предсердий, блокирует трансмембранные ионные токи калия; *in vivo* проявляет высокую антифибрилляторную активность при ишемических и неишемических нарушениях ритма сердца, повышает порог фибрилляций; и может быть отнесено к антиаритмическим препаратам III класса.

Соединение РУ-539, ингибирующее ФДЭ, проявляет положительную инотропную активность на изолированных предсердиях и способно повышать сократительную активность, улучшать функциональные резервы сердца *in vivo* у животных с некоронарогенным повреждением миокарда.

Соединения РУ-1355, амфедазол, РУ-539 относятся к классу умеренно токсичных (3 класс). При их введении в эффективных дозах не выявлено существенных кардиальных и экстракардиальных изменений у животных.

ВЫВОДЫ:

1. Консенсусный прогноз спектра активностей с помощью системы PASS и ИТ Микрокосм по сходству к референсным препаратам для 1393 конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола (N¹-бензимидазола; 2,3-дигидро-N¹-бензимидазола; N⁹-имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола; N¹-имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола; пиразоло[1,5-

a]бензимидазола; пиролло[1,2-*a*] бензимидазола; тиазоло[3,2-*a*]бензимидазола; 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазола; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола, N¹,N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) позволил установить, что 93,5% соединений могут проявлять антиаритмическую, 80,8% - кардиотоническую, 42,1% - противоишемическую активности, а данный класс является перспективным для проведения экспериментального поиска кардиопротекторов.

2. Наиболее перспективными для поиска веществ, увеличивающих рефрактерность миокарда, являются производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, содержащих в положении C² - фенильный - и в положении N⁹ или N¹ - диэтиламиноэтильный заместители.

3. Соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – амфедазол - интенсивно влияет на возбудимость изолированных предсердий и превосходит амиодарон по величине минимальной эффективной концентрации в 10 раз; в дозе 5*10⁻⁵М блокирует трансмембранные ионные токи калия на 60%.

4. Установлено, что среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов высокоактивные ингибиторы NHE-1 наиболее часто встречаются среди N¹-замещенных 2-аминобензимидазолов, содержащих в качестве значимого заместителя в положении N¹ морфолиноэтильный заместитель.

5. Соединение 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид - РУ-1355 - активно ингибирует NHE-1 тромбоцитов кролика (IC₅₀=5,4*10⁻¹⁰ М) и превосходит препарат сравнения зонипорид в 50 раз; у животных с длительной ишемией/реперфузией левой коронарной артерии статистически достоверно снижает тяжесть постреперфузионных нарушений ритма на 53%, уменьшает размер зоны некроза миокарда в 1,8 раза, ограничивает рост концентрации тропонина I в плазме крови в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой.

6. Среди 60 конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов, ингибирующих ФДЭ, наибольшую положительную инотропную активность проявляет соединение 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия бромид - РУ-539, которое дозозависимо увеличивает амплитуду изометрического сокращения изолированных предсердий и активнее амринона по величине IC₅₀ в 6 раз.

7. Кардиопротекторные (антиремоделирующие) свойства соединения РУ-1355 связаны с противоишемическими, противоаритмическими, антифибрилляторными свойствами и способностью препятствовать гипертрофии миокарда. В исследованиях *in vivo* у животных с кратковременной ишемией/реперфузией левой коронарной артерии вещество РУ-1355 статистически достоверно предотвращает развитие постреперфузионных фибрилляций (ED₅₀ 1,25 мг/кг); увеличивает порог электрических фибрилляций по отношению к контрольной группе животных на 90,6% и статистически достоверно сокращает время до восстановления нормального ритма на 33,3%. При увеличении пред- и постнагрузки соединения РУ-1355, предуктал и милдронат улучшают сократимость миокарда животных с хронической изопротереноловой интоксикацией. В

дозе 1,25 мг/кг/сутки соединение РУ-1355 практически не уступает препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходит их по влиянию на основные показатели (улучшение сократимости миокарда, ограничение роста уровней тропонина I и малонового диальдегида, снижение плотности коллагена).

