

Скрининг кардиотропной активности в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов

Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Цель настоящего исследования – поиск в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов соединений, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью. Скрининг в ряду этих соединений позволил выявить соединение-лидер – N1-(2,3,4-триметоксибензил)–N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этан-диамин, которое обладает не только выраженной антиаритмической, но и противофибрилляторной активностью. Изучение антиишемического действия этого соединения на модели субэндокардиальной ишемии у крыс свидетельствует о том, что оно по своей антиишемической активности, как минимум, не уступает эталонному для этой модели антагонисту ионов кальция верапамилу.

Ключевые слова: скрининг, антиишемическая и антиаритмическая активности, α , ω -диарилметильные производные бис-(ω -аминоалкил)аминов

Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α , ω -diarylmetil derivatives of bis-(ω - aminoalkyl)amines

Kryzhanovskii S.A., Likhosherstov A.M., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Mokrov G.V., Gudasheva T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The purpose of this study – the search among the α , ω -diarylmetil derivatives of bis-(ω -aminoalkyl)amines compounds possessing antiarrhythmic and anti-ischemic activity. The screening among these compounds revealed compound leader – N1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)–N2-{2-[(2,3,4-trimethoxybenzyl)amino]ethyl}-1,2-ethanediamine, which not only has a pronounced antiarrhythmic but also antifibrillation activity. Study of antiischemic action of that compound on the subendocardial ischemia model in rats indicates that it is in its antiischemic activity, at least not inferior calcium ions antagonist – verapamil to the reference for this model.

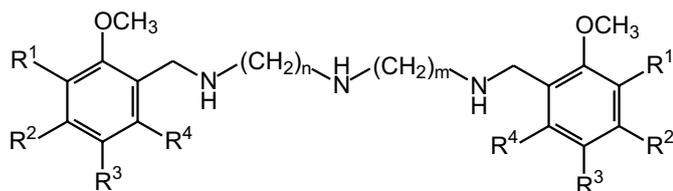
Keywords: screening, antiischemic and antiarrhythmic activity, α , ω -diarylmetil derivatives of bis-(ω -aminoalkyl) amines

Автор, ответственный за переписку:

Крыжановский Сергей Александрович – д.м.н., заведующий лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495)601-21-85; e-mail: SAK-538@yandex.ru

Введение

Поиск новых оригинальных кардиотропных лекарственных средств, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью, безусловно, является одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед современной кардиофармакологией. В рамках решения этой проблемы впервые в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов был проведён поиск соединений, обладающих подобной активностью. Было сконструировано, синтезировано и изучено 8 соединений общей формулы:



где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 могут быть двумя или тремя водородными или одной, или двумя метокси-группами, n и m могут быть одинаковыми и иметь значения 2 или 3, или быть разными и иметь значения $n = 2$ и $m = 3$.

С теоретических позиций подобные соединения потенциально должны обладать свойствами р-FOX ингибиторов, т. е. блокировать в ишемизированном миокарде аномальный метаболизм свободных жирных кислот. Известно, что в условиях ишемии миокарда основным источником АТФ является анаэробный гликолиз. При этом происходит подавление аэробного синтеза АТФ, осуществляемого за счёт физиологического β -окисления свободных жирных кислот, в результате чего в зоне неадекватного кровообращения миокарда содержание недоокисленных свободных жирных кислот резко возрастает [9, 10]. Этот процесс получил название «метаболическое ремоделирование миокарда» [11]. В дальнейшем было показано, что именно дисбаланс между окислением глюкозы и свободных жирных кислот в ишемизированных кардиомиоцитах обуславливает формирование ишемической/постишемической дисфункции левого желудочка сердца, его ремоделирование и повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма [6], а также инициирует процессы, ответственные за апоптоз кардиомиоцитов [5]. Накопленные данные о механизмах, лежащих в основе метаболического ремоделирования

миокарда, позволили сформулировать теоретические подходы к медикаментозной цитопротекции — процессу восстановления энергетического метаболизма ишемизированных кардиомиоцитов путём подавления аномального метаболизма свободных жирных кислот [4, 7, 8], т. е. созданию и внедрению в клинику новых лекарственных средств метаболического действия для лечения ишемических сердечно-сосудистых заболеваний. Первоначально группа лекарственных средств, обладающих способностью подавлять аномальное β -окисление свободных жирных кислот, получила название блокаторы 3-кетоацил коэнзим А-тиолазы, поскольку именно этот механизм лежал в основе кардиопротективного действия единственного представителя этой группы — триметазида [3]. Однако после внедрения в широкую клиническую практику препарата ранолазин, в основе кардиопротективного действия которого лежит не блокада 3-кетоацил коэнзим А-тиолазы, а обратимое ингибирование НАДН⁺-дегидрогеназы митохондрий [2, 12], эту группу лекарственных средств — блокаторов аномального метаболизма свободных жирных кислот объединили под названием «парциальные ингибиторы окисления жирных кислот» — p-FOX ингибиторы (partial fatty acid oxidation inhibitor).

