

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

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ТИМОФЕЕВА АННА САМОВНА

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

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

ВОЛГОГРАД – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. НАТРИЙ–ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕННИК – ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1. Кардиопротекторы. Современное состояние вопроса	14
1.2. Биологическая роль Na^+/H^+ обмена: основные изоформы Na^+/H^+ обменников, строение, регуляция, физиологическое значение	19
1.3. Роль Na^+/H^+ обмена при патологии сердечно-сосудистой системы	23
1.3.1. Значение Na^+/H^+ обмена при ишемии и реперфузии	23
1.3.2. Функции Na^+/H^+ обмена при нарушениях ритма сердца.....	26
1.3.3. Na^+/H^+ обмен при сердечной недостаточности	28
1.4. Ингибиторы Na^+/H^+ обменника - новый фармакологический класс кардиопротекторных средств.	32
1.5. Кардиопротекторные свойства производных бензимидазолов	37
1.6. Заключение	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований	42
2.2. Перечень используемых реактивов и веществ	42
2.3. Список использованного программного обеспечения.....	47
2.4. Экспериментальные животные	47
2.5. Методы поиска ингибиторов NHE-1 <i>in vitro</i>	47
2.6. Методы QSAR-анализа	48
2.6.1. Среднее и супремальное оценивание перспективности химических классов	49
2.6.2. Методы расчета физико-химических параметров.....	50

2.6.3. Корреляционный анализ	51
2.6.4. Множественный пошаговый регрессионный анализ	52
2.7. Методы изучения кардиопротекторных свойств <i>in vivo</i>	54
2.7.1. Исследование противоишемической активности.....	54
2.7.2. Определение антиаритмической активности.....	56
2.7.3. Изучение кардиопротекторных свойств.....	58
2.8. Метод изучения общетоксикологических свойств	61
2.9. Метод изучения острой токсичности.....	63
3.0. Методы статистической обработки	63
ГЛАВА 3. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕННИКА СРЕДИ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГУАНИДИНОВУЮ ГРУППУ	65
3.1. Поиск соединений с NHE-1-ингибирующей активностью <i>in vitro</i> на тромбоцитах кролика.....	65
3.2. Зависимость NHE-1–ингибирующей активности соединений от их структуры.....	68
3.3. Анализ перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности	76
3.4. Зависимость NHE-1–ингибирующей активности соединений от их физико–химических свойств	82
3.5. Регрессионный анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов.....	85
3.6. Заключение	90
ГЛАВА 4. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И ЗОНИПОРИДА НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА У КРЫС.....	93
4.1. Влияние соединения РУ-1355 на зону риска и некроза миокарда	94
4.2. Действие вещества РУ-1355 на уровень тропонина I в плазме крови.....	97

4.3. Заключение	99
5.1. Противоаритмические свойства соединения РУ-1355 при длительной ишемии/реперфузии	102
5.2. Изучение антифибрилляторной активности соединения РУ-1355 при кратковременной ишемии/реперфузии	105
5.3. Влияния соединения РУ-1355 на порог электрических фибрилляций	106
5.4. Действие соединения РУ-1355 и зонипорида на основные параметры ЭКГ	109
5.5. Заключение	111
ГЛАВА 6. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И МИЛДРОНАТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОМ.....	112
6.1. Моделирование хронической сердечной недостаточности.....	113
6.1.1. Заключение	120
6.2. Изучение кардиопротекторных свойств соединения РУ-1355 при хронической интоксикации изопротеренолом	121
6.2.1. Влияние соединения РУ-1355 на индекс гипертрофии миокарда при хронической интоксикации изопротеренолом	121
6.2.3. Действие соединения РУ-1355 на уровень МДА в миокарде и тропонина I в плазме крови	129
6.3. Заключение	133
ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355	135
7.1. Влияние соединения РУ-1355 на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы	135
7.2. Влияние соединения РУ-1355 на двигательную и мышечную координацию, реактивность	136

7.3. Влияние соединения РУ-1355 на поведенческие реакции мышей в тесте «открытое поле».....	137
7.4. Действие соединения РУ-1355 на вегетативную функцию нервной системы мышей.....	140
7.5. Изучение острой токсичности соединения РУ-1355.....	140
7.6. Заключение.....	141
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	142
ВЫВОДЫ.....	157
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	160

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-АмБИ – аминокбензимидазола

АТ II - ангиотензин II

АТФ - аденозинтрифосфат

ИЗО - изопротеренол

ИмБИ – имидазобензимидазол

ИРП -ишемическое/реперфузионное повреждение

МДА - малоновый диальдегид

ПОЛ - перекисное окисление липидов

ПреК - прекондиционирование

РУ - лабораторный шифр соединения

СН - сердечная недостаточность

САП - карбоангидраза изоформа II

СаМ – кальмомодулин

СаМКП - Ca^{2+} /кальмодулин зависимая киназа II

СНР - кальциневрин

EGF - эпидермальный фактор роста

ERK 1/2 - внеклеточно регулируемые киназы 1 и 2

ERM - белки эзрин/радиксин/мезин

NBS - Na^+ - HCO_3^- – симпорт

NCE - $3Na^+/Ca^{2+}$ - обменник

NHE - Na^+/H^+ -обмен

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

PIP₂ - фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат

PKC - протеинкиназа C

PLC - фосфолипаза

MAP - митоген активируемая протеинкиназа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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

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

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

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

бензимидазола оказывают подобное действие, ингибируя NHE-1 [Zhang1, 2007; Lee2, 2009].

Степень разработанности. На сегодняшний день доказано участие NHE-1 в патофизиологических процессах, происходящих при ССЗ: повреждении миокарда и мозга во время ишемии/реперфузии, возникновении нарушений ритма сердца [Koliakos, 2008], развитии гипертрофии [Cingolani, 2011], эндотелиальной дисфункции, сердечной недостаточности (СН) [Malo, 2006], а также таких осложнений, как кардиомиопатии и ангиопатии [Дедов, 2006]. Многократно подтвержденные в эксперименте кардиопротекторные свойства ингибиторов NHE-1 позволили начать клинические исследования. Показана эффективность таких препаратов, как: зонипорид, карипорид, сабипорид, энипорид, при лечении атеросклероза, аритмий, острого инфаркта миокарда, СН [Kim, 2007]. Поскольку у данных веществ выявлены нейротоксические эффекты, представляется целесообразным продолжить поиск соединений с новыми химическими структурами.

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

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

1. Провести поиск соединений с NHE-1–ингибирующей активностью среди новых производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола;
2. Изучить зависимость биологической активности соединений от их структуры и физико-химических свойств;
3. Определить острую токсичность наиболее активных соединений;
4. Исследовать противоишемические свойства наиболее активного соединения на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией сердца у крыс в сравнении с препаратом зонипорид;

5. Оценить антиаритмические и антифибрилляторные эффекты наиболее активного вещества и зонипорида на моделях длительной и кратковременной ишемии/реперфузии миокарда;

6. Изучить кардиодинамические и морфологические эффекты активного вещества и препарата сравнения милдроната при хронической изопротереноловой интоксикации;

7. Определить общетоксикологические свойства наиболее активного соединения.

Научная новизна

Впервые была изучена NHE-1–ингибирующая активность новых производных, содержащих циклическую гуанидиновую группу: N¹ и N⁹ имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2–аминобензимидазола. Установлено, что выраженность NHE-1-ингибирующих свойств производных 2–аминобензимидазола определяется наличием аминогруппы в положении C₂, диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в N¹, фторбензоилметила в N³.

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

Теоретическая и практическая значимость

Выявленные в ходе проведенного исследования закономерности между NHE-1–ингибирующей активностью новых производных циклических

гуанидинов используются при целенаправленном поиске и синтезе новых соединений. Было показано, что повышение NHE-1–ингибирующей активности производных 2–аминобензимидазола связано со снижением липофильности первого заместителя при одновременном увеличении общей липофильности молекулы.

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

Методология и методы исследования

Эксперименты выполняли согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сыренский, 2008; Чичканов, 2008; Галенко-Ярошевский, 2012], с использованием современных высокоинформативных методов, имеющихся в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, НИИ фармакологии и ГБУ ВМНЦ. Исходя из целей и задач исследования, были использованы модели сердечно-сосудистой патологии, позволяющие изучить противоишемические, антиаритмические и антифибрилляторные свойства соединения РУ-1355, влияние его на сократительную активность и процессы ремоделирования миокарда.

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

Реализация результатов исследования

Результаты выявленных закономерностей между структурой и физико-химической характеристикой исследованных рядов производных циклических гуанидинов внедрены в работу по оптимизации синтеза соединений с NHE-1-ингибирующей активностью, которая проводится на базе НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского

университета и НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета. Результаты работы внедрены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пермской государственной медицинской академии.

Основные положения, выносимые на защиту

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

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

3. Вещество РУ-1355 на моделях 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс сокращало размеры зоны некроза сердца, ограничивало рост тропонина I в плазме крови и проявляло антиаритмические свойства; при кратковременной ишемии/реперфузии обладало антифибрилляторной активностью; при хронической интоксикации изопротеренолом сохраняло сократительную активность и функциональные резервы, препятствовало образованию соединительной ткани в миокарде, ограничивало рост тропонина I в плазме крови и МДА в тканях миокарда.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

Публикации

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

Объем и структура работы. Диссертационные исследования изложены на 175 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 34

рисунками, 24 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), главы материалы и методы (глава II), экспериментальной части (главы III-VII), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 131 источников, в том числе 48 зарубежных.

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

1.1. Кардиопротекторы. Современное состояние вопроса

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из наиболее распространенных причин смертности во всем мире [Чазов, 2011; Шальнова, 2011, 2012; Мишалов, 2012; Петров, 2014; De Paula, 2014]. Медицинская статистика не утешительна: инфаркты, атеросклероз и другие проявления ишемической болезни сердца «молодеют». Все чаще подобные заболевания встречаются у людей 30-35 лет [Руженцова, 2010; Гаас, 2011].

Статистика ССЗ по России выглядит следующим образом: из 100 тысяч человек от инфаркта миокарда (ИМ) ежегодно умирают 330 мужчин и 154 женщины, а от инсультов 204 мужчины и 151 женщина [Зайцева, 2006; Ежов, 2009; Цыганкова, 2010; Касумова, 2012]. Среди общей смертности в России ССЗ составляют 57% [Палаткина, 2012]. Большая доля здесь принадлежит ИБС и АГ с их осложнениями – ИМ и нарушением мозгового кровообращения [Морозова, 2008; Гарганеева, 2013; Чигиринская, 2013].

Необходимость фармакологической защиты миокарда является неотъемлемым фактом различных патологических состояний [Стаценко, 2005; Галагудза, 2011; Михин, 2011; Асташкин, 2014]. Такой защитой обладают кардиопротекторы – средства, оптимизирующие работу и функцию сердца.

По мнению Г. Арутюнова и соавторов [2002], к принципиальным методами кардиопротекции в арсенале клинициста относятся меры, направленные на сохранение проходимости коронарных артерий, блокаду патологического ремоделирования камер сердца и цитопротекцию (табл. 1.1).

Основные направления кардиопротекции¹

Принцип	Механизмы реализации	Препараты	Результат
Сохранение проходимости коронарных артерий	Замедление роста атеросклеротической бляшки	Статины	Снижение ишемии миокарда, сохранение сократительной функции сердца
Замедление морфологического, ионного и электрофизиологического, гемодинамического ремоделирования камер сердца	Нормализация активности нейrogормонов (ангиотензина II, норадреналина и альдостерона); модификация ионного гомеостаза, восстановление гемодинамики и морфологической структуры	Кардиопротекторы (ингибиторы АПФ, β-блокаторы, антагонисты альдостерона, ивабрадин и другие)	Уменьшение массы миокарда, нормализация геометрии камер сердца, восстановление электрофизиологической гомогенности миокарда
Повышение толерантности к гипоксии кардиомиоцитов	Модификация энергетического метаболизма	Цитопротекторы: триметазидин, этилметилгидроксипиридина сукцинат, милдронат	Предотвращение перехода кардиомиоцитов в состояние гибернации

К сожалению, несмотря на четкое определение патогенетических путей развития кардиальной патологии и введение в клиническую практику многочисленных групп препаратов, успех терапии остается недостаточным. Длительное время большой интерес представляли препараты, способные благоприятно влиять на метаболизм миокарда. К метаболизму относятся все реакции, в результате которых строятся структурные элементы клеток и тканей, и процессы, в которых из содержащихся в клетках веществ извлекается энергия [Трешкур, 2011; Олесова, 2013].

¹адаптирована, Арутюнов, 2002 год.

Препараты, существенно не влияющие на гемодинамические параметры, но способные «переключать» метаболизм миокарда с окисления жирных кислот на окисление глюкозы, получили название антиангинальных средств с метаболическим механизмом действия или миокардиальных цитопротекторов [Трухан, 2014].

Общепринятой классификации миокардиальных цитопротекторов не существует, так как данный класс препаратов весьма разнообразен по химической структуре и по механизмам действия. Наиболее приемлемой из всех возможных представляется классификация по механизму действия [Косарев, 2013]:

1. Регуляторы поступления субстратов в кардиомиоциты (глюкозо-калий-инсулиновая смесь);
2. Ингибиторы карнитин-пальмитоилтрансферазы (этомоксир; оксфеницин; аминокарнитин);
3. Ингибиторы бета-окисления жирных кислот (триметазидин; ранолазин);
4. Стимуляторы пируват-дегидрогеназы (дихлорацетат; левокарнитин);
5. Препараты с прочими механизмами действия (кокарбоксилаза; инозин; фосфокреатин; этилметилгидроксипиридина сукцинат; мельдоний (милдронат); ивабрадин).

В соответствии с Федеральным руководством по использованию лекарственных средств [2013] в клинической практике в качестве кардиопротекторов используется триметазидин, ивабрадин и этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Среди групп ингибиторов бета-окисления жирных кислот, наиболее изученным препаратом является триметазидин, с доказанным антиангинальным и антиишемическим эффектом; воздействует непосредственно на ишемизированные кардиомиоциты. К началу 2007 года с триметазидином было выполнено 54 двойных слепых рандомизированных

клинических исследования. Показана способность препарата уменьшать гипертрофию миокарда левого желудочка [Морозова, 2008; Асташкин, 2014]. Показаниями для использования триметазида являются: 1) стенокардия напряжения (в многокомпонентных схемах антиангинальной терапии); 2) инфаркт миокарда и ранний постинфарктный период; 3) хроническая сердечная недостаточность. Рекомендации ВНОК по диагностике и лечению хронической сердечной недостаточности указывают на безопасность его применения, если препарат назначается совместно с основными средствами лечения заболевания [Трухан, 2014].

К препаратам с прочими механизмами действия относится милдронат. Он активирует гликолиз и повышенное использование химически связанного кислорода, уменьшает повреждающее действие на клеточные мембраны ацил-карнитина и ацил-коэнзима А. Препарат милдронат в рандомизированных клинических исследованиях не изучали, доказательная база в отношении большинства показаний к его применению отсутствует. В рекомендациях по лечению стабильной стенокардии, инфаркта миокарда и хронической сердечной недостаточности данного препарата нет [Беленькова, 2012]. Однако антиишемическая эффективность милдроната продемонстрирована при инфаркте миокарда, отмечено его положительное действие на толерантность к физической нагрузке, уменьшение клинических проявлений стенокардии, снижение потребления нитратов, в том числе у пожилых пациентов [Михин, 2012]. Продemonстрирована целесообразность применения милдроната в комбинированной терапии как систолической, так и диастолической ХСН [Стаценко, 2005].

В течении последних 25 лет активно изучаются и разрабатываются методы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения. Это дает возможность сохранить функции миокарда, ограничить зону некроза, предотвратить развитие сердечной недостаточности и улучшить клинические результаты у пациентов с ИБС [Сыренский, 2008; Трухан,

2014]. К числу наиболее эффективных подходов подобной защиты миокарда от ишемического/реперфузионного повреждения (ИРП) относится прекондиционирование (ПреК). ПреК – это феномен, при котором кратковременные эпизоды ишемии коронарной артерии активируют механизмы защиты миокарда от последующего глобального повреждения и способствуют значительному снижению частоты осложнений, возникающих в период ишемии/реперфузии [Науменко, 2014].

Предположение о возможности индукции ПреК с помощью определенных фармакологических препаратов возникло вскоре после открытия ишемического ПреК [Новикова, 2014]. Они включают агонисты G-белок связанных рецепторов (G-БСР), также известные как рецепторно-зависимые триггеры ПреК (брадикинин, аденозин, ацетилхолин, опиоидные пептиды и катехоламины); доноры NO; «открыватели» АТФ-чувствительных K^+ -каналов; ингибиторы фосфодиэстеразы-5 и Na^+/H^+ -обмен (NHE) [Лыкасова, 2014].

Поэтому в настоящее время активно изучаются эффекты как ишемического [Галагудза, 2006; Маслов, 2014], так и фармакологического ПреК миокарда [Цырлин, 2009; Новикова, 2014]. Объяснение необходимости разработок в данном направлении кроется в механизмах ремоделирования клеток миокарда, физиологических условиях и периодах ишемического воздействия. Примером фармакологического ПреК является использование ингибиторов NHE-1 [Fliegel, 2009; Karmazyn, 2013].

Таким образом, существующие подходы с назначением различных средств гемодинамического и метаболического типа действия далеко не всегда могут обеспечить оптимальный результат при лечении ССЗ, поэтому разработка новых кардиопротекторных препаратов, влияющих на процессы прекондиционирования в кардиомиоцитах, может быть одним из приоритетных направлений современной медицины.

1.2. Биологическая роль Na^+/H^+ обмена: основные изоформы Na^+/H^+ обменников, строение, регуляция, физиологическое значение

Важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний отводят повреждению кардиомиоцитов, закислению внутриклеточной среды и развитию «кальциевого парадокса» [Писаренко, 2004]. Данные нарушения, обусловленные различными этиологическими факторами, имеют важное патогенетическое значение и нередко являются основными для прогноза заболевания. В связи с этим, целесообразным является стремление оказать корректирующее влияние на нарушенный метаболизм кардиомиоцитов [Аникин, 2014].

В регуляции pH внутриклеточной среды принимают участие ряд ионных обменов, таких как: NHE, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -симпорт и другие [Писаренко, 2005]. Известно, что NHE является одним из основных регуляторов натриевого и кальциевого гомеостаза в клетке. NHE составляет группу мембранных белков, которые синтезируются во всех тканях организма [Malo, 2006]. К настоящему времени были идентифицированы 10 изоформ (NHE-1-NHE-10) обменника, которые обладают структурными различиями, а также индивидуальной чувствительностью к ингибированию фармакологическими агентами (таб. 1.2) [Luo, 2007; Karmazyn, 2013; Xu, 2015].

Наиболее активно изучается NHE-1 изоформа, которая широко распространена и была первой клонирована из тканей человека. Она представляет собой гликопротеин 91 kDa, осуществляющий трансмембранный обмен ионов Na^+ на ионы H^+ со стехиометрией 1:1, что указывает на электронейтральность процесса [Хуе, 2010]. Эта изоформа найдена в плазматической мембране эритроцитов, тромбоцитов и в миокарде.

В состав NHE-1 входят 815 аминокислот. Структура обменника содержит 2 домена. N-домен располагается в мембране, состоит из 500

Изоформы Na^+/H^+ обменника

Изоформы	Разновидность	Структура		Локализация
NHE-1 ¹	Human	815	91 kDa	Кардиомиоциты, тромбоциты, базолатеральные мембраны различных тканей
NHE-2 ¹	Rat	813	91 kDa	Клетки желудка, ободочной кишки, тонкого кишечника, надпочечников
	Rabbit	809	90 kDa	Почки и клетки кишечника
NHE-3 ¹	Rat	831	93 kDa	Тонкий кишечник, желудок (апикальная часть), эпителий проксимальных канальцев почек, кишечник)
NHE-4 ¹	Rat	813	81 kDa	Желудок, тонкая и толстая кишка, почечные канальца
NHE-5 ¹	Human	896	99 kDa	Мозг (гиппокамп), селезенка, семенники, скелетные мышцы
NHE-6 ¹	Human	669	74 kDa	Головной мозг, скелетные мышцы, сердце
NHE-7,8,9 ¹	Human	725	80 kDa	Мозг (затылочная доля), скелетные мышцы, секреторные ткани (желудка, простаты, поджелудочной железы, щитовидной железы)
NHE-10 ²	Human			Остеобласты и остеокласты

аминокислотных остатков и отвечает за транспорт катионного обмена. С-терминальный цитоплазматический домен состоит из 315 аминокислотных остатков, обеспечивает внутриклеточную активность обменника, возможно, за счет воздействия протеинкиназ (рис. 1.1) [Луо, 2007].

Регуляция внутриклеточного ионного обмена имеет решающее значение для поддержания гомеостаза в сердце. Есть целый ряд механизмов, посредством которых стабилизируется рН, особенно после внутриклеточного ацидоза вследствие ишемии миокарда. NHE является одним из ключевых

¹Спасов, 2013; Malo, 2006; Луо, 2007.

²Lee, 2008.

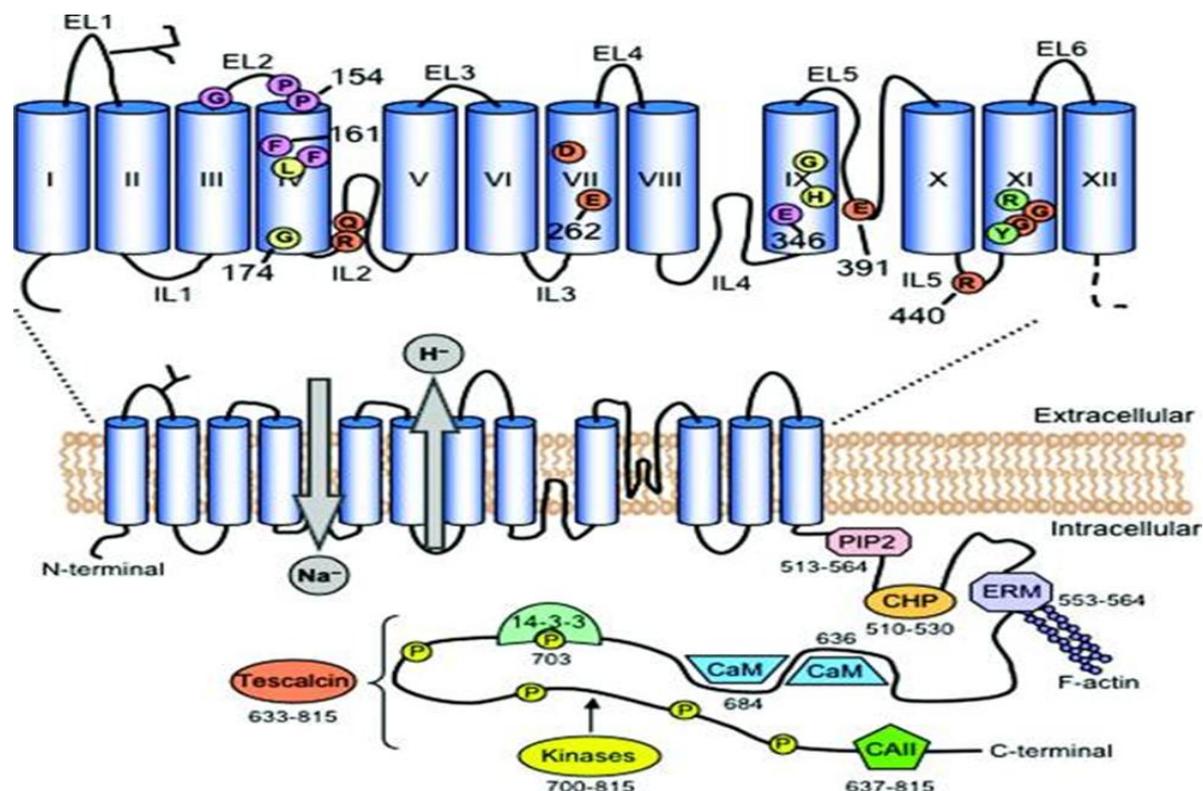


Рис 1.1. Структурный и функциональный анализ Na^+/H^+ обмена [Slepков, 2007].

Обозначения: EL1–EL6, внеклеточные петли 1–6; IL1–IL5, внутриклеточные петли 1–5; E (аминокислота глутаминовая), D аспарагиновая кислота (аспарагиновая кислота; регулирующие элементы: CaM (кальмодулин); CHP (кальциневрин (кальцийзависимая фосфатаза, белковая фосфатаза III) гомологичный белок (протеин); ERM (белки эзрин/радиксин/мезин); CAII (карбоангидраза изоформа II); PIP_2 (фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат).

механизмов восстановления водородного показателя путем экструзии (т.е. высвобождения) протонов одновременно с притоком натрия после ишемии, индуцированной внутриклеточным ацидозом.

NHE – структурный белок, который относится к системе регулирования и организации цитоскелета, взаимодействуя с ним путем актин-связывающего ERM (эзрин, радиксин, мезин) протеина с остатками 553-564 С-терминального конца. Обменник работает как плазматический мембранный остов, соединяющий вместе множество белков так, что они могут функционально взаимодействовать. Дистальная область С фрагмента содержит множество остатков серина и треонина, которые фосфорилируются протеинкиназами в ответ на продолжительный ацидоз. Фосфорилирование остатков в этой области изменяет температуру кристаллизации обменника,

активируя его при более щелочном значении pH. Киназы, которые фосфорилируют NHE и стимулируют его активацию, включают: ERK 1/2 (внеклеточные регулируемые киназы 1 и 2) [Fliegel, 2009], MAP (митоген активируемая протеинкиназа) [Зверев, 2003], p90^{rsk} (p90 рибосомальная киназа s6) [Fliegel, 2009], Rho-связанная киназа (ROCK) [Koliakos, 2008], NIK (Nck-взаимодействующая киназа) [Malo, 2006], CaMKII (Ca²⁺/кальмодулин зависимая киназа II) [Slepков, 2007].

NHE активируется в ответ на различные внеклеточные стимулы. Полагают, что это происходит через взаимодействие вспомогательных белков или биологически активных веществ с C-доменом путем фосфорилирования. Цитоплазматический домен обменника, как уже сообщалось, взаимодействует с различными протеинами, в том числе Ca²⁺-связывающим белком, протеинкиназой, фосфатазой и белками цитоскелета. Кроме того, фосфорилирование происходит путем фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP2), эпидермального фактора роста (EGF), эндотелина-1, рибосомальной S6 киназы, кальциневрина B, кальмодулина (CaM) и протеинкиназы B [Koliakos, 2008]. Идентификация многих дополнительных факторов и сайтов фосфорилирования показала, что регулирование NHE проходит через сложный и многоэтапный процесс [Fliegel, 2009].

Основные функции NHE заключаются в регуляции внутриклеточного показателя pH, защите от закисления цитоплазмы клетки, контроле клеточного объема и трансэпителиальном транспорте Na⁺, H⁺, Cl⁻ (рис. 1.2).

Таким образом, NHE участвует во многих патофизиологических процессах, включающих клеточную миграцию, регуляцию клеточного pH, апоптоз, гипертрофию, эндотелиальную дисфункцию, ишемическое и реперфузионное повреждение [Koliakos, 2008], а так же таких заболеваний, как сахарный диабет [Slepков, 2007], СН [Cingolani, 2011], нарушение мозгового кровообращения [Luo, 2007]. Наибольший интерес NHE представляет при патологии ССЗ.

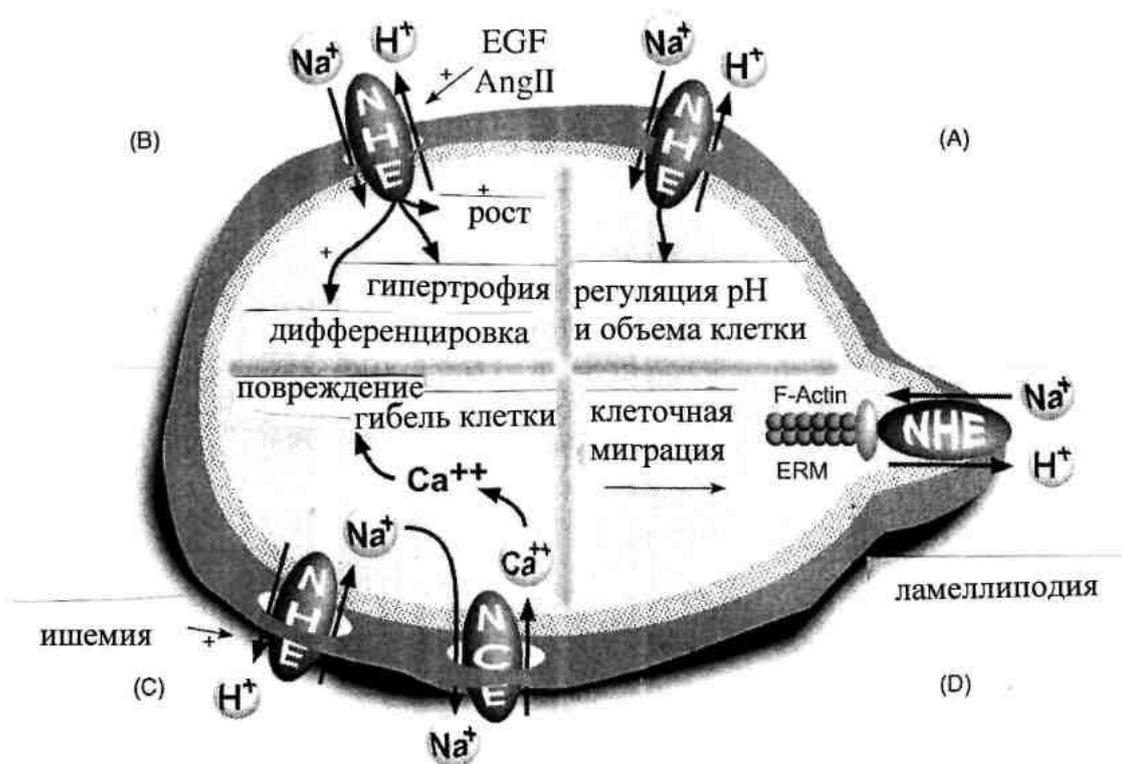


Рис. 1.2. Биологическая роль Na^+/H^+ обмена [Fliegel, 2009].

А) в норме: обмен ионов Na^+ и H^+ ; регуляция рН и объема клетки; В) при развитии сердечной недостаточности: рост, гипертрофия и дифференцировка кардиомиоцитов;

С) при ишемии: перегрузка кальцием, повреждение клетки; D) клеточная миграция.

1.3. Роль Na^+/H^+ обмена при патологии сердечно-сосудистой системы

Известно, что NHE имеет существенное значение при таких патологиях как: ишемическое и реперфузионное повреждение, СН, эндотелиальная дисфункция, ХСН и другие [Koliakos, 2008].

1.3.1. Значение Na^+/H^+ обмена при ишемии и реперфузии

В норме энергетическое обеспечение кардиомиоцитов осуществляется за счет расщепления 2 главных клеточных субстратов – углеводов (глюкозы) и жирных кислот (ЖК). За счет β – окисления ЖК образуется около 60–70% аденозинтрифосфата (АТФ), однако для этого требуется большое количество кислорода. При его дефиците в условиях временной или постоянной ишемии миокарда метаболизм глюкозы заканчивается на этапе пирувата, что сопровождается снижением выработки энергии примерно в 20 раз. Кроме

того, формируется метаболический ацидоз, приводящий к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция и натрия. Усугубляет ситуацию конкурентное в условиях ишемии β – окисление ЖК, исходом которого является внутриклеточный ацидоз и еще большее накопление натрия и кальция. Возникающие диспропорции, в конечном счете, и приводят к снижению сократимости миокарда и дальнейшему прогрессированию заболевания.

При физиологическом значении pH NHE имеет низкую активность. Во время ишемии/реперфузии происходит накопление внутриклеточных протонов, которые выводятся из клеток через сарколеммный NHE в обмен на вход ионов Na^+ . Возрастание содержания ионов Na^+ в свою очередь активирует $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен через сарколемму, ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу и способствует входу ионов кальция в кардиомиоциты. Возникает « Ca^{2+} -перегрузка» (рис. 1.3).

Реперфузия усугубляет повреждение, возникшее во время ишемии. Концентрация внеклеточных протонов быстро снижается, формируется большая разница между градиентами вне/внутриклеточных H^+ , что ведет к росту уровня кальция, реперфузионным аритмиям и некрозу миокарда.

Параллельно с развитием «кальциевого парадокса» в механизме ишемического и реперфузионного повреждения миокарда важная роль принадлежит «кислородному парадоксу» [Зверев, 2003]. Его суть заключается в резком нарушении сократимости миокарда вплоть до развития контрактуры миофибрилл и изменение ультраструктуры кардиомиоцитов при реоксигенации (рис. 1.4).

Таким образом, в условиях перегрузки кальцием, как и при реоксигенации, происходит резкий рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что является одной из причин развития повреждения миокарда.

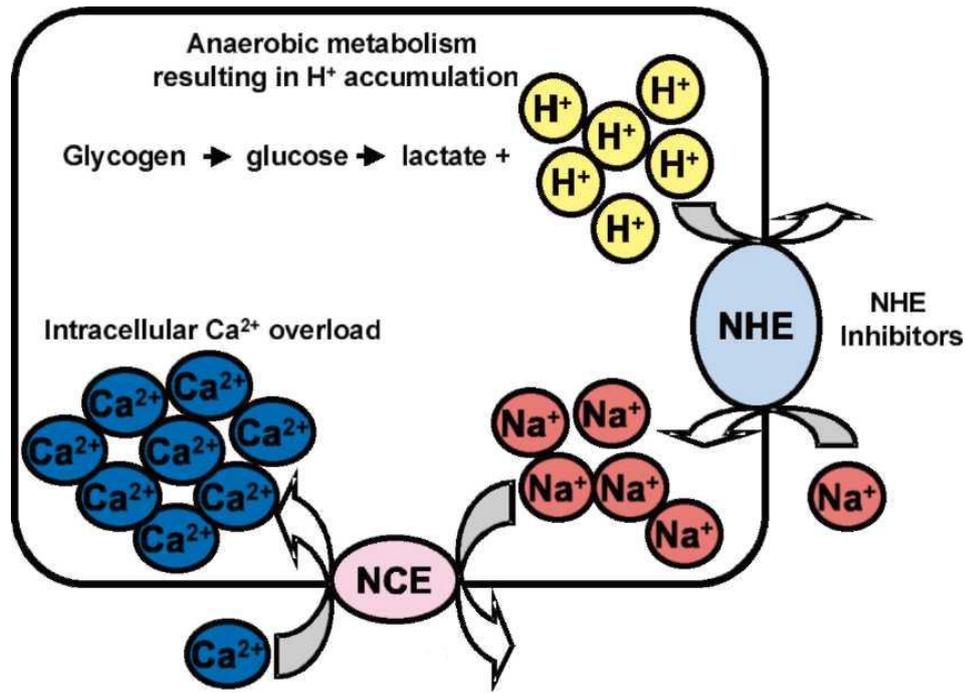


Рис. 1.3. Участие Na^+/H^+ обмена в механизме развития «кальциевого парадокса» при ишемии миокарда [Fliegel, 2009].
 Обозначения: NHE – Na^+/H^+ -обмен; NCE - $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен.

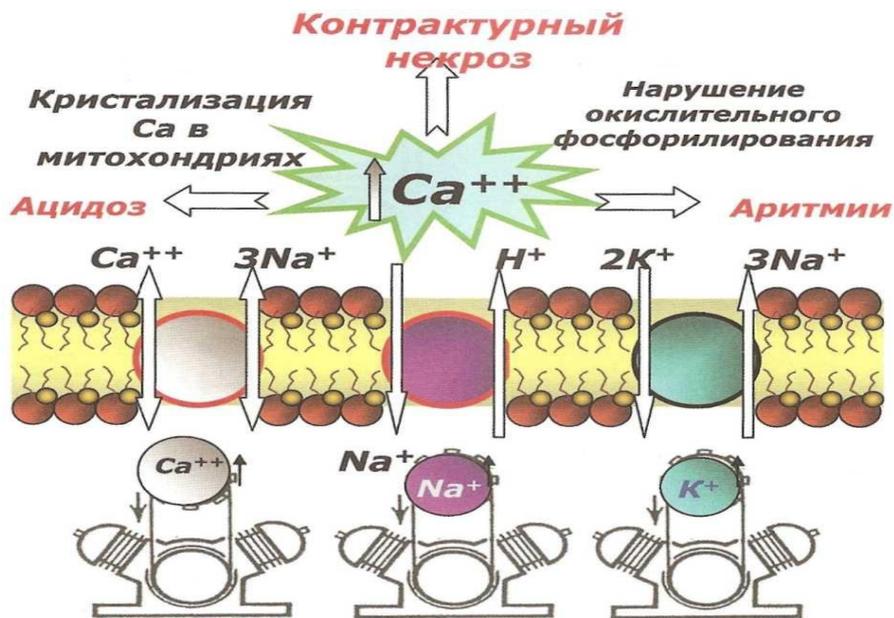


Рис. 1.4. Схема перегрузки кардиомиоцитов кальцием при реперфузии [Шилов, 2009].

1.3.2. Функции Na^+/H^+ обмена при нарушениях ритма сердца

Во время острой ишемии и реперфузии в сердце могут возникать нарушения ритма, являющиеся жизнеугрожающими состояниями. Механизмы, участвующие в возникновении аритмий, формируются в зависимости от стадии ишемии. В раннюю ишемическую стадию (до 90 минут), значительная часть кардиомиоцитов остается жизнеспособной, в более позднюю стадию преобладают некротические изменения [Нарыжная, 2012; Sánchez, 2011]. Нарушения ритма по механизму «re-entry», происходят при ранней ишемии, в позднюю стадию и реперфузию – как по «re-entry», так и при участии эктопического автоматизма [Крыжановский, 2010; Yui, 2011].

Феномен «re-entry» вызван задержкой возбуждения кардиомиоцитов ишемизированной области, в результате чего становится возможным повторное вхождение возбуждающего импульса в один и тот же регион и возникновение внеочередного импульса. Это происходит из-за замедления деполяризации кардиомиоцитов в зоне ишемии [Маслов, 2010]. Показана важная роль увеличения Ca^{2+} в индукции ишемических и реперфузионных нарушений ритма. Кроме того, установлено, что в возникновении аритмии важную роль играет повреждение межклеточных контактов и их основного компонента - белка коннексина, что приводит к замедлению проведения и возникновению аритмий по механизму «re-entry» [Sánchez, 2011].

Во время ишемии значение рН снижено, к концу реперфузии оно восстанавливается до нормальных значений. Однако, в начале реперфузии внутриклеточный рН остается пониженным, вследствие чего за счет обмена H^+ на Na^+ в цитоплазму продолжает поступать Na^+ через NHE. Избыток натрия удаляется из саркоплазмы Na^+/K^+ -АТФазой и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортером в обмен на ионы кальция, что приводит к непродолжительному, но интенсивному их увеличению и возникновению связанных с ними реперфузионных аритмий. В частности, показано, что избыточное накопление ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах вызывает задержанную

постдеполяризацию, триггерную активность и, как следствие, тахикардии (рис.1.5) [Трешкур, 2011].

В экспериментах с биолюминисцентным Ca^{2+} -зондом акварином обнаружено, что возрастание Ca^{2+} в кардиомиоцитах выше 1,5 мкМ сопровождается возникновением фибрилляции желудочков [Нарыжная, 2012].

В дальнейших исследованиях с использованием другого флюоресцентного Ca^{2+} -зонда Indo-1 обнаружена обратная зависимость между концентрацией ионов кальция и порогом фибрилляции желудочков.

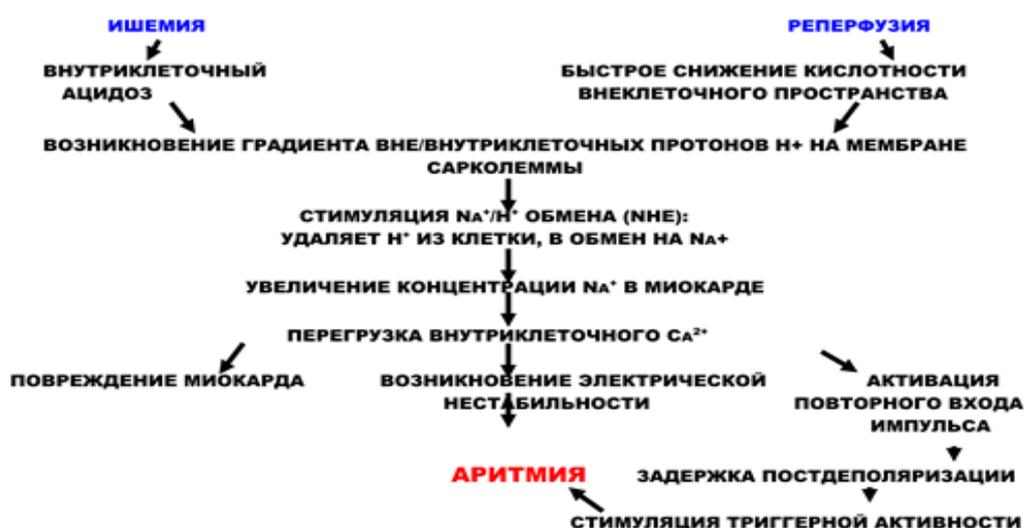


Рис. 1.5. Участие Na^+/H^+ обмена в механизмах развития аритмий [Спасов, 2013; Hashimoto, 2003].

Причиной этих изменений является то, что при высокой концентрации Ca^{2+} в кардиомиоцитах происходит спонтанный, необусловленный деполяризацией сарколеммы, выброс ионов из саркоплазматического ретикулума. Кроме того, перегрузка кардиомиоцитов кальцием может

способствовать замедлению проводимости биоэлектрических импульсов и возникновению аритмий по типу «re-entry» [Sánchez, 2011].

Таким образом, в условиях активации NHE происходит ионное и электрофизиологическое ремоделирование миокарда.

1.3.3. Na^+/H^+ обмен при сердечной недостаточности

NHE является мембранным гликопротеином, играющим ключевую роль в поддержании внутриклеточного pH, концентрации Na^+ и клеточного объема. Ранее было показано, что хроническая стимуляция β -адренергическим агонистом изопротеренолом (ИЗО), индуцирует гипертрофию сердца, сопровождающуюся повышенным фиброзом [Kitagawa, 2004; Takaki, 2004; Zhang, 2005; Nakajima-Takenaka, 2009], так же обнаружено, что хроническая стимуляция ИЗО вызывает диастолическую дисфункцию левого желудочка, связанную с нарушением Ca^{2+} обмена. Было установлено, что активация NHE, путем активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, ведет к нарушению регуляции обмена кальция, что играет существенную роль в развитии сердечной недостаточности [Хуе, 2010; Cingolani, 2011].

Многочисленные сигналы, активирующие гипертрофию, объединяются общим набором ядерных факторов, которые будут взаимодействовать так, чтобы активировать или угнетать транскрипцию определенных белковых генов сердца. Нарушения обмена ионов Na^+ считаются вторичными по отношению к активности NHE, и в дальнейшем сопровождаются изменениями концентрации ионов кальция, ведущих к диастолическим, систолическим и другим видам внутриклеточных дисфункций. Поэтому можно предположить, что если заблокировать данный механизм, то дальнейшие процессы будут происходить по нисходящему пути от ингибирования обменника до его антигипертрофического эффекта. Тем не менее, возможно, что ингибирование NHE-1 уменьшает образование активных форм кислорода (АФК), делая механизм более сложным, поскольку гипертрофический путь стремительно направлен на блокаду обменника.