8. Амфедазол можно отнести к антиаритмическим препаратам III класса со сложным мембранотропным действием, ограничивающим процессы электрофизиологического ремоделирования миокарда. На моделях нарушений ритма неишемического и ишемического генеза амфедазол превосходит препарат сравнения амиодарон по эффективной дозе в 8,5 и более раз. Соединение увеличивает порог электрических фибрилляций в дозе 3 мг/кг в 20 раз. Вещество увеличивает продолжительность интервала QT_c на 10% в дозе 0,85 мг/кг. Амфедазол проявляет противоишемический эффект при дозируемой окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии и превосходит амиодарон по величине ED₄₀ (2,1 мг/кг) в 12 раз.

9. Кардиопротекторные свойства соединения РУ-539 связаны со способностью ослаблять гемодинамическое ремоделирование миокарда. У животных с некоронарогенным повреждением миокарда вещество при проведении нагрузочных тестов статистически значимо улучшает сократительную активность миокарда и улучшает функциональные резервы сердца (увеличивает МИФС без дополнительного увеличения ЧСС). В условиях нагрузки объемом изучаемое вещество превосходит амринон по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,88%, скорости увеличения сократимости миокарда на 17% и скорости его расслабления на 74,09%, по динамике МИФС на 70,99%. В тесте на адренореактивность соединение РУ-539 превосходит амринон по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости расслабления, МИФС в 1,4; 2,4 и 1,5 раза соответственно. При проведении теста постнагрузки по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости сокращения, ЧСС и МИФС соединение РУ-539 оказывает эффект подобный амринону и превосходит его по способности сохранять сократимость на достаточно высоком уровне.

10. По величине LD₅₀ в соответствии с классификацией токсичности веществ по Березовской исследуемые производные бензимидазола соединения РУ-1355, амфедазол, РУ-539 относятся к умеренно токсичным (3 класс).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданная база данных соединений, обладающих NHE-1 ингибирующими свойствами, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс, сократимость изолированных предсердий крыс у соединений с антифосфодиэстеразной активностью, может быть использована для прогноза данных видов активности у вновь синтезированных веществ.

Методология поиска веществ, влияющих на рефрактерность миокарда, NHE-1, сократимость миокарда, может быть использована при проведении направленного поиска соединений с кардиопротекторной активностью.

Выявленные *in silico* значимые признаки высокого уровня NHE-ингибирующего и

антиаритмического эффектов рекомендуется использовать для направленного синтеза соединений с данными видами активности.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности дальнейшего доклинического (фармакокинетического, токсикологического, фармацевтического) изучения соединений под лабораторными шифрами РУ-1355, амфедазол, РУ-539.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Vassiliev, P.M. Consensus Drug Design Using IT Microcosm / P.M. Vassiliev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, A.F. Kucheryavenko, **N.A. Gurova**, V.A. Anisimova // Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine / Eds. L. Gorb, V. Kuz'min, E. Muratov / Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics / Ed. J. Leszczynski. – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.
2. Спасов, А.А. Антиаритмические свойства зонипорида (экспериментальное исследование) / А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, А.С. Тимофеева, С.М. Сорокин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т.77, №6. - С. 13-17.
3. **Гурова, Н. А.** Кардиопротекторные свойства зонипорида на модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, А.С. Тимофеева, А.А. Желтова, В.Ю. Федорчук // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. - Т. 76, №8. - С. 17-19.
4. Суздальев, К.Ф. Синтез и фармакологическая активность аминоспиртов ряда индола / К.Ф. Суздальев, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, В.А. Косолапов, А.Ф. Кучерявенко, **Н.А. Гурова**, Л.В. Науменко, В.А. Кузнецова, О.Ю. Гречко, Н.А. Колобродова, Т.М. Митина, Д.В. Мальцев, М.Н. Бабакова, С.В. Денькина // Хим.-фарм. журнал. - 2013. - Т. 47, № 3. - С. 3-7.
5. Спасов, А.А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция активности. / А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, М.В. Харитонова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – т. 76, №1. – с. 43-48.
6. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность амидов 2,3-дигидроимидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2- α]-бензимидазол-*N*-уксусных кислот / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, И.Е. Толпыгин, Е.В. Тибирькова, О.А. Салазникова, В.А. Кузнецова, **Н.А. Гурова**, К.В. Ленская, Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев, Н.А. Колобродова, Т.М. Митина, О.Ю. Гречко // Хим.-фарм. журнал. - 2012. - Т.46, №11. - С. 15-20.
7. Спасов, А.А. Синтез и фармакологическая активность амидов 2-амино-3-индолилакриловой кислоты / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, К.Ф. Суздальев, В.А. Косолапов, А.Ф. Кучерявенко, **Н.А. Гурова**, О.Ю. Гречко, Л.В. Науменко, Н.А. Колобродова, Т.М. Митина, Д. В. Мальцев, М.Н. Бабакова // Хим.-фарм. журнал. - 2012. - Т.46, №10. - С. 8-13.

8. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(N,N-дизамещенных)ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, И.Е. Толпыгин, Л.В. Ельцова, А.Ф. Кучерявенко, Л.В. Науменко, **Н.А. Гурова**, К.В. Ленская, Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев, Т.М. Митина, О.Ю. Гречко // Хим.-фарм. журнал. - 2012. - Т. 46, №9. - С. 6-10.
9. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Н.А. Колобродова, **Н.А. Гурова**, О.А. Салазникова, Л.В. Науменко, В.А. Косолапов, Л.В. Ельцова, Т.М. Митина, М.П. Воронкова, К.В. Ленская // Хим.-фарм. журнал. - 2012. - Т. 46, №6. - С. 3-8.
10. **Гурова, Н.А.** Метод изучения влияния новых соединений на активность натрий/водородного обменника / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, А.С. Питерсен // Вестник ВолгГМУ. - 2011. - №2. - С. 70-72.
11. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин, В.И. Минкин, М.В. Черников, Д.С. Яковлев, А.Ю. Стуковина, И.И. Горягин, О.Ю. Гречко, Н.В. Кириллова, В.А. Косолапов, Е.В. Тибирькова, О.А. Салазникова, Л.В. Науменко, **Н.А. Гурова** // Хим.-фарм. журнал. - 2010. - Т. 44, №7. - С. 7-13.
12. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 1-диалкил(алкил)аминоэтил-2,3-дигидроимидазо-[1,2 *a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин, М.В. Черников, Д.С. Яковлев, И.И. Горягин, **Н.А. Гурова**, О.А. Салазникова, Л.В. Науменко, В.А. Косолапов, Л.В. Ельцова, Н.А. Колобродова // Хим.-фарм. журнал. - 2010. - Т. 44, №5. - С. 9-12.
13. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность солей 3-ацетил-2-R-9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин, В.А. Косолапов, А.Ф. Кучерявенко, **Н.А. Гурова**, О.Ю. Гречко, Н.В. Кириллова, Л.В. Ельцова, Л.В. Науменко, В.Д. Сысуева // Хим.-фарм. журнал. - 2010. - Т. 44, №3. - С. 8-13.
14. Спасов, А.А. Влияние производного имидазобензимидазола РУ-353, обладающего местноанестезирующим и антиаритмическим действием, на кардио- и гемодинамику / А.А. Спасов, А.П. Галенко-Ярошевский, **Н.А. Гурова**, В.В. Пономарев // Кубанский научный медицинский вестник. - 2000. - №4. - С. 64-68.
15. Спасов, А.А. Исследование фармакокинетики производного имидазобензимидазола РУ-353, обладающего антиаритмическими и местноанестезирующими свойствами / А.А. Спасов, А.П. Галенко-Ярошевский, Л.А. Смирнова, **Н.А. Гурова**, В.В. Пономарев // Кубанский научный медицинский вестник. - 2000. - №4. - С. 68-72.
16. Спасов, А.А. Кардиотоксические свойства кордарона в условиях острой ишемии и инфаркта миокарда / А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, Т.И. Панченко // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1998. - Т. 61, № 6. - С. 25-30.