Цель исследования

Цель настоящего исследования — поиск в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -амино-алкил)аминов биологически активных соединений, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью.

Материалы и методы

Животные

Все включённые в исследование животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» при контролируемом освещении (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовало приказу МЗ РФ № 708н «Об учреждении правил лабораторной практики» от 23.08.2010 г. и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинкской декларации (2000).

Изучение острой токсичности (LD_{50}) изучаемых соединений

LD_{50} изучаемых соединений определяли по стандартной методике на беспородных белых мышцах-самцах

массой 18–20 г. Соединения растворяли в дистиллированной воде для инъекций и вводили внутривенно (в/в) в объёме 0,1 мл/10 г массы тела. По методу Литчфилда–Вилкоксона рассчитывали LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} и их 95% доверительные интервалы.

Изучение антиаритмической активности изучаемых соединений

Объект исследования — белые беспородные крысы-самцы. Оценку спектра антиаритмической активности изучаемых соединений проводили на аконитиновой и хлоридкальциевой моделях нарушений сердечного ритма; о противофибрилляторной активности изучаемых соединений судили по их влиянию на порог электрической фибрилляции желудочков сердца. Эксперименты проводили согласно методическим рекомендациям, подробно изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [1]. Статистическую обработку результатов проводили по методу точной вероятности Фишера (аконитиновая и хлоридкальциевая аритмия) и с использованием знаково-рангового критерия Уилкоксона (порог электрической фибрилляции).

Изучение антиишемической активности изучаемых соединений

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б). Острую эндокардиальную ишемию миокарда вызывали по методу, описанному S. Yamamoto с соавт. [13]. Для этой цели животным с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно (в/в) со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист β -адренорецепторов изопроterenол. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 мин от момента начала инфузии изопроterenолола. В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия). Животные были рандомизированы на 9 групп: 1-я — контроль ($n = 16$); 2-я — соединение IIa ($n = 7$); 3-я — соединение IIб ($n = 9$); 4-я — соединение IIв ($n = 7$); 5-я — соединение IIг ($n = 7$); 6-я — соединение IIд ($n = 7$); 7-я — соединение IIе ($n = 5$); 8-я — соединение IIж ($n = 6$) и 9-я — соединение IIз ($n = 5$). Животным контрольной группы за 2 мин до начала инфузии изопроterenолола в/в вводили эквивалентный объём (0,2 мл) физиологического раствора, а животные основных групп по аналогичной схеме получали исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). Полученные результаты обрабатывали статистически. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой по критерию Стьюдента с поправкой

Таблица 1

Острая токсичность изучаемых соединений

Соединения	LD ₁₆ , мг/кг, в/б	LD ₅₀ , мг/кг, в/б	LD ₈₄ , мг/кг, в/б
Па	69,0 (67,6÷70,4)	90,9 (75,9÷108,8)	119,7 (117,3÷122,1)
Пб	114,5 (110,5÷118,6)	163,3 (134,5÷175,5)	232,0 (224,9÷241,4)
Пв	123,2 (122,7÷123,6)	138,3 (128,2÷149,2)	155,3 (154,7÷155,8)
Пг	98,6 (98,2÷99,0)	118,8 (103,0÷121,4)	126,9 (126,4÷127,4)
Пд	58,0 (46,8÷71,8)	106,8 (75,6÷150,0)	196,9 (159,0÷243,9)
Пе	33,1 (25,1÷37,6)	62,0 (43,5÷88,4)	116,2 (102,2÷132,2)
Пж	62,2 (59,5÷65,0)	87,6 (72,2÷106,3)	123,4 (118,1÷128,9)
Пз	63,2 (58,8÷68,0)	91,7 (68,1÷123,4)	132,9 (123,6÷142,9)

Бонферрони. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$, критерий двухсторонний. Полученные результаты выражали в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

Результаты по определению LD₅₀ изучаемых соединений представлены в табл. 1.

Как следует из полученных данных, наибольшей токсичностью обладают соединения Пж, Пе, Па и Пз — III класс токсичности, остальные относятся к IV классу токсичности, т. е. к малотоксичным веществам (табл. 1).

При изучении антиаритмической активности изучаемых соединений на модели аконитиновой аритмии (табл. 2) показано, что выраженную антиаритмическую активность на данной модели, патогномоничной для антиаритмиков I класса по классификации Vaughan Williams, проявляют соединения Па, Пв и Пг.

На модели хлоридкальциевой аритмии, патогномоничной для антиаритмиков IV класса по классификации Vaughan Williams, выраженную антиаритмическую активность проявляют соединения Пг, Пе и Пж (табл. 3).

При изучении особенностей влияния изучаемых соединений на порог электрической фибрилляции желудочков (табл. 4) показано, что на данной модели активны соединения Па, Пв, Пг и Пд.