Ингибирование NHE-1 у взрослых крыс со спонтанной гипертензией в течение 1 месяца сопровождалось регрессией гипертрофии сердца с нормализацией ядерного фактора активированных T-регуляторных клеток. Однако, это не единственный путь, участвующий в патологии миокарда. В развитии гипертрофии и ремоделировании миокарда важную роль играет миокардиальный стресс, включающий увеличение объёмной нагрузки и ЛЖД, острый инфаркт миокарда и другие факторы. При этом активизируются механические, нейрогуморальные и прогипертрофические сигналы, которые взаимодействуют между собой и запускают патогенетические процессы в сердце. К этим сигналам относятся MAP киназа [Takaki, 2004], серин-треонин киназа [Nakajima-Takenaka, 2009], кальциневрин (CNP), Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу II (CaMKII) [Kitagawa, 2004], инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), эндотелин-1, ангиотензин II [Li, 2011] (рис.1.6).

В литературе наиболее изучены влияния NHE-1 на механизмы формирования ИЗО-индуцированной гипертрофии миокарда [Takaki, 2004].

В частности ангиотензин II участвует в активации обменника с помощью p90 рибосомальной киназы s6 ($p90^{RSK}$), запуская Ca^{2+} -зависимый процесс путем протеинкиназы C (PKC) [Shibata, 2011]. Ангиотензин II связывается с G белком AT_1 (подтип рецептора ангиотензин 1) и инициирует внутриклеточную передачу сигнала через белок Gq (G-белок подтип q). Этот сигнальный каскад, включающий прогипертрофические факторы - кальмодулин и кальциневрин гомологичные белки (CAM и CNP), приводит к активации PKC и внеклеточно регулируемых киназ 1 и 2 (ERK 1/2). Фосфолипаза C (PLC) активирует генерацию вторичных мессенджеров - диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP_3), что способствует росту внутриклеточного кальция. Позднее усиливается продукция свободных радикалов и факторов транскрипции ведущих к гипертрофии миокарда (рис. 1.7).

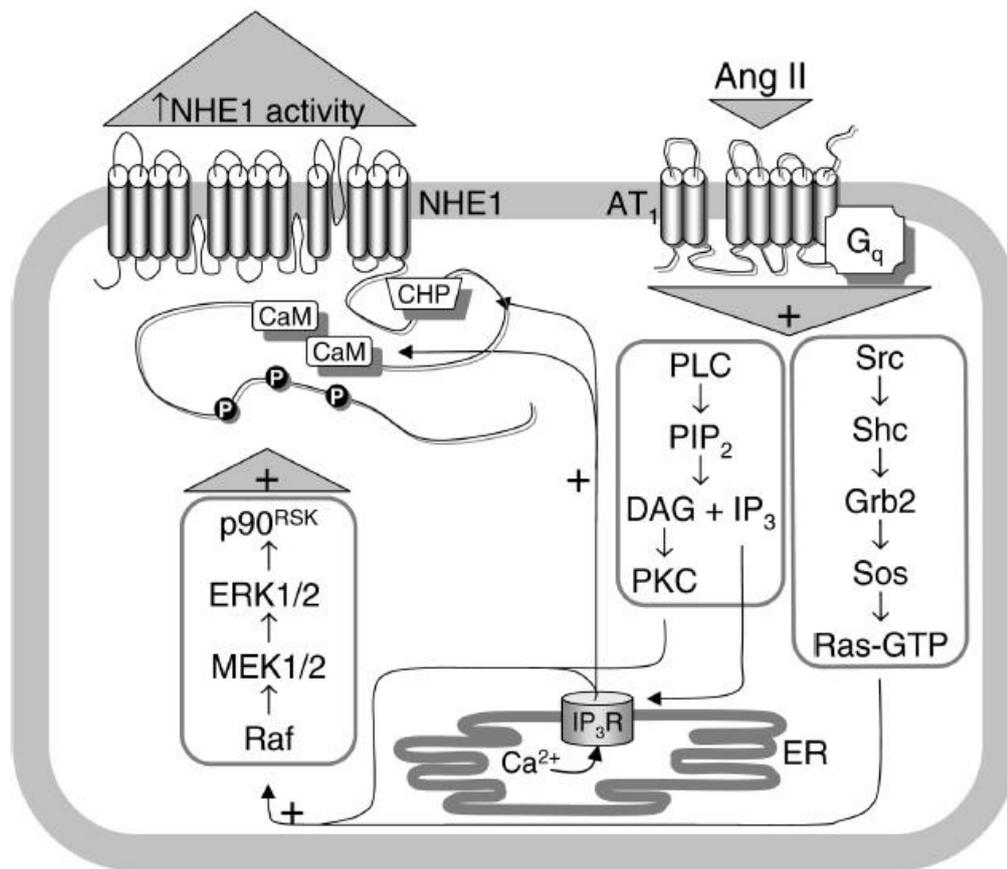


Рис. 1.6. Гипотетическая модель для рецептор-опосредованной активации NHE-1 [Shibata, 2011].

Обозначения: Анг II - ангиотензин II; AT₁ - подтип рецептора ангиотензин 1; CaM - кальмодулин; CHP - кальциневрин гомологичный белок; DAG - диацилглицерол; ERK - внеклеточно регулируемая киназа; Gq - G-белок подтип q; IP₃ - инозитолтрифосфат; IP₃R, IP₃ рецептор; MEK, MAP - киназы ERK; NHE-1 - Na⁺/H⁺ обменник изоформы 1; PIP₂, фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат; PLC - фосфолипаза C; PKC - протеинкиназа C; p90^{RSK} - p90 рибосомальная киназа s6.

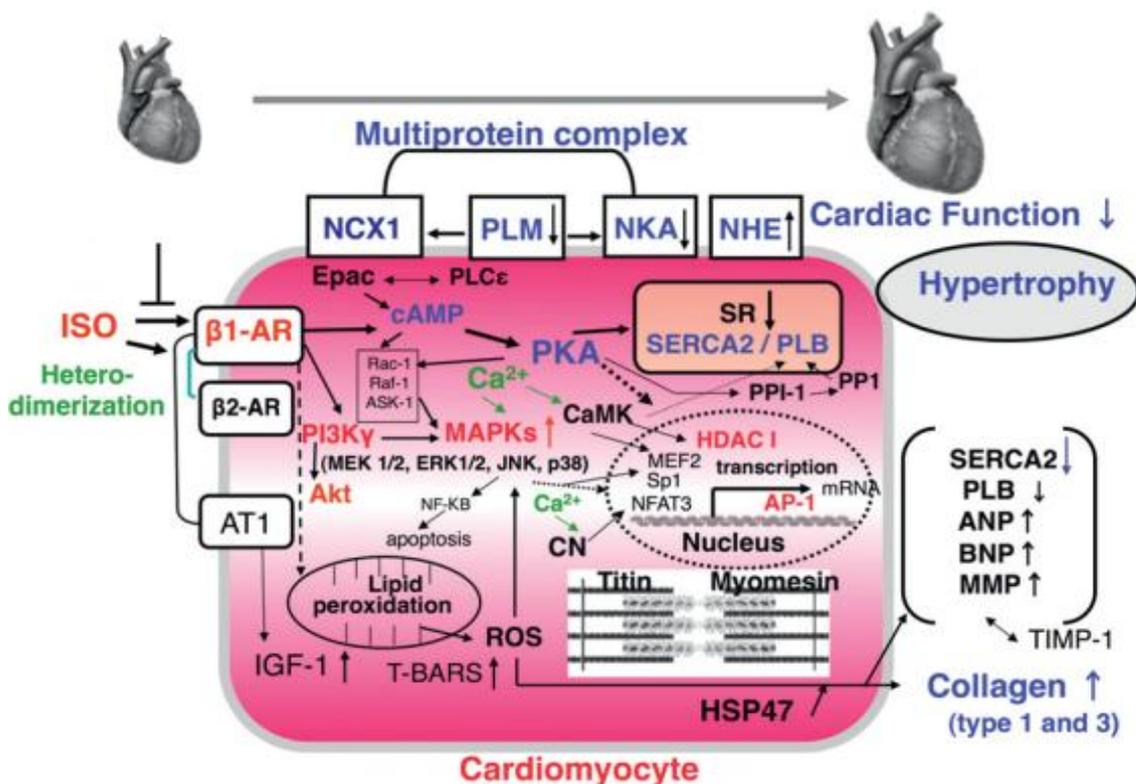


Рис. 1.7. Участие Na^+/H^+ обмена в возможных механизмах формирования изопроterenол–индуцированной гипертрофии миокарда [Takaki, 2004].

Обозначения: ISO - изопроterenол; AR – адренергический рецептор ; AT1 – ангиотензиновый рецептор 1; NCX1 - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник 1; PLM – фосфолемман; NKA – Na^+/K^+ обмен; NHE – Na^+/H^+ обмен; SR – саркоплазматический ретикулум; SERCA2 – Ca^{2+} АТФаза саркоплазматического ретикулума; PLB – фосфоламбан; PKA – протеин киназа А; PPI-1 – ингибитор протеин фосфатазы 1; PP1 – протеин фосфатаза 1; MAPKs – митоген активированная протеин киназа; CaMK – Ca^{2+} кальмодулин-зависимая киназа; CN – кальциневрин; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа класса IB; Akt – протеин киназа B; ROS – активные формы кислорода; T-BARS – реактивное вещество тиобарбитуровой кислоты; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; HDAC1 – гистон деацетилаза класса I; AP-1 – белок активатор-1; Epac – cAMP – регулирующий фактор обмена гуаниновых нуклеотидов; HSP47 – белок теплового шока 47.

Таким образом, активация NHE-1 приводит к морфологическому ремоделированию желудочков. Возникшее при ХСН ремоделирование желудочков связано с гипертрофией кардиомиоцитов, апоптозом и некрозом клеток, коллагеновой деградацией и интерстициальным фиброзом [Шляхто, 2005].

1.4. Ингибиторы Na^+/H^+ обменника - новый фармакологический класс кардиопротекторных средств

Основные принципы современной кардиопротекции направлены на сохранение коронарного кровотока, замедление ремоделирования камер сердца, повышение толерантности к повреждающему действию различных факторов [Зверев, 2003; Гурова, 2012; Karmazyn, 2013]. Среди новых подходов перспективным является использование соединений, влияющих на возникновение «ишемического прекондиционирования», своеобразной тренировки сердечной мышцы, увеличивающей ее адаптационные возможности к ишемии и реперфузии [Атрощенко, 2006; Галагудза, 2006]. Одной из таких групп являются ингибиторы NHE-1. Кардиопротекторное действие блокаторов NHE-1 связано с уменьшением повреждающего действия повышенной активации данного обменника [Lee1, 2009].

С целью уменьшения вредных последствий чрезмерной активации NHE-1, было разработано несколько ингибиторов, полученных с первоначальной целью обеспечить кардиопротекторное действие. Учитывая способность K^+ -сберегающего мочегонного средства - амилорида блокировать проводящие Na^+ каналы, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ и NHE-1 обменники, он стал первым препаратом, описанным как ингибитор NHE-1 [Benos, 1982].

Чтобы увеличить эффективность и селективность ингибиторов, направленных на NHE-1, были синтезированы и исследованы несколько молекул, полученных из амилорида. Используя реакцию двойного замещения азота в 5-аминогруппе, были получены производные пиразина (рис. 1.8). Данные соединения являются гораздо более эффективными, чем амилорид, но ингибирующее действие данных соединений оказалось не достаточно избирательным [Seferovic, 2008].

Соединения, в которых пиразиновый цикл амилорида был замещён на пиридиновый или фенильный, а гетероциклический азот располагался в мета положении ацилгуанидиновой группы, были в 54 и 36 раз активнее

соответственно, препарата сравнения в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах человека.

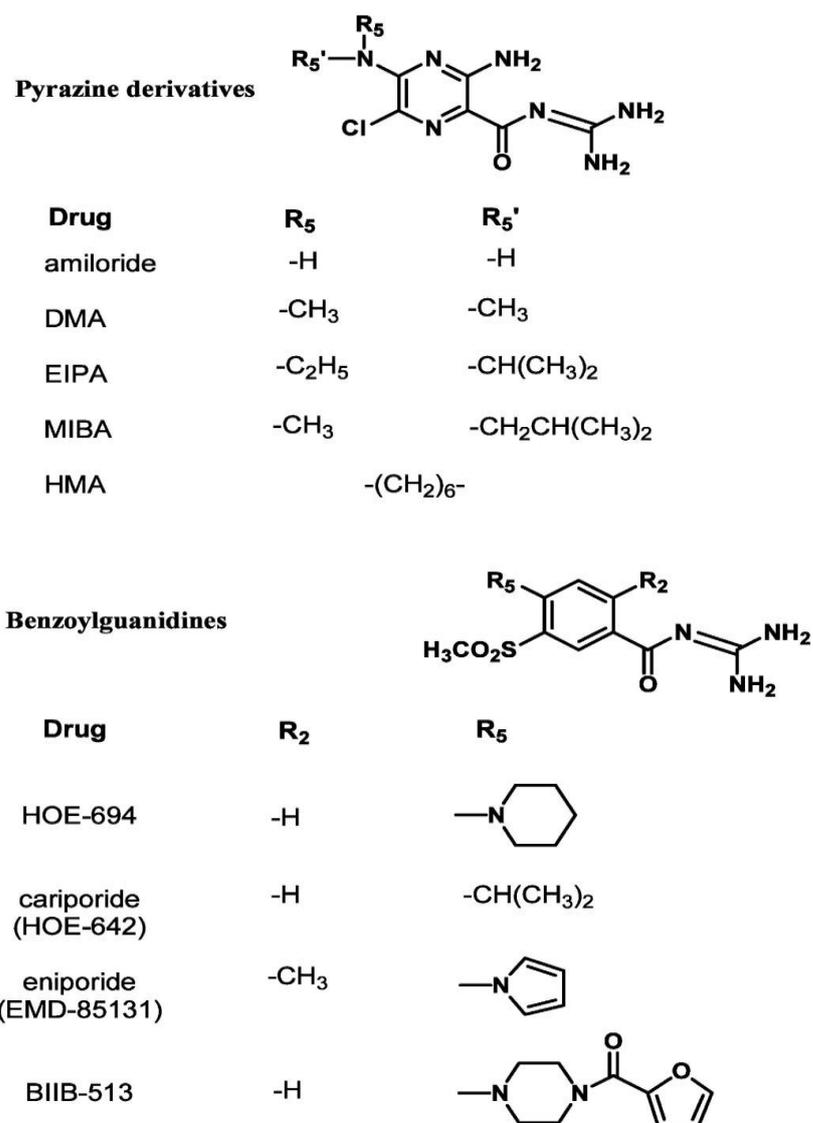


Рис. 1.8. Химическая структура амилорида и его пиразиновых и фенильных производных [Masereel, 2003].

Позднее были описаны соединения, в состав которых входят бензоилгуанидиновые производные, такие как: НОЕ-642 (карипорид), энипорид (EMD-85131), сабипорид (BIIB-722). Далее были найдены бициклические производные гуанидина, содержащие циклогептапиридин (TY-12533), бензоксазиносон (КБ-R9032), дигидробензофуран (BMS 284640),

индол (SM 20220, SM 20550, SMP-300), тетрагидронафтаден (T-162559), хинолин (зонипорид (CP-597396), MS 31038) и другие [Kim, 2007; Lee2, 2009; Li, 2011]. На рисунке 1.9 представлены химические структуры некоторых ингибиторов. В настоящее время появились данные о наличии способности ингибировать NHE-1 у производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, отличительной особенностью которых также является наличие гуанидиновой группы (рис. 1.10) [Zhang1, 2007].

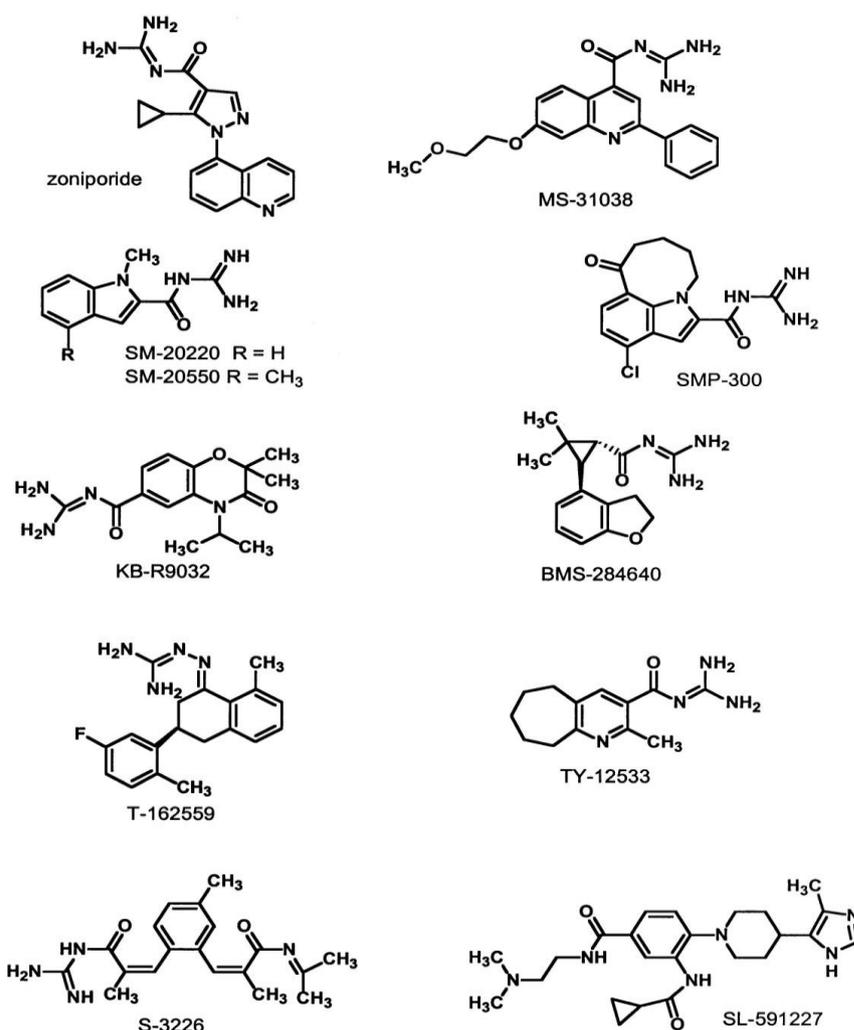
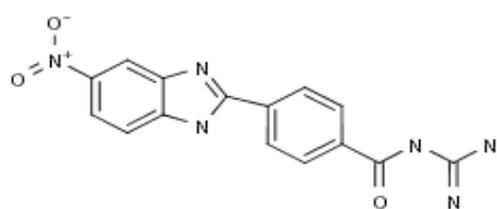
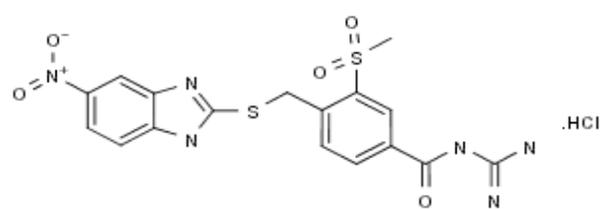


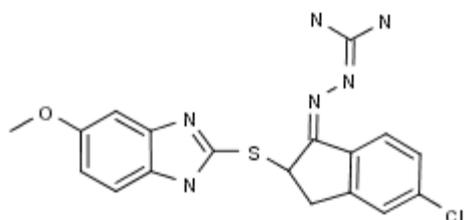
Рис. 1.9. Химическая структура известных NHE-1 ингибиторов [Masereel, 2003].



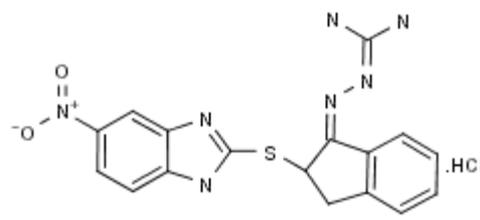
452945



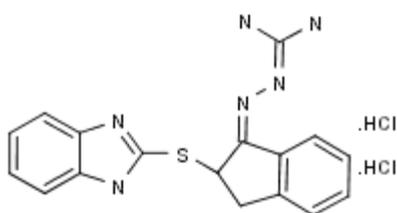
452946



672265



672271



672272

Рис. 1.10. Химические структуры некоторых производных неконденсированных бензимидазолов ингибиторов NHE-1 [Thomson Reuters Integrity, дата обращения 01.05.2011].

Исходя из теоретических предпосылок и предварительных экспериментальных данных, представлялось целесообразным провести поиск и изучение соответствующей активности среди новых производных циклических гуанидинов.

В ряде исследований показано, что ингибиторы NHE-1 способны предупреждать развитие аритмий, в особенности летально опасных фибрилляций желудочков, как при ишемии, так и во время реперфузии. Впервые было продемонстрировано, что включение НОЕ-694 в состав перфузата в период реперфузии снижает фибрилляции желудочков

изолированного сердца крысы после 15-минутной региональной ишемии. Сходный эффект на фибрилляции желудочков оказывало предишемическое введение НОЕ-694 на той же модели. Впоследствии другими авторами было подтверждено, что введение этого ингибитора перед ишемией и во время реперфузии оказывает такое же влияние на снижение фибрилляций желудочков, что и добавление его в перфузат только при реперфузии. Эти результаты показали, что активация NHE-1 на стадии реперфузии является наиболее важной для проявления антиаритмического эффекта ингибитора. Введение карипорида перед окклюзией коронарной артерии снижало частоту возникновения фибрилляций желудочков при ишемии и реперфузии у животных различных видов на моделях ишемического и реперфузионного стресса *in vivo* и *in vitro*. Анализ этих данных показывает, что эффект ингибиторов NHE-1 прямо не опосредован блокадой электрогенных ионных токов, как у классических антиаритмических препаратов [Hashimoto, 2003].

В литературе [Nanda, 2010] имеются подтверждения того, что ингибиторы NHE-1 способны улучшать восстановление сократительной функции как после относительно коротких (до 15–20 мин), так и длительных периодов ишемии, сопровождающихся при реперфузии развитием некроза. В случае ишемии короткой длительности эффективность защиты миокарда одинакова как при предишемическом введении ингибиторов обменника, так и при их введении на ранней стадии реперфузии. Эта закономерность была установлена на изолированном перфузируемом сердце и миокарде *in situ* у животных различных видов при использовании карипорида, НОЕ-694 и зонипорида [Oh, 2007; Zhang1, 2007].

Многokrатно подтвержденные в эксперименте кардиопротекторные свойства ингибиторов NHE-1 позволили начать клинические исследования. В соответствии с международной базой данных Thomson Reuters Integrity, клинические испытания начаты у 5 соединений (табл. 1.3).

Спектр клинического применения включает профилактику риска инфаркта миокарда у больных с нестабильной стенокардией; при проведении операций по замене аортального клапана; сохранение ультраструктуры и восстановление функции донорских сердец при использовании консервирующих растворов, при остром инфаркте миокарда с помощью ангиопластики.

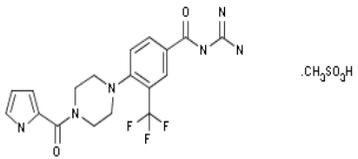
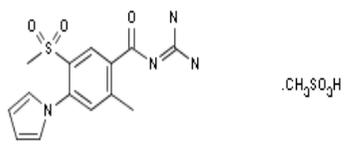
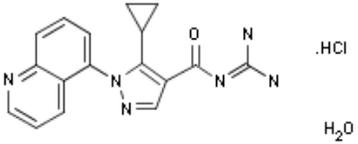
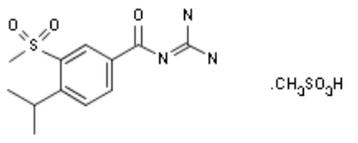
В настоящее время наиболее активным для селективного фармакологического ингибирования NHE-1 считается производное бензоилгуанидина - зонипорид [Tracey, 2003; Oh, 2007]. В экспериментальных и клинических исследованиях он улучшал восстановление сократительной функции левого желудочка, повышал скорость нарастания давления, восстанавливал аортальный выброс, снижал тяжесть желудочковых аритмий, ограничивал зону некроза [Спасов, 2013; Ayoub, 2007]. Однако в последнее время появились публикации о нейротоксическом действии зонипорида, что существенно ограничивало его применение.

1.5. Кардиопротекторные свойства производных бензимидазолов

Имеющиеся литературные данные [Анисимова, 1987; Гурова, 2011, 2012, 2014] позволяют высказать предположение, что производные бензимидазола проявляют свойства кардиопротекции: противоишемические, антифибрилляторные, метаболические и антигипоксические.

В частности, в экспериментальных исследованиях Спасова (1983) на собаках с ишемией по Harris (1956) было показано, что наибольшей противоаритмической активностью обладает соединение, содержащее гуанидиновую группу: дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-третичнобутилимидазо(1,2-*a*)бензимидазол – ритмидазол (соединение РУ-36); помимо этого данное соединение увеличивало скорость оттока крови из коронарного синуса и ограничивало зону повреждения миокарда при коронарной окклюзии. Азотнокислая соль 3,4-диметоксифенил

Ингибиторы NHE-1 в стадии клинических исследований [Спасов, 2013].

№	Препарат	Химическая структура	Фирма-разработчик	Клинические испытания		Предполагаемая терапевтическая группа
				фаза	нозоология	
1.	Сабипорид (ВПВ-722)		Boehringer Ingelheim	I	Стенокардия	Средство для лечения стенокардии. Антиаритмический препарат. Кардиопротектор.
2.	EMR-62204	-	Merck KGaA	II	Сердечная недостаточность	Средство для лечения сердечной недостаточности
3.	Энипорид (EMD-96785, YM-103, EMD-85131)		Merck KGaA	II*	Инфаркт миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда
			Astellas Pharma	II*	Инфаркт миокарда	
4.	Зонипорид (CP-597396, EMD-392426)		Pfizer	III	Ишемия миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда, заболеваний коронарных артерий и атеросклероза
5.	Карипорид (Ное-642)		Sanofi-aventis	III	Инфаркт миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда. Средство, применяемое при проведении коронарного шунтирования
				III*	Коронарное шунтирование	

* - исследования приостановлены.

9-диэтиламиноэтил имидазо(1,2-*a*) бензимидазола (соединение РУ-180) показало наиболее позитивное влияние на устойчивость миокарда к гипоксии (ограничивало повреждение миокарда при недостатке кислорода вследствие новодриновой интоксикации и коронарной окклюзии). Наибольшее адаптогенное действие оказывал дигидробромид 9-диэтиламиноэтил-2-пара-оксифенилимидазо(1,2-*a*)бензимидазол (соединение РУ-85), за счёт стресс-регулирующего влияния, которое заключалось в стабилизации систем энергопродукции на уровне клеток и как следствие снижение напряжения общего адаптационного синдрома. Данное соединение препятствовало нарушению ритма при хлоридкальциевой и оубаиновой интоксикации, снижало размер зоны некроза миокарда при новодриновой интоксикации и коронарной окклюзии.

В исследованиях Панченко (1990) наиболее выраженная антиоксидантная активность при аскорбатиндуцированном перекисном окислении липидов обнаружена у дигидробромида 2-(3,4 диоксифенил)-9-диэтиламиноэтил имидазо(1,2-*a*) бензимидазола (соединение РУ-185) и дигидрохлорида 2-(4-хлорфенил)-1-диэтиламиноэтил имидазо(1,2-*a*) бензимидазола (соединение РУ-596). Соединения РУ-596, РУ-185 превосходили по степени ингибирования перекисного окисления антиоксидантное средство ионол в 3,1 и 2,6 раз соответственно. На кошках по Shatney (1976) у соединения РУ-185 установлено кардиопротекторное действие, связанное с ограничением зоны некроза на 15% при экспериментальном инфаркте.

В экспериментах Грецкой (1987) и Гуровой (1998) у производного N₁ имидазо (1,2-*a*) бензимидазола (соединение РУ-353) – амфедазола на кошках по методу Генштейна (1981) были выявлены противofiбрилляторные свойства: снижение частоты навязанного ритма и увеличение порога электрических fiбрилляции желудочков. В терапевтических дозах соединение РУ-353 не оказывало общетоксикологических и специфических

кардиотоксических эффектов. Таким образом, на основании приведенных литературных данных установлено, что данные структуры, содержащие встроенную гуанидиновую группу, могут быть перспективными в плане поиска соединений с кардиопротекторными свойствами.

1.6. Заключение

Важной проблемой клинической практики является защита миокарда от неблагоприятных эффектов: ацидоза, гипоксии, ишемии, нарушений ритма, сердечной недостаточности. Однако вопросы кардиопротекции до сих пор остаются не решенными.

Одним из новых подходов является прекондиционирование - метаболическая адаптация миокарда к ишемии, развивающаяся после повторяющихся кратковременных эпизодов снижения доставки кислорода тканям миокарда и приводящая к повышению устойчивости мышцы сердца к последующей более длительной ишемической атаке. Ишемическое прекондиционирование тесно связано с фармакологическим к которому относятся ингибиторы NHE-1. Наиболее активно эта группа изучалась зарубежными авторами [Fliegel, 2009; Luo, 2010; Karmazyn, 2013; Xu, 2015]. Основные положительные эффекты ингибиторов NHE-1 на ишемизированный миокард в экспериментальных и клинических исследованиях связаны с улучшением восстановления сократительной функции левого желудочка после реперфузии; сокращением зоны ишемии и некроза; уменьшением выраженности нарушения ионного гомеостаза, сопровождающего ишемию/реперфузию; редуцированием апоптоза, снижением частоты возникновения и тяжести аритмий, вызванных ишемией/реперфузией и угнетением прогипертрофических факторов при сердечной недостаточности.

Среди ингибиторов NHE-1 в соответствии с международной базой данных Thomson Reuters Integrity известно 259 веществ, содержащих свободные и циклические гуанидиновые группы. Пять из этих соединений

дошли до клинических испытаний. Кроме того, кардиопротекторные свойства найдены у конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов, содержащих встроенную гуанидиновую группу – соединение РУ-36 (противоаритмическая активность), соединение РУ-180 (противогипоксическая активность), соединение РУ-85 (адаптогенное действие), соединение РУ-353 (антифибрилляторный эффект), соединение РУ-185 (антиоксидантное действие).

Таким образом, на основании приведенных данных актуальным является поиск ингибиторов NHE-1. В качестве одного из возможных субстратов этого действия на основании литературных данных можно предполагать эффекты циклических производных бензимидазола и 2-аминобензимидазола, содержащих встроенную гуанидиновую группу.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований

Все исследования выполнены согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [2012].

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правил лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года. Забой животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). Острую токсичность соединений исследовали в соответствии с требованиями по проведению доклинических испытаний [Арзамасцев, 2012]. Для поиска соединений, обладающих кардиопротекторной активностью, были использованы методы, предназначенные для экспериментальных исследований и компьютерной обработки информации.

2.2. Перечень используемых реактивов и веществ

Реактивы: натрия пропионат (MP Biomedicals, Inc., Франция), NERES (GERBU, Германия), кальций хлористый 2-х-водный (дигидрат) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), магний хлористый 6-водный «ч» $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ЗАО «УНИХИМ», Россия), D-глюкоза (безводная) кристаллическая «ч» $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), натрий хлористый «ХЧ» NaCl (ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия), калий хлористый «ЧДА» KCl (ООО «РЕАХИМ», Россия), калий фосфорнокислый однозамещённый KH_2PO_4 «ЧДА» (ОАО

«Петербургский Красный химик», Россия), магний сернистокислый 7-водный $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (ООО «РЕАХИМ», Россия), гидрокарбонат натрия $NaHCO_3$ (ООО «РЕАХИМ», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), ортофосфорная кислота (Реахим, Россия), тиобарбитуровая кислота (ICN Biomedicals, США), этанол 96°, гепарин (Гедеон Рихтер, Венгрия), хлоралгидрат («Panreac», Barcelona), бутанол (Реахим, Россия), изопротеренол (SIGMA, США), 10% забуференный нейтральный формалин (ООО «МоДиТех, Казань»), гомогенизированная парафиновая среда (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург). *Красители:* Синий Эванс (SIGMA, США) и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (SIGMA, США), окраска по Массону (ООО «МоДиТех», Казань), гематоксилин и эозин (ООО «МоДиТех», Казань). *Наборы:* набор реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (CUSABIOBIOTECHCO., LTD. Китай).

Изучены 26 веществ под лабораторными шифрами «РУ», содержащих встроенную гуанидиновую группу, из которых 3 относятся к производным 2,3-дигидро- N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 соединения – к производным N^1 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 соединения – к производным N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 15 соединений – к производным 2-аминобензимидазола (табл. 2.1). Исследуемые вещества синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой².

²Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

Таблица 2.1

Химические структуры изучаемых соединений

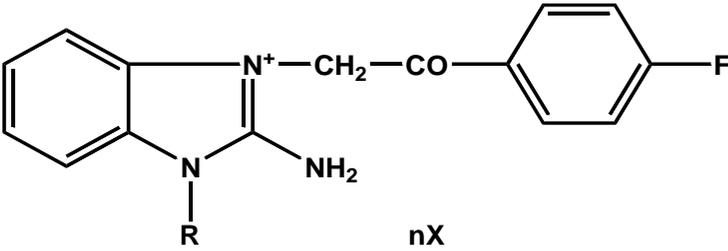
№	Шифр соединения	R	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
I. Производные 2-аминобензимидазола Иа. 1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия					
					
1	ПУ-1361	CH ₃	Br ⁻	C ₆ H ₁₅ BrFN ₃ O	364,24
2	ПУ-1362	C ₂ H ₅	Br ⁻	C ₁₇ H ₁₇ BrFN ₃ O	378,27
3	ПУ-1363	C ₃ H ₅	Br ⁻	C ₁₈ H ₁₇ BrFN ₃ O	390,28
4	ПУ-1364	C ₃ H ₇	Br ⁻	C ₁₈ H ₁₉ BrFN ₃ O	392,29
5	ПУ-1365	C ₄ H ₉	Br ⁻	C ₁₉ H ₂₁ BrFN ₃ O	406,32
6	ПУ-1366	CH ₂ C ₆ H ₅	Br ⁻	C ₂₂ H ₁₉ BrFN ₃ O	440,34
7	ПУ-1369	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Br ⁻	C ₁₉ H ₂₂ BrFN ₄ O	421,33
8	ПУ-1370	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	Br ⁻	C ₂₀ H ₂₄ BrFN ₄ O	435,36
9	ПУ-1390	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Br ⁻	C ₂₁ H ₂₆ BrFN ₄ O	449,39
10	ПУ-1199	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	Br ⁻	C ₂₂ H ₂₆ BrFN ₄ O	461,39
11	ПУ-1200	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Br ⁻	C ₂₁ H ₂₄ BrFN ₄ O ₂	463,37
12	ПУ-1355	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Cl ⁻	C ₂₁ H ₂₄ ClFN ₄ O ₂	418,90

Таблица 2.1 (продолжение)

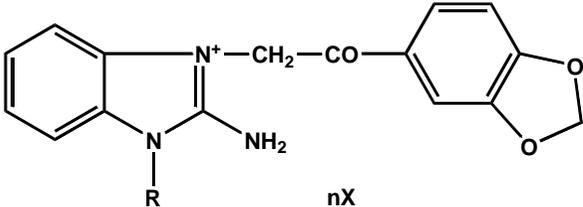
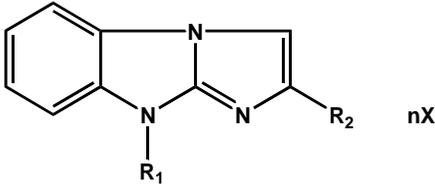
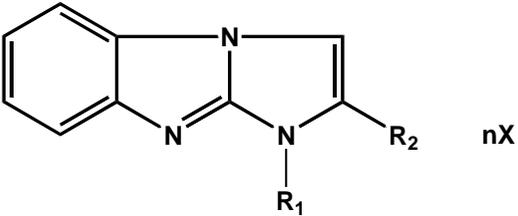
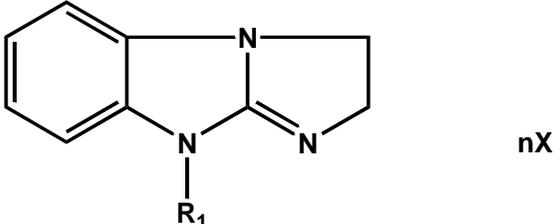
№	Шифр соединения	R	nX	Брутто формула	Молекулярный вес	
Ив. 1-замещенные 2-амино-3-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия						
						
13	ПУ-1183	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Br^-	$\text{C}_6\text{H}_{15} \text{BrFN}_3\text{O}$	475,30	
14	ПУ-1184	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	Br^-	$\text{C}_{17}\text{H}_{17} \text{BrFN}_3\text{O}$	487,30	
15	ПУ-1185	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$	Br^-	$\text{C}_{18}\text{H}_{17} \text{BrFN}_3\text{O}$	489,30	
II. Производные N⁹-имидазо[1,2-a]бензимидазола						
						
16	ПУ-17	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	C_6H_5	2HCl	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_4$	417,30
17	ПУ-64	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	C_6H_5	2HNO ₃	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_6$	458,40
18	ПУ-1204	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	Br	2HCl	$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{FN}_4$	435,30
19	ПУ-1205	$(\text{CH}_2)_2 \text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	Br	2HCl	$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}$	437,30

Таблица 2.1 (продолжение)

№	Шифр соединения	R ₁	R ₂	nX	Брутто формула	Молекулярный вес
III. Производные N¹-имидазо[1,2-a]бензимидазола						
						
20	ПУ-602	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	C ₆ H ₄ OH	2HCl*2H ₂ O	C ₂₂ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₂	451,30
21	ПУ-606	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	C ₆ H ₅	2HCl	C ₂₂ H ₂₆ Cl ₂ N ₄ O	451,80
22	ПУ-354	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	C ₆ H ₅	2HCl	C ₂₂ H ₂₆ Cl ₂ N ₄	417,30
23	ПУ-355	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Br	2HCl	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ N ₄ O	419,30
IV. Производные 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-a]бензимидазола						
						
24	ПУ-255	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	2HCl	C ₆ H ₁₅ BrFN ₃ O	342,20	
25	ПУ-254	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	2HCl	C ₁₇ H ₁₇ BrFN ₃ O	331,20	
26	ПУ-283	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	2HCl	C ₁₈ H ₁₇ BrFN ₃ O	345,20	

2.3. Список использованного программного обеспечения

Программный комплекс «Микрокосм» 4.2 (Россия), ChemDraw Ultra 8.0 (США), Adobe Photoshop 4.0 (США), компьютерная программа Image J 1.46r (США), программа Excel из пакета Office XP (Microsoft, США), компьютерный гемодинамический анализатор на базе программы BEAT (Москва, Россия), программа AGGR версия 2.00 (Россия), программное обеспечение «Поли-Спектр» с подключенным программным модулем «Поли-Спектр-Анализ/В» (Россия).

2.4. Экспериментальные животные

Опыты проводили на 162 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г и 76 белых неинбредных мышах обоего пола массой 17-36 г, 25 кроликах самцах, породы шиншилла весом 2,5-3,5 кг, содержащихся в условиях вивария (температура 22-24°C), с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92). На момент проведения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования. (Ветеринарное свидетельство 247 № 0077561 от 02.03.2012 г., поставщик ФГУП «Питомник лабораторных животных» «Рапполово» (крысы); 247 № 0111207 от 18.12.2013 г., поставщик ФГУП «Питомник лабораторных животных» «Рапполово» (крысы, мыши); 250 № 042261 от 17.12.2012 г., поставщик ФГУП «Питомник лабораторных животных» «Рапполово» (крысы); 250 № 0309472 от 08.04.2012 г., поставщик ФГУП «Питомник лабораторных животных» «Рапполово» (крысы, мыши); 250 № 0380791 от 14.01.2013 г., поставщик ФГБУ НЦБМТ РАМН (кролики).

2.5. Методы поиска ингибиторов NHE-1 *in vitro*

Изучение влияния соединений проведено по методу [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002], основанному на оценке степени светопропускания при изменении формы тромбоцитов, модифицированному [Гурова, 2011].

Образцы крови забирали из краевой вены уха кролика (n=25) в пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия, в соотношении 1:10. Для

получения плазмы богатой тромбоцитами (ПБогТ) кровь центрифугировали на центрифуге Multi centrifuge CM 6M (Латвия) при 1000 оборотах в минуту в течение 12 минут. В контрольной серии экспериментов к 200 мкл ПБогТ для снижения внутриклеточного рН добавляли 600 мкл раствора пропионата натрия (в ммоль/л: Na пропионат 135, HEPES 20, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, глюкоза 10; рН 6.7; t=37⁰С). Происходила активация NHE-1, увеличивался приток натрия, связанный с выделением цитозольного Н⁺, ведущий к отеку (сферуляции) тромбоцита в результате аккумуляции воды в цитоплазме. При этом наблюдалось облегчение светопропускания. Для контроля изменения светопропускания в условиях нормальной рН использовали раствор Кребса (600 мкл, в ммоль/л: NaCl – 120, KCl – 4,8, КН₂РO₄ – 1,2, MgSO₄ – 2,5, NaHCO₃ – 25, CaCl₂ – 2,6, глюкоза – 5,4; рН 7,4; t=37⁰С).

Изменения формы тромбоцитов регистрировали по уровня светопропускания с помощью лазерного агрегометра «БИОЛА-220LA НПФ», Россия.

Исследуемые соединения в объеме 10 мкл добавляли в кювету с ПБогТ (200 мкл) за 5 минут до добавления раствора пропионата натрия, инкубировали при температуре 37⁰С и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (1000 оборотов в минуту). Соединения и препарат сравнения изучали в диапазоне концентраций 10⁻¹¹–10⁻⁶ Моль/л.

В качестве препарата сравнения был выбран селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (SIGMA, США) [Ayoub, 2007].

Рассчитывали эффективную концентрацию (EC₅₀), с помощью регрессионного анализа зависимости между log концентрации и активностью обменника. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. (StatSoft, США) и Excel 2007 (MS Office XP, США).

2.6. Методы QSAR-анализа

Методы исследования количественной связи между химической

структурой веществ и их биологической активностью – QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), основаны на описании структуры соединения с помощью набора числовых характеристик и построении корреляций между величиной активности и их значениями [Baskin, 1997; Zefirov, 2002].

В настоящей работе использована традиционная фрагментация структурных формул соединений на базовую структуру и присоединенные к ней отдельные заместители, позволяющая достаточно просто выявлять эмпирические QSAR-закономерности.

2.6.1. Среднее и супремальное оценивание перспективности химических классов

В соответствии с моделью Фри-Уилсона [Голендер, 1978], итоговая биологическая активность соединения складывается из активности базовой химической структуры и присоединенных к ней заместителей. Влияние заместителей может быть как положительным, так и отрицательным. Поэтому вклад базовой структуры в общую биологическую активность соединения может быть представлен через любую среднюю оценку (медиана, мода, средние арифметическое, геометрическое или гармоническое) активности исследуемых веществ. Чаще всего в качестве такой оценки используется среднее арифметическое

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^N X_i \quad (1).$$

Второй составляющей в общей биологической активности соединения является суммарный вклад в эту активность заместителей, присоединенных к базовой химической структуре. Чем лабильнее основная химическая структура в отношении введения в нее заместителей, усиливающих или ослабляющих активность соединения, тем больше будет дисперсия фармакологической активности в ряду исследуемых веществ.