Патенты

1. Патент РФ RU 2526902. Средство, обладающее кардиопротекторным действием, и галогениды 1,3-дизамещённых 2-иминобензимидазолия. / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Н.А. Гурова**, А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, В.И. Минкин. // опубл.27.08.2014. Бюл. Изобретений. - 2014. - №24. - 9 С.
2. Патент РФ RU 2521213. Средство, обладающее кардиотонической активностью. / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Н.А. Гурова**, В.И. Петров, В.И. Минкин // опубл. 27.06.2014. Бюл. Изобретений. – 2014. - №18. - 18 С.
3. Патент РФ RU 2518741. Средство, ингибирующее Na^+/H^+ -обмен, и галогениды 1-диалкиламиноэтил-3-[замещенный(дизамещенный) фенацил]-2-аминобензимидазолия. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, И.Е. Толпыгин, А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, В.И. Петров, В.И. Минкин // опубл. 10.06.2014. Бюл. Изобретений. - 2014. - №16. - 8 с.
4. Патент РФ RU 2518740. Средство, ингибирующее Na^+/H^+ -обмен, и дигидрохлорид 2-(3,4-метилendioксифенил)-9-морфолиноэтилимидазо [1,2-а]бензимидазола. / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Н.А. Гурова**, А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, В.И. Минкин. // опубл. 10.06.2014. Бюл. Изобретений. – 2014. - №16. - 8 С.
5. Патент РФ RU 2477130. Средство, обладающее антиаритмическим, антифибрилляторным, противоишемическим действием, и фармацевтическая композиция на его основе. / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, **Н.А. Гурова**, В.И. Минкин, В.И. Петров // опубл. 10.03.2013. Бюл. Изобретений. - 2013. - №7. - 18 с.
6. Патент РФ RU 2453313. Фармацевтическая композиция, препятствующая развитию синдрома предвозбуждения. / А.А. Спасов, В.И. Петров, **Н.А. Гурова**, Б.М. Пятин, Н.И. Авдюнина, В.А. Анисимова, В.И. Минкин // опубл. 20.06.2012. Бюл. Изобретений. - 2012. - №17. - 19 с.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. **Гурова, Н.А.** Антифибрилляторная активность производного имидазобензимидазола соединения РУ-353 / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Трансляционная медицина (Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова (до 2013 года)). - 2012. - Т. 5, №16. - С. 5-8.
2. **Гурова, Н.А.** Влияние амилорида на активность Na^+/H^+ -обменника тромбоцитов / **Н.А. Гурова**, А.С. Питерсен, В.Ю. Федорчук, Д.В. Косолапова // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2012. - №2. - С. 19-21.
3. **Гурова, Н.А.** Моделирование изопротереноловой ишемии миокарда у крыс / **Н.А. Гурова**, М.В. Харитоновна, Н.Г. Панышин, С.М. Сорокин // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2012. - №2. - С. 51-54.
4. Спасов, А.А. Na^+/H^+ обменник – как мишень для поиска соединений с цитопротекторным действием / А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, В.Ю. Федорчук, А.С. Тимофеева, В.А. Анисимова // Обзорение психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева: приложение (тезисы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения

академика АМН СССР Артура Виторовича Вальдмана, «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014). -2014.- Т. Приложение, №б/н. - С. 163-164.

5. Vassiliev, P. Computational prediction of synergistic pharmacological effects for complex molecular systems / P. Vassiliev, A. Spasov, V. Kosolapov, L. Naumenko, **N. Gurova**, N. Chepljaeva, V. Kuznetsova, D. Yakovlev, A. Taran, D. Sorotsky, V. Anisimova // 20th EuroQSAR Understanding Chemical-Biological Interactions - St-Peterburg, August 31 - September 4 2014. – P. 144.

6. **Гурова, Н.А.** Кардиопротекторный эффект соединения РУ-295 / **Н.А. Гурова**, А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, А.А. Желтова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина «Современные проблемы химической науки и фармации», Чебоксары, 3-4 апреля, 2014. - С. 155-156.

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

8. Гниденко, М.Г. Сравнительный анализ селективности лигандов фосфодиэстеразы-3А с помощью биоинформационных технологий / М.Г. Гниденко, С.С. Горина, Е.М. Григорьева, Ю.А. Грозганс, Э.А. Гуламова, И.О. Егорова, А.И. Еремина, А.М. Севостьянова, В.Ю. Федорчук, **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 6-8 ноября 2013). - 2014. - Т. Приложение, №б/н. - С. 28-29.

9. Дрoнь, М.Ю. Биоинформационное сравнение первичных аминокислотных последовательностей натрий-водородных обменников различных типов / М.Ю. Дрoнь, А.Н. Енькова, В.Ю. Федорчук, А.С. Питерсен, **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 6-8 ноября 2013). - 2014. - Т. Приложение, №б/н. - С. 36-37.

10. Резников, Е.В. Влияние конденсированных производных азолов на сократительную активность изолированных предсердий / Е.В. Резников, **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев, В.А. Анисимова // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 6-8 ноября 2013). - 2014. - Т. Приложение, №б/н. - С. 109-110.

11. Тимофеева, А.С. Анализ зависимости NHE-ингибирующей активности от химической структуры производных бензимидазолов / А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, **Н.А. Гурова**, В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 6-8 ноября 2013). - 2014. - Т. Приложение, №б/н. - С. 134-135.