Оценку антиишемической активности изучаемых соединений проводили на модели субэндокардиальной ишемии у крыс (табл. 5). Наибольшую антиишемическую активность на данной модели проявляет соединение Пг. Следует отметить, что антиишемическая активность соединения Пг сопоставима с таковой эталонного для этой модели антагониста ионов кальция верапамила. Помимо соединения Пг, определённую антиишемическую активностью проявляют и соединения Пв, Пе и Пз.

Таблица 2

Оценка антиаритмической активности изучаемых соединений на модели аконитиновой аритмии

Соединения								
Конт-роль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
0/11	3/6 $p=0,029$	н/а	3/6 $p=0,029$	8/8 $p<0,001$	н/а	н/а	н/а	н/а
Примечание: p – указано по отношению к контролю; н/а – неактивен. В числителе указано количество выживших животных, в знаменателе – объём выборки.								

Таблица 3

Оценка антиаритмической активности изучаемых соединений на модели хлоридкальциевой аритмии

Соединение								
Конт-роль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
0/11	н/а	н/а	н/а	4/6 $p=0,008$	н/а	4/6 $p=0,008$	3/6 $p=0,036$	н/а
Примечание: p – указано по отношению к контролю; н/а – неактивен; в числителе указано количество животных без нарушений ритма, в знаменателе – объём выборки.								

Таблица 4

Влияние изучаемых соединений на порог электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс ($n=6$)

Соединение							
Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
1/5 $p=0,062$	н/а	1,5/>40 $p=0,028$	2/>40 $p=0,018$	2/15 $p=0,043$	н/а	н/а	н/а
Примечание: p – указано по отношению к исходному уровню; н/а – неактивен; в числителе указан исходный уровень, в знаменателе – порог фибрилляции после введения вещества (показаны медианы).							

Таблица 5

Влияние изучаемых соединений на депрессию сегмента ST на ЭКГ во II стандартном отведении, вызванную изопроterenолом (20 мкг/кг/мин в/в в течение 5 мин) – антиишемическая активность

Показатель	Соединение								
	контроль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
Депрессия сегмента ST, мВ	0,20± ±0,02	0,11± ±0,02	0,13± ±0,05	0,09± ±0,02	0,01± ±0,01	0,15± ±0,04	0,08± ±0,02	0,17± ±0,03	0,06± ±0,02
<i>n</i>	16	7	9	7	7	6	5	6	5
<i>p</i>		0,109	0,304	0,025	0,001	0,544	0,02	0,999	0,011

Примечание: *n* – число животных в группе; *p* – указано по отношению к контролю.

Таким образом, в результате скрининга в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов) для дальнейшего доклинического фармакологического изучения отобрано соедине-

ние-лидер — N¹-(2,3,4-триметоксибензил)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этан-диамин (соединение Пг).

Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: 2013; часть 1: 385–416.
2. Aldakkak M., Camara A.K., Heisner J.S., Yang M., Stowe D.F. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011; 64: 4: 381–392.
3. Kantor P.F., Lucien A., Kozak R., Lopaschuk G.D. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res.* 2000; 86: 5: 580–588.
4. Marzilli M. Recurrent and resistant angina: is the metabolic approach an appropriate answer? *Coron. Artery Dis.* 2004; 15: Suppl. 1: S23–S27.
5. Mencarelli A., Cipriani S., Renga B., D'Amore C., Palladino G., Distrutti E., Baldelli F., Fiorucci S. FXR activation improves myocardial fatty acid metabolism in a rodent model of obesity-driven cardiotoxicity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013; 23: 2: 94–101.
6. Snorek M., Hodyc D., Sedivy V., Durišová J., Skoumalová A., Wilhelm J., Neckář J., Kolář F., Herget J. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol. Res.* 2012; 61: 6: 567–574.
7. Stanley W.C. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2004; 9: Suppl. 1: S31–S45.
8. Stanley W.C. Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2002; 11: 5: 615–629.
9. Tousoulis D., Bakogiannis C., Briasoulis A., Papageorgiou N., Androulakis E., Siasos G., Latsios G., Kampoli A.M., Charakida M., Toutouzias K., Stefanadis C. Targeting myocardial metabolism for the treatment of stable angina. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19: 9: 1587–1592.
10. Ussher J.R., Jaswal J.S., Lopaschuk G.D. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ. Res.* 2012; 111: 5: 628–641.
11. van Bilsen M. «Energetics» of heart failure. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1015: 238–249.
12. Wyatt K.M., Skene C., Veitch K., Hue L., McCormack J.G. The antianginal agent ranolazine is a weak inhibitor of the respiratory complex I, but with greater potency in broken or uncoupled than in coupled mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 10: 1599–1606.
13. Yamamoto S., Matsui K., Sasabe M., Ohashi N. Effect of an orally active Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 39: 2: 234–241.