Таким образом, в качестве меры отклика базовой структуры на усиление или ослабление ее активности могут быть использованы любые

вариационные характеристики, известные в математической статистике – дисперсия, вариационный полуразмах, среднеквадратичная ошибка, максимальное или минимальное значения и т.п. Поскольку фармакологов интересуют прежде всего высокоактивные соединения, то для оценки перспективности анализируемого класса, с точки зрения усиления активности базовой структуры, имеет смысл рассматривать супремальные оценки ряда, т.е. оценки, отражающие максимальные значения показателя фармакологической активности. Наиболее естественным способом оценки вариационного разнообразия в данном случае является функция максимума

$$\sup (X) = \max_{i=1}^N (X_i) \quad (2),$$

которая при увеличении объема выборки асимптотически приближается к супремуму функции, описывающей зависимость «структур – активность».

Таким образом, для оценки перспективности заданного химического класса как источника веществ с высокой NHE-1-ингибирующей активностью можно использовать оценку вклада базовой структуры в виде среднего арифметического всех значений фармакологической активности. Степень влияния на базовую структуру вводимых в нее заместителей, усиливающих активность соединения, отражает максимальное значение среди всех полученных величин биологической активности.

2.6.2. Методы расчета физико-химических параметров

С целью выявления зависимости степени NHE-1 ингибирующей активности производных циклических гуанидинов от их физико-химических свойств для соединений в форме основания (без учета кислотного остатка) рассчитывали липофильные и стерические параметры – для всей структуры в целом и для отдельных заместителей R₁ и R₂ (см. табл. 2.1).

Показатели липофильности в виде логарифма коэффициента распределения в системе «октанол – вода» log P вычислялись с применением

различных схем фрагментного приближения [Vellarkad, 1989]. Липофильность является важным параметром для суждения о транспортных возможностях соединений в биологических объектах [Раевский, 2006].

В качестве стерического параметра использовалась молекулярная рефракция MR, значения которой рассчитывались с использованием классической аддитивной схемы в различных модификациях [Arup, 1987]. Молекулярная рефракция отражает степень поляризуемости молекулы в электрическом поле – чем больше молекула, тем сильнее она поляризуется.

2.6.3. Корреляционный анализ

Меру линейной зависимости двух переменных X и Y отражает коэффициент корреляции Пирсона (3)

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (3),$$

где N – число наблюдений;

X_i, Y_i – значения переменных X и Y для i -го наблюдения, $i = 1, \dots, N$;

\bar{X}, \bar{Y} – средние значения переменных X и Y .

Величина R изменяется от -1 до +1, отрицательный знак означает обратную, а положительный – прямую линейные зависимости. Фактически корреляционный анализ представляет собой однопараметровый регрессионный анализ, так как в нем в качестве независимой выступает только одна переменная³. Коэффициент корреляции Пирсона представляет собой статистику, основанную на дисперсионных метриках, поэтому для оценки его статистической значимости используется критерий Фишера F . Линейная зависимость двух переменных считается статистически достоверной, если величина коэффициента корреляции соответствует значению $p < 0,05$. По смыслу формулы (3), показатель R отражает ту часть

³Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым, за что выражаем благодарность и глубокую признательность

общей суммы квадратов отклонений переменных X и Y от их средних значений, которая объясняется регрессией. Квадрат коэффициента корреляции Пирсона может быть интерпретирован как процент наблюдений, которые успешно предсказываются с помощью полученной регрессионной зависимости и значения Y для которых не выходят за пределы доверительного интервала регрессионного уравнения.

2.6.4. Множественный пошаговый регрессионный анализ

Для анализа многопараметровой зависимости между ингибирующей активностью и физико-химическими параметрами производных циклических гуанидинов мы использовали процедуру множественного пошагового регрессионного анализа, с отбором значимых переменных в режиме обратного отжига. Множественный регрессионный анализ в качестве предиктора рассматривает одновременно несколько переменных и тем самым учитывает их совокупное влияние на биологическую активность.

Общий вид уравнения регрессии задается следующей формулой

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^M a_i X_i \quad (4),$$

p_i

N R s $F(\gamma_1, \gamma_2)$ p

где Y – зависимая переменная;

X_i – независимые переменные, $i = 1, \dots, M$;

M – число независимых переменных;

a_0 – свободный член регрессионного уравнения;

a_i – регрессионные коэффициенты перед независимыми переменными,
 $i = 1, \dots, M$;

p_i – статистическая значимость регрессионных коэффициентов,
 $i = 1, \dots, M$;

N – число наблюдений;

R – коэффициент множественной корреляции;

s – стандартная ошибка уравнения регрессии;

$F(\gamma_1, \gamma_2)$ – критерий Фишера с γ_1, γ_2 степенями свободы;

p – статистическая значимость уравнения регрессии.

При использовании процедуры обратного отжига сначала все независимые переменные включаются в общее регрессионное уравнение, где зависимой переменной Y является биологическая активность, а независимыми переменными X_i – все физико-химические параметры, с соответствующими весовыми коэффициентами a_i . Затем программа проводит анализ значимости каждой из переменных, входящих в полученное уравнение (с учетом их влияния друг на друга) и исключает из уравнения наименее значимую переменную, имеющую максимальное значение величины p_i . Данная селекция продолжается итеративно до тех пор, пока все входящие в регрессионное уравнение независимые переменные не будут значимыми, т.е. имеющими $p_i < 0,05$.

В итоговое регрессионное уравнение входит свободный член a_0 (являющийся константой) и весовые коэффициенты a_i перед независимыми переменными, отражающие вклад каждого физико-химического параметра в общую величину биологической активности.

Под каждой независимой переменной в регрессионном уравнении указана ее значимость p_i , характеризующая достоверность влияния данного параметра на биологическую активность, она должна быть меньше 0,05.

Построение регрессионных зависимостей выполняли отдельно для каждого из четырех показателей ННЭ-1 ингибирующей активности:

$$|\Delta(10^{-8})|, |\Delta(10^{-7})|, |\Delta(10^{-6})| \text{ и } \log(1/EC_{50}).$$

Из всех значимых регрессионных уравнений, полученных для разных показателей ННЭ-1 ингибирующей активности, выбирали лучшее, с максимальным значением коэффициента множественной корреляции R .

2.7. Методы изучения кардиопротекторных свойств *in vivo*

2.7.1. Исследование противоишемической активности

Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями к доклиническим испытаниям по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств [Чичканов, 2008].

Кардиопротекторные свойства были изучены на модели длительной ишемии/реперфузии на крысах-самках (n=38), массой 260-300 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 - «ложнооперированные» - животным проводили весь комплекс операций, кроме перевязки левой коронарной артерии (n=9); 2 – «контроль-ишемия/реперфузия» - животным с перевязкой левой коронарной артерии вводили физиологический раствор (n=9); 3 – «ишемия/реперфузия+зонипорид» - животным с перевязкой левой коронарной артерии внутривенно вводили зонипорид (1 мг/кг⁴ (n=10); 4 – «ишемия/реперфузия+PY-1355» животным с перевязкой левой коронарной артерии вводили изучаемое соединение (1,2 мг/кг, доза эквимольная зонипориду) (n=10). Все исследуемые соединения вводили внутривенно за 10 минут до реперфузии.

Исследования проводили при искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии. В качестве анестезии использовали внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. Ишемию миокарда воспроизводили путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА). Продолжительность ишемии и реперфузии составляла по 60 минут.

Визуализацию зон риска и ишемии проводили с помощью окрашивания Синим Эвансом (СЭ) и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) [Сыренский, 2008]. После завершения реперфузии вокруг коронарной артерии вновь затягивали лигатура и внутривенно вводили 0,5 мл 5%-го

⁴Доза определена в соответствии с литературными данными [Clements-Jewery, 2004]

раствора синего Эванса. После визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами, сердце быстро удаляли и разрезали в поперечном направлении на пять фрагментов одинаковой толщины (1 мм) с помощью матрицы Alto, США. Базальные поверхности фотографировали цифровым фотоаппаратом Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels (Япония) для последующего определения площади зоны риска (Эванс–негативные участки) и неишемизированного миокарда (Эванс–позитивные участки). Расчет площадей осуществляли на компьютере с помощью программы Image J. Общий объем зоны риска для данного сердца вычисляли путем умножения площади Эванс–негативного участка каждого среза на его толщину и суммирования полученных по пяти срезам значений. Затем срезы сердца на 5 минут помещали в 1%-ный раствор TTC при температуре инкубации 37°C. После инкубации с TTC изображения базальных поверхностей срезов фотографировали повторно и рассчитывали площади зоны инфаркта (TTC–негативные участки, находящиеся в пределах зоны риска). Затем таким же способом, как и в случае зоны риска, вычисляли общий объем зоны инфаркта для данного сердца. Размеры зон риска и инфаркта представляли в виде отношения объема зоны риска к объему сердца, а также в виде отношения объема зоны инфаркта к объему зоны риска в процентах.

Развитие ишемического повреждения анализировали по электрокардиограмме (ЭКГ).

В качестве маркера повреждения миокарда иммунохимически определяли содержание тропонина I в сыворотке крови крыс набором реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (cTn-I) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США). Содержание тропонина I выражали в пкг/мл плазмы.

2.7.2. Определение антиаритмической активности

Антиаритмические свойства изучали на модели длительной 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией на крысах-самках (n=28), массой 260-300 г. Операционные вмешательства, деление животных на группы описаны в разделе 2.7.1.

Препарат сравнения зонипорид и соединение РУ-1355 вводили в эквимолярных дозах 1 и 1,12 мг/кг соответственно, за пять минут до ишемии внутривенно. Тяжесть аритмий оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов - нет нарушений ритма; 1 - единичные экстрасистолы, синусовые тахи- и брадикардии; 2 - множественные экстрасистолы, блокады; 3 – пароксизмальная тахикардия, электромеханическая диссоциация; 4 – фибрилляция, асистолия [Цорин, 2004].

Изучение антифибрилляторной активности проводили при кратковременной ишемии/реперфузии на крысах-самцах (n=42), массой 380-450 г в соответствии с руководством по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств [Галенко-Ярошевский, 2012].

Исследования проводили под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг, внутрибрюшинно) в условиях искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии. Лигатуру подводили под общим стволом левой коронарной артерии (2 мм от края левого ушка предсердия). Ишемию проводили в течение семи минут с последующей пяти минутной реперфузией. Все исследуемые соединения вводили за 5 минут до ишемии внутривенно.

Препарат сравнения – зонипорид вводили в дозе 1 мг/кг. Соединение РУ-1355 изучали в дозе 1,12; 2,5 и 5,0 мг/кг. Рассчитывали ED_{50} с помощью программы «Graph.Pad.Prism.5.0», США.

Наличие ишемии оценивали по изменению глубины зубца Q и подъему сегмента ST.

Наличие лечебного действия оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов - нет лечебного действия; 1 – наличие лечебного действия.

Влияние на порог фибрилляций⁵ оценивали у анестезированных (уретан, 1300 мг/кг, в/в) беспородных крысах-самцах массой тела 350-450 г (n=18). Соединение РУ-1355 и зонипорид вводили в дозах 1,25 и 1 мг/кг соответственно, внутривенно (однократно). Исследования проводили при искусственной вентиляции легких, стернэктомии, перикардотомии. В миокард левого желудочка имплантировали два электрода на расстоянии 0,5 см друг от друга. Порог электрической фибрилляции сердца определяли повторяющимся сканированием уязвимого периода сердечного цикла серией из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности (длительность стимула - 4 мсек, частота - 50 имп/сек). Минимальную силу тока, вызывающую при двукратном повторении фибрилляцию желудочков, принимали за порог фибрилляции. В расчет брали животных, у которых фибрилляция желудочков наступала при силе тока не более 6 мА. В работе использовали электростимулятор HSE Stimulator II (Hugo Sach Elektronik, Германия). Проводили регистрацию ЭКГ во II стандартном отведении электрокардиографом ЭК 4Т-02 (Россия). Визуальный контроль, регистрируемых параметров проводили 4-канальным осциллоскопом фирмы Elema-Siemens (Швеция) в течение всего эксперимента.

Изучали влияние исследуемых соединений на параметры ЭКГ (зубцы и комплексы P, PQ, QRS, QT, R, интервал RR), у крыс-самок (n=12, массой 22-250 г), через 5 минут после введения исследуемых соединений. Препарат сравнения зонипорид в дозе 1 мг/кг и соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг вводили внутривенно однократно.

⁵Исследования проводились совместно со старшим преподавателем кафедры фармакологии ВолгГМУ к.м.н. Н.А. Гуровой.

Регистрацию электрокардиограммы производили на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия) во II стандартном отведении.

2.7.3. Изучение кардиопротекторных свойств

Кардиопротекторные свойства изучали на модели хронической сердечной недостаточности с использованием изопротереноловой интоксикации согласно методам [Ennis, 2003; Shibata, 2011].

Все животные были рандомизированы по весу. Исследования проводили на 24 беспородных крысах-самцах массой 380-400 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – «интактные» – животные (n=6), которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); 2 группа – «ИЗО» - животные (n=6), которым вводили внутривентрикулярно изопротеренон по 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); 3 группа – «ИЗО+РУ-1355» - группа животных (n=6), с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); 4 группа – «ИЗО+Милдронат» - группа животных (n=6), с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). В качестве препарата сравнения был выбран метаболический цитопротектор – милдронат (АО «Гриндекс», Латвия), используемый в комплексной терапии ИБС и ХСН. Все соединения вводили внутривентрикулярно.

После окончания исследований животных повторно взвешивали для расчета индекса гипертрофии.

В условиях наркоза (хлоралгидрат 350 мг/кг, внутривентрикулярно), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии проводили катетеризацию левого желудочка сердца. Нагрузку объемом осуществляли болюсным введением изотонического раствора натрия хлорида из расчета 3 мл/кг массы животного [Тюренков, 2012], в течение двух секунд. Максимальную изометрическую нагрузки проводили пережатием

восходящей части дуги аорты на 30 с. Регистрировали левожелудочковое давление (ЛЖД), скорости сокращения ($dp/dt+$) и расслабления ($dp/dt-$), частоту сердечных сокращений (компьютерный гемодинамический анализатор на базе программы BEAT (Россия)). После проведения всех нагрузок, животное подвергали эвтаназии, далее проводили забор сердец, отдельно выделяли левый желудочек, межжелудочковую перегородку и определяли их массу. Рассчитывали индекс гипертрофии по отношению массы левого желудочка к массе животного [Ennis, 2003], определяли максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) расчетным способом $((LЖД_{max} \times ЧСС) / \text{масса левого желудочка} + 1/3 \text{ межжелудочковой перегородки})$ [Тюренков, 2012].

В качестве маркера повреждения определяли тропонин I в плазме крови крыс и МДА в миокарде. Продукты перекисного окисления липидов определяли в тканях сердца в тесте с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Данный тест основан на способности ТБК в кислой среде, и при высокой температуре реагировать с малоновым диальдегидом (МДА), конечным продуктом окислительной дегградации липидов [Андреева, 1988]. Определяли оптическую плотность верхней фазы на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 535 нм.

Содержание МДА с учетом коэффициента молекулярной экстинции $K=1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ вычисляли по следующей формуле:

Для плазмы $C_{\text{МДА}}=85,47 * E$ (нмоль/мл плазмы)

Для гомогената $C_{\text{МДА}}=854,7 * E$ (нмоль/г ткани),

где E – оптическая плотность в пробе при 532 нм, а коэффициент молекулярной экстинции для оптического показателя E_{535} .

Метод определения тропонина I в плазме крови описан в гл. 2.7.1.

Проводили патологоанатомическое исследование образцов сердец⁶. После эвтаназии производили вскрытие животного и осмотр внутренних органов на предмет патологических изменений. Затем вскрывали грудную полость, отсекали от окружающих тканей сердце. После этого определяли массу сердца и быстро проводили забор материала. Вскрытое сердце помещали в 10%-ный раствор нейтрального забуференного формалина. После фиксации в формалине в течение 48 часов образцы тканей обезвоживали и заливали в парафин. С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4 - 6 мкм. Их окрашивали гематоксилином и эозином, для более детального выявления элементов соединительной ткани использовали метод окраски по Массону, включающий четыре различных красителя: железный гематоксилин Вейгерта, пикриновая кислота, смесь кислых красителей для цитоплазмы и анилиновый синий [Саркисов, 1996].

Использование полуколичественных морфологических методов в данном исследовании было продиктовано, прежде всего, необходимостью сравнения структурных изменений в нескольких группах, а также тем, что изменения тканевых и внутриклеточных компонентов в миокарде при увеличении или уменьшении функциональной нагрузки на сердце носят, в основном, количественный характер.

Для объективной сравнительной оценки структурных изменений в сердце в условиях эксперимента определяли степень выраженности следующих морфологических признаков при окраске тканевых срезов по Массону: площадь очагов формирования соединительной ткани и образование коллагеновых волокон. Гистологические препараты документировали цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и

⁶ Выражаем глубокую признательность зав. кафедрой патологической анатомии, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

окуляра x10.

2.8. Метод изучения общетоксикологических свойств

Проводили с использованием схемы многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin, 1964].

Исследования выполняли на 36 мышах-самках массой 18-22 г. Животные были распределены на 2 группы: 1 группа - «контрольная» - животным внутрибрюшинно вводили изотонический раствор натрия хлорида 0,1 мл на 10 г веса, 2 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг (эффективная доза), 3 группа - «опыт» - вводили соединение РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг (в 25 раз превышающую эффективную). Регистрацию показателей проводили в первый и последний день для всех групп до введения вещества и в последующие 60, 120 минут.

Изучение поведенческих реакций оценивали в тесте «открытое поле», позволяющем оценивать ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных. Данная установка состоит из квадратной площадки с отверстиями в полу, разделенной на 25 квадратов с освещенной и выделенной зоной в центре. Животных по очереди помещали в центр площадки на две минуты, затем наблюдали за ними и регистрировали следующие параметры: горизонтальную двигательную активность (число пересеченных линий), вертикальную двигательную активность (число вставаний на задние лапы), ориентировочно-исследовательскую активность (число заглядываний в отверстия), количество выходов в центральную зону, наличие фекальных болюсов, мочеиспускания и груминг (эмоциональный фактор).

Для исследования двигательной координации и мышечно-расслабляющего действия использовали методики вращающегося стержня «тест Ротарод» и тест «удержания на проволоке и сетке». В тесте «Ротарод» оценивали длительность удержания животного на металлической

перекладине диаметром 3 см, в течение 30 секунд, со скоростью вращения 10 оборотов в минуту. В тестах «удержания на проволоке и сетке», отмечали количество лапок, участвующих в удержании животного и оценивали в баллах (1 лапка – 1 балл), в течение 20 секунд.

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

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

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

Пугливость животных оценивали при прикосновении корнцангом. Судороги (0баллов – отсутствие, 1б – двигательное возбуждение, бег, 2б – клонические, 3б – тонические), тремор (0баллов – отсутствие, 1б – локальный, мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2б – локальный, среднеамплитудный тремор, 3б – генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела), изменение положения тела (1балл - нормальное положение, 2-5б – последовательно возрастающее угнетение рефлексов положения: 2б – боковое; 3б – на спине, сгибается; 4б – полубок, 3б – лапы вверху, одна на полу; 5б – на спине, лапы сложены), характер походки (изменение, сниженный тонус передних лапок) оценивали при визуальном наблюдении в процентах. Слуховой и роговичный рефлексы оценивались по реакции отдергивания головы при раздражении слухового прохода и роговицы соответственно (оценивали в процентах).

Ипсилатеральный сгибательный рефлекс измерялся путём сдавливания задней лапы зажимом с оценкой времени возникновения и силы реакции (оценивали в процентах).

Спонтанную двигательную активность определяли на одноканальном актометре фирмы "Ugo Basile" (Италия), в котором регистрировались передвижения животных, осуществляемые замыканием неподвижных контактов, расположенных на полу камеры в течение 5 минут (оценивали суммарное количество и процент).

Определяли функциональное состояние вегетативной нервной системы: размер зрачка, птоз верхнего века, саливация, пилоэрекция, цвет кожи. Подсчитывали число дыхательных движений у бодрствующих животных в течение 1 мин. Термометрию проводили электронным термометром («OMRON», Германия), в прямой кишке на глубине 15 мм.

О влиянии изучаемого соединения на состояние животных судили по изменению регистрируемых показателей по сравнению с контрольными значениями.

2.9. Метод изучения острой токсичности

Острую токсичность определяли на 40 белых неинбредных мышьяк-самцах массой 20-25 г. при внутрибрюшинном введении. За животными наблюдали в течение двух недель после введения веществ.

Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали метод Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 1963].

3.0. Методы статистической обработки

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

критерия Манна-Уитни («Statistica 6.0»). Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ Na^+/H^+ ОБМЕННИКА СРЕДИ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГУАНИДИНОВУЮ ГРУППУ

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

Изучение NHE-1-ингибирующей активности было проведено для 26 веществ, содержащих встроенную в цикл гуанидиновую группировку под лабораторными шифрами «РУ», из которых 15 производных 2-аминобензимидазола (12 соединений - 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия, 3 соединения - 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил) бензимидазолия и 11 производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (3 соединения - 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 соединения - N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 - N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола). При физиологическом значении pH NHE-1 имеет низкую активность. Во время возникновения внутриклеточного ацидоза происходит накопление внутриклеточных протонов, которые выводятся из клеток через сарколеммный NHE-1 в обмен на вход ионов Na^+ . Возрастание внутриклеточного содержания ионов Na^+ активирует $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -реверсивный обмен через сарколемму, инициируя вход ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Возникает « Ca^{2+} -перегрузка» [Писаренко, 2004, 2005; Kim, 2007; Fliegel, 2009].

На первом этапе была изучена NHE-1-ингибирующая активность производных циклических гуанидинов и известного селективного ингибитора – зонипорида. В контрольной серии экспериментов при добавлении к 200 мкл плазме богатой тромбоцитами (ПБогТ), изменение светопропускания наблюдалось в среднем на 30-40% от исходного уровня калибровки. При добавлении 135 ммоль/л натрия пропионата, подобные изменения увеличились до 60-70%. При добавлении натрия пропионата к ПБогТ, предварительно инкубированной с селективным ингибитором NHE-1

зонипоридом, происходило снижение уровня светопропускания по отношению к исследованиям только с буфером (рис. 3.1). Это свидетельствует о том, что зонипорид ингибирует NHE-1 и уменьшает вероятность сферуляции тромбоцитов. Полученные результаты согласуются с литературными данными [Rosskopf, 1991; Kusumoto, 2002].

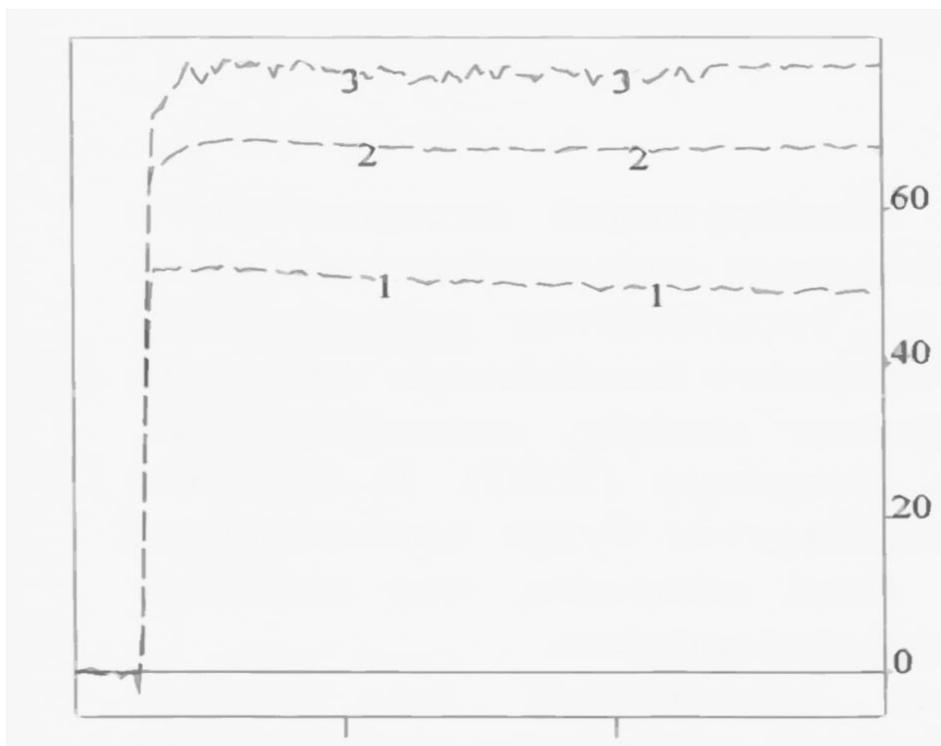


Рис. 3.1 Влияние зонипорида в дозе $1 \cdot 10^{-8}$ М на светопропускание плазмы богатой тромбоцитами, активированной натрия пропионатом (лазерный агрегометр «БИОЛА-220 ЛА», Россия).

Обозначения: 1 – ПБогТ с раствором Кребса; 2 – ПБогТ с зонипоридом в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М + натрия пропионатный буфер; 3 – ПБогТ с натрия пропионатным буфером. Ось X: процент изменения светопропускания; ось Y: время измерения (3 минуты).

В ходе проведенного исследования было показано дозозависимое угнетение активности NHE-1, при использовании зонипорида в диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-6} М. Рассчитана величина EC_{50} зонипорида, которая составила $2,70 \cdot 10^{-8}$ М. Регрессионное уравнение и величина парного коэффициента корреляции (R^2) представлены на рис. 3.2.

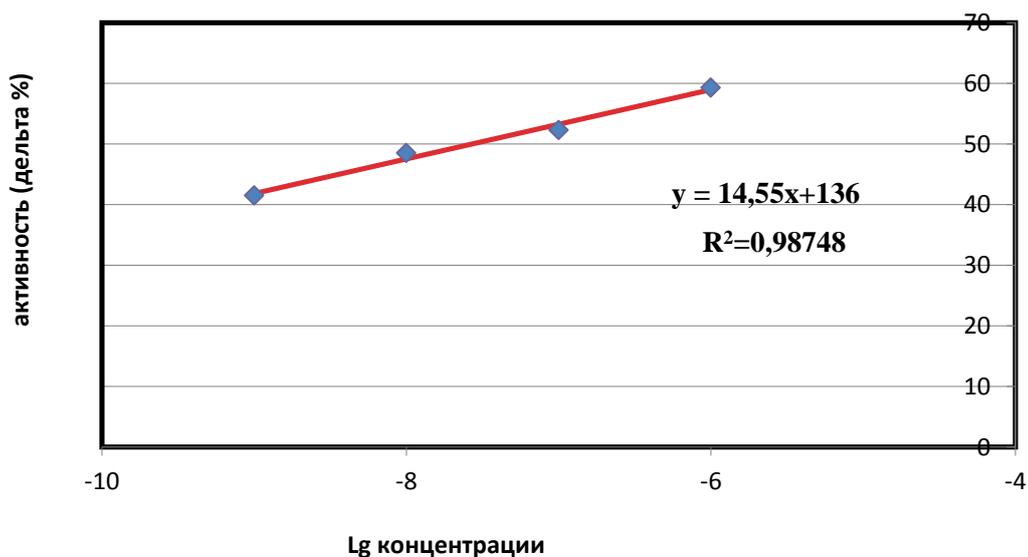


Рис. 3.2. Зависимость ингибирующего эффекта зонипорида на NHE-1 обменник от концентрации (расчет величины EC_{50}).

Ранее на данной методике [Гурова, 2011], было изучено NHE-1–ингибирующее действие неселективного ингибитора амилорида, EC_{50} которого составила $1 \cdot 10^{-6}$ М. Поэтому, все исследуемые соединения на данном этапе изучали в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ М. Для соединений, у которых ингибирующая активность в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М была выше, чем 50%, исследования проводили в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-11}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ М.

Химическая структура изучаемых соединений и молекулярные массы указаны в (табл. 2.1).

Найдено 5 соединений, превосходящие зонипорид по своей активности в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М: РУ-1355 и РУ-1199 – в 1,5 раза, РУ-1390 – в 1,4 раза, РУ-1200 и РУ-1369 – в 1,2 раза. Эффект равный зонипориду, оказали 5 соединений: РУ-1365, РУ-1183, РУ-1361, РУ1364 и РУ-1184. Остальные 16 веществ уступали препарату сравнения по NHE-1–ингибирующей активности.

Аналогичная закономерность наблюдалась при расчете величины EC_{50} (табл. 3.1).

3.2. Зависимость NHE-1–ингибирующей активности соединений от их структуры

На втором этапе была изучена NHE-1-ингибирующая активность производных 2–аминобензимидазола: 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия и 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил) бензимидазолия.

При изучении 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил) бензимидазолия было показано, что в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М большинство соединений проявили высокую NHE-1-ингибирующую активность. Соединения РУ-1199, РУ-1355 превосходили зонипорид в 1,5 раза, РУ-1390 – в 1,4 раза, РУ-1369 и РУ-1200 – в 1,2 раза и проявили наибольшую активность. Соединение РУ-1365 оказало эффект равный зонипориду. Для этих соединений были проведены исследования в концентрациях ниже $1 \cdot 10^{-8}$ М и рассчитана EC_{50} (табл. 3.2 Ia). Остальные соединения уступали препарату сравнения по активности.

При оценке зависимости активности от химической структуры в ряду изучаемых производных 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия были выявлены некоторые закономерности. Вещества РУ-1361, РУ-1362, РУ-1363, РУ-1364, РУ-1366 в положение N¹ с метильным, этильным, аллильным, пропильным радикалами соответственно проявили низкую ингибирующую активность в отношении NHE-1. В концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М процент ингибирования составил в среднем от 26% до 37%.

При введении азотсодержащих радикалов в положение N¹ производных 2–аминобензимидазола наблюдалось увеличение NHE-1-ингибирующей активности. При этом у ациклических заместителей активность была ниже,

Таблица 3.1

**Влияние производных циклических гуанидинов на активность ННН-1
(*in vitro* на тромбоцитах кролика) (M±m)**

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

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

чем у циклосодержащих. Так, при наличии диметиламинопропильного заместителя у соединения РУ-1370 наблюдался средний уровень активности: в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М – 35,5%, EC₅₀ – $3,52 \cdot 10^{-8}$ М. При наличии бутильного радикала у соединения РУ-1365 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М

наблюдалась активность подобная зонипориду и составила – 43,2%, по величине EC_{50} – $1,31 \cdot 10^{-8}$ М.

Наибольшую активность проявили соединения, содержащие в положении N¹ диэтиламиноэтильный (РУ-1390), диметиламиноэтильный (РУ-1369), пиперидиноэтильный (РУ-1199) и морфолиноэтильный (РУ-1355, РУ-1200) радикалы. Так, ингибирующая активность этих соединений в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М в среднем составила – 65,8%; IC_{50} - $6,68 \cdot 10^{-10}$ М, $5,04 \cdot 10^{-9}$ М, $6,56 \cdot 10^{-10}$ М, $5,42 \cdot 10^{-10}$ М и $4,56 \cdot 10^{-9}$ М соответственно.

Таким образом, у производных 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия было показано, что наличие в положении N¹ диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного, морфолиноэтильного радикалов свидетельствует о высокой ННН-1-ингибирующей активности.

При изучении 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия (РУ-1183, РУ-1184, РУ-1185) было установлено, что РУ-1183 и РУ-1184 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М проявляли ННН-1-ингибирующую активность сопоставимую с зонипоридом. Для них была также рассчитана EC_{50} (таб. 3.2 Ib). Соединение РУ-1185 оказалось не активным.

Наибольшую активность проявили соединения производных 2-аминобензимидазола, содержащие в положении N¹ диэтиламиноэтильный (РУ-1183), пиперидиноэтильный (РУ-1184) радикалы. Ингибирующая активность этих соединений в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М в среднем составила – 46%; EC_{50} - $1,76 \cdot 10^{-8}$ М и $3,39 \cdot 10^{-8}$ М соответственно. Соединение, содержащее в положении N¹ морфолиноэтильный радикал (РУ-1185), показало высокую ингибирующую активность только в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М, которая составила 55,7%.

Таблица 3.2

NHE-1-ингибирующая активность соединений, содержащих гуанидиновую группу

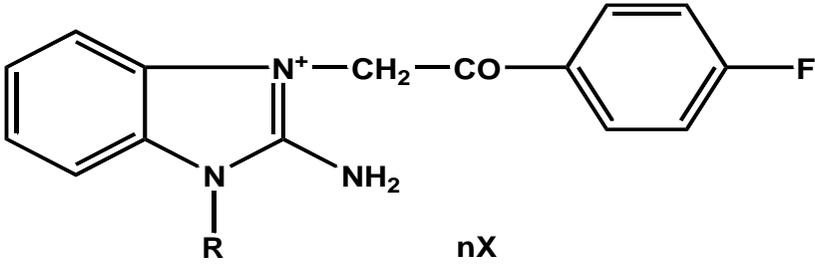
№	Шифр соединения	R	nX	NHE-1-ингибирующая активность			
				1×10^{-8} М	1×10^{-7} М	1×10^{-6} М	EC ₅₀ , М
I. Производные 2-аминобензимидазола Ia. 1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия							
							
1	ПУ-1361	CH ₃	Br ⁻	36,85±14,10	70,20±8,68	-	2,23*10 ⁻⁸
2	ПУ-1362	C ₂ H ₅	Br ⁻	45,22±24,89	29,92±7,43	-	—
3	ПУ-1363	C ₃ H ₅	Br ⁻	39,09±6,56	51,50±22,27	-	1,43*10 ⁻⁸
4	ПУ-1364	C ₃ H ₇	Br ⁻	33,63±4,84	63,72 ±16,74	-	3,01*10 ⁻⁸
5	ПУ-1365	C ₄ H ₉	Br ⁻	43,20±3,42	65,14±20,56	-	1,31*10 ⁻⁸
6	ПУ-1366	CH ₂ C ₆ H ₅	Br ⁻	26,95±11,34	41,61±10,78	-	—
7	ПУ-1369	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Br ⁻	57,40±2,07	45,39±17,05	-	5,04*10 ⁻⁹
8	ПУ-1370	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	Br ⁻	35,45±14,33	79,72±26,02	-	3,52*10 ⁻⁸
9	ПУ-1390	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Br ⁻	69,47±7,57	65,74±13,72	-	6,68*10 ⁻¹⁰
10	ПУ-1199	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	Br ⁻	73,95±12,55	74,35±12,76	51,03±15,09	6,56*10 ⁻¹⁰
11	ПУ-1200	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Br ⁻	57,29±5,64	56,23±17,19	74,59±8,63	4,56*10 ⁻⁹
12	ПУ-1355	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Cl ⁻	70,93±7,99	54,05±18,65	74,46±9,29	5,42*10 ⁻¹⁰

Таблица 3.2 (продолжение)

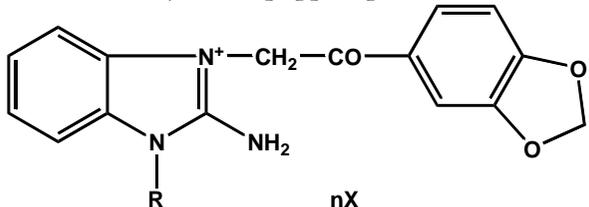
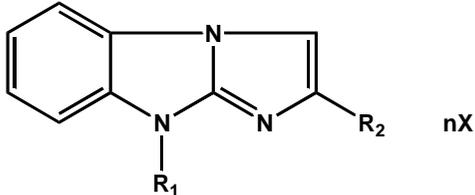
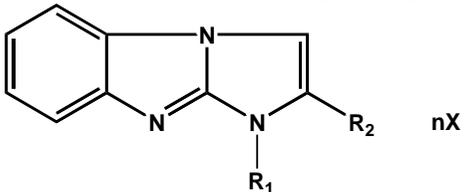
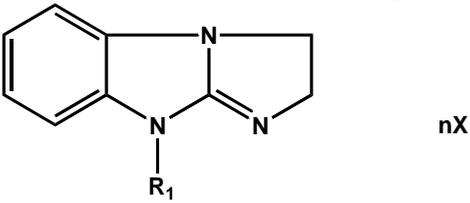
№	Шифр соединения	R	nX	NHE-1-ингибирующая активность				
				1×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	EC ₅₀ , M	
Iв. 1-замещенные 2-амино-3-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия								
								
13	ПУ-1183	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Br^-	46,90±18,55	-	83,53±6,98	$1,76 \cdot 10^{-8}$	
14	ПУ-1184	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	Br^-	46,41±7,69	53,38±1,89	59,30±4,84	$3,39 \cdot 10^{-8}$	
15	ПУ-1185	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$	Br^-	26,50±10,52	-	55,73±26,73	—	
II. Производные N⁹-имидазо[1,2-a]бензимидазола								
								
16	ПУ-17	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	C_6H_5	2HCl	27,84±18,50	65,37±6,32	32,49±7,80	$4,50 \cdot 10^{-8}$
17	ПУ-64	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	C_6H_5	2HNO ₃	-	22,45±12,88	52,05±12,08	$8,53 \cdot 10^{-7}$
18	ПУ-1204	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}(\text{CH}_2)_5$	Br	2HCl	-	23,92±2,07	29,26±13,26	—
19	ПУ-1205	$(\text{CH}_2)_2 \text{NC}_4\text{H}_8\text{O}$	Br	2HCl	-	-	35,94±11,84	—

Таблица 3.2 (продолжение)

№	Шифр соединения	R ₁	R ₂	nX	НHE-1-ингибирующая активность			
					1x10 ⁻⁸ М	1x10 ⁻⁷ М	1x10 ⁻⁶ М	EC ₅₀ , М
III. Производные N¹-имидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазола								
								
20	РУ-602	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	C ₆ H ₄ OH	2HCl*2H ₂ O	39,26±15,11	59,88±12,60	70,89±14,75	3,78*10 ⁻⁸
21	РУ-606	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	C ₆ H ₅	2HNO ₃	34,21±7,87	43,12±7,95	56,95±12,66	2,89*10 ⁻⁷
22	РУ-354	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	C ₆ H ₅	2HCl	-	-	46,26±14,31	—
23	РУ-355	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O	Br	2HCl	-	-	47,04±14,45	—
VI. Производные 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазола								
								
24	РУ-255	(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅		2HCl	25,17±1,41	-	45,87±13,73	—
25	РУ-254	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂		2HCl	28,64±14,49	-	36,76±12,30	—
26	РУ-283	(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₄) ₂ O		2HCl	-	-	36,13±22,53	—

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

Таким образом, при оценке NHE-1-ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола, было показано, что высокая NHE-1-ингибирующая активность может быть связана с наличием в положении N¹ диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного, морфолиноэтильного радикалов, которые далее обозначены как «активные». По величине EC₅₀ соединения расположились следующим образом - РУ-1355>РУ-1199>РУ-1390>РУ-1200>РУ-1369>РУ-1365>РУ-1363>РУ-1183>РУ-1361>зонипорид>РУ-1364>РУ-1184.

На следующем этапе были изучены соединения производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, содержащие гуанидиновую группу: производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N⁹-замещенных 2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, содержащие в положении N⁹ или N¹ «активные» радикалы.

При оценке производных N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (соединения РУ-17, РУ-1204), содержащие в положении N⁹ пиперидиноэтильные радикалы, соединение РУ-64, содержащее в положении N⁹ диэтиламиноэтильный радикал и соединение РУ-1205, содержащее в положении N⁹ морфолиноэтильный радикал, было выявлено, что вещества не проявили высокой ингибирующей активности в концентрации 1*10⁻⁸ М и по данным EC₅₀ уступали зонипориду (таб. 3.2 II).

При изучении производных N⁹-замещенных 2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (РУ-254, РУ-255, РУ-283), содержащие в положении N⁹ диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный и морфолиноэтильный радикалы соответственно было установлено, что данные вещества проявили низкую NHE-1-ингибирующую активность (ниже 50%) (табл. 3.2 IV).

При оценке производных N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (РУ-602, РУ-606, РУ-354, РУ-355), содержащие в положении N¹ пиперидиноэтильный, диэтиламиноэтильный и морфолиноэтильный радикалы соответственно была

показана высокая ингибирующая активность только в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ М. По величине EC_{50} соединения уступали зонипориду (табл. 3.2 III).

Было установлено, что введение «активных» для производных 2-аминобензимидазола радикалов (пиперидиноэтильный, диэтиламиноэтильный и морфолиноэтильный) в положение N^9 или N^1 производных - имидазо[1,2-*a*]бензимидазола не приводило к высокому уровню NHE-1-ингибирующей активности. По величине EC_{50} исследуемые вещества расположились следующим образом - зонипорид > РУ-602 > РУ-283 > РУ-1205 > РУ-606 > РУ-354 > РУ-254 > РУ-17 > РУ-355 > РУ-255 > РУ-1204 > РУ-64.

Можно предположить, что NHE-1-ингибирующая активность у производных N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N^9 - 2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N^1 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, зависит в большей степени от базовой структуры, чем от вводимых радикалов.

Таким образом, при изучении NHE-1-ингибирующей активности в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика было показано, что структура 2-аминобензимидазола оказалась наиболее перспективна как по вкладу базовой структуры, так и по степени изменения активности при ее модификации.

Найдены соединения РУ-1355, РУ-1199, РУ-1200, РУ-1183, РУ-1390, РУ-1369, РУ-1361, РУ-1363, РУ-1365 которые превосходили зонипорид по величине EC_{50} .

Наибольшую активность проявили соединения – производные 2-аминобензимидазола, которые в положении N^1 содержат диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный, морфолиноэтильный радикалы.

С учетом данных EC_{50} , LD_{50} соединения можно расположить следующим образом: РУ-1355 > РУ-1199 > РУ-1200 > РУ-1183 > зонипорид (табл. 3.3).

Влияние некоторых производных 2-аминобензимидазола на активность NHE-1 в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (EC₅₀), острую токсичность (LD₅₀ мг/кг внутрибрюшинно)

№	Вещество	EC ₅₀		LD ₅₀ мг/кг в/бр. мыши
		М	мг/л	
1.	РУ-1355	5,42*10 ⁻¹⁰	0,0002	342,7
2.	РУ-1199	6,56*10 ⁻¹⁰	0,0003	401,8
3.	РУ-1200	4,56*10 ⁻⁹	0,0020	643,3
4.	РУ-1183	1,76*10 ⁻⁸	0,0080	240,0
5.	Зонипорид	2,70*10 ⁻⁸	0,0100	250,0*

Примечание: * - [Tracey, 2003].

Таким образом, было найдено 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид - соединение РУ-1355, которое превосходило зонипорид по уровню активности в концентрации 1*10⁻⁸ М и по величине EC₅₀.

3.3. Анализ перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности⁷

Среднее значение биологического эффекта показывает меру активности базовой структуры без учета влияния заместителей. Была проведена оценка средней активности модифицированного бензимидазольного фрагмента с конденсированным или неконденсированным циклом, содержащим гуанидиновую группу.

Результаты анализа по средним и супремальным оценкам полностью соответствуют данным, полученным при анализе зависимости химической структуры от биологической активности на уровне NHE-1-ингибирующей активности производных циклических гуанидинов.

⁷ Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым, за что выражаем благодарность и глубокую признательность

При оценке по «средним» среди производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола было показано, что в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М наибольшую активность проявляли соединения производные N₁ имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (табл. 3.4, рис. 3.3). Однако при сравнении производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, в дозе $1 \cdot 10^{-8}$ М наибольшую активность проявили производные 2-аминобензимидазола.

Подобная тенденция сохраняется в более высоких концентрациях – $1 \cdot 10^{-7}$ М (рис 3.4) и $1 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 3.5). Наибольшую активность проявили также производные соединения 2-аминобензимидазола. По средней величине EC₅₀ наблюдались еще более значительные различия (рис. 3.6).

Таким образом, оценка NHE-1-ингибирующей активности производных циклических гуанидинов по «средним» показывала, что бициклический кор - базовая структура неконденсированного 2-аминобензимидазола является наиболее перспективной структурой для поиска новых высоко активных ингибиторов NHE-1.

Таблица 3.4

Средние оценки уровня NHE-1 ингибирующей активности химических коров производных циклических гуанидинов

№	Химический кор	n	Средняя оценка			
			lg(1/EC ₅₀)	% (10 ⁻⁸) М	% (10 ⁻⁷) М	% (10 ⁻⁶) М
1.	2,3-дигидро-N ⁹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	3	—	26,91	34,11	35,59
2.	N ¹ -имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	4	6,787	36,74	51,50	55,29
3.	N ⁹ - имидазо[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы	4	6,348	27,80	37,25	37,44
4.	2-Аминобензимидазолы	15	7,451	45,55	57,71	66,44
5.	Все имидазо [1,2- <i>a</i>] бензимидазолы*	11	6,514	31,02	40,42	44,51

Примечание: * - обобщенное, включает предыдущие 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N⁹- имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; n – количество исследуемых соединений.

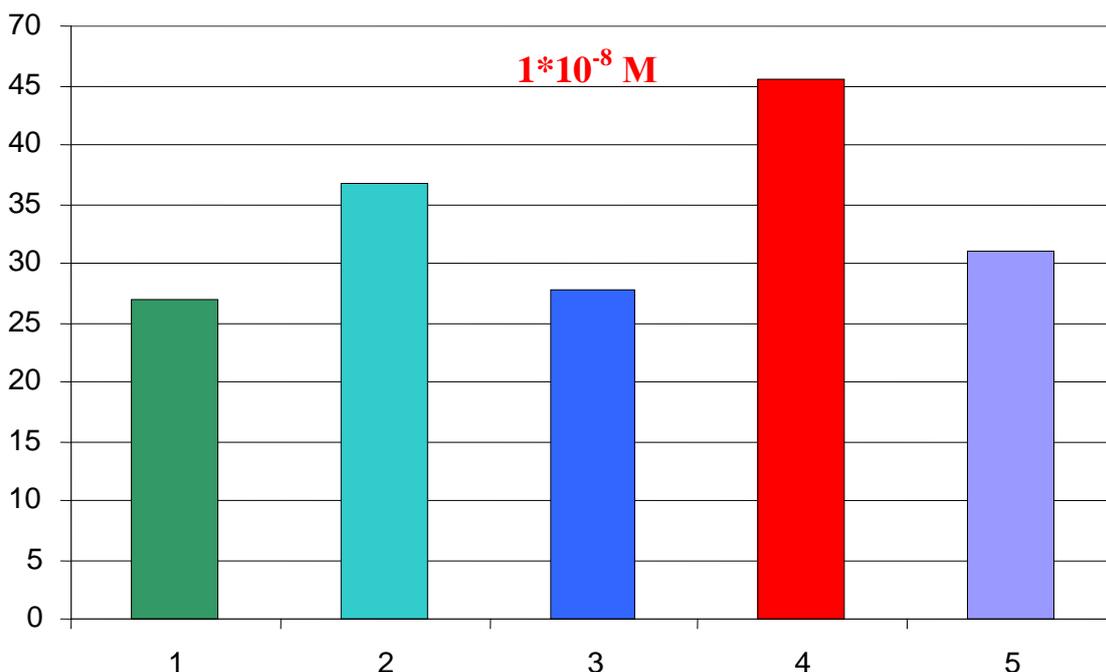


Рис. 3.3. Средние оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических классов производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-8} М (см. табл. 3.4).
 Ось X: 1 – 2,3-дигидро- N^9 -ИмБИ; 2 – N^1 -ИмБИ; 3 – N^9 -ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ, (обозначения химических классов соответствует нумерации в табл. 3.4.)
 Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-8} М.

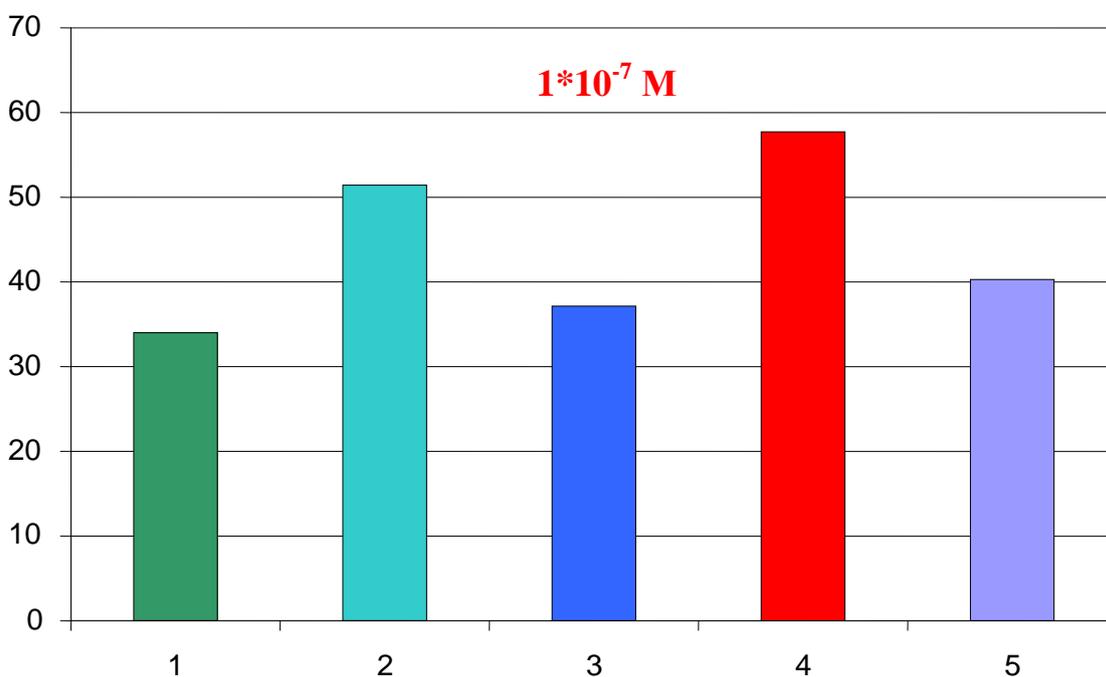


Рис. 3.4. Средние оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических классов производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-7} М (см. табл. 3.4).
 Ось X: 1 – 2,3-дигидро- N^9 -ИмБИ; 2 – N^1 -ИмБИ; 3 – N^9 -ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.
 Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-7} М.

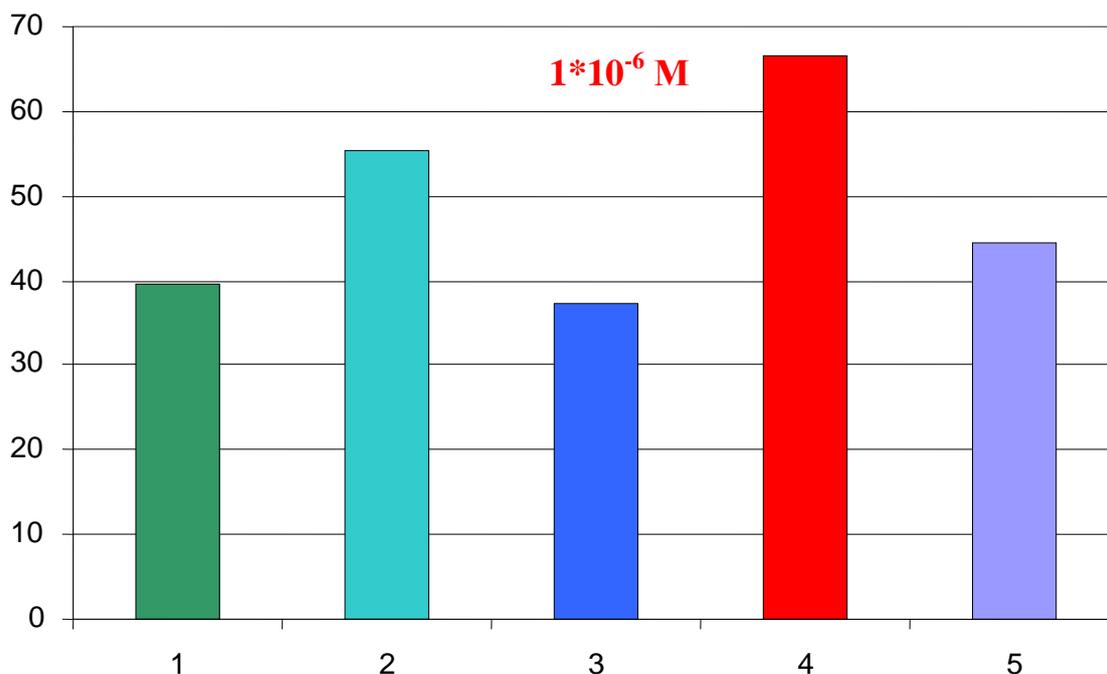


Рис. 3.5. Средние оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических кóров производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-6} М (см. табл. 3.4).

Ось X: 1 – 2,3-дигидро-N⁹-ИмБИ; 2 – N¹-ИмБИ; 3 – N⁹-ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.

Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-6} М.

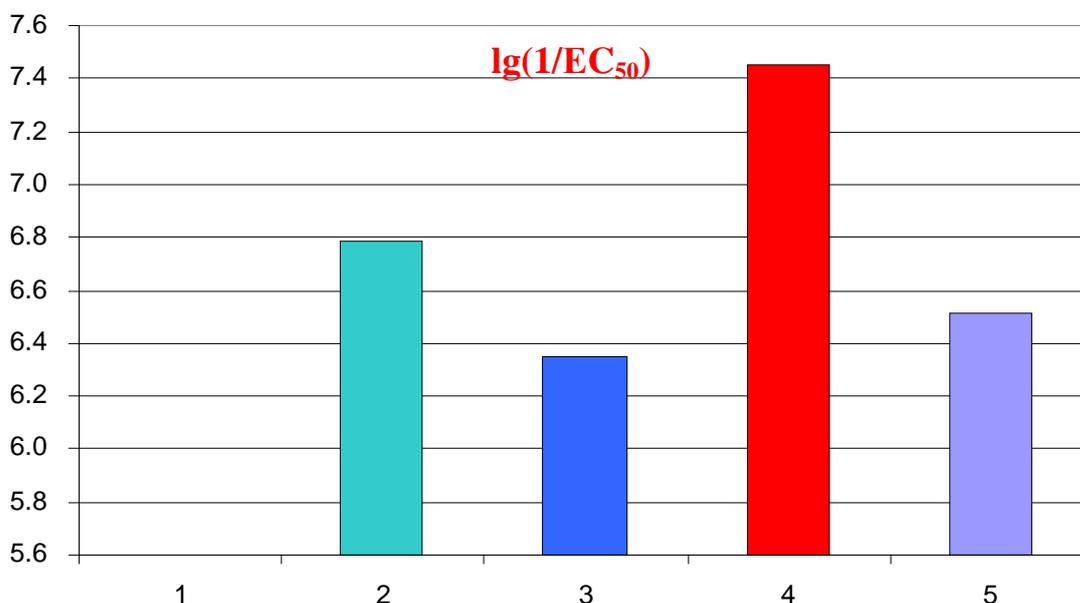


Рис. 3.6. Средние оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических кóров производных циклических гуанидинов для EC₅₀ (см. табл. 3.4).

Ось X: 1 – 2,3-дигидро-N⁹-ИмБИ; 2 – N¹-ИмБИ; 3 – N⁹-ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.

Ось Y: логарифм обратной величины IC₅₀, М.

Максимальные (супремальные) оценки показывают степень реакции базовой структуры на введении в нее заместителя, повышающего активность.

В диапазоне концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ М и по величине EC_{50} сохраняется та же закономерность, что и при оценке «средних» значений (табл. 3.5, рис. 3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

Таблица 3.5

Супремальные оценки уровня NHE-1 ингибирующей активности химических коров производных циклических гуанидинов

№	Химический кор	n	Максимальная оценка			
			$\lg(1/EC_{50})$	% (10^{-8}) М	% (10^{-7}) М	% (10^{-6}) М
1.	2,3-дигидро-N ⁹ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	3	–	28,64	35,52	45,87
2.	N ¹ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	4	7,423	39,26	59,88	70,89
3.	N ⁹ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	4	7,347	27,80	65,37	52,05
4.	2-Аминобензимидазолы (АмБИ)	15	9,266	73,95	79,72	83,53
5.	Все имидазо[1,2а]бензимидазолы (ИмБИ)	11	7,423	39,26	65,37	70,89

Примечание: -- не рассчитывали, т.к. максимальная активность не превышала 50%; n - количество исследуемых соединений.

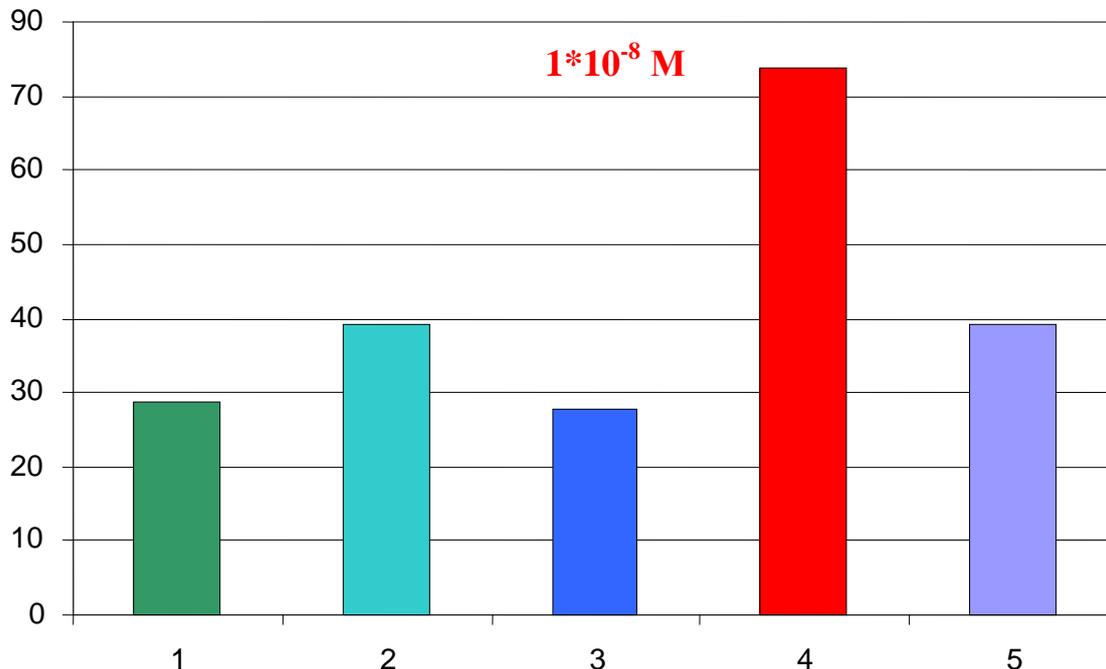


Рис. 3.7. Супремальные оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических коров производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-8} М (см. табл. 3.5).

Ось X: 1 – 2,3-дигидро-N⁹-ИмБИ; 2 – N¹-ИмБИ; 3 – N⁹-ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.

Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-8} М.

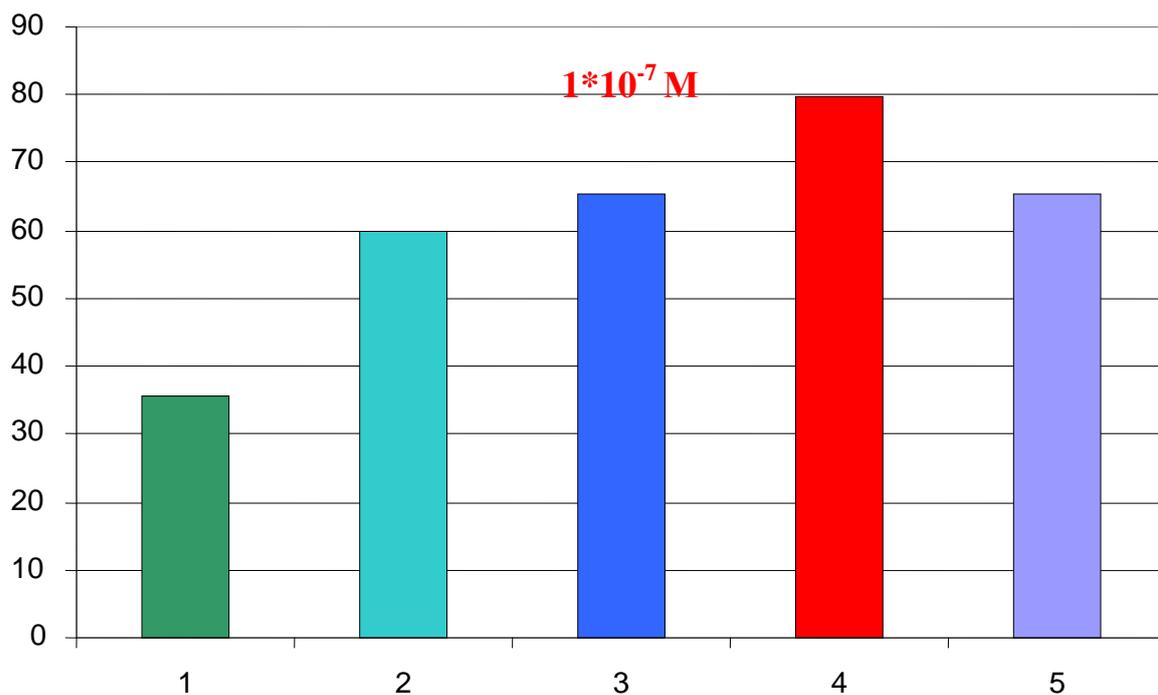


Рис. 3.8. Супремальные оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических коров производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-7} М (см. табл. 3.5). Ось X: 1 – 2,3-дигидро- N^9 -ИмБИ; 2 – N^1 -ИмБИ; 3 – N^9 -ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ. Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-7} М.

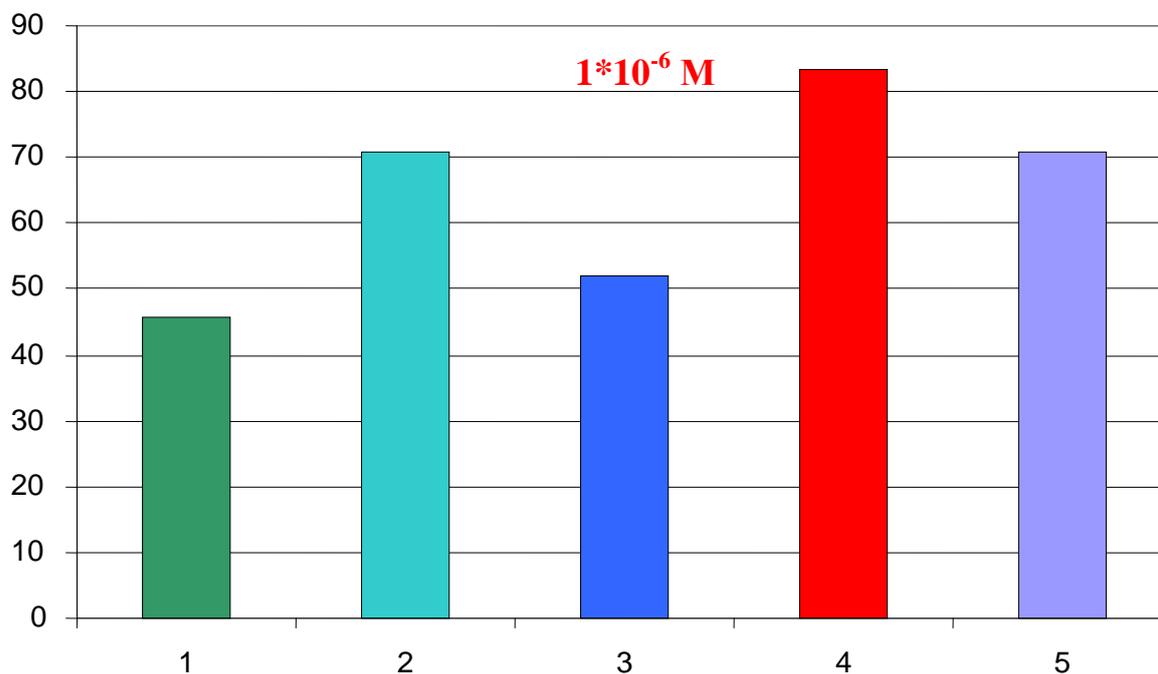


Рис. 3.9. Супремальные оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических коров производных циклических гуанидинов в концентрации 10^{-6} М (см. табл. 3.5).

Ось X: 1 – 2,3-дигидро- N^9 -ИмБИ; 2 – N^1 -ИмБИ; 3 – N^9 -ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.
Ось Y: NHE-1 ингибирующая активность в концентрации вещества 10^{-6} М.

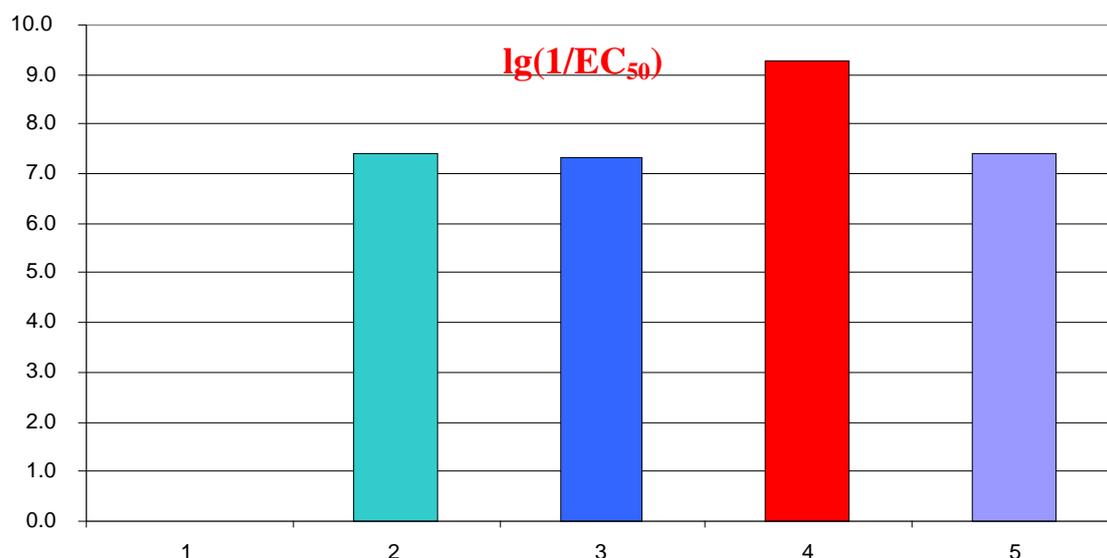


Рис. 3.10. Супремальные оценки уровня NHE-1-ингибирующей активности химических ко́ров производных циклических гуанидинов для EC₅₀ (см. табл. 3.5).
Ось X: 1 – 2,3-дигидро-N⁹-ИмБИ; 2 – N¹-ИмБИ; 3 – N⁹-ИмБИ; 4 – 2-АмБИ; 5 – все ИмБИ.
Ось Y: логарифм обратной величины IC₅₀, М.

Так супремальная оценка NHE-1 ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М оказалась почти в 2 раза выше для всех имидазо[1,2-а] бензимидазолов и составила 73,9% и 39,3% соответственно (рис.3.7, табл. 3.5). В более высоких концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ М и $1 \cdot 10^{-6}$ М эти отличия несколько нивелируются, но сохраняются различия на 21,9% и 17,8% соответственно возможно, это связано с потерей селективности в более высоких концентрациях.

Наиболее перспективным классом ингибиторов NHE-1 обменника являются неконденсированные бициклические производные 2-аминобензимидазола, как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на модификацию базовой структуры заместителями для создания высоко активного скаффолда ингибиторов NHE-1.

3.4. Зависимость NHE-1-ингибирующей активности соединений от их физико-химических свойств

При анализе NHE-1-ингибирующей активности нами был проведен расчёт физико-химических параметров 26 производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, содержащих гуанидиновую

группировку: 3 соединения производных 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 соединения производных N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 4 соединения производных N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 15 соединений производных 2-аминобензимидазола.

Для проведения QSAR-анализа необходимо две составляющих – биологическая активность (зависимая переменная Y), характеризующая воздействие соединения на организм и набор физико-химических параметров (независимые переменные X_i), которые описывают химическую структуру (табл. 3.6). Для каждого из исследуемых соединений были рассчитаны следующие показатели: молекулярная рефракция всей молекулы MR_0 , первого заместителя MR_{R1} , второго заместителя MR_{R2} , липофильность всей молекулы $\log P_{R0}$, первого заместителя $\log P_{R1}$, второго заместителя $\log P_{R2}$ (см. приложение 1).

Корреляционный анализ по сути представляет собой однопараметровый регрессионный анализ, поскольку в нем в качестве независимой переменной рассматривается только один физико-химический показатель.

В таблице 3.7 приведены максимальные коэффициенты корреляции NHE-1 ингибирующей активности и физико-химических параметров производных циклических гуанидинов. Результаты расчетов показывают, что для всех соединений (независимо от их принадлежности к химическим классам) на величину биологической активности практически не влияют такие параметры, как молекулярная рефракция первого заместителя MR_{R1} , липофильность всей молекулы $\log P_0$ и второго заместителя $\log P_{R2}$; слабо влияет молекулярная рефракция второго заместителя MR_{R2} . Достаточно существенное влияние на величину активности оказывают молекулярная рефракция всей молекулы MR_0 (прямая зависимость) и липофильность первого заместителя $\log P_{R1}$ (обратная зависимость).

Максимальные коэффициенты корреляции NHE-1 ингибирующей активности и физико-химических параметров производных циклических гуанидинов

Показатель активности	Все соединения		2-Амино-бензимидазолы		Все имидазо[1,2-а]бензимидазолы	
	Параметр	R	Параметр	R	Параметр	R
$ \Delta(10^{-8}) $	MR ₀	0,459	MR _{R1}	0,525	MR _{R2}	0,697
$ \Delta(10^{-7}) $	MR _{R2}	0,355	MR _{R1}	0,175	MR _{R1}	0,428
$ \Delta(10^{-6}) $	MR ₀	0,546	MR _{R1}	-0,603	MR _{R0}	0,302
log(1/IC ₅₀)	logP _{R1}	-0,518	logP _{R1}	-0,587	logP _{R1}	0,955

Примечание: MR₀ - молекулярная рефракция всей молекулы; MR_{R1} - молекулярная рефракция первого заместителя; MR_{R2} - молекулярная рефракция второго заместителя; logP_{R1} - липофильность первого заместителя.

У производных 2-аминобензимидазола в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М, наибольшее значение коэффициента корреляции равно 0,603 для молекулярной рефракции первого заместителя MR_{R1}; в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М коэффициент корреляции для этого же параметра составляет 0,525. Коэффициент корреляции для липофильности первого заместителя logP_{R1} равен -0,587.

У производных имидазо[1,2-а]бензимидазола наблюдаются самые большие значения максимальных коэффициентов корреляции: 0,955 для липофильности первого заместителя logP_{R1} и 0,697 для молекулярной рефракции второго заместителя MR_{R2}.

Существенно, что при переходе от 2-аминобензимидазолам к имидазо[1,2-а]бензимидазолам для параметров logP_{R1} и MR_{R1} наблюдается инверсия зависимости от обратной (отрицательный знак коэффициента корреляции) к прямой (положительный коэффициент корреляции). При этом на величину активности 2-аминобензимидазолов существенное влияние оказывают параметры только первого заместителя – липофильность logP_{R1} и

молекулярная рефракция MR_{R1} , а для активности производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола имеют значение также молекулярная рефракция всей молекулы MR_0 и молекулярная рефракция второго заместителя MR_{R2} .

В связи с этим можно сделать предположение о различных механизмах взаимодействия производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с сайтом связывания NHE-1. Для 2-аминобензимидазолов рост липофильности и молекулярной рефракции первого заместителя R_1 приводит к снижению активности. В случае имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов увеличение $\log P_{R1}$ и MR_{R1} , наоборот, приводит к увеличению фармакологического эффекта; при этом существенную положительную роль играет молекулярная рефракция молекулы MR_0 и второго заместителя MR_{R2} .

3.5. Регрессионный анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов

Для NHE-1 ингибирующей активности всех соединений (без деления их на классы) было получено QSAR-уравнение (1), включающее шесть физико-химических параметров. Уравнение (1) имеет высокий коэффициент множественной корреляции $R = 0,9013$ и весьма высокую достоверность $p = 3,48 \cdot 10^{-3}$, что иллюстрирует рис. 3.11. Анализ этого уравнения показывает, что на уровень активности положительно влияет липофильность обоих заместителей $\log P_{R1}$ и $\log P_{R2}$, а также молекулярная рефракция молекулы в целом MR_0 . В то же время, на величину активности отрицательно влияют общая липофильность молекулы $\log P_0$ и молекулярная рефракция обоих заместителей MR_{R1} и MR_{R2} . Таким образом, на NHE-1 ингибирующую активность всех соединений оказывают влияние как липофильность, так и стерические параметры – заместителей R_1 и R_2 и всей молекулы в целом.

Уравнение (2), полученное только для производных 2-аминобензимидазола, также имеет высокий коэффициент корреляции $R = 0,9050$ и очень высокую достоверность $p = 4,00 \cdot 10^{-5}$ (рис. 3.12).

Общее регрессионное уравнение:

$$|\Delta(10^{-6})| = -118.46 - 161.19 \cdot \log P_0 + 167.20 \cdot \log P_{R1} + 93.33 \cdot \log P_{R2} + \\ + 14.33 \cdot MR_0 - 16.64 \cdot MR_{R1} - 18.85 \cdot MR_{R2} \quad (1), \\ 3.78 \cdot 10^{-3} \quad 2.92 \cdot 10^{-3} \quad 5.17 \cdot 10^{-3} \\ 1.08 \cdot 10^{-3} \quad 1.35 \cdot 10^{-3} \quad 2.26 \cdot 10^{-3}$$

$$N = 17 \quad R = 0.9013 \quad s = 8.87 \quad F(6,10) = 7.22 \quad p = 3.48 \cdot 10^{-3}$$

где $|\Delta(10^{-6})|$ – абсолютная величина NHE-1 ингибирующей активности при концентрации вещества 10^{-6} М;

$\log P_0$ – липофильность всей молекулы; $\log P_{R1}$ – липофильность первого заместителя; $\log P_{R2}$ – липофильность второго заместителя; MR_0 – молекулярная рефракция всей молекулы; MR_{R1} – молекулярная рефракция первого заместителя; MR_{R2} – молекулярная рефракция второго заместителя; N – число исследуемых соединений; R – коэффициент множественной корреляции; s – стандартная ошибка регрессионного уравнения, F – критерий Фишера; p – статистическая достоверность регрессионного уравнения.

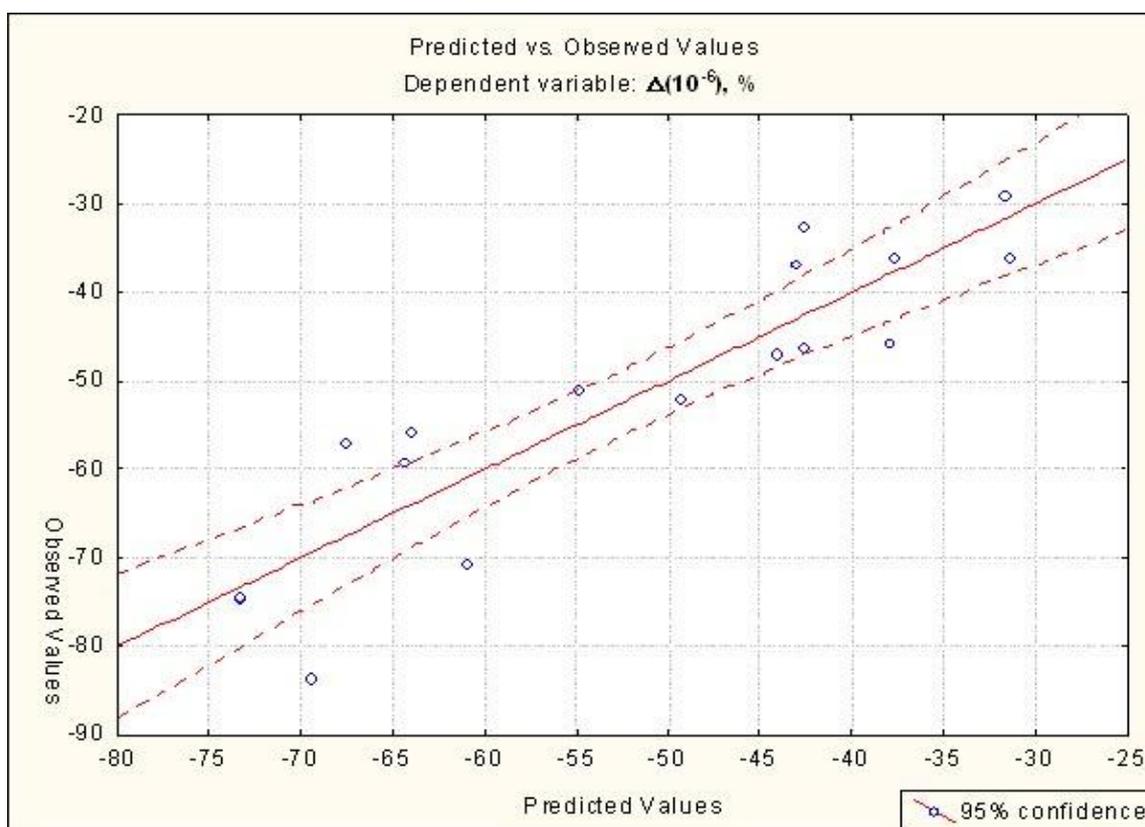


Рис. 3.11. Общее регрессионное уравнение зависимости NHE-1 ингибирующей активности производных циклических гуанидинов от их физико-химических свойств.

Примечание: \circ экспериментальные значения; — расчетные значения; --- 95% доверительный интервал для расчетных значений.

Регрессионное уравнение для производных 2-аминобензимидазола:

$$|\Delta(10^{-8})| = -182.98 + 78.81 \cdot \log P_0 - 76.03 \cdot \log P_{R1} - 2.10 \cdot 10^{-5} \log P_{R2} + 9.00 \cdot 10^{-6} \log P_{R3} \quad (2),$$

$$N = 15 \quad R = 0.9050 \quad s = 7.65 \quad F(2,12) = 27.14 \quad p = 4.00 \cdot 10^{-5}$$

где $|\Delta(10^{-8})|$ – абсолютная величина NHE-1 ингибирующей активности при концентрации вещества 10^{-6} М;

$\log P_0$ – липофильность всей молекулы; $\log P_{R1}$ – липофильность первого заместителя; $\log P_{R2}$ – липофильность второго заместителя; N – число исследуемых соединений; R – коэффициент множественной корреляции; s – стандартная ошибка регрессионного уравнения, F – критерий Фишера; p – статистическая достоверность регрессионного уравнения

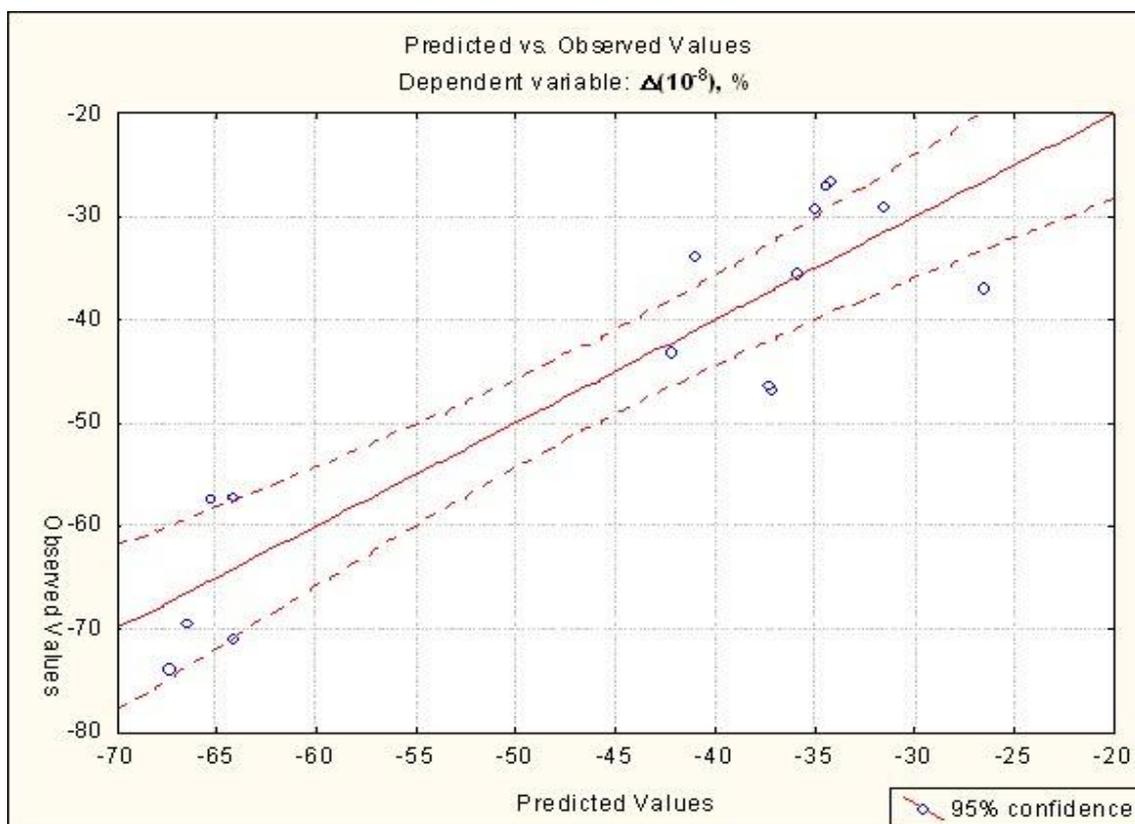


Рис. 3.12. Регрессионное уравнение зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола от их физико-химических свойств.

Примечание: ° экспериментальные значения; — расчетные значения; --- 95% доверительный интервал для расчетных значений

Анализ этого уравнения показывает, что на уровень активности положительно влияет общая липофильность молекулы $\log P_0$. В то же время, на величину активности отрицательно влияет липофильность молекулы

первого заместителя $\log P_{R1}$. Таким образом, на NHE-1 ингибирующую активность производных 2-аминобензимидазола оказывает влияние только липофильность.

Регрессионное уравнение для производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола:

$$|\Delta(10^{-6})| = 206.19 - 69.94 \cdot \log P_0 + 69.27 \cdot \log P_{R1} + 13.86 \cdot \log P_{R2} \quad (3),$$

$$4.30 \cdot 10^{-3} \quad 3.44 \cdot 10^{-3} \quad 7.24 \cdot 10^{-3}$$

$$N = 11 \quad R = 0.8558 \quad s = 7.57 \quad F(3,7) = 6.38 \quad p = 2.05 \cdot 10^{-2}$$

где $|\Delta(10^{-6})|$ – абсолютная величина NHE-1 ингибирующей активности при концентрации вещества 10^{-6} М;

$\log P_0$ – липофильность всей молекулы; $\log P_{R1}$ – липофильность первого заместителя; $\log P_{R2}$ – липофильность второго заместителя; N – число исследуемых соединений; R – коэффициент множественной корреляции; s – стандартная ошибка регрессионного уравнения, F – критерий Фишера; p – статистическая достоверность регрессионного уравнения

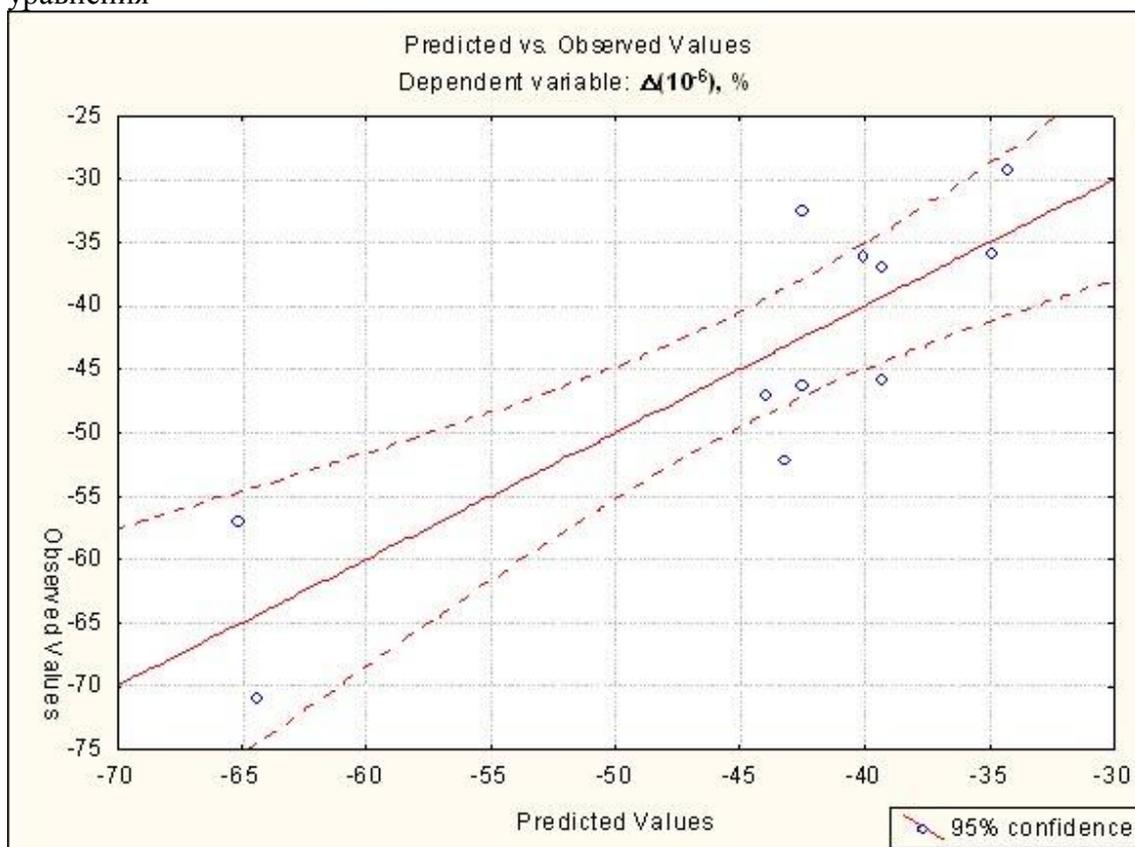


Рис. 3.13. Регрессионное уравнение зависимости NHE-1-ингибирующей активности производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола от их физико-химических свойств.

Примечание: ° экспериментальные значения; — расчетные значения; --- 95% доверительный интервал для расчетных значений.

В уравнениях (2) и (3) входят два одинаковых параметра: общая липофильность всей молекулы $\log P_0$ и липофильность первого заместителя $\log P_{R1}$. Однако при переходе от одного уравнения к другому характер их влияния претерпевает инверсию. Кроме того, в уравнение (3) входит дополнительный параметр $\log P_{R2}$. В связи с этим можно предположить, что гидрофильно-гидрофобное взаимодействие производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с активным сайтом белка NHE-1 различаются, как это и было выявлено на этапе корреляционного анализа.

В уравнение (1) входит три стерических параметра MR_0 , MR_{R1} и MR_{R2} , а в уравнениях (2) и (3) они отсутствуют. Весьма вероятно, что у производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола имеется общий механизм взаимодействия с сайтом NHE-1, детерминированный размером их базовых структур. Возможно, этот механизм осуществляется через связывание данных конденсированных систем с каким-либо «особым» карманом сайта NHE-1, например, ответственным за фиксацию так называемых «привилегированных» структур, к которым относятся производные неконденсированного бензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола [De Simone, 2004].

Более высокая активность производных 2-аминобензимидазола, по-видимому, объясняется меньшим размером данного бицикла, что позволяет ему более свободно помещаться в указанном кармане и связываться с ним: для незамещенного 2-аминобензимидазола $MR=38,5 \text{ см}^3/\text{моль}$, а для незамещенного имидазо[1,2-*a*]бензимидазола $MR=44,4 \text{ см}^3/\text{моль}$.

В классе производных 2-аминобензимидазола повышению NHE-1 ингибирующей активности способствует снижение липофильности первого заместителя $\log P_{R1}$, при одновременном увеличении общей липофильности молекулы $\log P_0$ – за счет увеличения липофильности второго заместителя.

В классе производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, наоборот,

повышение NHE-1 ингибирующей активности обеспечивается снижением липофильности молекулы $\log P_0$ и увеличением липофильности обоих заместителей $\log P_{R1}$ и $\log P_{R2}$. При этом необходимо так подобрать комбинацию радикалов, чтобы суммарное повышение их липофильности компенсировалось уменьшением липофильности базовой структуры имидазо[1,2-*a*]бензимидазола за счет синергетического влияния на нее этих заместителей.

Таким образом, связывание 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с сайтом NHE-1, вероятно, состоит из двух этапов: 1) первичная «базовая» фиксация основной структуры в «привилегированном» кармане сайта, регулируемая размерами молекулы; 2) вторичное «регуляторное» взаимодействие со специфическим карманом сайта NHE-1 за счет гидрофильно-гидрофобного и электростатического взаимодействий.

3.6. Заключение

В исследованиях на тромбоцитах кролика *in vitro* было изучено 26 конденсированных и неконденсированных бензимидазолов содержащих гуанидиновую группировку – производные 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия, производные 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия, производные 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Найдено 5 соединений, превосходящих препарат сравнения - зонипорид по NHE-1-ингибирующей активности в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М: РУ-1199, РУ-1355 – в 1,5 раза, РУ-1390 – в 1,4 раза, РУ-1369 и РУ-1200 – в 1,2 раза, и проявившие наибольшую активность. По величине EC₅₀ данные соединения также были активнее зонипорида. Остальные соединения оказывали активность близкую по величине препарату сравнения.

При изучении зависимости активности от структуры и свойств соединений высокую NHE-1-ингибирующую активность проявили соединения производных 2-аминобензимидазола, содержащие в положении N¹ диэтиламиноэтильный (PY-1390), диметиламиноэтильный (PY-1369), пиперидиноэтильный (PY-1199) и морфолиноэтильный (PY-1355, PY-1200) радикалы.

С использованием «средних» и «супремальных» оценок NHE-1-ингибирующей активности производных циклических гуанидинов было показано, что бициклический кор - базовая структура неконденсированного 2-аминобензимидазола является наиболее перспективной структурой для поиска новых высоко активных ингибиторов NHE-1. Производные 2-аминобензимидазола являются наиболее активным классом не только в плане вклада базового химического ко́ра в общий уровень активности, но и в плане усиления этой активности за счет введения дополнительных заместителей.

При изучении NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов было уставлено, что механизмы физико-химического взаимодействия с сайтом ингибирования NHE-1 обменника у производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола различаются. Взаимодействие производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с сайтом NHE-1 происходит в два этапа: связывание с «привилегированным» карманом сайта основной части молекулы (регулируется размерами лиганда) и связывание со «специфическим» карманом сайта (определяется липофильностью и электронными параметрами).

Уровень NHE-1 ингибирующей активности всего ряда производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола определяется их липофильностью и стерическими характеристиками, у производных 2-аминобензимидазола зависит только от липофильности. Более высокая

активность производных 2-аминобензимидазола обусловлена меньшим размером базового структурного фрагмента этих соединений.

Выявленные в результате проведенного QSAR-анализа закономерности могут быть использованы для поиска новых высокоактивных ингибиторов NHE-1.

На основании данных по острой токсичности, в соответствии с классификацией токсичности веществ [Березовская, 2003], исследуемые производные 2-аминобензимидазола можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс). С учетом данных EC_{50} и LD_{50} соединения можно расположить таким образом: РУ-1355>РУ-1199>РУ-1200>РУ-1183>зонипорид.

Таким образом, было найдено 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид - соединение РУ-1355, которое превосходило зонипорид по уровню активности в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М по величине EC_{50} (рис. 3.14).

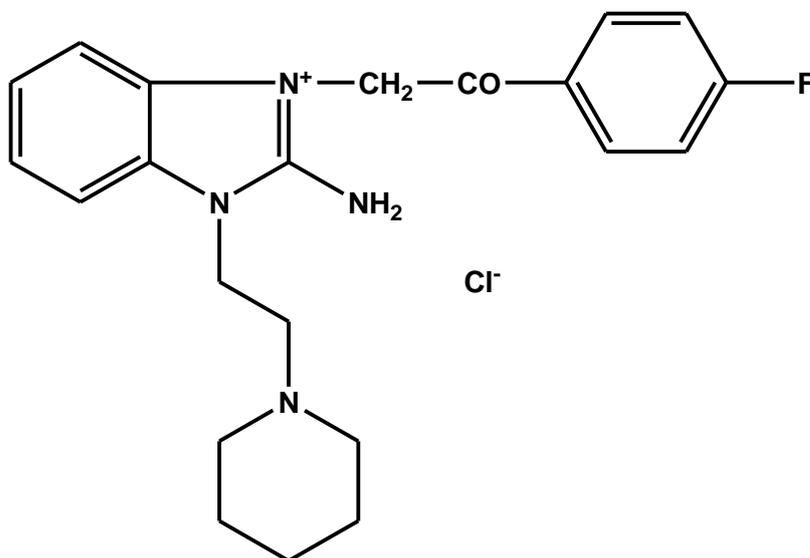


Рис. 3.14. Химическая структура соединения РУ-1355 – 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид.

ГЛАВА 4. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ RU-1355 И ЗОНИПОРИДА НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА У КРЫС

Важнейшим подходом к лечению сердечно-сосудистых заболеваний наряду с базовой терапией является защита кардиомиоцитов от необратимых повреждений, предупреждение ремоделирования миокарда, направленное на восстановление энергетических процессов и электролитного баланса [Михин, 2011]. Поэтому в настоящее время в фармакологии активно изучаются эффекты как ишемического, так и фармакологического preconditionирования миокарда [Галагудза, 2011; Andreadou, 2008].

Одним из современных подходов к кардиопротекции является использование избирательных ингибиторов NHE-1. Они ограничивают перегрузку клетки кальцием и уменьшают тяжесть развивающихся повреждений, в течение миокардиальной ишемии и реперфузии [Зверев, 2003].

В норме NHE-1 имеет низкую активность. Во время ишемии, в ответ на развивающийся ацидоз, его активность увеличивается и приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов Na^+ . Данный механизм способствует ингибированию Na^+/K^+ -АТФазы – основного пути выведения Na^+ из кардиомиоцитов. Накопление ионов Na^+ увеличивает вход ионов Ca^{2+} в клетки за счет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена [Malo, 2006]. Реперфузия усугубляет повреждение, возникшее во время ишемии миокарда. В период реперфузии концентрация внеклеточных протонов быстро снижается, что ведет к еще большему росту уровня кальция, контрактурам и некрозу кардиомиоцитов [Fliegel, 2009]. Ингибиторы NHE-1 оказывают свое кардиопротекторное действие при ишемии/реперфузии, ингибируя этот патологический каскад событий [Спасов, 2013; Fliegel, 2005; Andreadou, 2008].

4.1. Влияние соединения РУ-1355 на зону риска и некроза миокарда

У всех животных при проведении перевязки левой коронарной артерии (группы: 2 – «ишемия/реперфузия»; 3 – «ишемия/реперфузия+зонипорид»; 4 – «ишемия/реперфузия+РУ-1355»), развивалось ишемическое повреждение миокарда. На ЭКГ во II стандартном отведении наблюдали признаки ишемии (подъемы сегмента ST, снижение амплитуды зубца R). После внутривенного введения раствора СЭ, в конце 60-ти минутной реперфузии, происходила визуализация зоны риска. В среднем она составила 48,9% (табл. 4.1). Данные размеров анатомической зоны риска и зоны инфаркта в этих группах статистически достоверно отличались от таковых у животных, которым проводили весь комплекс операций, кроме перевязки левой коронарной артерии (группа «ложнооперированные»). Отсутствие различий в величине зоны риска указывало на стандартный уровень перевязки ЛКА и равные начальные условия ишемии у животных во всех трех группах.

У животных с патологией (группа 2 - «ишемия/реперфузия»), которым за 10 минут до реперфузии внутривенно вводили физиологический раствор, после окрашивания СЭ зона риска составляла 53,2% (табл. 4.1). При последующем окрашивании срезов сердца раствором ТФТ зона некроза составляла 44,4% по отношению к зоне риска (табл. 4.1, рис. 4.1), и 23,6% по отношению ко всему левому желудочку (рис. 4.2).

У животных, которым за 10 минут до реперфузии внутривенно вводили препарат сравнения зонипорид (группа 3), зона ишемии составляла 47,25% (табл. 4.1). При окрашивании срезов сердца ТТС зона некроза составила 31,2% по отношению к зоне риска (табл. 4.1), 14,7% по отношению ко всему объёму левого желудочка (рис. 4.2), что статистически значимо меньше по сравнению с группой «ишемия/реперфузия» в 1,4 раза.

У животных, которым за 10 минут до реперфузии внутривенно вводили соединение РУ-1355, (группа 4) зона риска составила 46,3% (рис. 4.1; табл. 4.1). При последующем окрашивании ТТС зона некроза в данной группе

Таблица 4.1

Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида (в эквимоллярных дозах) на размеры зон риска, некроза миокарда и содержание тропонина I в плазме крови в условиях длительной ишемии/реперфузии (M±m)

№	Группа	n	Дозы	Размеры зоны риска (% по отношению к левому желудочку)	Размеры зоны некроза (% по отношению к зоне риска)	Уровень тропонина I (пкг/мл)
1.	Ложнооперированные	6	Физ. р-р. 0,1 мл на 100 г веса	0,00±0,00	0,00±,00	136,65±38,03
2.	Ишемия/реперфузия	6	Физ. р-р. 0,1 мл на 100 г веса	53,20±4,99 [#]	44,36±3,79 [#]	528,32±81,32 [#]
3.	Ишемия/реперфузия+ зонипорид	7	1 мг/кг	47,25±3,82 [#]	31,18±2,98 ^{**}	252,76±72,05 ^{*#}
4.	Ишемия/реперфузия+ соединение РУ-1355	7	1,12 мг/кг	46,33±3,20 [#]	24,10±1,47 ^{**&}	211,88±60,14 ^{*#}

Примечания: различия статистически достоверны (p<0,05) к: # - группе «ложнооперированные»; * - группе «ишемия/реперфузия»; & - группе «ишемия/реперфузия+зонипорид». Все исследуемые соединения вводили однократно внутривенно за 10 минут до реперфузии.

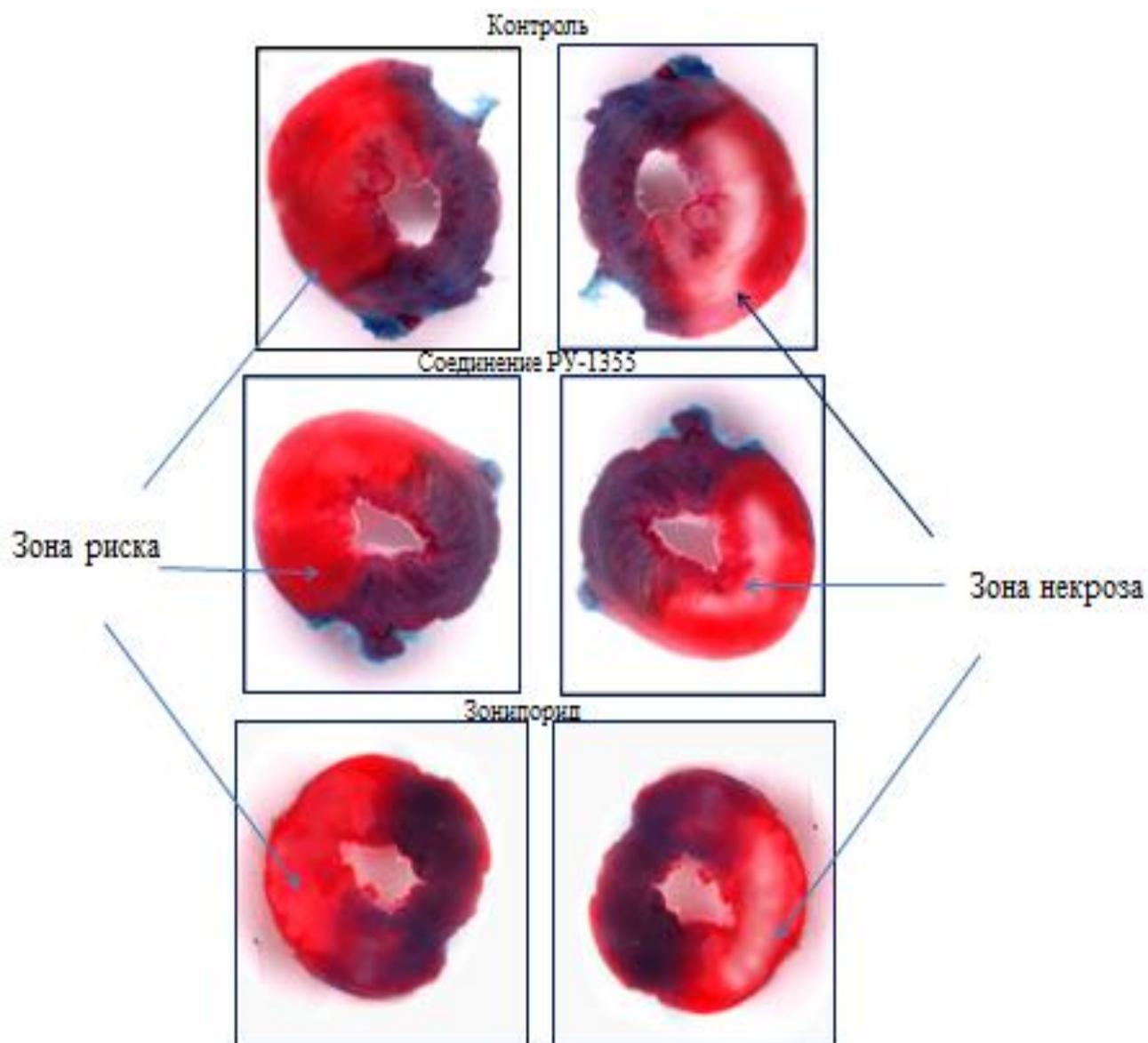


Рис. 4.1. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимольных дозах на зоны риска и инфаркта миокарда крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии.

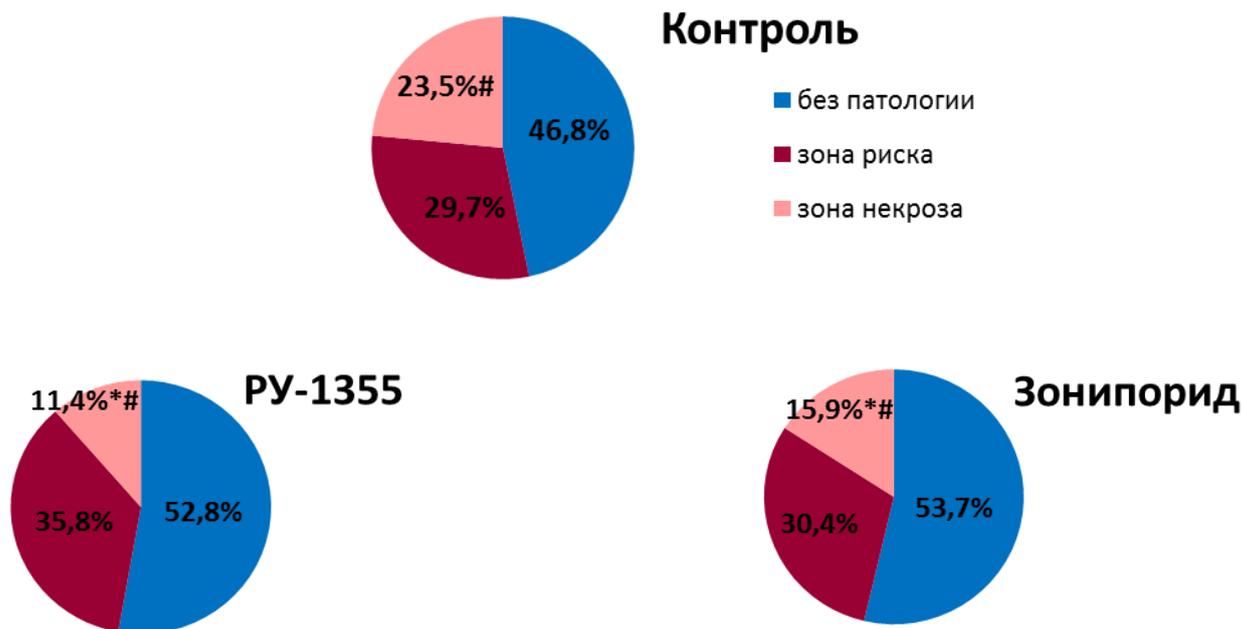


Рис. 4.2. Влияние соединения РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорида (1 мг/кг) в эквимолярных дозах на распределение зон повреждения миокарда крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии (% левого желудочка).

Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - группе «ложнооперированные»; * - группе «ишемия/реперфузия».

составляла 24,1% от зоны риска, и 11,2% от общего объёма левого желудочка (рис. 4.2). По величине зоны некроза различия статистически значимы как в группе «ишемия/реперфузия», так и «ишемия/реперфузия+зонипорид» в 1,8 и 1,3 раза соответственно.

Таким образом, было показано, что в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс, соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг, ограничивало зону некроза и превосходило зонипорид в 1,3 раза.

4.2. Действие вещества РУ-1355 на уровень тропонина I в плазме крови

Для оценки тяжести повреждения определяют уровень миокардиальных маркеров в сыворотки крови, таких как КФК, КФК-МВ,

АЛТ, ЛДГ-1, АСТ [Беневоленский, 2009; Островский, 2009, Бакумцева, 2011; Потапенко, 2012]. Во многих экспериментальных работах установлено, что наиболее выраженная корреляционная связь наблюдается между уровнем тропонина I и размером инфаркта [Лебедев, 2008; Дорофейков, 2010]. Таким образом, инфаркт-лимитирующий эффект (уменьшение зоны некроза и уровня миокардиальных маркеров) в остром эксперименте может быть верифицирован с помощью оценки тропонина I, коррелирующего с тяжестью инфаркта.

При иммуноферментном анализе наличия повреждения миокарда у группы животных, которым вводили физ. раствор («ишемия/реперфузия»), был показан достоверно высокий уровень тропонина I в плазме крови. Он составлял 528,32 пкг/мл (табл. 4.1; рис. 4.3), что в 3,9 раза выше чем у ложнооперированных ($p < 0,05$).

Зонипорид ограничивал рост уровня тропонина I в плазме крови животных с ишемией/реперфузией. Уровень тропонина составлял 252,76 пкг/мл (табл. 4.1; рис. 4.3), что статистически значимо в 2,1 раза ниже, чем в группе «ишемия/реперфузия».

У животных, которым вводили соединение РУ-1355 (группа «ишемия/реперфузия + РУ-1355»), наблюдался в 2,5 раз более низкий подъем уровня маркера повреждения по отношению к группе «ишемия/реперфузия» ($p < 0,05$). Уровень тропонина I составлял 211,88 пкг/мл (табл. 4.1; рис. 4.3).

Таким образом, было показано, что в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг, ограничивало рост концентрации маркера повреждения миокарда тропонина I в плазме крови, равный по данному виду активности препарату зонипорид.

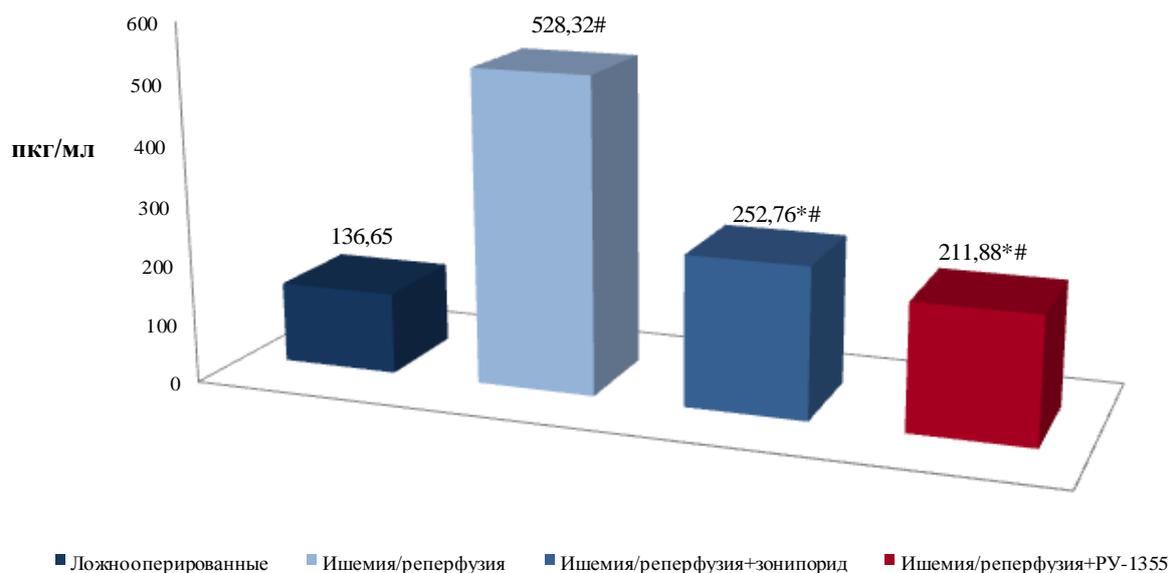


Рис. 4.3. Влияние соединения PY-1355 (1,12 мг/кг) и зониопирида (1 мг/кг) в эквимолярных дозах на уровень тропонина I (пкг/мл) в плазме крови крыс в условиях 60-ти минутной ишемии и 60-ти минутной реперфузии.

Примечание: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - группе «ложнооперированные»; * - группе «ишемия/реперфузия».

4.3. Заключение

Кардиопротекторное действие производного 2-аминобензимидазола PY-1355 было изучено в условиях 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс. Комплексную оценку проводили с учетом размеров анатомической зоны повреждения и уровня специфического маркера повреждения миокарда тропонина I.

Исследуемое вещество PY-1355 вводили внутривенно в дозе 1,12 мг/кг за 10 минут до реперфузии, так как наибольшая активность NHE-1 происходит в конце или на первых секундах реперфузии [Зверев, 2003].

Соединение PY-1355 ограничивало размеры зоны некроза миокарда. При окрашивании срезов сердец TTC зона некроза в данной группе составляла $24,10 \pm 1,47\%$. Было показано, что изучаемое вещество статистически достоверно превосходило показатели контрольных животных в 1,8 раза и 1,3 раза, получавших зониопирид.

Кроме того, соединение РУ-1355 ограничивало рост маркера повреждения миокарда тропонина I подобно зонипориду. Оно способствовало более низкому подъему тропонина I в 2,5 раза ниже чем у контрольных животных ($p < 0,05$). Уровень тропонина в данной группе составил 211,88 пкг/мл.

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

Известно, что одним из повреждающих факторов в период ишемии и реперфузии является активация сарколемного NHE-1 в кардиомиоцитах [Спасов, 2013; Andreadou, 2008; Fliegel, 2009]. При этом развивается «Ca²⁺-перегрузка», которая приводит к ухудшению функции проводящей системы и сократительного миокарда, ремоделированию желудочков, активации апоптоза. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что производное 2-аминобензимидазола РУ-1355 ингибирует NHE-1, предотвращая избыточное поступление кальция внутрь кардиомиоцитов, способствуя ограничению ишемического и постреперфузионного повреждения.

ГЛАВА 5. АНТИАРИТМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И ЗОНИПОРИДА

Острая ишемия миокарда приводит к значительным внутриклеточным и внеклеточным ионным и метаболическим изменениям. Некоторые внеклеточные изменения, такие как увеличение калия, лактата, продукция двуокси углерода, ацидоз и катехоламиновый релиз, приводят к повышению внутриклеточной концентрации кальция, магния и ионов натрия [Писаренко, 2005; Fliegel, 2009]. Эти биохимические и метаболические изменения влияют на входящие и выходящие трансмембранные ионные токи, в результате чего происходят глубокие изменения в покоем мембране кардиомиоцитов. Помимо этого происходит деполяризации мембранного потенциала покоя, уменьшение скорости электродвижущих сил, замедление проводимости, снижение возбудимости, укорочение продолжительности потенциала действия, нарушение рефрактерности, реполяризации и автоматизма. Хотя перечисленные биохимические и электрические изменения происходят не одновременно, внутриклеточная перегрузка Na^+ и Ca^{2+} является общим конечным пунктом, ведущим к аритмиям сердца после длительной и кратковременной ишемии путем активации электрического разобщения в кардиомиоцитах [Нарыжная, 2012]. Таким образом, изменение внутриклеточного гомеостаза ионов активирует рН-регулятор – NHE-1, являющийся важным фактором нарушения ритма вследствие ишемии сердца. Его ингибирование может быть эффективным в данной патологии [Avkiran, 2003; Fliegel, 2005].

Поэтому были проведены исследования антиаритмической активности соединения РУ-1355 и селективного блокатора NHE-1 - зонипорида, как при длительной, так и при кратковременной ишемии/реперфузии.

5.1. Противоаритмические свойства соединения РУ-1355 при длительной ишемии/реперфузии

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

Изменение нормального автоматизма обусловлено нарушением функций синусно-предсердного узла, водителей ритма второго и третьего порядков. Патологический автоматизм (эктопическая активность) может возникать в ткани предсердий, желудочков, пучке Гиса, волокнах Пуркинье при частичной деполяризации кардиомиоцитов. Триггерная активность (ранняя и поздняя постдеполяризация) обуславливает возникновение эктопических импульсов. Ранняя постдеполяризация появляется во время 3-й фазы потенциала действия, поздняя - после её окончания. Механизм ранней постдеполяризации запускается при увеличении продолжительности потенциала действия - например, удлинении интервала Q-T, низком внутриклеточном содержании ионов калия. При поздней постдеполяризации эктопические импульсы возникают на фоне ускоренного ритма [Метелица, 2001; Крыжановский, 2012].

В наших исследованиях после проведения оперативных вмешательств во всех экспериментальных группах на исходе возникали незначительные нарушения ритма, связанные с повреждением миокарда при подведении

лигатуры под ствол левой коронарной артерии (ЛКА). Регистрируемые аритмии были переведены в балльную систему. Средний балл составил 0,6.

Ишемические нарушения ритма регистрировали с момента перевязки ствола ЛКА. Они проявлялись в виде единичных и множественных экстрасистол, нарушений проводимости, приступов тахикардии и в редких случаях брадикардии. Тяжесть нарушений на 5 минуте составляла во всех группах 2,18 балла.

К 50-ой минуте наблюдения у всех животных с перевязкой ЛКА средний балл аритмического повреждения незначительно вырос и составил 2,24, что статистически достоверно отличалось от группы ложнооперированных, у которых данный показатель оставался равен 0,6 балла. Через 10 минут после введения изучаемых соединений (60 минута ишемии) картина аритмического повреждения внутри экспериментальных групп статистически значимо не изменилась (табл. 5.1). Так, у животных после внутривенного введения соединения РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг данный показатель снизился на 7,5% по отношению к 50-й минуте наблюдения и оказался близким по значению с зонипоридом. Однако, в отличие от контрольной группы, просматривалась тенденция к снижению тяжести нарушений ритма. Данный показатель по отношению такового у животных с патологией после введения соединения РУ-1355 и зонипорида снизился на 10,8% и 11,2% соответственно.

В условии реперфузии наблюдается нарастание гетерогенности миокарда в ишемизированной зоне, повреждение мембран кардиомиоцитов, деструкция сарколеммы и мембран клеточных органелл вследствие накопления в них катионов, в частности натрия, кальция, что является дополнительным повреждающим фактором [Avkiran, 2003].

Таблица. 5.1

Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида (в эквимольных дозах) при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии на тяжесть нарушений ритма на этапах 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс (в баллах, М±m)

№	Группы		Исход	Ишемия (баллы)				Реперфузия (баллы)		
				5 мин	30 мин	50мин ¹	60 мин	5 мин	30 мин	60 мин
1.	Ложно-оперированные	7	0,60±0,27	0,40±0,27	0,60±0,27	0,60±0,27	0,40±0,27	0,25±0,29	0,40±0,27	0,60±0,27
2.	Контроль патологии	7	0,58±0,23	2,17±0,11 [*]	2,08±0,15 [*]	2,33±0,14 [*]	2,33±0,14 [*]	2,58±0,15 [*]	2,25±0,13 [*]	2,42±0,15 [*]
3.	Зонипорид, 1 мг/кг	7	0,64±0,20	2,14±0,18 [*]	2,07±0,17 [*]	2,14±0,18 [*]	2,07±0,17 [*]	2,00±0,15 ^{*#}	1,93±0,20 [*]	1,64±0,20 ^{*#}
4.	Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг	7	0,58±0,23	2,25±0,25 [*]	2,17±0,21 [*]	2,25±0,22 [*]	2,08±0,26 [*]	1,92±0,29 [*]	1,83±0,24 [*]	1,58±0,26 ^{*#}

Примечания: Время введения вещества.

Различия статистически значимы (p<0,05) по сравнению с: * - исходом, # - контролем.

Баллы: 0 - нет нарушений ритма; 1 - единичные экстрасистолы; 2 - множественные экстрасистолы; нарушение внутрижелудочковой проводимости; блокады; 3 - пароксизмальная тахикардия; грубые нарушения ритма: диссоциация; 4 - асистолия; фибрилляция.

После реперфузии у контрольных животных с патологией нарушения ритма усилились и составили $2,58 \pm 0,15$ баллов. В группах животных, получавших соединение РУ-1355 и зонипорид, сохранилась тенденция к снижению по сравнению с контрольной группой.

К концу периода реперфузии соединение РУ-1355 и зонипорид статистически достоверно уменьшали выраженность аритмических нарушений на 34,7% и 32,2% соответственно по отношению к контрольным животным с патологией (табл. 5.1).

Таким образом, было установлено, что соединение РУ-1355 при внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг способствовало уменьшению постреперфузионных нарушений ритма в 1,5 раза на модели длительной ишемии/реперфузии миокарда подобно зонипориду.

5.2. Изучение антифибрилляторной активности соединения РУ-1355 при кратковременной ишемии/реперфузии

При фибрилляции образуются множественные петли re-entry в миокарде желудочков. При этом возникают сокращения отдельных волокон миокарда, но не происходит эффективного сокращения. Это обусловлено электрофизиологической неоднородностью тканей, когда отдельные участки сердца одновременно находятся в разных временных периодах де- и реполяризации.

В наших исследованиях у всех животных регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении до и после перевязки ствола ЛКА. При воспроизведении патологии во всех экспериментальных группах наблюдали признаки ишемического повреждения миокарда: подъем сегмента ST и снижение амплитуды зубца R.

После реперфузии у 86,7% животных контрольной группы регистрировали сначала спонтанные одиночные экстрасистолы, затем множественные. На второй минуте наблюдений развивалась тахикардия, переходящая в фибрилляцию. У 6,7% животных наблюдали

пароксизмальную тахикардию без перехода в фибрилляцию, у 6,7% - выраженную брадикардию.

При внутривенной инфузии зонипорида в дозе 1 мг/кг за 5 минут до ишемии количество тяжелых нарушений ритма было меньше и составило 28,6% случаев (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на развитие постреперфузионных фибрилляций у крыс ($M \pm m$)

№	Группы	Доза мг/кг	n	Постреперфузионные фибрилляции	
				предотвращение	
				%	баллы
1	Физиологический раствор.	0,1мл/100г	15	13,33	0,13±0,09
2	Соединение РУ-1355	1,12	6	33,33	0,33±0,23
3	Соединение РУ-1355	2,5	8	87,50	0,88±0,13*
4	Соединение РУ-1355	5	6	100,00	1,00±0,00*
5	Зонирорид	1	7	71,43	0,71±0,20*

Примечания: * - различия статистически достоверны к группе «физиологический раствор» ($p < 0,05$).

0 баллов - есть фибрилляции; 1 балл –нет фибрилляций.

Соединение РУ-1355 при профилактическом однократном внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг уступало зонипориду по способности ограничивать постреперфузионные фибрилляции. Повышение дозы вещества приводило к увеличению защитного эффекта. Была рассчитана ED_{50} соединения РУ-1355, которая составила 1,25 мг/кг.

5.3. Влияния соединения РУ-1355 на порог электрических фибрилляций

Порог фибрилляции желудочков при ишемии миокарда уменьшается, особенно в первые несколько минут после окклюзии коронарной артерии. В последующие 10–15 минут величина порога фибрилляции постепенно нарастает и достигает значений, имевшихся до возникновения ишемии, а в дальнейшем превосходит исходные контрольные величины.

Во время стимуляции желудочков электрическим током, сокращения сердца происходят неполноценно, что ведёт к развитию кратковременного ишемического повреждения и, следовательно, к активации NHE-1 [Hashimoto, 2003; Karmazyn, 2013]. Поэтому целесообразно изучать влияние ингибиторов данного обменника на порог электрических фибрилляций.

В проведенных исследованиях нами было установлено, что у животных во всех экспериментальных группах до введения исследуемых соединений наблюдались одинаковые показатели порога и продолжительности электрических фибрилляций: в среднем порог составил 1,3 мА, а ее продолжительность 75,1 секунды (табл. 5.3.).

После серий прямоугольных электрических импульсов продолжительностью 30 секунд у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г, порог и продолжительность фибрилляций по сравнению с исходными данными практически не отличались.

Соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении в дозе 1,25 мг/кг вызывало увеличение порога фибрилляций на 110,4% по отношению к исходному показателю, и на 90,6% по отношению к группе, получавшей физиологический раствор. Период времени до восстановления ритма сократился по отношению к исходным данным на 42,8% и к группе контрольных животных на 33,3% ($p < 0,05$) (табл. 5.3).

При введении препарата сравнения зонипорида в дозе 1 мг/кг порог электрических фибрилляций увеличился на 69,2% по отношению к исходным данным и на 60,0% по сравнению с контрольным показателем. Продолжительность времени до восстановления нормального ритма статистически достоверно сократилась по отношению к исходу на 37,9% и контролю на 29,4% (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Влияние соединения РУ-1355 (в дозе равной ED₅₀ при кратковременной инемии/реперфузии) и зонипорида при однократном внутривенном введении на изменение порога фибрилляций желудочков

№	Группы	n	Доза, мг/кг	вес животного, грамм	исходные фибрилляции		фибрилляции	
					Порог, mA	Продолжи- тельность, сек	Порог, mA	Продолжи- тельность, сек
1.	Контроль (физ. р-р)	6	0,1мл/100г	465,25±30,04	1,38±0,24	78,75±12,81	1,38±0,24	63,75±3,75
2.	Зонипорид	6	1	440,20±18,58	1,30±0,12	72,40±6,54	2,20±0,58	45,00±5,17*#
3.	Соединение -РУ1355	6	1,25	482,50±21,36	1,25±0,25	74,25±9,16	2,63±0,80	42,50±1,44*#

Примечания:

* - различия статистически достоверны к исходу (p<0,05);

- различия статистически достоверны к контролю (p<0,05).

На основании проведенных исследований было установлено, что соединение РУ-1355 повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца на 20% активнее, чем зонипорид. По способности уменьшать время до восстановления нормального ритма исследуемое соединение было близким по значению к препарату сравнения.

5.4. Действие соединения РУ-1355 и зонипорида на основные параметры ЭКГ

В основе механизма действия классических антиаритмиков лежит влияние на трансмембранные ионные токи. NHE-1 относится к электронейтральной системе, поэтому при ее ингибировании изменений со стороны проводящей системы сердца не происходит [Hashimoto, 2003]. Косвенно исключить влияние ингибиторов NHE-1 на потенциалзависимые каналы возможно при изучении их электрофизиологических свойств.

В наших исследованиях по изучению влияния соединения РУ-1355 и препарата сравнения зонипорида на компоненты электрокардиограммы крыс статистически значимых изменений не наблюдалось (табл. 5.4). Соединения РУ-1355 после однократного внутривенного введения в дозе 1,25 мг/кг не оказывало влияние на основные параметры ЭКГ. Интервалы RR, QT, QRS, PQ статистически достоверно не отличались от исходных показателей. Однако, наметилась тенденция к удлинению PQ, что свидетельствует о незначительном влиянии на атриовентрикулярную проводимость.

У животных, которым вводили зонипорид в дозе 1 мг/кг, наблюдалось незначительное увеличение продолжительности зубца Р и интервала PQ, удлинение R-R и вследствие этого происходило некоторое урежение ЧСС на 6,5% в отличие от исходных данных. Это свидетельствует о возможном влиянии зонипорида на задержку проведения возбуждения по предсердиям. Подобные свойства ингибиторов NHE-1 описаны в литературе [Hashimoto, 2003].

Таблица 5.4

Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на основные параметры ЭКГ наркотизированных крыс при однократном внутривенном введении ($M \pm m$)

№	Показатель	Зонипорид, 1 мг/кг (n=6)		РУ-1355, 1,25 мг/кг (n=6)	
		До введения	После введения	До введения	После введения
1.	P, сек.	0,025±0,002	0,027±0,002	0,024±0,001	0,024±0,001
2.	PQ, сек.	0,047±0,003	0,049±0,001	0,052±0,003	0,054±0,002
3.	QRS, сек.	0,027±0,002	0,026±0,002	0,026±0,002	0,030±0,004
4.	QT, сек.	0,071±0,002	0,077±0,002	0,074±0,003	0,073±0,005
5.	QT _c , сек.	0,190±0,004	0,201±0,008	0,199±0,005	0,195±0,010
6.	R, мВ	0,200±0,035	0,220±0,042	0,275±0,055	0,325±0,029
7.	RR, сек.	0,139±0,006	0,150±0,010	0,136±0,005	0,138±0,005
8.	ЧСС, уд/мин	433,00±17,57	404,80±27,15	443,25±15,00	438,00±17,37

Примечания: * - различия статистически значимы по сравнению с исходом ($p < 0,05$).

5.5. Заключение

Установлено, что исследуемое соединения РУ-1355 оказывает антиаритмическое и антифибрилляторное действие.

Изучаемое вещество проявило защитное действие в отношении ишемических нарушениях ритма подобно эффекту селективного блокатора NHE-1 - зонипориду. На модели длительной ишемии/реперфузии было показано, что к 60-й минуте реперфузии соединение в дозе 1,12 мг/кг статистически значимо снижало тяжесть нарушения ритма на 34,7% по отношению к контрольным данным.

Соединение РУ-1355 оказывало антифибрилляторное действие. При кратковременной ишемии/реперфузии ED₅₀ составила 1,25 мг/кг.

Исследуемое соединение в дозе 1,25 мг/кг повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца на 90,6% по отношению к контрольной группе с патологией ($p > 0,05$), и на 20% было активнее зонипорида ($p > 0,05$), однако эти различия оказались статистически не значимы. По способности уменьшать время до восстановления нормального ритма, исследуемое соединение превосходило контрольную группу с патологией на 33,3% ($p < 0,05$) и препарат сравнения на 6% ($p > 0,05$).

Статистически достоверных изменений со стороны ЭКГ при однократном введении соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг не выявлено.

ГЛАВА 6. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И МИЛДРОНАТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОМ

Повышенная активность симпатической нервной системы является одним из основных патологических особенностей пациентов с сердечной недостаточностью. Катехоламины играют важную роль в компенсаторной гипертрофии миокарда [Shibata, 2001; Nakajima-Takenaka, 2009]. Сердечная гипертрофия является важным шагом для сердца в переходе от адаптивного к дезадаптивному состоянию. Ранее было показано, что хроническая стимуляция β -адренергическим агонистом изопротеренолом (ИЗО), индуцирует гипертрофию сердца, сопровождающуюся повышенным фиброзом [Kitagawa, 2004; Takaki, 2004; Zhang, 2007], также обнаружено, что хроническая стимуляция ИЗО вызывает диастолическую дисфункцию левого желудочка, связанную с нарушением Ca^{2+} -обмена. Тем не менее, снижение частоты сердечных сокращений может компенсировать диастолическую дисфункцию [Nakajima-Takenaka, 2009]. С другой стороны, все больше исследований доказывают, что нарушение обмена Ca^{2+} играет существенную роль в развитии сердечной недостаточности [Xue, 2010; Cingolani, 2011]. В экспериментальных моделях сердечной недостаточности нашли свое применение фармакологические и генетические подходы, используемые для восстановления Ca^{2+} обмена. Тем не менее, конкретных исследований, направленных на улучшение ионного обмена во время гипертрофии сердца, в ответ на стимуляцию β -адренорецепторов по-прежнему недостаточно.

Таким образом, настоящее исследование целесообразно для изучения влияния нового ингибитора NHE-1 соединения РУ-1355 на развитие гипертрофии сердца и внутриклеточный обмен Ca^{2+} в ответ на хроническую инфузию изопротеренолом.

6.1. Моделирование хронической сердечной недостаточности

Для доклинического изучения кардиотропных эффектов новых соединений используют различные модели сердечной недостаточности: введение норадреналина в возрастающих дозах в течение 14 дней (кумулятивная доза 35 мг/кг), монокроталина в дозе 60 мг/кг, доксорубицина 15 мг/кг. Наиболее часто используют модель, связанную со стимуляцией бета-адренорецепторов [Казаченко, 2008; Talarico, 2014].

Известно, что постоянная стимуляция β -адренорецепторов изопротеренолом (ИЗО) индуцирует гипертрофию сердца, которая сопровождается усиленным фиброзом в интерстиции кардиомиоцитов [Zhang, 2007]. В ранее опубликованных исследованиях, были описаны механизмы, лежащие в основе хронической сердечной недостаточностью (ХСН), вызванной ИЗО [Ennis, 2003; Kitagawa, 2004; Nakajima-Takenaka, 2009]. Так в экспериментах на крысах *in vivo*, после внутрибрюшинного введения ИЗО в дозе 1,2 мг/кг в день однократно в течение 4 недель, происходила гибель части кардиомиоцитов, контрактура миофибрилл, отек межклеточного пространства, достоверное снижение содержания белков цитоскелета (тубулин, винкулин, киназа легких цепей миозина (КЛЦМ)) и внеклеточного матрикса фибронектина на 27–29%, резкое уменьшение содержания гликогена и наличие стреловидных включений в митохондриях, характерных для кальциевой перегрузки [Zhang, 2005]. Меньшая дозировка и более короткий срок введения изопротеренола (1 мг/кг – 11 дней) не оказывали выраженного повреждающего действия, но через 3 недели отмечалось уплотнение внеклеточного матрикса, сочетавшееся с повышением содержания миоспецифических белков (KRP — kinase-related protein, десмин) и тубулина на 26–32% по сравнению с контрольным уровнем [Kitagawa, 2004]. Изопротеренол повышал также экспрессию этих белков и КЛЦМ в культуре кардиомиоцитов. На основании результатов исследования установлено, что даже однократное воздействие изопротеренола создает в

сердечной мышце длительный "структурный след", выражающийся в повышенной экспрессии белков внеклеточного матрикса, а также саркоплазматических белков, вовлеченных, по-видимому, в гипертрофический ответ кардиомиоцитов [Shibata, 2011].

Используют разные подходы в моделировании сердечной недостаточности с помощью изопротеренола (введение ИЗО 85 мг/кг подкожно минипомпой в течение 14 дней, подкожные инъекции ИЗО 5 мг/кг в течение 1 недели и 5 мг/кг ИЗО в течение 28 дней внутривенно) [Ennis, 2003; Kitagawa, 20004; Nakajima-Takenaka, 2009].

Поэтому на первом этапе проведена оценка формирования сердечной недостаточности¹ при хроническом введении ИЗО в дозе 2,5 мг/кг 2 раза в день. До и через 2 и 4 недели после начала введения ИЗО фиксировали следующие показатели: масса животных, масса миокарда (суммарный вес левого желудочка и межжелудочковой перегородки), рассчитывался индекс гипертрофии, оценивалась сократительная активность и функциональные резервы сердца, уровень МДА, проводились морфологические исследования.

У интактных животных наблюдалась положительная динамика веса тела в течение всего периода наблюдения. Вес животных, получавших изопротеренол, на второй неделе (группа «ИЗО 2 неделя») статистически достоверно снизился на 61,4 грамма (16,8%). К концу периода введения («ИЗО 4 неделя») наблюдалось восстановление веса только до исходных значений (рис 6.1 А).

При отсутствии прироста веса животных с патологией наблюдали прибавку массы миокарда. Статистически достоверное увеличение на 34,7% (рис 6.1 Б) происходило на четвертой неделе.

¹Исследования были проведены совместно с к.м.н. Н.А. Гуровой, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

Наблюдался рост индекса гипертрофии: прирост у животных с ХСН на второй и четвертой неделе недели формирования патологии составил от интактной группы 42,4 и 37,9% соответственно (рис 6.1 В) ($p < 0,05$).

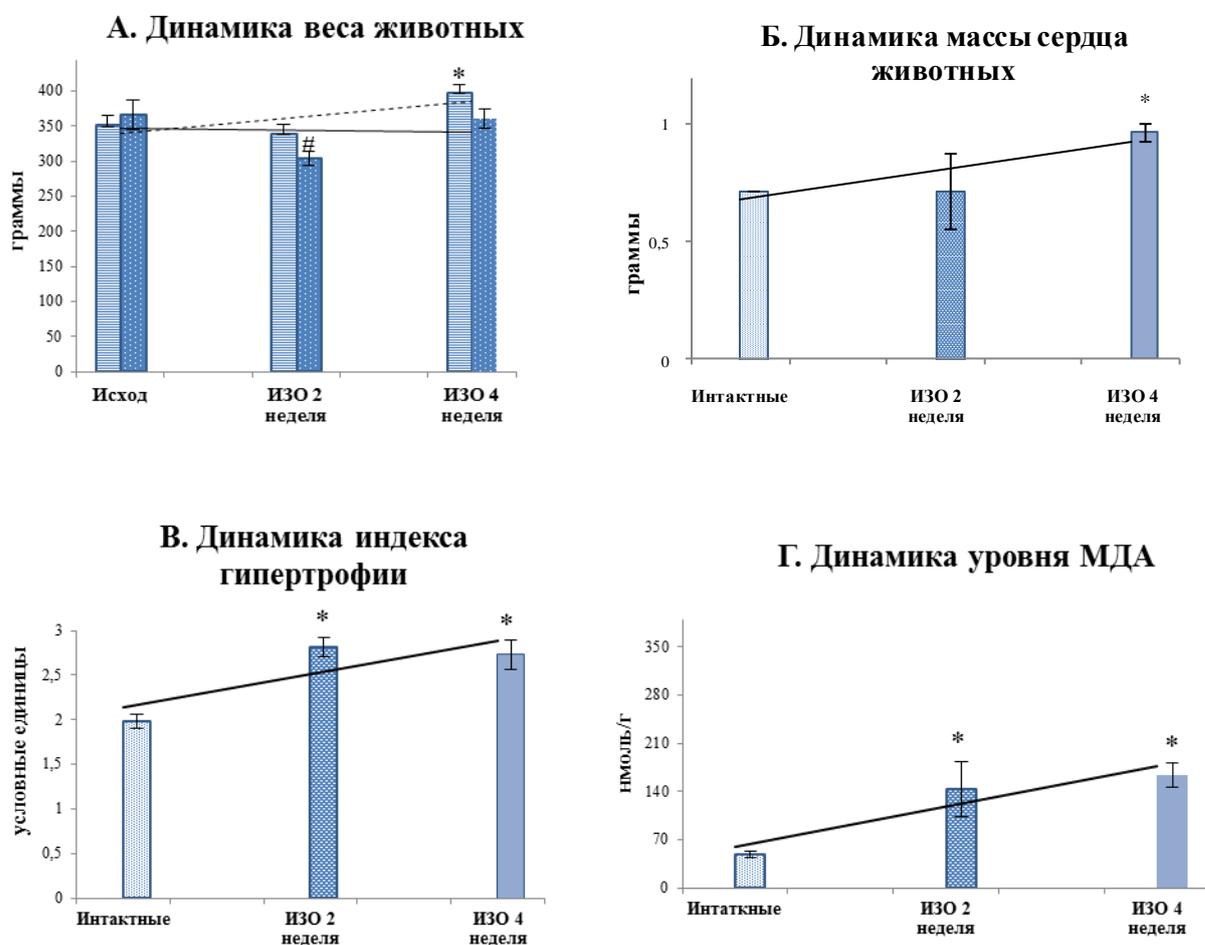


Рис 6.1. Динамика веса тела, массы миокарда, индекса гипертрофии и МДА при хронической интоксикации изопротеренолом у крыс (2,5 мг/кг 2 раза в день внутрибрюшинно в течение 4-х недель).

Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: # - исходу; * - группе «интактные».

На рис. А первый столбик: интактные животные; второй столбик: животные с изопротеренолом.

Уровень МДА в миокарде увеличивался и превосходил таковой у интактных животных на второй и четвертой недели в 2,9 и 3,4 раза соответственно ($p < 0.05$) (рис 6.1 Д).

При проведении динамических нагрузок было установлено угнетение сократительной активности у животных с ИЗО. В тесте с увеличением

преднагрузки (нагрузка объемом) у животных с ХСН после курсового введения изопротеренола, на 15-ой секунде проводили оценку основных показателей, таких как левожелудочковое давление (ЛЖД), частота сердечных сокращений (ЧСС) и максимальная интенсивность функционирования структур (МИФС).

При оценке прироста ЛЖД и ЧСС в динамике было выявлена следующая закономерность: на второй неделе введения ИЗО реакция на нагрузку обеспечивалась в большей степени за счет увеличения сократимости и в меньшей степени за счет прироста ЧСС. ЛЖД статистически достоверно снизилось на четвертой неделе по сравнению с интактными, и наблюдался отрицательный прирост (-7,1%) (6.2 рис., Приложение 2). При расчете МИФС было выявлено, что только на 2-й неделе функциональные резервы были компенсированы при снижении сократимости за счет увеличения ЧСС. К четвертой неделе МИФС значительно снизился на 89,9% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 6.2).

Аналогичные результаты наблюдались при увеличении максимальной изометрической нагрузки. При оценке в динамике максимального ответа (на 5-ой секунде) и способности удерживать нагрузку (на 25-ой секунде) у животных с ХСН после курсового введения изопротеренола, было показано, что ЛЖД максимально снизилось к четвертой неделе практически в 2 раза. ЧСС возрастала. Наблюдалась отрицательная динамика МИФС (рис. 6.3). На четвертой неделе формирования патологии данные показатели статистически достоверно снизился примерно в 2 раза

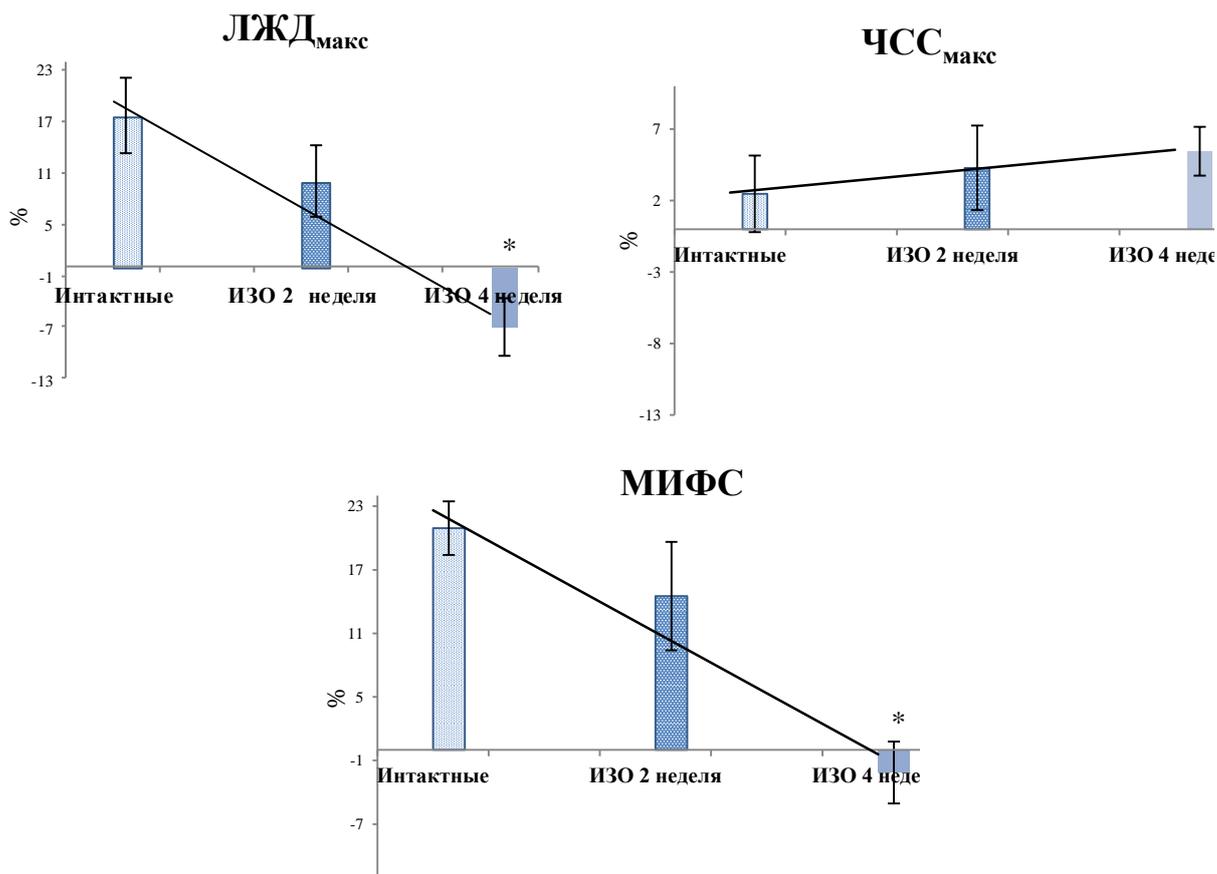


Рис. 6.2. Изменение показателей кардиодинамики при увеличении преднагрузки (в тесте нагрузки объемом) у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (2,5 мг/кг 2 раза в день внутривентрикулярно в течение 4-х недель).

Примечание: * - различия статистически достоверны к интактным ($p < 0,05$).

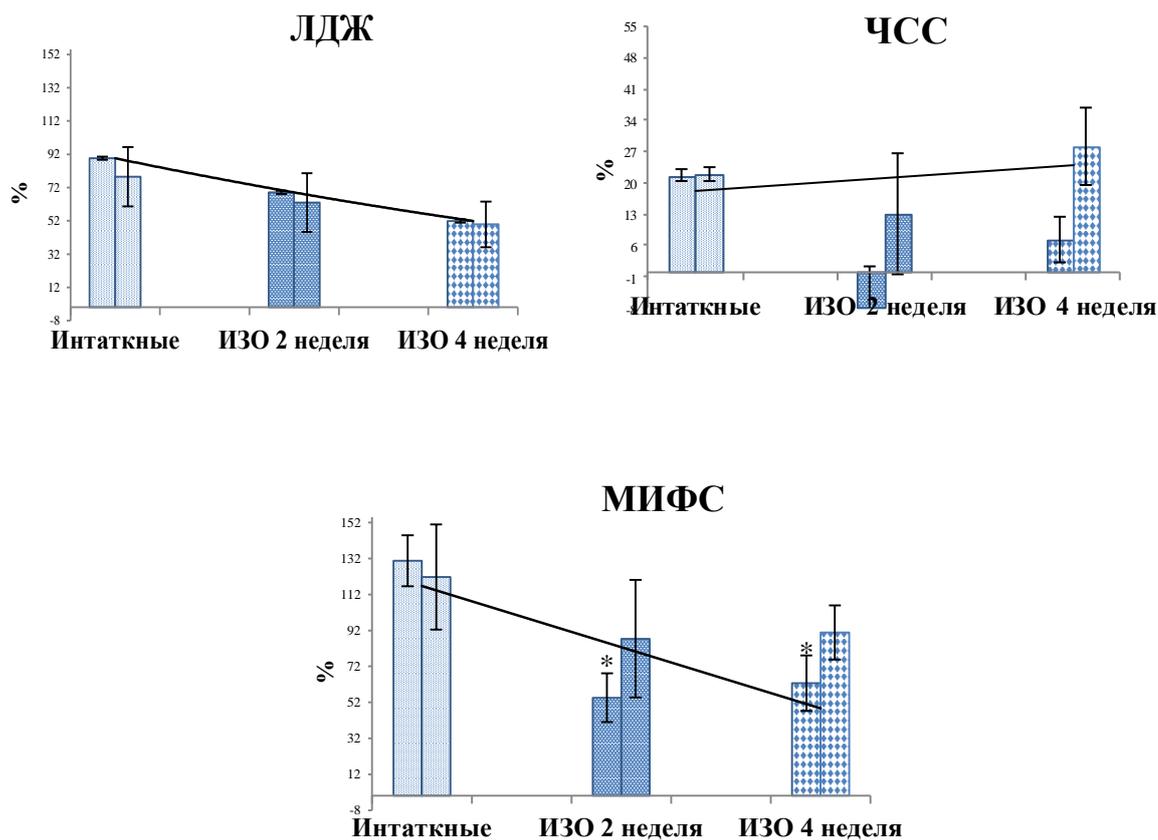


Рис. 6.3. Изменение показателей кардиодинамики при увеличении постнагрузки (в тесте с максимальной изометрической нагрузкой) у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (2,5 мг/кг 2 раза в день внутривнутрибрюшинно в течение 4-х недель).

Примечание: * - различия статистически достоверны к интактным ($p < 0,05$).

В каждой группе первый столбик: максимальный эффект на 5 секунде; второй столбик: эффект на 25 секунде.

После проведения нагрузочных тестов проведено морфологическое исследование миокарда левого желудочка крыс при формировании ХСН.

В миокарде крыс интактной группы преобладали кардиомиоциты, формировавшие мышечные волокна, с равномерно окрашенной ацидофильной цитоплазмой и хорошо выраженной поперечной исчерченностью. Ядра кардиомиоцитов на продольных срезах имели овальную форму и содержали значительное количество гетерохроматина.

Между мышечными клетками обнаруживалось незначительное количество рыхлой волокнистой соединительной ткани с кровеносными капиллярами.

В миокарде крыс экспериментальной группы («ИЗО 2 неделя») в условиях хронического изопротеренолового (2,5 мг/кг в/бр) повреждения в течение 2 недель сохранялись дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация цитоплазмы. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка с переходом в интрамуральный миокард обнаруживались участки зрелой фиброзной соединительной ткани. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как умеренно выраженная.

В миокарде крыс экспериментальной группы («ИЗО 4 неделя») в условиях хронического изопротеренолового (2,5 мг/кг в/бр) повреждения в течение 4 недель обнаруживались дистрофические и атрофические изменения в кардиомиоцитах; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы кардиомиоцитов. В миокарде между участками фиброзной ткани обнаруживался сетчатый фиброз, а так же дистрофически измененные и резко атрофичные кардиомиоциты. Участки фиброзирования обнаруживались также в периваскулярных отделах миокарда левого желудочка. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как выраженная.

При балльной оценке результатов морфологических исследований в динамике был показан рост объемной плотности соединительной ткани и коллагеновых волокон ($p < 0,05$). Данные представлены на рис. 6.4 и Приложение 3.

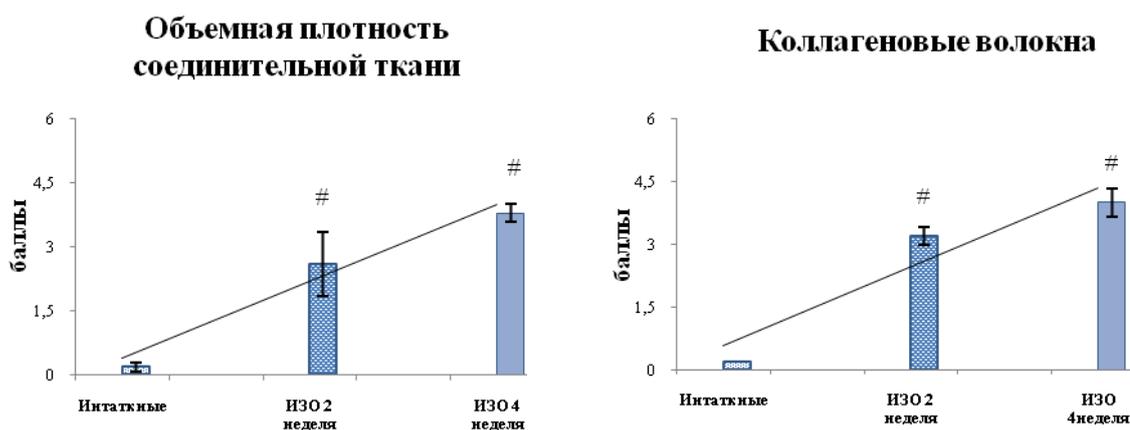


Рис. 6.4. Изменение объемной плотности соединительной ткани и коллагеновых волокон при формировании хронического повреждения миокарда изопроterenолом (2,5 мг/кг 2 раза в день внутривнутрибрюшинно в течение 4-х недель).

Примечание: # - различия статистически достоверны к интактным ($p < 0,05$).

Данные показатели достигли максимальных значений к 4-й неделе и составили для объёмной плотности и количества коллагеновых волокон около 4 баллов.

6.1.1. Заключение

Известно, что длительная стимуляция β -рецепторов изопроterenолом (ИЗО) в дозах 1-3 мг/кг приводит к гипертрофии миокарда, которая сопровождается усиленным фиброзом миокарда [Zhang, 2007].

В наших исследованиях было показано, что наиболее явные признаки формирования ХСН развились на 4 неделе введения ИЗО. О чем свидетельствуют статистически значимый рост индекса гипертрофии на 37,9%, уровня МДА в 3,4 раза, снижение сократительной активности миокарда и функциональных резервов при проведении пред- и постнагрузок.

При оценке результатов морфологических исследований наблюдалось формирование в течение первой-второй недели молодой грануляционной ткани в миокарде, богатой клеточными элементами, а в последующие сроки к выраженному кардиосклерозу.

При анализе морфологических исследований был выявлен значимый рост как объемной плотности соединительной ткани, так и коллагеновых волокон (от 0 баллов у интактных до 4 баллов на 4-й неделе).

Поэтому для дальнейшего изучения кардиопротекторных свойств соединений нами была выбрана 4-х недельная модель хронической изопротереноловой интоксикации: 2,5 мг/кг 2 раза в день внутривенно.

6.2. Изучение кардиопротекторных свойств соединения РУ-1355 при хронической интоксикации изопротеренолом

Для оценки кардиопротекторных свойств изучаемого соединения РУ-1355 и препарата сравнения мидронат был использован комплексный подход по следующим показателям: масса животных, масса миокарда, индекс гипертрофии, сократительная активность и функциональные резервы сердца, уровень МДА, морфологические исследования.

6.2.1. Влияние соединения РУ-1355 на индекс гипертрофии миокарда при хронической интоксикации изопротеренолом

При оценке влияния соединений на выраженность сердечной недостаточности, вызванной хроническим изопротереноловым повреждением, было установлено, что у животных в группе «интактные» исходный вес составил 336,9 грамм (табл. 6.1). Через четыре недели прибавка веса составила 17,5% (59,1 грамма) и статистически достоверно отличалась от исходного показателя. Индекс гипертрофии был равен 1,79 условных единиц.

В группе животных, получавших изопротеренол (группа 2 - «ИЗО»), в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) в течение 28 дней, исходный вес был 346,4 грамма. Прирост веса в конце 4-ой недели у животных этой группы составил 1,2% (4,2 грамма), что было в 14,6 раза статистически достоверно ниже, чем у интактных животных (табл. 6.1). Коэффициент гипертрофии составил 2,5 условных единиц и отличался от группы интактных животных ($p < 0,05$).

У животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня, исходный вес животных в начале эксперимента был 340,0 г. Прирост после 4-х недель составил 5,1% (17,3 грамма) и был выше в 4,3 раза по отношению к группе с интоксикацией ИЗО. Коэффициент гипертрофии составил 2,4 условных единиц и был на 7,1% ниже, чем в группе животных с ИЗО (табл. 6.1).

У животных с ХСН, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг в течение 31 дня, исходный вес составил 342,4 грамма. Прибавка веса к 4-ой неделе составила 4,6% (15,6 грамма) и была выше в 3,8 раза по сравнению с группой ХСН. Индекс гипертрофии составил 2,2 условных единиц, что на 6,8% было ниже по сравнению с группой ИЗО (табл. 6.1).

Таким образом, было установлено, что соединение РУ-1355 и милдронат при курсовом введении в дозах 2,5 и 50 мг/кг соответственно, ограничивают рост индекса гипертрофии миокарда.

6.2.2. Влияние соединения РУ-1355 на функциональные резервы миокарда

Первоначально проведены исследования в тесте **нагрузки объемом**. При оценке данных кардиодинамики было выявлено, что у животных с ХСН, исходные показатели сократимости не отличались от интактных (Приложение 4, 5, 6, 7, 8). Однако наблюдалось статистически значимое снижение ЧСС и МИФС на 12,0 и 29,6% ниже, чем в интактной группе ($p < 0,05$). У животных получавших изучаемые соединения наблюдалась тенденция к повышению ЧСС и МИФС по отношению к группе ХСН.

При проведении **нагрузки объемом** у интактных животных ЛЖД возрастало максимально на 30,0% на 15-ой секунде наблюдения, скорость сокращения ($dp/dt+$) на 19,2%, скорость расслабления ($dp/dt-$) миокарда на 26,0%, ЧСС на 8,9% по сравнению с исходными данными (рис. 6.5 А, Б, В, Г). Максимальный прирост МИФС составил 29,5% (рис. 6.5 Д).

Таблица 6.1

**Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на вес тела и миокарда крыс при хронической интоксикации
изопротеренолом (M±m)**

№	Группа	Исходный вес животных, г	Показатель через 4 недели формирования патологии			
			вес животного, г	масса левого желудочка, г	масса межжелудочковой перегородки, г	коэффициент гипертрофии, услов.ед.
1.	Интактные	336,90±14,61	396,00±11,02 [@]	0,48±0,02	0,24±0,01	1,79±0,04
2.	Изопротеренол (ИЗО)	346,40±16,90	350,57±19,42 [*]	0,63±0,04 [*]	0,25±0,01	2,53±0,12 [*]
3.	ИЗО+соединение РУ-1355, 1 мг/кг	340,00±11,49	357,25±19,41	0,61±0,039 [*]	0,27±0,04	2,35±0,18 [*]
4.	ИЗО+Милдронат, 50 мг/кг	342,40±13,14	358,00±8,59 [*]	0,53±0,02 ^{*#}	0,26±0,01	2,22±0,06 [*]

Примечания:

* - различия статистически достоверны группе интактные (p<0,05);

- различия статистически достоверны к группе ИЗО (p<0,05);

@ - различия статистически достоверны к исходу (p<0,05).

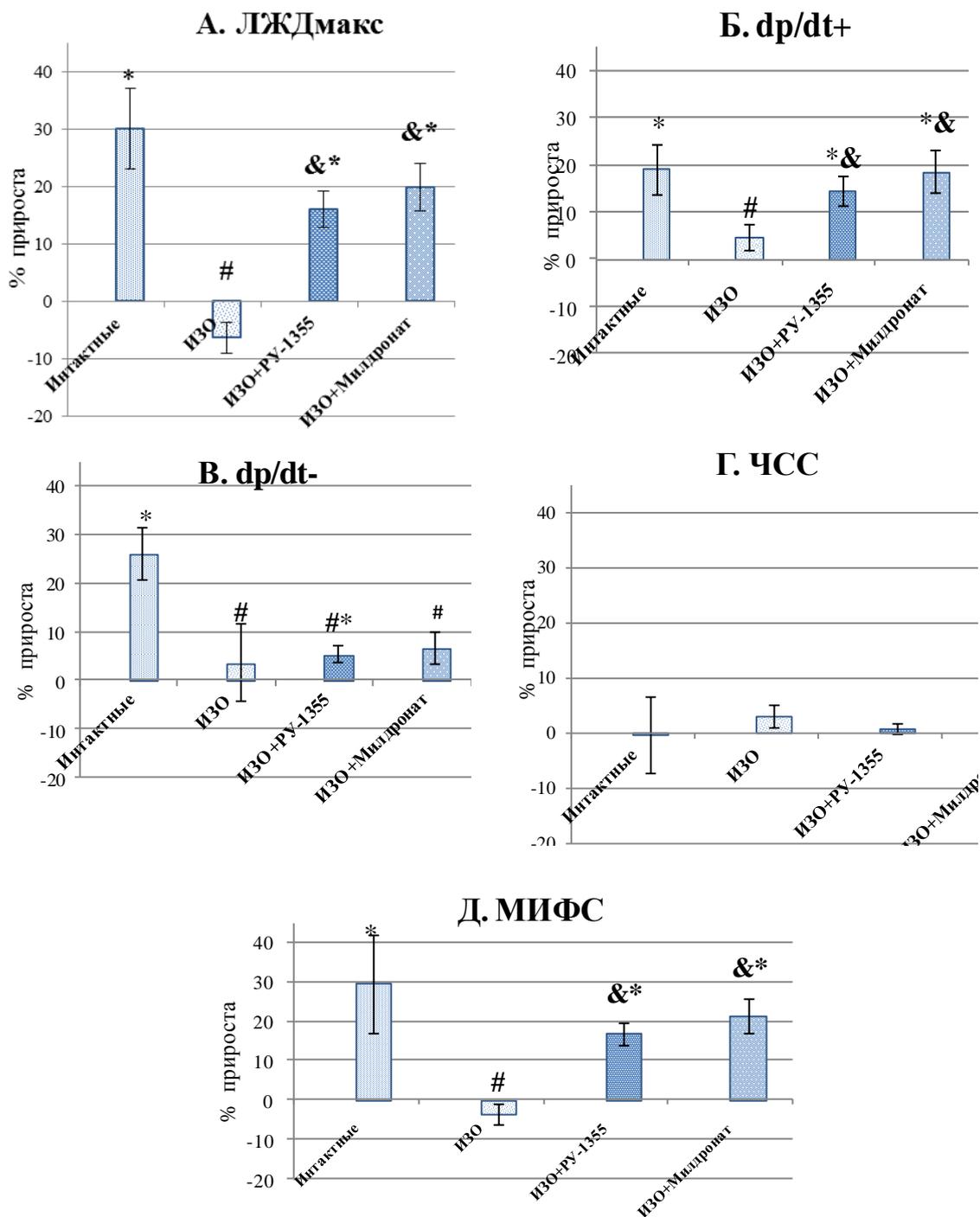


Рис. 6.5. Влияние соединения РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на максимальные показатели кардиодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопроterenолом (2,5 мг/кг внутривбрюшинно 2 раза в день в течение 4-х недель).

Примечания: различия статистически достоверные ($p < 0,05$): * - исход; # - группе интактные; & - группе ИЗО.

У животных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), вызванной изопроterenолом, в условиях нагрузки объемом динамическая

реакция отсутствовала. ЛЖД на 15-ой секунде снизилось на 6,3%. Скорости сократимости ($dp/dt+$) и расслабления ($dp/dt-$) увеличились на 4,6% и 3,6% соответственно. Значения ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$ были статистически достоверно ниже таковых в группе интактных животных на 82,7%, 76,2% и 86,2% соответственно (рис. 6.5 А, Б, В). ЧСС практически не изменялась (рис. 6.5 Г). На 15-ой секунде прирост МИФС оказался отрицательным (-3,6%) и статистически достоверно самым низким в экспериментальных группах на данной модели (рис. 6.5 Д, приложение 4-8).

Таким образом, у животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, основные показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом (ЛДЖ, $dp/dt+$, $dp/dt-$, МИФС) были статистически достоверно ниже, чем у интактных животных в 5,8, 4,2, 7,2 и 8,3 раз соответственно.

При проведении нагрузки объемом у животных с ХСН после курсового введения соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня, максимальный прирост ЛЖД составил 16,0% на 15-ой секунде (Приложение 4-8). Он статистически достоверно увеличился относительно аналогичного параметра группы животных с патологией в 2,5 раза (рис. 6.5 А). Максимальные приросты скорости сокращения ($dp/dt+$) и расслабления ($dp/dt-$) миокарда у животных данной группы составили 14,5% и 5,4% соответственно (рис. 6.5 Б, В). Показатели $dp/dt+$ и $dp/dt-$ были выше в 3,2 и 1,5 раза соответственно, по отношению к группе животных с изопротеренолом. ЧСС не изменялась (рис. 6.5 Г). Прирост МИФС составил 16,9%, что статистически достоверно выше в 4,7 раза по отношению к группе с хроническим повреждением изопротеренолом (рис. 6.5 Д).

У животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, получавших до проведения нагрузочных проб милдронат в дозе 50 мг/кг в течение 31 дня, при проведении нагрузки объемом прирост ЛЖД, скорости сокращения и скорости расслабления равнялся 19,9%, 18,7% и 6,5%, соответственно на 15-ой секунде наблюдения (рис. 6.5 А, Б, В). Прирост ЛЖД и $dp/dt+$ были статистически выше группы животных, получавших

изопротеренол в 3,2 и 4,1 раза соответственно (рис. 6.5 А, Б). Индекс расслабления ($dp/dt-$) составил 6,5% и практически не отличался от группы животных с интоксикацией изопротеренолом (рис. 6.5 В). Значения ЧСС у животных данной группы практически не менялись в течение всей нагрузки (рис. 6.5 Г). Прирост МИФС составил 21,2% и оказался статистически достоверным в 5,9 раза выше, чем у животных с изопротеренолом (рис. 6.5 Д).

Таким образом, было установлено, что соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг у животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом в условиях нагрузки объемом улучшало сократимость миокарда, подобно милдронату. По показателям (ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС), различия были статистически достоверно выше относительно аналогичных параметров в группе контрольных животных с изопротеренолом в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно.

Далее изучено влияния препаратов на кардиодинамику при **изометрической нагрузке**. При оценке исходных показателей кардиодинамики было выявлено, что у животных с ХСН, показатели сократимости не отличались от контрольных, однако наблюдалось статистически значимое снижение ЧСС и МИФС. В группах, получавших изучаемые соединения, показатели сократимости не отличались от животных с ХСН, однако, в группе с милдронатом наблюдалась статистически значимая тенденция к повышению МИФС (Приложение 9, 10, 11, 12, 13).

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что при изометрической нагрузке в течение 25 секунд у животных интактной группы на 5 секунде наблюдения прирост ЛЖД возрастало максимально на 92,3%, скорость сокращения ($dp/dt+$) на 50,6%, скорость расслабления ($dp/dt-$) миокарда на 30,2%, ЧСС на 12,8%, по сравнению с исходными данными ($p>0,05$) (Приложение 9-12). МИФС увеличилась на 119,1% по сравнению с исходными данными. Показатели прироста к концу нагрузки также оставались высокими и для ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС составили

82,4%, 32,4%, 29,9%, 17,9% и 116,6% соответственно ($p>0,05$) (рис 6.6 А, Б, В, Г, Д; приложение 13).

У контрольных животных с ХСН, вызванной введением изопротеренола, в условиях изометрической нагрузки на 5-ой секунде максимальный прирост ЛЖД составил 61,3%, $dp/dt+$ – 32,3%, $dp/dt-$ – 19,8%, по сравнению с исходными данными ($p>0,05$) (Приложение 9-11), что было ниже показателей интактной группы животных на 33,6%, 36,2% и 34,5% соответственно (рис 6.6 А, Б, В).

Прирост ЧСС в этой группе животных в условиях изометрической нагрузки увеличилась на 14,4%, что на 12,8% больше, чем в интактной группе (рис 6.6. Г). МИФС увеличилась на 85,4% по сравнению с исходными данными, и был ниже, чем у интактных животных на 28,4% (рис 6.6 Д.). К 25-ой секунде показатели сократимости снизились, и прирост ЛЖД составил 47,7%, $dp/dt+$ – 15,3%, $dp/dt-$ – 17,5%, МИФС – 95,6%, что в 1,7, 2,1, 1,7 и 1,2 раза соответственно было ниже по отношению к таковым у контрольных животных ($p>0,05$). Прирост ЧСС составил 32,1%, что в 1,8 раза было выше интактной группы ($p<0,05$).

У животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, получавших до проведения нагрузочных проб соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня, в условиях изометрической нагрузки увеличение всех показателей на 5-ой секунде составило ЛЖД_{макс} – на 65,8%, $dp/dt+$ – на 34,4%, $dp/dt-$ – на 8,7%, ЧСС – на 13,2%, МИФС – на 87,9%. Показатели прироста ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС были выше группы с ХСН вызванной ИЗО на 7,4%, 6,4% и 3,0% соответственно (рис. 6.6). К 25-ой секунде данные сократимости значительно увеличились, и прирост ЛЖД составил 66,2%, $dp/dt+$ – 37,2%, $dp/dt-$ – 24,3%, ЧСС – 43,9%; МИФС – 139,7%, что в 1,3, 2,4,

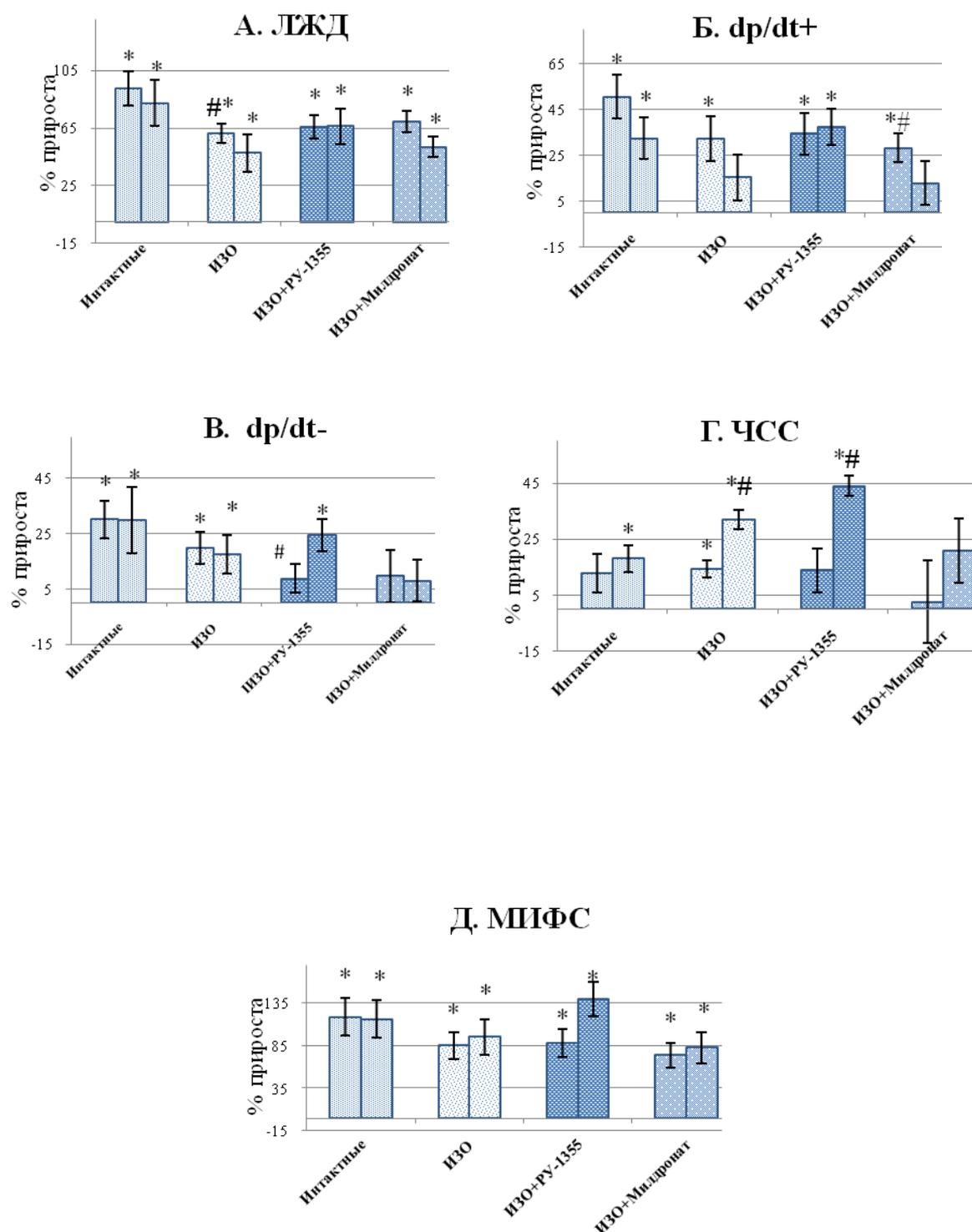


Рис. 6.6. Влияние соединения РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на показатели кардиодинамики в тесте с изометрической нагрузкой у животных с хронической интоксикацией изопроterenолом (2,5 мг/кг внутривбрюшинно 2 раза в день в течение 4-х недель).

Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: * - исходу; # - группе интактные; & - группе ИЗО. В каждой группе первый столбик: максимальный эффект на 5 секунде; второй столбик: эффект в конце нагрузки.

1,4, 1,4 и 1,5 раза, соответственно было выше по отношению к группе с интоксикацией ИЗО (группа 2) (рис. 6.6).

В группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, получавших до проведения нагрузочных проб милдронат в дозе 50 мг/кг в течение 31 дня, в период изометрической нагрузки максимальное увеличение ЛЖД на 5-ой секунде составило 69,6%, $dp/dt+$ 28,2%, $dp/dt-$ 9,7%, ЧСС 2,5%, МИФС 73,9% по сравнению с исходными данными ($p>0,05$) (Приложение 8-12). Показатели прироста ЛЖД были выше на 13,5% по отношению к группе ИЗО. Значения $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС были ниже на 12,7, 50,9, 82,7 и 13,5% соответственно в отличие от группы с ХСН (рис. 6.6). К 25-ой секунде показатели прироста ЛЖД составили 51,8% и были выше 8,7% по отношению к группе животных. Показатели прироста $dp/dt+$ составили 12,8%, $dp/dt-$ – 7,9%, ЧСС – 20,8%, МИФС – 82,9%, что на 16,6, 54,7, 35,1, 13,2% соответственно было ниже по отношению к группе с интоксикацией ИЗО (группа 2) (рис. 6.6).

При сравнительной оценке эффектов исследуемых соединений у животных с хронической интоксикацией ИЗО было показано, что по выраженности первоначальной реакции в условиях постнагрузки они не различались. Однако, в отличие от милдроната соединение РУ-1355 способствовало более длительному удержанию нагрузки (эффект на 25 секунде), что свидетельствует о сохранности сократимости, т.е. о кардиопротекторном действии. Соединение РУ-1355 превосходило милдронат на 25 минуте наблюдения по показателям ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС и МИФС на 21,8, 65,7, 67,4, 52,7 и 40,6% соответственно ($p>0,05$) (Приложение 9-13).

6.2.3. Действие соединения РУ-1355 на уровень МДА в миокарде и тропонина I в плазме крови

В результате проведенных экспериментов было установлено, что у интактных животных уровень маркера повреждения миокарда тропонина I в плазме крови и продукта перекисного окисления малонового диальдегида в

миокарде составили $1,66 \pm 0,67$ пкг/мл (табл. 6.2) и $101,07 \pm 5,93$ нмоль/г ткани соответственно (табл. 6.3).

В группе контрольных животных с ИЗО наблюдался достоверный рост этих показателей: тропонина I в плазме крови до $124,10 \pm 24,49$ пкг/мл (табл. 6.2.) и МДА до $172,41 \pm 12,43$ нмоль/г ткани миокарда (табл. 6.3).

Соединение РУ-1355 при введении в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня (группа 3) животным с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом ограничивало рост тропонина I (до $17,81 \pm 11,77$ пкг/мл) и МДА (до $100,57 \pm 5,67$ нмоль/г ткани миокарда), что статистически значимо в 6,9 и 1,7 раза соответственно было ниже чем у животных с ХСН (табл. 6.2, 6.3).

В группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат (группа 4 - «ИЗО+Милдронат») в дозе 50 мг/кг в течение 31 дня, показатели тропонина I ($44,12 \pm 19,92$ пкг/мл) и МДА ($113,57 \pm 6,12$ нмоль/г ткани миокарда) были ниже чем у контрольных животных в 2,8 и 1,5 раза соответственно ($p < 0.05$) (табл. 6.2, 6.3).

При сравнительной оценке эффектов, было установлено, что соединение РУ-1355 у животных с ХСН, по сравнению с группой ИЗО+Милдронат в 2,5 раза активнее ограничивало рост тропонина I. По влиянию на уровень МДА оказывало эффект подобный милдронату.

6.2.4. Морфологические изменения в миокарде левого желудочка при ХСН

Морфологические изменения у интактных и животных с хронической интоксикацией ИЗО, были подробно описаны в главе 6.1.3.

В миокарде крыс группы («ИЗО+РУ1355») отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы и набухание клеток. Ядра имели эллипсоидную форму, располагались в центре кардиомиоцитов, в них отмечалось умеренное содержание гетерохроматина.

Таблица 6.2

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на уровень тропонина I в плазме крови крыс при хронической интоксикацией изопротеренолом⁹

№	Группа	(M±m, пкг/мл)
1.	Интактные	1,66±0,67
2.	Изопротеренол (ИЗО)	124,10±24,49*
3.	ИЗО+РУ-1355, 1,25 мг/кг	17,81±11,77 [#]
4.	ИЗО+Милдронат, 50 мг/кг	44,12±19,92 ^{*#}

Примечание: * - различия статистически достоверны к группе интактные (p<0,05); # - различия статистически достоверны к группе ИЗО (p<0,05);

Таблица 6.3

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на уровень МДА в миокарде крыс с хронической интоксикацией изопротеренолом⁹

№	Группа	(M±m, нмоль/г ткани миокарда)
1.	Интактные	101,07±5,93
2.	Изопротеренол (ИЗО)	172,41±12,43*
3.	ИЗО+РУ-1355, 1,25 мг/кг	100,57±5,67 [#]
4.	ИЗО+Милдронат, 50 мг/кг	113,57±6,12 [#]

Примечания: * - различия статистически достоверны к группе интактные (p<0,05); # - различия, статистически достоверные к группе ИЗО (p<0,05).

Наблюдался слабовыраженный периваскулярный и интерстициальный отек. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалось образование коллагеновых волокон, а также разрастание фиброзной ткани богатой коллагеновыми волокнами между кардиомиоцитами папиллярных мышц. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как умеренно выраженная.

В миокарде крыс группы («ИЗО+Милдронат») отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация цитоплазмы. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка и папиллярных мышцах наблюдались участки очагового и сетчатого фиброза, площадь которых оценена в большинстве случаев как умеренно выраженная. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалась различная степень формирования коллагеновых волокон,

⁹ ИЗО вводили внутрибрюшинно 2,5 мг/кг 2 раза в день (в течение 4-х недель)

которая в большинстве случаев оценена как умеренная. Морфологическая картина свидетельствует о преобладании сочетания очагового и сетчатого фиброзирования миокарда при небольшом количестве лимфоцитов и гистиоцитов в формирующейся соединительной ткани.

При балльной оценке результатов морфологических исследований показано, что в группе животных с ХСН был самый высокий уровень объемной плотности соединительной ткани (4 балла) и коллагеновых волокон (4 балла) (Приложение 14, рис. 6.7). Исследуемые соединения практически одинаково способствовали ограничению образования соединительной ткани (в том числе коллагена), о чем свидетельствует более низкий уровень морфологических изменений по сравнению с группой ИЗО (рис. 6.7). Так у животных с ХСН, получавших РУ-1355, количество соединительной ткани было статистически достоверно ниже по сравнению с группой ИЗО как по общей плотности, так и по уровню коллагена в 29,3 и 25% соответственно.

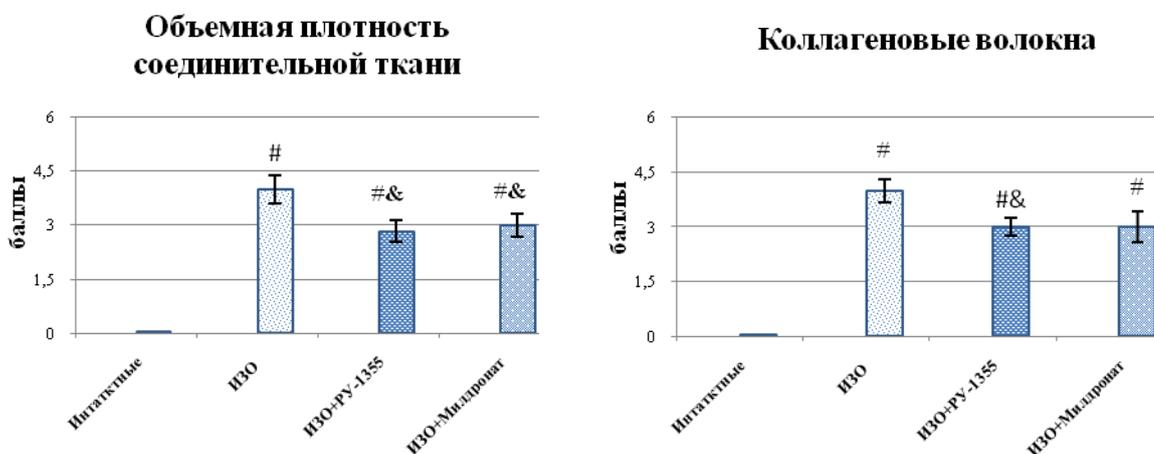


Рис. 6.7 Влияние РУ-1355 (1,25 мг/кг) и милдроната (50 мг/кг) на морфологические изменения миокарда при хроническом повреждении изопротеренолом (2,5 мг/кг внутривенно 2 раза в день в течение 4-х недель).

Примечания: различия, статистически достоверные ($p < 0,05$) к: # - группе интактные; & - группе ИЗО.

6.3. Заключение

Известно, что при формировании изопротереноловой ХСН у контрольных животных наблюдается концентрическая гипертрофия миокарда [Shibata, 2011], что подтверждено в макро- (индекс гипертрофии) и микроморфологических исследованиях. Так, обнаруживались дистрофические и атрофические изменения, очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы и сетчатый фиброз в кардиомиоцитах.

При проведении макроморфологических исследований было выявлено, что соединение РУ-1355, подобно милдронату, ограничивало рост индекса гипертрофии по сравнению с контрольными животными, однако данные изменения статистически не значимы.

При оценке микроморфологических исследований показано, что вещество РУ-1355 препятствовало образованию соединительной ткани. Количество ее было статистически достоверно ниже по сравнению с группой ИЗО как по общей плотности, так и по уровню коллагена на 29,3 и 25% соответственно.

Проведение пред- и постнагрузок позволяет выявить сохранность функциональных резервов у животных с изопротереноловой гипертрофией миокарда, поскольку сократительная активность миокарда в обычных условиях может и не страдать. Соединение РУ-1355 улучшало сократительную активность миокарда при ХСН. Так в условиях нагрузки объемом по максимальным показателям ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС статистически достоверно превосходило аналогичные параметры в группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом в 2,5, 3,2, и 4,7 раза, соответственно, оказывая эффект подобно милдронату. Прирост на пережатие восходящей части дуги аорты не отличался от контрольных животных, однако четко просматривается тенденция к сохранности показателей. Соединение РУ-1355 превосходило милдронат по удержанию эффекта на 25 секунде: по показателям ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС на 21,8, 65,7, 67,4, 52,7, 40,6% соответственно ($p>0,05$).

В условиях активации NHE-1 увеличивается образование активных форм кислорода (АФК). Поэтому о повреждении миокарда возможно судить не только по уровню тропонин I, но и по промежуточному продукту ПОЛ – МДА.

Соединение РУ-1355 у животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом статистически значимо ограничивало рост тропонина I и МДА в 6,9 и 1,7 раза, соответственно, было ниже, чем у контрольных животных. Изучаемое вещество в 2,5 раза активнее милдроната предотвращало рост тропонина I и не уступало ему по влиянию на уровень МДА.

Известно, что при ингибировании NHE-1 активируются прогипертрофическими факторами: MAPK, серин-треонин киназой, кальцинейрином, T-регуляторными клетками и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназой II (CaMKII) [Kitagawa, 2004].

Можно предположить, что соединение РУ-1355, блокируя NHE-1, останавливает патологический каскад, тем самым ограничивает гипертрофию миокарда и оказывает защитное действие от повреждающих факторов.

Таким образом, в результате проведенных исследований были выявлены кардиопротекторные свойства соединения РУ-1355 при курсовом введении у животных с экспериментальной ХСН.

ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355

Один из немаловажных этапов фармакологического исследования новых соединений – изучение их токсического действия и характера изменений, приводящих к гибели животных. Многотестовое наблюдение на мышах по С. Ирвину [Irwin, 1964] позволяет провести оценку общего токсического действия веществ по результатам изменения со стороны ЦНС, эмоционального состояния животных, поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости и некоторых вегетативных параметров, а так же определить дозы веществ, с которых начинают проявляться их неблагоприятные эффекты.

7.1. Влияние соединения РУ-1355 на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексy

Для оценки изменений эмоционального статуса животных, нервно-мышечной возбудимости и рефлексов у соединения РУ-1355 проводили следующие исследования: наблюдение за наличием или отсутствием вокализации, агрессии и пугливости при прикосновении к мыши корнцангом, проявление синдрома Штрауба, тремора, парезов, судорог. Оценивали выраженность слухового, роговичного и ипсилатерального сгибательного рефлексов.

При введении вещества РУ-1355 в дозах 1 и 25 мг/кг статистически значимых изменений со стороны эмоционального поведения животных (проявления признаков агрессивности, пугливости, вокализации) не наблюдалось.

Нервно-мышечная возбудимость мышей на протяжении всего исследования оставалась в пределах нормы. Парезов, тремора, судорог и синдрома Штрауба не было отмечено ни в одной из групп животных.

При введении соединения РУ-1355 в дозе 1 мг/кг состояние роговичного, слухового и ипсилатерального сгибательного рефлексов у животных не изменялось и было подобно контрольным с животным. Начиная

с дозы 25 мг/кг, снижался ипсилатеральный сгибательный рефлекс на 16,7% через два часа с момента введения исследуемого вещества, у двух животных из двенадцати.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соединение РУ-1355 в эффективной дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно не оказывает влияния на функциональную активность высшей нервной деятельности, не вызывает нарушений нервно-мышечной возбудимости и рефлексов.

7.2. Влияние соединения РУ-1355 на двигательную и мышечную координацию, реактивность

Для исследования влияния соединения РУ-1355 на изменения двигательной и мышечной координации проводились следующие тесты: наблюдение за изменением позы (положение тела в пространстве, конечностей), двигательной (расстройство равновесия, дискоординация, тонус конечностей, «Ротарод тест») и мышечной («тест удержания на проволоке и сетке») координацией, регистрация реактивности (время начала движения животного с места).

После введения мышам соединения РУ-1355 внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг изменения позы и тонуса конечностей, нарушения равновесия, развитие дискоординации не наблюдалось на протяжении всего эксперимента.

При введении исследуемого вещества в дозе 25 мг/кг в тесте «Ротарод» показано, что к 60 и 120 секунде происходило снижение двигательной координации на 18,9% и 11,1% соответственно по отношению к контрольной группе ($p > 0,05$). При оценке мышечного тонуса в тесте удержание на проволоке наблюдалось снижение данного показателя к 60 и 120 минуте на 30,3 и 20,8% соответственно ($p < 0,05$), в тесте удержание на сетке, Актометре отмечалась тенденция к снижению эффекта по отношению к группе с физиологическим раствором. Реактивность и изменение походки статистически значимо не изменялись (табл. 7.1).

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

7.3. Влияние соединения РУ-1355 на поведенческие реакции мышей в тесте «открытое поле»

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

При введении соединения РУ-1355 в дозе 1 мг/кг ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных не изменялся. В дозе 25 мг/кг наблюдалось статистически значимое угнетение горизонтальной активности (60 и 120 минута) на 60,8% и 75,1% соответственно, исследовательской активности (выхода в центр) на 120 минуте ($p < 0,05$) и груминга на 60 минуте ($p < 0,05$) (табл. 7.2).

Отмечалась тенденция к снижению вертикальной и поисковой способности на 78,3% и 88,0% соответственно, а также уровня эмоционального реагирования по отношению к контролю с физиологическим раствором ($p < 0,05$), что вероятно связано с мышечно-расслабляющим действием вещества РУ-1355 (табл. 7.2).

Таблица 7.1

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

Группы	Время измерения (минуты)	Тесты «Ротарод» и «Удержание на сетке и проволоке»						
		«Ротарод» (секунды)	Удержание на сетке (баллы)	Удержание на проволоке (баллы)	Актометр		Реактивность (секунды)	Изменение походки (%)
					суммарное количество	%		
Контроль 1 (физиологический раствор в дозе 0,1 мл/10 г)	Исход	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	186	100	6,73±1,86	100
	60	30,00±0,00	3,83±0,18	3,83±0,18	81	43,65	7,83±2,99	100
	120	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	103	55,38	6,16±2,11	100
Соединение РУ-1355 в дозе 1 мг/кг	Исход	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	240	100	2,17±0,59	100
	60	30,00±0,00	3,67±0,37	4,00±0,00	123	51,30	3,17±1,56	100
	120	27,50±1,17	3,83±0,18	3,50±0,37	14	11,02	4,67±1,19	100
Контроль 2 (физиологический раствор в дозе 0,1 мл/10 г)	Исход	30,00±0,00	3,83±0,18	4,00±0,00	90	100	8,50±2,49	100
	60	30,00±0,00	3,83±0,18	3,83±0,18	59	65,56	4,17±0,79	100
	120	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	45	50,00	8,67±2,27	100
Соединение РУ-1355 в дозе 25 мг/кг	Исход	30,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	127	100	12,17±5,89	50
	60	24,33±3,18	3,83±0,18	2,67±0,37 ^{*#}	106	44,20	8,67±5,07	50
	120	26,67±3,65	4,00±0,00	3,17±0,34 ^{*#}	27	21,20	6,67±0,97	50

Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$) к: * - исходу; # - группе контроль.

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

Группы	Время измерения (минуты)	Тест «Открытое поле»						
		Горизонтальная активность (количество пересеченных квадратов)	Вертикальная активность (количество вертикальных стоек)	Поисковая активность (количество заглядываний в норку)	Груминг (частота возобновления действий)	Выходы в центр (количество)	Болусы (количество)	Уриация (количество совершенных актов)
Контроль 1 физиологический раствор в дозе 0,1 мл/10 г	Исход	39,50±4,26	5,00±2,06	4,67±1,22	0,83±0,52	0,67±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	29,83±3,12	7,83±1,68	4,83±1,37	1,67±0,37	1,50±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	17,50±6,36*	5,17±2,03	1,33±0,46*	1,17±0,34	1,17±0,44	0,00±0,00	0,00±0,00
Соединение РУ-1355 в дозе 1 мг/кг	Исход	43,83±9,65	10,67±3,57	7,17±2,34	1,00±0,28	0,83±0,34	0,00±0,00	0,17±0,18
	60	23,83±9,67	7,83±4,11	3,17±0,66	1,00±0,40	1,83±1,28	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	5,83±1,50*	0,67±0,54*	1,17±0,66*	0,83±0,44	0,00±0,00 [#]	0,00±0,00	0,00±0,00
Контроль 2 физиологический раствор в дозе 0,1 мл/10 г	Исход	17,00±3,26	3,83±1,18	4,17±1,15	1,00±0,57	0,50±0,24	1,00±0,28	0,33±0,23
	60	20,33±4,95	1,33±0,73	3,00±1,33	1,67±0,54	1,50±0,73	0,33±0,23	0,50±0,25
	120	30,17±3,24*	1,50±1,12	1,67±1,54	1,33±0,67	1,50±0,73	0,67±0,37	0,83±0,18
Соединение РУ-1355 в дозе 25 мг/кг	Исход	6,67±2,22	0,83±5,22	0,50±0,37	1,33±0,92	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	60	8,00±4,49	0,83±0,71	0,83±0,59	0,00±0,00 [#]	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	120	7,50±4,46 [#]	0,17±0,18	1,00±0,69	0,00±0,00	0,00±0,00 [#]	0,00±0,00	0,00±0,00

Примечания: различия статистически достоверны (p<0,05) к: * - исход; # - группе контроль.

7.4. Действие соединения РУ-1355 на вегетативную функцию нервной системы мышей

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

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

Таким образом, было установлено, что токсическое действие вещества РУ-1355 на функциональную активность вегетативной нервной системы не проявляется в исследуемых дозах.

7.5. Изучение острой токсичности соединения РУ-1355

Исследуемое вещество РУ-1355 вводили однократно внутрибрюшинно белым неинбредным мышам обоего пола с соответствующим норме внешним видом, без отклонений в поведенческих реакциях и двигательной активности (см. главу 2.8), в диапазоне доз 80-400 мг/кг.

Характерными признаками отравления, производным 2-аминобензимидазола (соединения РУ-1355) были ограничение подвижности, частое поверхностное дыхание, снижение болевой и тактильной чувствительности. Непосредственной гибели животных предшествовали явления глубокой седации, угнетение дыхания, боковое положение с редкими клоническими судорогами.

Была определена острая токсичность для соединения РУ-1355,

показатель которой (LD_{50}) при внутрибрюшинном введении мышам составил 342,7 мг/кг, что позволяет отнести его к умеренно токсичным веществам по классификации [Березовская, 2003].

7.6. Заключение

В результате проведённого исследования по изучению общетоксических свойств соединения РУ-1355 после его однократного внутрибрюшинного введения в дозе 1 мг/кг установлено, что вещество не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы.

В дозе 25 мг/кг ($1/14 LD_{50}$), наблюдается снижения спонтанной двигательной активности, координации, расслабляющего эффекта, угнетение горизонтальной активности и уровня эмоционального реагирования.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются на сегодняшний день самыми распространенными причинами смертности [Чазов, 2011; Шальнова, 2011, 2012; Мишалов, 2012]. Ишемические поражения, нарушения ритма и проводимости, артериальные гипертензии, клапанные пороки и другие патологические изменения входят в реестр заболеваний сердца, занимающих ведущее положение. Среди общей смертности в России ССЗ составляют 57%. Большая доля здесь принадлежит ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности и артериальной гипертензии с ее осложнениями — инфарктами миокарда и инсультами [Шварц, 2010; Гаас, 2011; Чазова, 2011]. Статистика ССЗ по России выглядит таким образом: из 100 тысяч человек только от инфаркта миокарда ежегодно умирают 330 мужчин и 154 женщины, а от инсультов - 204 мужчины и 151 женщина [Руженцова, 2010].

Распространённость хронической сердечной недостаточности (ХСН) в странах Европы составляет от 1 до 3 %, а в Российской Федерации 7% [Беленков, 2006; Ситников, 2014; Seferovic, 2013]. Встречаемость в общей популяции нарушений ритма составляет 1-2%. Из года в год количество случаев аритмий увеличивается с возрастом – от 0,5% в возрасте 40-50 лет, до 5-15% в возрасте 80 лет [Петров, 2014].

Необходимым в период патологических состояний миокарда является его фармакологическая защита [Лебедев, 2008; Михин, 2011; Галагудза, 2011; Асташкин, 2014]. Такую защиту выполняют кардиоротекторы за счет оптимизации функциональной работы сердца при патологии, предупреждая действие повреждающих экзо- и эндогенных воздействий.

Основные направления кардиопротекции связаны с сохранением проходимости коронарных артерий, за счет угнетения роста атеросклеротических процессов в сосудах; замедлением морфологического, ионного и электрофизиологического, гемодинамического ремоделирования камер сердца, путем уменьшения массы миокарда, нормализации геометрии

камер сердца и восстановления электрофизиологической гомогенности миокарда; повышением толерантности к гипоксии миокарда с помощью предотвращения перехода кардиомиоцитов в состояние гибернации [Шляхто, 2005].

Важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний отводят повреждению кардиомиоцитов, закислению внутриклеточной среды и развитию «кальциевого парадокса» [Писаренко, 2004]. Данные нарушения, обусловленные различными этиологическими факторами, имеют важное патогенетическое значение и нередко являются основными для прогноза заболевания. В настоящее время активно развиваются подходы к защите миокарда от повреждающего действия перегрузкой кальция с помощью ингибиторов Na^+/H^+ -обменника (NHE-1) [Перфилова, 2005; Гурова, 2011; Аникин, 2014; Ayoub, 2007].

NHE-1 широко распространен и был первым клонирован из тканей человека. Он представляет собой гликопротеин 91 kDa, осуществляющий трансмембранный обмен ионов Na^+ на ионы H^+ , регуляция pH внутриклеточной среды [Ennis, 2008; Lee1, 2009].

В состав NHE-1 входят 815 аминокислот. Структура обменника содержит 2 домена N и C. N-домен отвечает за транспорт катионного обмена, C-цитоплазматический домен за счет протеинкиназной активности обеспечивает внутриклеточную функцию. Киназы, которые фосфорилируют NHE-1 и стимулируют его активацию, включают: ERK 1/2 (внеклеточные регулируемые киназы 1 и 2) [Fliegel, 2005], MAP (митоген активируемая протеинкиназа) [Зверев, 2003], p90^{rsk} (p90 рибосомальная киназа s6) [Fliegel, 2009], Rho-связанная киназа (ROCK) [Koliakos, 2008], NIK (Nck-взаимодействующая киназа) [Malo, 2006], CaMKII (Ca^{2+} /кальмодулин зависимая киназа II) [Slepkov, 2007].

В основе механизма действия NHE-1 лежит регуляция внутриклеточной среды, натриевого и кальциевого гомостаза в сердце

[Писаренко, 2005; Karmazyn, 2013; Luo, 2010], а так же восстановление водородного показателя после ишемии и реперфузии.

Ингибиторы NHE-1 активно изучались зарубежными авторами [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002; Tracey, 2003; Kim, 2007; Cingolani, 2011]. Основные положительные эффекты ингибиторов NHE-1 на ишемизированный миокард в экспериментальных и клинических исследованиях связаны с улучшением восстановления сократительной функции левого желудочка после реперфузии; сокращением зоны ишемии и некроза; уменьшением выраженности нарушения ионного гомеостаза, сопровождающего ишемию/реперфузию; редуцированием апоптоза, снижением частоты возникновения и тяжести аритмий, вызванных ишемией/реперфузией и угнетением прогипертрофических факторов при сердечной недостаточности.

Первоначально было разработано несколько ингибиторов Na^+/H^+ -обменника, которые обладали кардиопротекторными действиями – амилорид и его производные [Benos, 1982].

Позднее были описаны соединения, в состав которых входят бензоилгуанидиновые производные, такие как: НОЕ-642 (карипорид), его производное НОЕ-694, и энипорид (EMD-85131), сабипорид (ВІІВ-722). Далее были найдены бициклические производные гуанидина, содержащие циклогептапиридин (ТУ-12533), бензоксазинон (КБ-R9032), дигидробензофуран (BMS 284640), индол (SM 20220, SM 20550, SMP-300), тетрагидронафтаден (Т-162559), хинолин (зонипорид (CP-597396)), MS 31038) и другие [Kim, 2007; Lee, 2009; Li, 2011]. В соответствие с международной базой данных Thomson Reuters Integrity среди ингибиторов NHE-1 известно 259 веществ, содержащих циклические и свободные гуанидиновые группировки. Пять из данных соединений дошли до клинических испытаний [Thomson Reuters Integrity, дата обращения 01.05.2011].

В настоящее время стало известно о наличии способности ингибировать Na^+/H^+ обменник у производных бензимидазола [Tracey, 2003; Oh, 2007].

Имеющиеся литературные данные [Спасов, 1983; Гурова 2012; Косолапов, 2005] позволяют высказать предположение, что производные бензимидазола проявляют кардиопротекторные свойства.

Таким образом, можно сделать вывод, что производные конденсированных и неконденсированных бензимидазолов могут быть перспективными в исследованиях кардиопротекторных свойств, а наличие свободной или встроенной гуанидиновой группировки делает их интересными в плане поиска ингибиторов NHE-1.

На первом этапе изучение NHE-1-ингибирующей активности было проведено для 26 веществ, содержащих гуанидиновую группировку: 15 производных 2-аминобензимидазола, включающих: 1-замещенные 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия ($n=12$), 1-замещенные 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил) бензимидазолия ($n=3$) и 11 производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, состоящих из: 2,3-дигидро- N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола ($n=3$), N^1 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола ($n=4$), N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола ($n=4$). В качестве препарата сравнения был использован селективный ингибитор NHE-1 – зонипорид.

Исследование проводили *in vitro* по методу [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002] на тромбоцитах кролика, основанному на оценке степени светопропускания при изменении формы тромбоцитов [Гурова, 2011]. В основе метода лежит способность NHE-1 активироваться при возникновении ацидоза в период накопления внутриклеточных протонов, которые выводятся из клеток через сарколеммный NHE-1 в обмен на вход Na^+ . Возрастание внутриклеточного содержания ионов натрия активирует $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен через сарколемму, способствуя входу Ca^{2+} в кардиомиоциты, за счет чего возникает его перегрузка [Писаренко, 2004, 2005; Kim, 2007; Malo, 2006].

В ходе проведенного эксперимента было показано дозозависимое угнетение активности NHE-1, при использовании зонипорида в диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-6} М. Рассчитана величина EC_{50} , которая составила $2,70 \cdot 10^{-8}$ М, что соответствует литературным данным [Oh, 2007].

При изучении производных 2-аминобензимидазола: 1-замещенных 2-амино-3-(4-фторбензоилметил)бензимидазолия и 1-замещенных 2-амино-3-(4бензо[d][1,3]диоксол-5-ил-карбонилметил)бензимидазолия было найдено 5 активных соединений в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М. Так вещества РУ-1355 и РУ-1199 превосходили зонипорид по NHE-1-ингибирующая активности в 1,5 раза, РУ-1390 в 1,4 раза, РУ-1200 и РУ-1369 в 1,2 раза. Подобны эффекту зонипорида, оказались 5 соединений - РУ-1365, РУ-1183, РУ-1361, РУ-1364 и РУ-1184. Эффекты остальных веществ были ниже препарата сравнения.

Для соединений, которые оказались равными или превосходили зонипорид, были проведены дополнительные исследования в диапазоне концентраций 10^{-11} - 10^{-6} М и рассчитана EC_{50} .

По величине EC_{50} соединения производные 2-аминобензимидазола расположились следующим образом - РУ-1355>РУ-1199>РУ-1390>РУ-1200>РУ-1369>РУ-1365>РУ-1363>РУ-1183>РУ-1361>зонипорид>РУ-1364>РУ-1184.

Было показано, что у наиболее активных соединений в положении N¹ находятся диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный и морфолиноэтильный радикалы, которые могут быть определены как «активные».

На следующем этапе были изучены соединения производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, содержащих встроенную гуанидиновую группировку: производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N¹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, производные N⁹-замещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазола, содержащие в положении N⁹ или N¹ радикалы, наиболее активные у производных 2-аминобензимидазола.

При изучении производных N⁹-замещенных 2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (РУ-254, РУ-255, РУ-283), содержащих в положении N⁹ диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный и морфолиноэтильный радикалы соответственно было установлено, что данные вещества проявили низкую NHE-1-ингибирующую активность (ниже 50%).

При оценке производных N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола соединений РУ-17, РУ-1204, содержащих в положении N⁹ пиперидиноэтильные радикалы; РУ-64 в положении N⁹ – диэтиламиноэтильный радикал и РУ-1205 в положении N⁹ – морфолиноэтильный радикал, было выявлено, что данные соединения не проявили высокой ингибирующей активности в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М и по данным EC₅₀ уступали зонипориду.

У производных N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола (РУ-602, РУ-606, РУ-354, РУ-355), содержащих в положении N¹ пиперидиноэтильный, диэтиламиноэтильный и морфолиноэтильный радикалы соответственно, была показана высокая ингибирующая активность только в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ М. По величине EC₅₀ соединения уступали зонипориду.

Таким образом, было установлено, что введение «активных» для производных 2-аминобензимидазола радикалов в положение N⁹ (соединения РУ-17, РУ-64, РУ-1204, РУ-1205, РУ-254, РУ-255, РУ-283) или N¹ (соединения РУ-602, РУ-606, РУ-354, РУ-355) в структуру производных имидазо[1,2-а]бензимидазола не приводило к высокой NHE-1-ингибирующей активности. Можно предположить, что уровень ингибирующей активности зависит не только от наличия радикалов, но и от базовой структуры.

Таким образом, при изучении NHE-1-ингибирующей активности в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика было показано, что структура 2-аминобензимидазола является наиболее перспективна как по вкладу базовой структуры, так и по степени реакции на ее модификацию. Найдены соединения РУ-1355, РУ-1199, РУ-1200, РУ-1183, РУ-1390, РУ-1369, РУ-1361, РУ-1363, РУ-1365 которые превосходили зонипорид по величине EC₅₀. Наибольшую активность проявили соединения – производные 2-

аминобензимидазола, которые в положении N¹ содержат такие аминоалкильные радикалы, как диэтиламиноэтильный, пиперидиноэтильный, морфолиноэтильный.

На следующем этапе была проведена оценка перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных значений уровня активности.

При оценке уровня фармакологической активности с использованием методического подхода по «средним» активностям среди производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола было показано, что в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М наибольшую активность проявляли соединения производные N¹ имидазобензимидазола. Однако при сравнении производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола в дозе $1 \cdot 10^{-8}$ М наибольшую активность проявили производные 2-аминобензимидазола.

Подобная тенденция сохраняется в более высоких концентрациях – $1 \cdot 10^{-7}$ М и $1 \cdot 10^{-6}$ М. Наибольшую активность в этих концентрациях проявили также производные соединения 2-аминобензимидазола.

Максимальные (супремальные) оценки показывают степень реакции базовой структуры на введение в нее заместителя, повышающего активность. В диапазоне концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ М и по величине EC₅₀ сохраняется та же закономерность, что и при оценке «средних» значений. Так супремальная оценка NHE-1 ингибирующей активности производных 2-аминобензимидазола в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М оказалась почти в 2 раза выше производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и составила 73,93% и 39,26% соответственно. В более высоких концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ М и $1 \cdot 10^{-6}$ М эти отличия несколько нивелируются, но сохраняются различия на 21,95% и 17,83% соответственно, возможно это связано с потерей селективности.

Таким образом, базовая структура (бициклический «кор») неконденсированного бензимидазола является наиболее перспективной структурой для поиска новых ингибиторов NHE-1. Производные 2-аминобензимидазола являются наиболее активным классом не только в плане

вклада базового химического «кóра» в общий уровень активности, но и в плане усиления ее за счет введения дополнительных заместителей.

Далее изучали зависимость NHE-1-ингибирующей активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов. Уровень NHE-1 ингибирующей активности всего ряда производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола определяется их липофильностью и стерическими характеристиками. Было выявлено, что молекулярная рефракция первого заместителя и липофильность первого заместителя у производных 2-аминобензимидазола меньше чем у производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, поэтому видимо и взаимодействие с молекулой NHE-1 обменника у 2-аминобензимидазолов будет активнее.

Можно предполагать, что у производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола имеется общий механизм взаимодействия с сайтом NHE-1, детерминированный размером их базовых структур. Возможно, этот механизм осуществляется через связывание данных конденсированных систем с каким-либо «особым» карманом сайта NHE-1, например, ответственным за фиксацию так называемых «привилегированных» структур, к которым относятся производные неконденсированных бензимидазолов, имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов [De Simone, 2004]. Взаимодействие производных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола с сайтом NHE-1 вероятно происходит в два этапа: связывание с активным карманом сайта основной части молекулы (регулируется размерами лиганда) и связывание со «специфическим» карманом сайта (определяется липофильностью и электронными параметрами).

С учетом данных EC_{50} и LD_{50} изученных соединения можно расположить таким образом: РУ-1355>РУ-1199>РУ-1200>РУ-1183>зонипорид.

Таким образом, было найдено соединение РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид, которое статистически значимо превосходило зонипорид по EC_{50} .

Кардиопротекторные свойства ингибиторов NHE-1 связаны с противоишемическими, антиаритмическими и антипролиферативными свойствами [Andreadou, 2008; Fliegel, 2009; Xue, 2010]. Поэтому были проведены исследования *in vivo* на основных моделях, позволяющих оценить кардиопротекторные свойства.

Так на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс, провели комплексную оценку размеров зоны повреждения и уровня специфического маркера патологии миокарда тропонина I в плазме крови.

Соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг ограничивало размеры зоны некроза миокарда. При окрашивании срезов сердец TTC зона некроза в данной группе составляла $24,10 \pm 1,47\%$. Было показано, что изучаемое вещество по эффекту статистически достоверно превосходило в 1,8 раза показатели животных с ишемией, не получавших препарат, и 1,3 раза животных с препаратом сравнения.

Кроме того, соединение РУ-1355 ограничивало рост в плазме крови тропонина I подобно зонипориду. Оно способствовало более низкому подъему тропонина I в 2,5 раза ниже, чем у животных с ишемией ($p < 0,05$).

В результате проведенных исследований *in vivo* на модели ишемии/реперфузии показано, что соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии в дозе 1,12 мг/кг, превосходило зонипорид по способности ограничивать зону некроза.

Оценку кардиопротекторного действия так же проводили на основании антиаритмических и антифибрилляторных свойств соединения РУ-1355 в условиях ишемии.

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

Соединение РУ-1355 на модели кратковременной семи минутной ишемии и последующей пяти минутной реперфузии оказывало антифибрилляторное действие. Была рассчитана ED₅₀, которая составила 1,25 мг/кг.

Исследуемое вещество РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг во время серий прямоугольных электрических импульсов продолжительностью 30 секунд, повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца по отношению к группе с физиологическим раствором на 90,6% ($p > 0,05$) и на 20% было активнее зонипорида ($p > 0,05$). По способности уменьшать время до восстановления нормального ритма, исследуемое соединение превосходило контрольную группу с патологией на 33,3% ($p < 0,05$) и препарат сравнения на 6% ($p > 0,05$).

При изучении ЭКГ у наркотизированных животных при однократном введении было показано, что соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг статистически значимых изменений не оказывало.

Предполагаемый механизм противоишемического и связанного с ним антиаритмического и противофибрилляторного действия, вероятно, обусловлен ограничением избыточного поступления кальция внутрь кардиомиоцитов при ишемии. В период нарушений ритма при острой ишемии и реперфузии сердца происходит активация NHE-1, включая механизмы «re-entry», вызванные задержкой возбуждения кардиомиоцитов ишемизированной области и увеличением в них концентрацию Ca²⁺ [Маслов, 2010]. В частности, показано, что избыточное накопление ионов Ca²⁺ в

кардиомиоцитах вызывает задержку постдеполяризации, триггерную активность и, как следствие, тахикардию [Трешкур, 2011]. Кроме того важную роль играет повреждение межклеточных контактов и их основного компонента - белка коннексина, что приводит к замедлению проведения и возникновению аритмий [Sánchez, 2011].

В последнее время связь между активностью NHE-1 и гипертрофией миокарда, была установлена на модели симпатической активации нервной деятельности у трансгенных мышей [Nakajima-Takenaka, 2009]. Хроническая стимуляция β -адренергическим агонистом изопротеренолом индуцирует гипертрофию сердца, сопровождающуюся фиброзом и диастолической дисфункцией левого желудочка, связанную с нарушением Ca^{2+} обмена [Kitagawa, 2004; Nakajima-Takenaka, 2009]. Было установлено, что активация NHE-1, путем Na^+/Ca^{2+} обменника ведет к нарушению обмена кальция и играет существенную роль в развитии сердечной недостаточности [Хуе, 2010; Cingolani, 2011].

В условиях СН сократительная активность в обычных условиях может и не изменяться, однако при проведении нагрузочных тестов можно выявить сохранность функциональных резервов у животных с изопротереноловой гипертрофией миокарда.

При проведении пред- и постнагрузок было показано, что соединение РУ-1355 при внутрибрюшинном введении в дозе 1,25 мг/кг (в течение 31 дня) улучшало сократительную активность миокарда при экспериментальной ХСН у крыс.

Так в условиях нагрузки объемом по максимальным показателям прироста ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС статистически достоверно превосходило аналогичные параметры в группе животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно, оказывая эффект подобно милдронату. Прирост на пережатие аорты не отличалась от контрольных животных, однако четко просматривается тенденция к удержанию нагрузки. Соединение РУ-1355 превосходило милдронат по

удержанию эффекта на 25 секунде: по показателям ЛЖД, $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЧСС, МИФС на 21,8, 65,7, 67,4, 52,7, 40,6% соответственно ($p>0,05$).

В условиях развития изопротереноловой гипертрофии миокарда происходит активация NHE-1, что приводит к стимуляции факторов повреждения и накопления промежуточного продукта ПОЛ – малонового диальдегида. Поэтому о повреждении миокарда, возможно, судить не только по уровню тропонина I в плазме крови, но и косвенно по промежуточному продукту ПОЛ.

Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг у животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом статистически значимо ограничивало рост тропонина I и МДА в 6,9 и 1,7 раза соответственно. Изучаемое вещество в 2,5 раза активнее милдроната предотвращало рост тропонина I и не уступало ему по влиянию на уровень МДА.

При проведении макроморфологических исследований было выявлено, что соединение РУ-1355 подобно милдронату в дозе 50 мг/кг ограничивало рост индекса гипертрофии по сравнению с контрольными животными, однако данные изменения статистически не значимы.

При оценке микроморфологических исследований показано, что исследуемое соединение препятствовало образованию соединительной ткани. Ее количество было статистически достоверно ниже по сравнению с группой, получавшей изопротеренол, как по общей плотности, так и по уровню коллагена на 29,3 и 25% соответственно.

Известно, что при активации NHE-1 образуются прогипертрофические факторы: митогенактивируемая протеин киназа (МАРК), серин-треонинкиназа, кальциневрин, T-регуляторные клетки и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая киназа II (CaMKII) [Kitagawa, 2004]. Можно предположить, что соединение РУ-1355, блокируя NHE-1, останавливает патологический каскад ремоделирования, ограничивая гипертрофию миокарда и, оказывая защитное действие от повреждающих факторов.

В результате проведенных исследований были выявлены кардиопротекторные свойства соединения РУ-1355 при курсовом введении у животных с экспериментальной ХСН.

Один из немаловажных этапов фармакологического исследования новых соединений – изучение их токсического действия и характера изменений, приводящих к гибели животных. Многотестовое наблюдение на мышцах по С. Ирвину [Irwin, 1964] позволяет провести оценку общего токсического действия веществ по результатам изменения со стороны ЦНС, эмоционального состояния животных, поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости и некоторых вегетативных параметров, а так же определить дозы веществ, с которых начинают проявляться их неблагоприятные эффекты.

В результате проведенного исследования по изучению общетоксических свойств соединения РУ-1355 после его введения в дозе 1 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении выявлено, что исследуемое вещество не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. В дозе 25 мг/кг (1/14 LD₅₀), наблюдается снижения спонтанной двигательной активности, координации, мышечно-расслабляющего эффекта, угнетение горизонтальной активности и уровня эмоционального реагирования.

Таким образом, в исследованиях *in vivo* было подтверждено кардиопротекторное действие соединения РУ-1355: снижение размеров зоны некроза, уровня миокардиальных маркеров повреждения, как при ишемии, так и при экспериментальной ХСН. При кратковременной и длительной ишемии/реперфузии исследуемое вещество оказывало антиаритмическое и антифибрилляторное действие.

На основании приведенных данных установлено, что NHE-1 является важным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Основные

функции его заключаются в регуляции внутриклеточного рН, защите клетки от закисления цитоплазмы, контроле клеточного объема, угнетению продукции свободных радикалов и факторов транскрипции ведущих к гипертрофии миокарда.

Многочисленные факты указывают на возможность селективных ингибиторов NHE-1 снижать повреждения миокарда у животных различных видов на моделях *in vitro* и *in vivo*. К ним относятся уменьшение частоты возникновения желудочковых аритмий, ограничение размеров инфаркта и улучшение восстановления сократительной функции.

NHE-1 участвует во многих патофизиологических процессах, включающих клеточную миграцию, апоптоз, гипертрофию, эндотелиальную дисфункцию, ишемическое и реперфузионное повреждение [Koliakos, 2008]. Поэтому возможность регуляции этой мишени может способствовать профилактике таких заболеваний, как сахарный диабет, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, нарушение мозгового кровообращения, развитие злокачественных опухолей [Slepков, 2007; Malo, 2006].

У изученных нами 26 производных циклических гуанидинов *in vitro* в дозе $1 \cdot 10^{-8}$ М была выявлена NHE-1-ингибирующая активность разной степени выраженности. Наиболее перспективными оказались производные амнобензимидазола соединения РУ-1355, РУ-1199, РУ-1200, РУ-1183, РУ-1390, РУ-1369, РУ-1361, РУ-1363, РУ-1365 которые превосходили зонипорид по ингибирующей активности и величине EC_{50} . При изучении острой токсичности наиболее активных веществ, было выбрано 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия соединение РУ-1355.

В исследованиях *in vivo* были подвержены кардиопротекторные свойства соединения РУ-1355 при внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг. На модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс вещество вызывало уменьшение тяжести постреперфузионных нарушений ритма и ограничивало рост маркера повреждения миокарда тропонина I подобно зонипориду. По способности

сокращать размеры зоны некроза сердца статистически достоверно превосходило препарат сравнения.

Соединение РУ-1355 проявило антифибрилляторную активность при профилактическом однократном внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг как на модели постреперфузионных фибрилляций, так и по влиянию на порог электрических фибрилляций. Вещество увеличивало порог фибрилляций и уменьшало время до восстановления нормального ритма активнее зонипорида.

На модели экспериментальной ХСН при курсовом внутрибрюшинном введении соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня в условиях проведения функциональных нагрузок улучшало сократительную активность и функциональные резервы миокарда. Так в условиях нагрузки объемом по максимальным показателям прироста ЛЖД, $dp/dt+$, МИФС оказывало эффект подобно милдронату, а при постнагрузке превосходило препарат сравнения по способности к удержанию эффекта на 25 секунде. Вещество РУ-1355 в 2,5 раза активнее милдроната предотвращало рост тропонина I и не уступало ему по влиянию на уровень МДА. Изучаемое соединение подобно милдронату ограничивало рост индекса гипертрофии, оказывало антипролиферативное действие.

На основании выше приведенных данных можно заключить, что производное 2-аминобензимидазола соединение РУ-1355 является высокоактивным веществом с ННЭ-1-ингибирующими, противоишемическими, антифибрилляторными и антипролиферативными свойствами, что свидетельствует о целесообразности завершения полного цикла доклинических испытаний.

ВЫВОДЫ

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

2. Высокая NHE-1-ингибирующая активность наиболее характерна для производных 2-аминобензимидазола и определяется наличием аминогруппы в положении C₂, диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в N¹, фторбензоилметила в N³. В классе данных производных, повышению NHE-1 ингибирующей активности способствует снижение липофильности первого заместителя logP_{R1}, при одновременном увеличении общей липофильности молекулы logP₀.

3. Максимальная NHE-1-ингибирующая активность показана у соединения РУ-1355 – 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид. В исследованиях *in vitro* соединение РУ-1355 по уровню NHE-1 ингибирующей активности статистически значимо превосходило зонипорид по величине EC₅₀.

4. На модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс, исследуемое вещество сокращало размеры зоны некроза миокарда по сравнению с животными с ишемией и, получавших зонипорид в 1,8 и 1,3 раза соответственно (p<0,05). Соединение РУ-1355 подобно зонипориду ограничивало рост маркера повреждения миокарда тропонина I в 2,5 раза по сравнению с животными с патологией (p<0,05).

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

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

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

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

9. При изучении общетоксикологических свойств исследуемое соединение РУ-1355 в дозе 1 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. В дозе 25 мг/кг вещество РУ-1355 вызывало снижение спонтанной двигательной активности, координации, угнетение горизонтальной активности, оказывало мышечно-расслабляющий эффект. Соединение РУ-1355 в соответствии с классификацией токсичности веществ можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс). Величина LD_{50} составила 342,7 мг/кг.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданная база данных соединений с NHE-1 ингибирующей активностью может быть использована для прогноза данного вида активности у новых синтезированных веществ.

В исследованиях *in silico* были выявлены признаки высокого уровня NHE-1 блокирующих эффектов, что может быть использовано для направленного синтеза соединений.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности дальнейшего доклинического изучения соединения под лабораторным шифром РУ-1355.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41 – 43.
2. Аникин, Г. С. Применение триметазидина в кардиологии: современные клинико-фармакологические аспекты / Г. С. Аникин // Consilium medicum. – 2014. – № 10. – С. 73 – 75.
3. Анисимова, В. А. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов и промежуточных продуктов их синтеза / В. А. Анисимова, М. В. Левченко [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1987. – Т. XXI. – № 3. – С. 313 – 319.
4. Арутюнов, Г. Кардиопротекция в повседневной практике интерниста / Г. Арутюнов, С. Романов [и др.] // Врач. – 2002. – № 12. – С. 7 – 11.
5. Арзамасцев, Е. В. Особенности оценки токсичности воспроизведенных лекарственных средств / Е. В. Арзамасцев, И. В. Березовская [и др.] // Часть первая. - М.: Гриф и К. – 2012. – С. 35 – 36.
6. Асташкин, Е. И. Роль различных видов ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Фокус на валсартан / Е. И. Асташкин, М. Г. Глезер // Врач. – 2014. – № 13. – С. 76 – 83.
7. Атрощенко, Е. С. Новые ишемические синдромы – новая цель для кардиологов / Е. С. Атрощенко // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2006. – Т. 5. – № 2. – С. 73 – 78.
8. Бакумцева, Л. С. Роль тропонина I и белка, связывающего жирные кислоты, в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний / Л. С. Бакумцева, И. Н. Пермякова, Л. В. Заклякова // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6. – № 2. – С. 18 – 22.
9. Беленков, Ю. Н. Влияние шестимесячной терапии периндоприлом А на структурно-функциональное состояние артериального русла у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалова [и др.] // Кардиология. – 2014. – № 2. – С. 4 – 12.

10. Беленков, Ю. Н. Распространенность хронической сердечной недостаточности в Европейской части Российской Федерации – данные ЭПОХА-ХСН (часть 2) / Ю. Н. Беленков, И. В. Фомин [и др.] // Сердечная Недостаточность. – 2006. – № 3. – С. 3 – 7.
11. Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – Рига: Изд-во АН Латв. ССР, 1963. – С. 60 – 72.
12. Беленькова, Ю. А. Прогноз у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST в зависимости от наличия сахарного диабета 2 типа и выбранной тактики ведения острого периода заболевания / Ю. А. Беленькова, Е. В. Тавлуева [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2012. – № 5. – С. 17 – 24.
13. Беневоленский, Д. С. Лабораторная диагностика инфаркта миокарда: современные требования к качеству / Д. С. Беневоленский // Клинико-лабораторный консилиум. – 2009. – № 6. – С. 16 – 21.
14. Березовская, И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И. В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – № 3. – С. 32 – 34.
15. Воронина, Т. А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия новых фармакологических веществ / Т. А. Воронина, С. Б. Середенин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общ. ред. Р. У. Хабриева. – 2-изд., перераб и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 253 – 263.
16. Гаас, Г. Н. Особенности заболеваемости населения трудоспособного возраста болезнями системы кровообращения по данным ОМС / Г. Н. Гаас, А. А. Модестов // Социальные аспекты здоровья населения. – 2011. – Т. 17. – № 1. – С. 5 – 25.

17. Галагудза, М. М. Оценка инфаркт-лимитирующего эффекта пре- и посткондиционирования с помощью определения уровня миокардиальных маркеров / М. М. Галагудза, Л. Ю. Морозова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – № 4. – С. 90 – 94.
18. Галагудза, М. М. Пассивная и активная таргетная доставка лекарственных препаратов в ишемизированный миокард / М. М. Галагудза, Д. В. Королев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152. – № 7. – С. 113 – 116.
19. Галенко-Ярошевский, П. А. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств / П. А. Галенко-Ярошевский, Н. В. Каверина [и др.] // Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 385 – 416.
20. Гарганеева, А. А. «Регистр острого инфаркта миокарда» как информационная популяционная система оценки эпидемиологической ситуации и медицинской помощи больным острым инфарктом миокарда / А. А. Гарганеева, С. А. Округин [и др.] // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2013. – Т. 12. – № 1. – С. 37 – 41.
21. Голендер, В. Е. Вычислительные методы конструирования лекарств / В. Е. Голендер, А. Б. Розенблит. – Рига: Зинатне, 1978. – 238 с.
22. ГОСТ Р 51000.3-96. Общие требования к испытательным лабораториям. – М.: Госстандарт РФ, 1996. – 6 с.
23. ГОСТ Р 51000.4-96. Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий. – М.: Госстандарт РФ, 1996. – 6 с.
24. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. – М.: Госстандарт РФ, 1993. – 7 с.
25. Грецкая, И. Б. Поиск и изучение новых антиаритмических веществ в ряду азотсодержащих гетероциклических производных: Дисс... канд. мед. наук / Грецкая Ирина Борисовна. – Ростов-на-Дону, 1987. – 148 с.

26. Гурова, Н. А. Фармакотоксикологические свойства нового антиаритмического вещества, производного имидазобензимидазола: Дисс... канд. мед. наук / Гурова Наталия Алексеевна. – Волгоград, 1998. – 152 с.
27. Дедов, И. И. Сахарный диабет: реперфузионные осложнения и проблемы кардиопротекции / И. И. Дедов, А. А. Александров // *Consilium medicum*. – 2006. – № 9. – С. 44 – 53.
28. Дорофейков, В. В. Особенности клинико-лабораторной манифестации сердечно-сосудистой патологии у больных сахарным диабетом 2 типа и микроповреждение миокарда / В. В. Дорофейков, О. Н. Машек [и др.] // Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. – 2010. – № 5. – С. 18 – 26.
29. Ежов, М. В. Значение малых доз ацетилсалициловой кислоты в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых осложнений / М. В. Ежов // *Consilium Medicum*. – 2009. – Т. 11. – № 5. – С. 85 – 87.
30. Зайцева, Н. С. Медико-генетическое прогнозирование риска развития мозгового инсульта / Н. С. Зайцева, М. М. Батюшин // *Российский кардиологический журнал*. – 2006. – № 2. – С. 50 – 55.
31. Зверев, Я. Ф. Ингибирование Na^+/H^+ обмена как новый подход к защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения / Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2003. – Т. 2. – № 3. – С. 16 – 34.
32. Касумова, Ф. Н. Гормональный гомеостаз у женщин с ишемической болезнью сердца в разных возрастных группах / Ф. Н. Касумова // *Российский кардиологический журнал*. – 2012. – № 5. – С. 81 – 83.
33. Коняхин, А. Ю. Коррекция ишемии миокарда: опыт применения триметазидина в терапии стенокардии напряжения / А. Ю. Коняхин, Т. Р. Каменева, Б. А. Родионов // *Фарматека*. – 2006. – № 2. – С. 20 – 26.
34. Косарев, В. В. Миокардиальные цитопротекторы: клинико-фармакологические подходы к применению при ишемической болезни

сердца / В. В. Косарев, С. А. Бабанов // – Consilium medicum. – 2013. – № 10. – С. 34 – 39.

35. Косолапов, В. А. Антиоксидантные средства: стратегия отбора, перспективы применения: Дисс... докт. мед. наук / Косолапов Вадим Анатольевич. – Волгоград, 2005. – 266 с.

36. Крюков, Н. Н. Справочник терапевта / Н. Н. Крюков, М. А. Качковский. – Ростов–на–Дону: Феникс, 2011.– 446 с.

37. Крыжановский, С. А. К механизму противофибрилляторного действия афобазола / С. А. Крыжановский, В. Н. Столярук [и др.] // Бюллетень эксп. биологии и медицины. – 2010. – Т. 149. – № 3. – С. 290 – 293.

38. Крыжановский, С. А. Антифибрилляторная активность дипептидного антагониста фактора роста нервов / С. А. Крыжановский, В. Н. Столярук [и др.] // Физиология человека. – 2012. – Т. 38. – № 4. – С. 102.

39. Лебедев, А. В. Сердечные тропонины Т и I в диагностике острого инфаркта миокарда / А. В. Лебедев, Ю. А. Васюк [и др.] // Медицина критических состояний. – 2008. – № 3. – С. 26 – 30.

40. Лыкасова, Е. А. Прединфарктная стенокардия как клиническая форма феномена ишемического прекондиционирования миокарда / Е. А. Лыкасова, В. В. Тодосийчук [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2014. – № 3. – С. 58 – 62.

41. Маслов, Л. Н. Опиоиды – триггеры адаптивного феномена ишемического прекондиционирования сердца / Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная [и др.] / Российский физиологический журнал. – 2014. – № 9. – С. 993 – 1007.

42. Метелица, В. И. Справочник по клинической фармакологии сердечно–сосудистых лекарственных средств. 2–е издание. М., БИНОМ – СПб: Невский Диалект, 2002. – 926 с.

43. Мирзоян, Р. С. Цереброваскулярные эффекты афобазола при сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца / Р. С. Мирзоян, Н. А. Хайлов, Т. С. Ганьшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – № 5. – С. 2 – 7.

44. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
45. Михин, В. П. Кардиоцитопротекторы – новое направление клинической кардиологии / В. П. Михин // Архив внутр. медицины. – 2011. – № 1. – С. 21 – 28.
46. Михин, В. П. Эффективность милдроната на постгоспитальном этапе реабилитации больных, перенесших инфаркт миокарда / В. П. Михин, О. Н. Кольцова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. – № 2. – С.57 – 61.
47. Мишалов, В. Г. Факторы риска кардиальных осложнений у больных, прооперированных по поводу аневризмы брюшного отдела аорты, на фоне ишемической болезни сердца / В. Г. Мишалов, Е. Н. Амосова [и др.] // Сердце и сосуды. – 2012. – Т. 39. – № 3. – С. 26 – 39.
48. Морозова, Т. Е. Коррекция факторов риска у больных артериальной гипертонией с нарушениями липидного обмена: место и роль гиполипидемических средств / Т. Е. Морозова, В. Л. Захарова // Клиническая фармакология и терапия. – 2008. – № 4. – С. 34 – 39.
49. Нарыжная, Н. В. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца: основные проявления и молекулярный механизм / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов // Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. – 2012. – № 5. – С. 56 – 59.
50. Науменко, С. Е. Особенности обмена серотонина миокарда при ишемии в условиях ишемического прекондиционирования // Российский физиологический журнал / С. Е. Науменко, Т. В. Латышева, М. А. Гилинский // Российский физиологический журнал. – 2014. – № 7. – С. 820 – 828.
51. Недогода, С. В. Доказательная база применения лизиноприла при артериальной гипертонии / С. В. Недогода // Справочник поликлинического врача. – 2013. – № 12.– С. 18 – 20.

52. Новикова, М. В. Влияние терапии триметазидином на вариабельность ритма сердца у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца // М. В. Новикова, М. Г. Глезер // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2014. – № 5. – С. 36 – 44.
53. Олесова, В. М. Метаболизм миокарда и препараты метаболического действия / В. М. Олесова, О. Ю. Маркатюк [и др.] // Кардиология. – 2013. – № 1. – С. 66 – 72.
54. Островский, О. В. Лабораторные маркеры повреждения миокарда в современной кардиологии / О. В. Островский // Вестник ВолгГМУ. – 2009. – № 1. – С. 11 – 15.
55. Палаткина, Л. О. Окислительный стресс - роль в патогенезе хронической сердечной недостаточности, возможности коррекции / Л. О. Палаткина, О. Н. Корнеева, О. М. Драпкина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. – Т. 11. – № 6. – С. 91 – 94.
56. Панченко, Т. И. Противоаритмические свойства новых антиоксидантных веществ – конденсированных производных бензимидазола: Дисс... канд. мед. наук / Панченко Татьяна Ивановна. – Ростов-на-Дону, 1990. – 169 с.
57. Перфилова, В. Н. Окислительный стресс - роль в патогенезе хронической сердечной недостаточности, возможности коррекции / В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков // Вестник ВолгГМУ. – 2005. – Т. 1. – № 13. – С. 30 – 33.
58. Петров, В. И. Анализ антитромботической терапии у больных с постоянной формой фибрилляции предсердий (фармакоэпидемиологическое исследование) / В. И. Петров, О. В. Шаталова, А. С. Маслаков // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2014. – Т. 10. – № 2. – С. 174 – 178.
59. Писаренко, О. И. Ишемическое прекондиционирование: от теории к практике / О. И. Писаренко // Кардиология. – 2005. – № 9. – С. 62 – 72.

60. Писаренко, О. И. Ингибиторы Na^+/H^+ обмена – новый класс кардиопротекторов / О. И. Писаренко // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90. – № 9. – С. 1103 – 1110.
61. Потапенко, М. С. Маркер дестабилизации атеросклеротических бляшек (PAPP-A) и некроза миокарда (тропонин I): возможности клинического применения в анестезиологии / М. С. Потапенко, С. Н. Гриценко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13. – № 3. – С. 391 – 395.
62. Раевский, О. А. Дескрипторы водородной связи в компьютерном молекулярном дизайне / О. А. Раевский // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 97 – 107.
63. Руженцова, Т. А. Фитостерины в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний / Т. А. Руженцова // Лечащий врач. – 2010. – № 7. – С. 66.
64. Саркисов, Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов // Руководство для врачей и лаборантов. - М.: Медицина, 1996. – 544 с.
65. Спасов, А. А. Имидазо-(1,2-а)-бензимидазолы – новый класс кардиотропных средств: Дисс... докт. мед. наук / Спасов Александр Алексеевич. – Волгоград, 1983. – 540 с.
66. Спасов, А. А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция активности / А. А. Спасов, Н. А. Гурова, М. В. Харитоновна // Экспер. и клин. фармакол. – 2013. – Т. 76. – № 1. – С. 43 – 48.
67. Стаценко, М. Е. Возможности применения милдроната в комплексном лечении хронической сердечной недостаточности у больных в раннем постинфарктном периоде / М. Е. Стаценко, О. Е. Спорова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2005. – № 6. – С. 62 – 66.
68. Сыренский, А. В. Влияние изменения метаболического и антиоксидантного статуса миокарда на выраженность его ишемического и реперфузионного повреждения / А. В. Сыренский, М. М. Галагудза [и др.] // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2008. – №. 10. – С. 1171 – 1180.

69. Трешкур, Т. В. Роль восстановления коронарного кровотока и оптимизации метаболизма кардиомиоцитов в лечении желудочковых аритмий высоких градаций ишемического генеза / Т. В. Трешкур, А. А. Татарина [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 69 – 76.
70. Трухан, Д. И. Миокардиальный цитопротектор триметазидин МВ как важный компонент комплексной терапии ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности / Д. И. Трухан // Consilium medicum. – 2014. – №.10. – С. 86 – 92.
71. Тюренков, И. Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова // Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 375 – 384.
72. Цорин, И. Б. О противоишемическом и антиаритмическом действии препарата эзафосфина / И. Б. Цорин, Г. Г. Чичканов // Экспер. и клин. фармакол. – 2004. – Т. 67. – № 4. – С.16 – 18.
73. Цыганкова, А. С. Ишемическая болезнь сердца у женщин. Особенности факторов риска и клинического течения инфаркта миокарда в зависимости от возраста / А. С. Цыганкова, Е. Л. Федорова [и др.] // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2010. – Т. 9. – № 1. – С. 23 – 32.
74. Цырлин, В. А. Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть I / В. А. Цырлин, А. В. Сыренский, М. М. Галагудза, Д. Л. Сонин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. – № 4. – С. 4 – 12.
75. Чазов, Е. И. Испытание гипотензивного действия препарата оксаком, содержащего динитрозильный комплекс железа с глутатионом, на здоровых добровольцах / Е. И. Чазов, О. В. Родненков [и др.] // Кардиология. – 2011. – № 11. – С. 28 – 37.
76. Чазова, И. Е. В фокусе внимания – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента: рамиприл при артериальной

гипертонии // И. Е. Чазова, Т. В. Мартынюк, Л. Г. Ратова // Системные гипертензии. – 2011. – № 3. – С. 5 – 10.

77. Чигиринская, А. А. Влияние нарушений функций сердца на исход острого нарушения мозгового кровообращения / А. А. Чигиринская, А. Г. Лежнев // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013.– Т. 3. – № 3. С. 673.

78. Чичканов, Г. Г. Влияние зетебрадина при его длительном применении на течение экспериментального инфаркта миокарда у крыс / Г. Г. Чичканов, И. Б. Цорин [и др.] // Экспер. и клин. фармакол. – 2008. – № 5. – С. 13 – 18.

79. Шальнова, С. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «эпидемиология сердечнососудистых заболеваний в различных регионах России» / С. А. Шальнова, А. О. Конради [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2012. – № 5. – С. 6 – 11.

80. Шальнова, С. А. Тенденции смертности в России в начале XXI века (по данным официальной статистики) / С. А. Шальнова, А. Д. Деев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – Т. 10. – № 6. – С. 5 – 10.

81. Шварц, В. А. Влияние терапии препаратом Кардионат на качество жизни у больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST в раннем постинфарктном периоде / В. А. Шварц, А. Р. Киселев, О. М. Посненкова // Consilium medicum. – 2010. – № 5. – С. 94 – 98.

82. Шилов, А. М. Инфаркт миокарда. Патофизиологические и клинические аспекты / А. М. Шилов // Медицинская литература от издательства: Миклош, 2009. – 164 с.

83. Шляхто, Е. В. Метаболизм миокарда при хронической сердечной недостаточности и современные возможности метаболической терапии / Е. В. Шляхто, М. М. Галагудза [и др.] // Сердечная недостаточность. – 2005. – № 4. – С. 148 – 156.

84. Andreadou, I. E. Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction / I. E. Andreadou, K. Iliodromitis [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – V. 5. – № 30. – P. 3204 – 3213.
85. Arup, K.G. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. Modeling dispersive and hydrophobic interactions / K. G. Arup, M. C. Gordon // *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* – 1987. – V. 27. – № 21. – P. 21 – 35.
86. Avkiran, M. / Basic biology and pharmacology of the cardiac sarcolemmal sodium/hydrogen exchanger / M. Avkiran // *J. Card. Surg.* – 2003. – № 1. – P. 3 – 12.
87. Ayoub, I. M. Zoniporide preserves left ventricular compliance during ventricular fibrillation and minimizes postresuscitation myocardial dysfunction through benefits on energy metabolism / I. M. Ayoub, J. D. Kolarova [et al.] // *Crit Care Med.* – 2007. – V. 35. – № 10. – P. 2329 – 2336.
88. Baskin, I. I. A neural device for searching direct correlations between structures and properties of chemical compounds / I. I. Baskin, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1997. – V. 37. – № 4. – P. 715 – 721.
89. Belardinelli, R. Clinical benefits of a metabolic approach in the cardiac rehabilitation of patients with coronary artery disease / R. Belardinelli, F. Lacalaprice [et al.] // *Am J Cardiol.* – 2006. – № 98. – P. 25 – 33.
90. Benos, D. J. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells / D. J. Benos // *Am. J. Physiol.* – 1982. – № 242. – P. 131 – 145.
91. Cingolani, H. E. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain / H. E. Cingolani, I. L. Ennis, E. A. Aiello, N. G. Pérez // *Pflugers Arch.* – 2011. – V. 462. – № 1. – P. 29 – 38.
92. Clements-Jewery, H. Cardioprotective efficacy of zoniporide, a potent and selective inhibitor of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1, in an experimental model of cardiopulmonary bypass / H. Clements-Jewery, F. J. Sutherland [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2004. – V. 142. – № 1. – P. 57 – 66.

93. De Paula, J. G. Management of multivessel coronary disease after primary angioplasty: staged reintervention versus optimized clinical treatment and two-year follow-up / J. G. De Paula, M. F. de Godoy [et al.] // *Rev Bras Cir Cardiovasc.* – 2014. – № 29. – P. 177 – 85.
94. De Simone, R. W. Privileged structures: applications in drug discovery / R. W. De Simone, K. S. Currie [et al.] // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2004. – V. 7. – № 5. – P. 473 – 494.
95. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Official Journal L. – 2010. – № 27. – P. 33 – 79 (revising Directive 86/609/EEC).
96. Ennis, I. L. Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na^+/H^+ exchanger inhibition / I. L. Ennis, G. M. Console [et al.] // *Hypertension.* – 2003. – V. 41. – № 6. – P. 1324 – 1329.
97. Fliegel, L. Regulation of the $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$ exchanger in the healthy and diseased myocardium / L. Fliegel // *Expert Opin Ther Targets.* – 2009. – V. 13. – № 1. – P. 55 – 68.
98. Fliegel, L. The Na^+/H^+ exchanger isoform 1 / L. Fliegel // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – № 37. – P. 33 – 37.
99. Hashimoto, K. Myocardial Ischemia and Preconditioning / K. Hashimoto, K. E. Nagasawa, B. M. Zhu // *Hypertension.* – 2003. – №. 6. – P. 389 – 397.
100. Irwin, S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics.* – 1964. – V. 5. – P. 174 – 179.
101. Karmazyn, M. NHE-1: still a viable therapeutic target / M. Karmazyn // *Rev Bras Cir Cardiovasc.* – 2013 – №. 61. – P. 77 – 82.
102. Kim, J. Pharmacodynamic characteristics and cardioprotective effects of new NHE1 inhibitors / J. Kim, Y. S. Jung // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – V. – 567. – № 1. – P. 131 – 138.
103. Kitagawa, Y. Reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy on in situ left ventricular function in rat hearts / Y. Kitagawa, D. Yamashita, H. Ito, M.

Takaki // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – V. 287. – № 1. – P. 277 – 285.

104. Koliakos, G. NHE-1: a molecular target for signalling and cell matrix interactions / G. Koliakos, K. Paletas, M. Kaloyianni // *Connect. Tissue Res.* – 2008. – V. 49. – № 3. – P. 157 – 161.

105. Kusumoto, K. In vitro and in vivo pharmacology of a structurally novel Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, T-162559 / K. Kusumoto, H. Igata [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2002. – № 135. – P. 1995 – 2003.

106. Lee, S. H. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected] / S. H. Lee, T. Kim // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – № 2. – P. 20 – 26.

107. Lee1, B.K. Effects of KR-33028, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct / B. K. Lee, D. H. Lee, S. Park // *Brain Res.* – 2009. – № 1248. – P. 22 – 30.

108. Lee2, S. (2-Aryl-5-methylimidazol-4-ylcarbonyl)guanidines and (2-aryl-5-methyloxazol-4-ylcarbonyl)guanidines as NHE-1 inhibitors / S. Lee, K. Y. Yi [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – V. 19. – № 5. – P. 1329 – 1331.

109. Li, J. M. Design, synthesis and Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 inhibitory activity of feruloylagmatine analogues / J. M. Li, Y. He [et al.] // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2011. – V. 46. – № 8. – P. 936 – 941.

110. Luo, J. Physiology and pathophysiology of Na(+)/H(+) exchange isoform 1 in the central nervous system / J. Luo, D. Sun // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2007. – V. 4. – № 3. – P. 205 – 215.

111. Malo, M. E. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger / M. E. Malo, L. Fliegel // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – V. 84. – № 11. – P. 1081 – 1095.

112. McKelvie, R. Heart Failure / R. McKelvie // *Clin Evid.* – 2003. – № 9. – P. 95 – 118.

113. Nakajima-Takenaka, C. Left ventricular function of isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts perfused with blood: mechanical work and energetics / C.

Nakajima-Takenaka, G. X. Zhang [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2009. – № 297. – P. 1736 – 1743.

114. Nanda, S. Atrial fibrillation advances in drug therapy / S. Nanda, S. M Siddique [et al.] // Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. – 2010. – V. 5. – № 1. – P. 11 – 19.

115. Oh, K. S. Effects of KR-33028, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, on ischemia and reperfusion-induced myocardial infarction in rats and dogs / K. S. Oh, H. W. Seo [et al.] // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2007. – V. 21. – № 3. – P. 255 – 263.

116. Roskopf, D. Rapid determination of the elevated Na⁺/H⁺ exchanger in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay / D. Roskopf, E. Morgenstern [et al.] // Journal of Hypertension. – 1991. – № 9. – P. 231 – 238.

117. Sánchez, J. A. Effects of a reduction in the number of gap junction channels on their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts / J. A. Sánchez, A. Rodríguez-Sinovas [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – V. 301. – № 6. – P. 2442 – 2453.

118. Seferovic, P. M. Organization of heart failure management in European Society of Cardiology member countries: survey of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the Heart Failure National Societies/Working Groups / P. M. Seferovic, S. Stroerk [et al.] // Eur. J. Heart Fail. – 2013. – V. 15. – № 9. – P. 947 – 959.

119. Shibata, M. NHE-1 participates in isoproterenol-induced downregulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts / M. Shibata, D. Takeshita [et al.] // J Physiol Heart Circ Physiol. – 2011. – V. 301. – № 5. – P. 2154 – 2160.

120. Slepko, E. R. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger / E. R. Slepko, J. K. Rainey, B. D. Sykes, L. Fliegel / Biochem J. – 2007. – V. 401. – № 3. – P. 623 – 633.

121. Takaki, M. Left ventricular mechanoenergetics in small animals / M. Takaki // *Jpn J Physiol.* – 2004. – № 54. – P. 175 – 207.
122. Thomson Reuters Integrity: Официальный сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://integrity.thomson-pharma.com> (дата обращения 01.05.2011).
123. Tracey, W. R. Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1) / W. R. Tracey, M. C. Allen [et al.] // *Cardiovasc. Drug. Rev.* – 2003. – V. 21. – №. 1. – P. 17 – 32.
124. Vellarkad, N. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics / N. Vellarkad, A. K. Viswanadhan [et al.] // *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* – 1989. – V. 2. – P. 163 – 172.
125. Xu, H. Loss of NHE8 expression impairs ocular surface function in mice / H. Xu, Y. Zhao [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2015. – №. 1. – P. 79 – 87.
126. Xue, J. Elevated myocardial Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 activity elicits gene expression that leads to cardiac hypertrophy / J. Xue, F. Mraiche // *Physiol Genomics.* – 2010. – № 42. – P. 374 – 383.
127. Yui, H. Comparative effects of verapamil, nicardipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury / H. Yui, U. Imaizumi [et al.] // *Anesthesiol Res Pract.* – 2011. – № 33. – P. 521 – 528.
128. Zefirov, N. S. Fragmental approach in QSPR / N. S. Zefirov, V. A. Palyulin // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2002. – V. 42. – № 5. – P. 1112 – 1122.
129. Zhang, G. X. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats / G. X. Zhang, S. Kimura [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2005. – № 65. – P. 230–238.
130. Zhang, G. X. Role of AT₁ receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice / G. X. Zhang, K. Ohmori [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2007. – № 42. – P. 804 – 811.

131. Zhang, R. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury / R. Zhang, L. Lei [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – V. 17. – № 9. – P. 2430 – 2433.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Физико-химические параметры производных циклических гуанидинов

№	Шифр	LogP ₀	LogP _{R1}	LogP _{R2}	MR ₀	MR _{R1}	MR _{R2}	Химический класс
1.	RU-0254	3,55	1,26	-0,42	81,19	34,34	1,60	2,3-дигидро-N ⁹ -ImBI
2.	RU-0255	3,60	1,31	-0,42	83,51	36,66	1,60	2,3-дигидро-N ⁹ -ImBI
3.	RU-0283	2,47	0,18	-0,42	80,63	33,79	1,60	2,3-дигидро-N ⁹ -ImBI
4.	RU-0354	4,04	1,31	2,03	103,98	36,66	25,28	N ¹ -ImBI
5.	RU-0355	2,90	0,18	2,03	101,11	33,79	25,28	N ¹ -ImBI
6.	RU-0602	3,65	1,31	1,64	105,79	36,66	27,09	N ¹ -ImBI
7.	RU-0606	3,59	1,26	1,64	103,47	34,34	27,09	N1-ImBI
8.	RU-0017	4,04	1,31	2,03	103,98	36,66	25,28	N ⁹ -ImBI
9.	RU-0064	3,98	1,26	2,03	101,66	34,34	25,28	N ⁹ -ImBI
10.	RU-1204	4,19	1,31	2,19	104,39	36,66	25,68	N ⁹ -ImBI
11.	RU-1205	3,06	0,18	2,19	101,51	33,79	25,68	N ⁹ -ImBI
12.	RU-1183	4,01	1,26	1,81	115,58	34,34	33,45	АмБИ
13.	RU-1184	4,06	1,31	1,81	117,90	36,66	33,45	АмБИ
14.	RU-1185	2,93	0,18	1,81	115,02	33,79	33,45	АмБИ
15.	RU-1199	4,44	1,31	2,19	110,13	36,66	26,68	АмБИ
16.	RU-1200	3,31	0,18	2,19	107,25	33,79	25,68	АмБИ
17.	RU-1355	3,31	0,18	2,19	107,25	33,79	25,68	АмБИ
18.	RU-1361	3,71	1,09	2,19	80,14	6,88	25,68	АмБИ
19.	RU-1362	4,05	1,33	2,19	84,94	11,48	25,68	АмБИ
20.	RU-1363	4,15	1,48	2,19	88,25	16,13	25,68	АмБИ
21.	RU-1364	4,53	1,75	2,19	89,54	16,08	25,68	АмБИ
22.	RU-1365	4,95	2,17	2,19	94,14	20,68	25,68	АмБИ
23.	RU-1366	5,19	2,52	2,19	103,30	31,17	25,68	АмБИ
24.	RU-1369	3,71	0,58	2,19	98,21	24,74	25,68	АмБИ
25.	RU-1370	3,81	1,07	2,19	102,80	29,34	25,68	АмБИ
26.	RU-1390	4,38	1,26	2,19	107,81	34,34	25,68	АмБИ

Изменение показателей динамики при проведении функциональных нагрузок у животных в условиях формирования ХСН (интоксикация изопротеренолом) в течение 4 недель (M±m)

№	Показатель	Максимальный ответ на нагрузку, Δ %		
		<i>преднагрузка</i> - нагрузка объемом	<i>постнагрузка</i> - максимальная изометрическая нагрузка	
			5сек	25 сек
Контроль				
1	Левожелудочковое давление	17,65±4,34	89,85±12,32	78,47±17,81
2	ЧСС	2,46±2,68	21,71±1,48	21,71±1,48
3	МИФС	20,93±2,52	130,74±14,10	121,71±29,27
Изопротеренол 1 неделя				
1	Левожелудочковое давление	17,07±3,75	109,46±17,11	89,67±11,02
2	ЧСС	-2,24±2,10	2,17±14,30	29,22±20,72
3	МИФС	14,52±5,12	113,49±31,06	149,15±47,00
Изопротеренол 2 неделя				
1	Левожелудочковое давление	10,03±3,07	69,06±6,27	62,94±17,64
2	ЧСС	4,28±2,96	-7,92±9,19*	12,98±13,50
3	МИФС	14,51±2,59	54,57±13,57*	87,34±32,70
Изопротеренол 3 неделя				
1	Левожелудочковое давление	-12,95±9,59*	69,02±12,56	72,11±21,36
2	ЧСС	15,21±6,84	21,76±8,67	24,88±18,12
3	МИФС	-0,68±9,68	105,84±19,61	103,99±19,37
Изопротеренол 4 неделя				
1	Левожелудочковое давление	-7,08±3,41*	51,93±15,51	49,88±13,71
2	ЧСС	5,45±1,71	7,34±5,06	28,12±8,79
3	МИФС	-2,12±2,92*	62,62±15,41*	90,88±15,11

Примечание: * - различия, статистически достоверные к исходу, (p<0,05).

**Морфологические изменения в миокарде крыс при формировании
хронического повреждения миокарда изопротеренолом (M±m)**

N	Группы	n	Количество соединительной ткани	
			объемная плотность, баллы	по коллагеновым волокнам, баллы
1	Интактные	4	0,18±0,11	0,1±0,00
2	2 неделя	7	2,60±0,76 [#]	3,20±0,22 [#]
3	4 неделя	8	3,80±0,22 [#]	4,00±0,35 [#]

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: # - группе «интактные».

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику ЛЖД (мм. рт. ст.) в условиях нагрузки объемом у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m)

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Интактные	85,38±6,16	99,76±10,36	106,07±9,79*	110,79±9,61*	101,33±9,54	94,16±9,17	90,46±6,52
2.	Изопротеренол (ИЗО)	90,52±6,95	91,10±4,29	91,57±6,15	84,94±7,29#	83,75±8,23	84,86±7,79	81,34±7,23
3.	ИЗО +РУ-1355	91,01±7,96	92,96±8,47	102,67±6,59	104,72±6,56^	96,48±4,14^	89,97±5,32^	88,49±6,42^
4.	ИЗО+Милдронат	81,09±3,92	88,62±3,93	93,74±3,82	96,97±4,10*	91,19±3,62	88,59±3,30	83,24±1,99

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику скорости сокращения (+dp/dt) (мм. рт. ст./сек.) в условиях нагрузки объемом у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m)

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Интактные	3462,70±250,62	3815,41± 220,01	3978,86± 213,93	4051,66± 229,53	3796,09± 247,69	3619,69± 199,78	3523,01± 236,12
2.	Изопротеренол (ИЗО)	3146,08±251,52	3134,57± 174,79 [#]	3155,36± 184,21 [#]	3224,16± 195,29 [#]	3044,66± 205,99 [#]	3101,45± 237,92	3118,52± 210,77
3.	ИЗО +РУ-1355	3539,63±558,41	3787,82± 727,79	3871,75± 579,52	4055,52± 715,09	3482,09± 592,13	3255,65± 484,05	3189,99± 440,54
4.	ИЗО+Милдронат	3698,24±423,89	4050,86± 601,97	4313,74± 499,54	4394,57± 540,27	4422,02± 439,41 ^{&}	3955,90± 407,75	3807,67± 315,67

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходно; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

**Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику скорости расслабления (-dp/dt) (мм. рт. ст./сек.)
в условиях нагрузки объемом у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом
(M±m)**

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Интактные	-2728,45±132,05	-3065,58± 157,25	-3131,85± 188,35	-3428,55± 137,09*	-3188,45± 184,50*	-3056,10± 224,16	-2836,09± 221,00
2.	Изопротеренол (ИЗО)	-2875,99±165,33	-2846,63± 140,49	-2919,55± 142,93	-2945,13± 102,40 [#]	-2793,29± 143,85	-2802,82± 170,12	-2821,69± 170,88
3.	ИЗО +РУ-1355	-3364,19±588,44	-3289,02± 567,37	-3114,64± 576,91	-3529,35± 554,41	-3176,56± 425,31	-3073,13± 442,12	-2965,48± 439,55
4.	ИЗО+Милдронат	-3098,08±256,31	-3182,66± 223,37	-3289,79± 342,03	-3300,08± 344,19	-3389,41± 307,32	-3368,26± 272,59	-3061,89± 180,03

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику ЧСС (уд./мин.) в условиях нагрузки объемом у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m)

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Интактные	374,83±10,61	362,00± 19,63	364,83± 20,29	370,67± 20,66	378,17± 7,91	383,50± 8,59	406,33± 20,42
2.	Изопротеренол (ИЗО)	329,83±7,03 [#]	304,50± 18,21 [#]	329,33± 11,84	338,50± 12,38	342,33± 8,43 [#]	344,00± 14,15 [#]	340,33± 13,81 [#]
3.	ИЗО +РУ-1355	344,60±13,68	333,60± 17,66	342,40± 14,00	347,60± 15,79	349,60± 15,65	334,00± 12,99 [#]	334,60± 10,88 [#]
4.	ИЗО+Милдронат	338,75±24,98	340,25± 24,81	341,50± 25,85	342,75± 26,70	340,50± 28,58	344,25± 27,28	343,50± 30,74

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходно; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику МИФС (мм. рт. ст.*ЧСС/г) в условиях нагрузки объемом у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m)

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Интактные	50260,76±4761,76	57002,10± 8019,24	59806,58± 4069,79	63658,00± 4657,28*	59666,24± 4920,22	56729,62± 5932,99	58360,10± 7102,68
2.	Изопротеренол (ИЗО)	35387,12±4933,36 [#]	32653,14± 3659,04 [#]	35774,25± 4664,69 [#]	34027,16± 4706,06 [#]	33962,99± 5117,09 [#]	34644,93± 5230,76 [#]	33131,17± 5259,76 [#]
3.	ИЗО +РУ-1355	39070,96±6220,35	38903,86± 6791,21	43299,29± 5481,35 [#]	45033,48± 6063,37 [#]	41652,69± 5069,35 [#]	36903,96± 4139,63 [#]	36709,15± 5060,01 [#]
4.	ИЗО+Милдронат	39063,29±1245,53 [#]	42874,34± 992,27 ^{&}	45507,19± 937,64 ^{*#}	47250,79± 1507,06 ^{**&}	44055,73± 997,45 ^{*#}	43330,03± 818,02 ^{**}	40667,74± 1821,26 [#]

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику ЛЖД (мм. рт. ст.) в условиях постнагрузки у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m)

№	Группы	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	20	25	реперфузия
1.	Интактные	91,17±4,78	172,58±7,98*	169,38±8,32*	165,35±8,59*	161,50±8,10*	162,07±9,08*	90,40±5,81
2.	Изопротеренол (ИЗО)	92,25±6,74	148,71±14,25*	141,37±2,09*#	137,44±14,69*	138,82±11,63*	134,08±3,33*#	92,31±7,03
3.	ИЗО+РУ-1355	88,31±9,81	145,35±13,44*	144,19±11,40*	146,31±9,86*	144,42±8,21*	144,47±10,87*	105,22±8,41
4.	ИЗО+Милдронат	86,58±6,59	146,81±12,68*	131,07±9,19*#	133,25±9,64*#	132,33±11,69*#	132,71±15,48*	92,38±5,83

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

**Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику скорости сокращения (+dp/dt) в условиях
постнагрузки у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m, мм. рт. ст./сек.)**

№	Группы	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)						реперфузия
			окклюзия						
			5	10	15	20	25		
1.	Интактные	3885,88±231,74	5769,83± 322,15*	5480,05± 263,43*	5132,81± 262,07*	5034,67± 279,66*	5053,15± 277,03*	3581,01± 237,83	
2.	Изопротеренол (ИЗО)	3266,19±267,25	4376,32± 578,19#	3955,50± 446,19#	3721,48± 416,03#	3900,39± 427,95#	3749,46± 422,97#	2966,51± 220,31	
3.	ИЗО+РУ-1355	3066,14±367,84	4094,14± 471,03#	3862,91± 252,42#	3900,03± 279,05#	4162,25± 460,36	4192,19± 498,34	3831,23± 628,99	
4.	ИЗО+Милдронат	3681,25±556,54	4762,97± 831,85	3909,87± 585,18#	3876,18± 618,98	4031,16± 694,61	4218,68± 838,34	3635,16± 542,25	

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику скорости расслабления (-dp/dt) в условиях постнагрузки у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m, мм. рт. ст./сек.)

№	Группы	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Интактные	-3153,35±194,89	-4028,54±164,03*	-4070,94±252,41*	-3898,55±63,47*	-3898,31±246,36*	-3978,73±263,55*	-3038,66±135,78
2.	Изопротеренол (ИЗО)	-2990,09±177,77	-3582,47±267,45	-3370,43±55,97 [#]	-3207,72±65,18 [#]	-3384,66±202,80	-3518,44±309,74	-2884,56±185,25
3.	ИЗО+РУ-1355	-2917,67±254,29	-3133,06±141,91 [#]	-3218,36±254,19 [#]	-3393,19±310,12	-3698,18±302,76	-3630,86±351,58	-3813,56±702,22
4.	ИЗО+Милдронат	-3062,05±330,94	-3252,19±201,62 [#]	-3153,28±156,41 [#]	-3068,35±171,19 [#]	-3168,07±223,04 [#]	-3244,79±277,84	-2978,77±332,78

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику ЧСС в условиях постнагрузки у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m, уд./мин.)

№	Группы	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Интактные	377,89±8,87	423,78± 24,51	417,33± 27,05	431,67± 24,71*	430,89± 16,79*	443,86± 14,34*	351,67± 27,82
2.	Изопротеренол (ИЗО)	334,50±16,31 [#]	383,00± 22,74	402,83± 26,29 [#]	403,17± 29,96*	432,33± 32,34*	443,17± 32,23*	342,33± 22,55
3.	ИЗО+РУ-1355	341,00±24,07	381,00± 16,72	416,25± 20,24	438,00± 17,88*	477,00± 23,18*	488,25± 24,16*	447,25± 14,86 ^{*#&}
4.	ИЗО+Милдронат	368,50±35,29	380,05± 46,11	419,17± 33,44	437,50± 33,25	448,00± 34,98	435,64± 36,12	410,67± 30,93

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исход; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на динамику МИФС в условиях постнагрузки у интактных и животных с хронической интоксикацией изопротеренолом (M±m, мм. рт. ст.*ЧСС/г)

№	Группы	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)						реперфузия
			окклюзия						
			5	10	15	20	25		
1.	Интактные	53550,76± 4290,44	112975,05± 9727,55*	108213,70± 8235,21*	108369,15± 6030,22*	106415,28± 5693,54*	109935,01± 5806,56*	49366,43± 5616,88	
2.	Изопротеренол (ИЗО)	36927,44± 5342,05#	69071,83± 11413,54*#	68476,54± 10390,39*#	65362,53± 9423,61*#	70557,26± 9110,44*#	70164,79± 9579,28*#	38344,97± 5467,53	
3.	ИЗО+РУ-1355	41577,66± 9572,27	73998,68± 10888,08#	79853,35± 10284,16*	85130,81± 10274,00*	92167,26± 12549,88*	94798,33± 14434,78*	63962,43± 11059,09	
4.	ИЗО+Милдронат	46513,05± 5979,80	80305,43± 11352,79*#	79916,38± 8332,01*#	84866,69± 8696,17*#	87402,11± 12054,13*	85626,14± 14574,63*	55686,78± 6094,31&	

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: * - исходу; # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО»; ^ - группе «ИЗО+РУ-1355».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «ИЗО» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза в день) (28 дней); «ИЗО+РУ-1355» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг (31 день); «ИЗО+Милдронат» - группа животных, с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили милдронат в дозе 50 мг/кг (31 день). Все соединения вводили внутривенно.

Влияние соединения РУ-1355 и милдроната на морфологические изменения миокарда при хроническом повреждении изопротеренолом (M±m)

N	Группы	n	Количество соединительной ткани	
			объемная плотность, баллы	по коллагеновым волокнам, баллы
1	Интактные	4	0,05±0,00	0,06±0,00
2	Изопротеренол (ИЗО)	6	4,00±0,40 [#]	4,00±0,32 [#]
3	ИЗО+РУ-1355	7	2,83±0,31 ^{#&}	3,00±0,26 [#]
4	ИЗО+Милдронат	8	3,00±0,32 ^{#&}	3,00±0,41 [#]

Примечания: различия, статистически достоверные (p<0,05) к: # - группе «интактные»; & - группе «ИЗО».