12. Vassiliev, P.M. Complex consensus approach to *in silico* search for novel drugs / P.M. Vassiliev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, O.Y. Grechko, A.F. Kucheryavenko, L.V. Naumenko, **N.A. Gurova**, N.I. Chepljaeva, V.A. Kuznetsova, D.S. Yakovlev, V.A. Anisimova // Books of Abstracts. Methods and application of Computational Chemistry (5th international symposium), Kharkiv, Ukraine, 1-5 July 2013. - P. 29
13. **Гурова, Н.А.** Влияние заместителей производных класса N¹-имидазобензимидазола на способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода предсердий / **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев, А.А. Спасов, В.А. Анисимова, Е.В. Резников // Материалы V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». - Ростов-на-Дону, 5 сентября 2013. - С 340-341.
14. Васильев, П.М. Консенсусный подход в поиске *in silico* новых лекарственных веществ / П.М. Васильев, А.А. Спасов, В.А. Косолапов, О.Ю. Гречко, А.Ф. Кучерявенко, Л.В. Науменко, **Н.А. Гурова**, Н.И. Чепляева, В.А. Кузнецова, Д.С. Яковлев, В.А. Анисимова // Тезисы Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, Москва, 8-12 сентября 2013. - С. 281.
15. **Гурова, Н.А.** Поиск ингибиторов Na⁺/H⁺-обменника среди производных бензимидазольных систем / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, В.А. Анисимова, А.С. Тимофеева, В.Ю. Федорчук, А.А. Желтова // Тезисы Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, 8-12 сентября 2013. - С. 279.
16. Суздаев, К.Ф. Синтез и фармакологическая активность 1,2-аминоспиртов ряда 3-винилиндола / К.Ф. Суздаев, А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, В.А. Косолапов, А.Ф. Кучерявенко, **Н.А. Гурова**, Л.В. Науменко, В.А. Кузнецова, О.Ю. Гречко, Н.А. Колобродова, Т.М. Митина, Д.В. Мальцев, М.Н. Бабакова, С.В. Денькина // Тезисы Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, 8-12 сентября 2013. - С. 151.
17. Спасов, А.А. Комбинаторная библиотека амидов 2-амино-3-индолилукриловой кислоты. Синтез и фармакологическая активность / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, К.Ф. Суздаев, В.А. Косолапов, А.Ф. Кучерявенко, **Н.А. Гурова**, О.Ю. Гречко, Л.В. Науменко, Н.А. Колобродова, Т.М. Митина, Д.В. Мальцев, М.Н. Бабакова // Тезисы Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, 8-12 сентября 2013. - С.148.
18. **Гурова, Н.А.** Влияние соединения АКС-539 на функциональные резервы сердца в условиях изменения преднагрузки у крыс с сердечной недостаточностью / **Н.А. Гурова**, В.Н. Перфилова, С.М. Сорокин, В.А. Анисимова // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград, сентябрь 2012). - 2012. - Т. Приложение, №б/н. - С. 107.
19. Питерсен, А.С. Изучение эффекта соединения АКС-284 на активность натрий/водородного обменника в сравнении с зонипоридом / А.С. Питерсен, **Н.А. Гурова**, В.Ю. Федорчук // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный

- поиск новых лекарственных средств», Волгоград, сентябрь 2012). - 2012. - Т. Приложение, №б/н. - С. 157.
20. **Гурова, Н.А.** Поиск и изучение ингибиторов Na^+/H^+ -обменника среди производных азолов / **Н.А. Гурова**, В.А. Анисимова, А.С. Питерсен, В.Ю. Федорчук // Материалы съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 18-21 сентября 2012. - С. 53.
21. Спасов, А.А. Изучение влияния некоторых конденсированных азотсодержащих соединений на активность Na^+/H^+ обменника / А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, В.А. Анисимова, А.С. Питерсен, В.Ю. Федорчук // Сборник материалов конгресса (тезисы докладов) XIX Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». - Москва, 23-27 апреля 2012. - С. 425.
22. **Гурова, Н.А.** Изучение влияния некоторых производных бензимидазола на параметры изометрического сокращения / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, Анисимова В.А. // Сборник материалов конгресса (тезисы докладов) XVIII Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство», Москва, 11-15 апреля 2011. - С. 431.
23. **Гурова, Н.А.** Изучение влияния новых ингибиторов миокардиальной фосфодиэстеразы на параметры изометрического сокращения / **Н.А. Гурова**, В.Ю. Федорчук, В.А. Анисимова // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград, сентябрь 2011). - 2011. - Т. Приложение, №б/н. - С. 30.
24. Питерсен, А.С. Сравнительная оценка влияния производных циклических гуанидинов на активность Na^+/H^+ -обменника / А.С. Питерсен, **Н.А. Гурова**, В.А. Анисимова // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград, сентябрь 2011). - 2011. - Т. Приложение, №б/н. - С.68-69.
25. **Гурова, Н.А.** Анализ влияния новых ингибиторов миокардиальной фосфодиэстеразы на параметры изометрического сокращения / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». - Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011. - С. 87.
26. Спасов, А.А. Скрининг *in silico* производных конденсированных азолов с высокой фармакологической активностью / А.А. Спасов, П.М. Васильев, О.Ю. Гречко, А.Ф. Кучерявенко, Д.С. Яковлев, Л.В. Науменко, А.Ю. Стуковина, В.А. Косолапов, **Н.А. Гурова**, В.А. Анисимова // Сборник тезисов, 2-й Международный Конгресс - Партнеринг и выставка по биотехнологии и биоэнергетике, Москва, 13-15 апреля 2010. - С. 176.
27. Тюренокв, И.Н. Изучение прямого инотропного действия ди- и трипептидов / И.Н. Тюренокв, В.Н. Перфилова, А.А. Спасов, **Н.А. Гурова**, Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди // Сборник материалов конгресса (тезисы докладов) XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 12-16 апреля 2010. - С. 730.
28. **Гурова, Н.А.** Проверка прогноза антиаритмической активности среди производных имидазобензимидазола / **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев // Сборник материалов конгресса (тезисы докладов) XVI Российского национального конгресса "Человек и Лекарство", Москва, 6-10 апреля 2009. - С. 79.

29. **Гурова, Н.А.** Компьютерный прогноз и экспериментальная проверка антиаритмической активности производных азотсодержащих гетероциклов / **Н.А. Гурова**, П.М. Васильев, В.А. Анисимова // Психофармакология и биологическая наркология: специальный выпуск (Материалы III Съезда Фармакологов России «Фармакология - Практическому Здравоохранению» - Санкт-Петербург, 23-27 сентября 2007). -2007.- Т. 7. - С. 1671.
30. Анисимова, В.А. Изучение механизма действия нового антиаритмического соединения РУ-353, производного имидазобензимидазола / В.А. Анисимова, И.Б. Грецкая, **Н.А. Гурова**, В.И. Поротиков, А.А. Спасов // Лекарства - Человеку. - 2000. - Т. 12, № 2. - С. 4-11.
31. **Гурова, Н.А.** Изучение кардиотоксичности нового антиаритмического соединения, удлиняющего потенциал действия / **Н.А. Гурова**, А.А. Спасов, Т.И. Панченко, В.А. Анисимова // Тезисы IV Международного славянского Конгресса по электронной стимуляции и клинической электрофизиологии сердца, VI Всероссийской Конференции по электростимуляции и клинической электрофизиологии сердца, IV Всероссийского симпозиума "Диагностика и лечение нарушений ритма и проводимости сердца у детей", II Международного симпозиума " Электроника в медицине. Мониторинг, диагностика, терапия" - Санкт-Петербург, 10-12 февраля 2000. - С. 95.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

- НHE-1 - натрий/водородный обменник 1 изоформы
- QSAR - Quantitative Structure-Activity Relationship
- БИ - бензимидазолы
- ИЗО, ISO – изопротеренол
- ИмБИ - имидазобензимидазолы
- ИТ – информационные технологии
- ЛЖД - левожелудочковое давление
- ЛКА – левая коронарная артерия
- МДА - малоновый диальдегид
- МИФС - максимальная интенсивность функционирования структур
- МЭК - минимальная эффективная концентрация
- ПОЛ - перекисное окисление липидов
- ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания
- СЭ - синий Эванс (краситель)
- Тн I - тропонин I
- ТФТ - 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид
- ФДЭ - фосфодиэстераза
- ХСН - хроническая сердечная недостаточность
- ЧСС - частота сердечных сокращений
- ЭКГ - электрокардиограмма

Гурова Наталия Алексеевна

**«ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ - НОВЫЙ КЛАСС
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ»**

АВТОРЕФЕРАТ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология