

**АНСАМБЛЕВЫЙ ДИСКРИМИНАНТНЫЙ АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ
NHE-1-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ
ОТ ЦЕНТРИРОВАННЫХ НА ГУАНИДИНОВЫЙ ФРАГМЕНТ
ЭЛЕКТРОННЫХ ПАРАМЕТРОВ**

**П. М. Васильев¹, В. Ю. Муравьева¹, Н. А. Гурова¹, Л. Р. Яналиева¹,
В. В. Ворфоломеева¹, В. А. Анисимова², М. В. Богославецва²**

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии,

²НИИ физической и органической химии Южного Федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

В исследованиях *in silico* методом ансамблевого дискриминантного анализа выявлены зависимости NHE-1-ингибирующей активности циклических гуанидинов — производных N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2-аминобензимидазола — от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров.

Ключевые слова: *in silico*, NHE-1-ингибирующая активность, циклические гуанидины, N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы, 2-аминобензимидазолы, зависимости «структура — активность», ансамблевым дискриминантным анализ.

**ENSEMBLE DISCRIMINANT ANALYSIS OF RELATIONSHIPS BETWEEN
NHE-1-INHIBITORY ACTIVITY OF CYCLIC GUANIDINS AND THE ELECTRONIC
PARAMETERS OF GUANIDINE FRAGMENT**

**P. M. Vassiliev, A. A. Spasov, V. U. Muravyova, N. A. Gurova, L. R. Yanaliev,
V. V. Vorfolomeeva, V. A. Anisimova, M. V. Bogoslavtseva**

*Volgograd State Medical University,
department of pharmacology, Volgograd,*

Research institute of physical and organic chemistry of the Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

In silico relationships between NHE-1 inhibitory activity of cyclic guanidins (N⁹-imidazo[1,2-a]benzimidazoles and 2 aminobenzimidazoles) and the electronic parameters of guanidine fragment using ensemble discriminant analysis were revealed.

Key words: *in silico*, NHE-1-inhibitory activity, cyclic guanidines, N⁹-imidazo[1,2-a]benzimidazoles, 2-aminobenzimidazoles, structure-activity relationships, ensemble discriminant analysis.

При анализе химической структуры известных ингибиторов натрий-водородного обменника 1 изоформы (NHE-1) выявлено, что большинство из них содержат гуанидиновую группу. Она представлена в структурах амилорида и его производных (DMA, EIPA, MIBA и HMA); производных бензоилгуанидина (НОЕ-642 (карипорид), НОЕ-694, энипорид (EMD-85131), сабипорид (ВИБ-722)). Известны моно- (S1611, S3226) и бициклические производные гуанидина, содержащие хинолин (зонипорид (CP-597396), MS 31038), индол (SM 20220, SM 20550, SMP-300), бензоксазинон (КБ-R9032), дигидробензофуран (BMS 284640), тетрагидронафтален (Т-162559), циклогептапиридин (ТУ-12533) и другие [2, 5, 7]. Международная база Thomson Reuters Integrity (2011) содержит 262 гуанидинсодержащих производных, обладающих NHE-ингибирующей активностью. Кроме того, опубликованы данные о наличии у циклических гуанидинов — производных бензимидазолов — способности ингибировать NHE-1 [3,7], которые содержат не только полностью, но и частично встроенную гуанидиновую группу.

В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии ВолгГМУ было показано, что высокая NHE-1-ингибирующая активность наиболее характерна для производных аминобензимидазола и определяется наличием аминогруппы в положении С₂, диэтиламиноэтильного, пиперидиноэтильного или морфолиноэтильного заместителя в N¹ [3]. Кроме того, было установлено, что введение в структуру производных имидазо[1,2-а]бензимидазола «активных» для производных аминобензимидазола радикалов в положение N⁹ или N¹ не приводило к высокому уровню NHE-1-ингибирующей активности.

В последующем, при проведении фармакофорного анализа соединений с высоким NHE-1-ингибирующим уровнем активности, были выявлены потенциальные 2D-фармакофоры, в том числе гуанидиновая группировка — частично или полностью встроенная в гетероцикл.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Было выдвинуто предположение, что на реализацию данного вида активности влияют электронные

параметры гуанидинового фрагмента и атомов его ближайшего окружения. Поэтому для исследования были выбраны соединения двух химических классов: производных 2-аминобензимидазола (частично встроенная в цикл гуанидиновая группа) и производные N⁹-имидазо[1,2- α]бензимидазола (полностью встроенная в цикл гуанидиновая группа), содержащие в одном и том же положении по отношению к азоту в гуанидиновой группе или диэтиламиноэтильный, или пиперидиноэтильный, или морфолиноэтильный заместители.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Расчет центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров и анализ их влияния на NHE-1-ингибирующую активность изучаемых веществ проводили в несколько этапов.

1. Изучение NHE-1-ингибирующей активности 25 соединений производных циклических гуанидинов под лабораторными шифрами «РУ», из которых 21 производных N⁹-имидазо[1,2- α]бензимидазола и 4 — 2-аминобензимидазола (табл. 1, 2) в сравнении с селективным ингибитором зонипоридом *in vitro* на тромбоцитах кролика по методу D. Rosskopf [6] и K. Kusumoto [4], модифицированному [1] в концентрациях (1×10^{-6} М; 1×10^{-7} М; 1×10^{-8} М).

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

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

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

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

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

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

8. Пошаговый дискриминантный анализ, выявление значимых систем дискриминантных функций (программа Statistica 8.0, StatSoft, USA, 2007).

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

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

11. Расчет средних значений электронных параметров и статистическое сравнение (t-критерий Стью-

дента, $p < 0,05$) групп соединений с полностью встроенной и частично встроенной в цикл гуанидиновой группировкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях *in vitro* все изучаемые соединения проявили NHE-1-ингибирующую активность различной степени выраженности. Было показано дозозависимое действие. Все изученные соединения в соответствии с граничными значениями активности, полученными в результате кластерного анализа, были разделены на 2 класса: «активные» (а) в концентрации 1×10^{-8} М $\Delta(10^{-8}) > 42,0$ %; б) в концентрации 1×10^{-7} М $\Delta(10^{-7}) > 30,0$ %; в) в концентрации 1×10^{-6} М $\Delta(10^{-6}) > 41,0$ %) и «неактивные». В концентрации 1×10^{-8} М было выявлено «активных» 32 % производных циклических гуанидинов. В концентрациях 1×10^{-7} М и 1×10^{-6} М количество таких соединений увеличилось и составило 58 и 68 % соответственно.

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

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

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

При сопоставлении дискриминантных зависимостей активности соединений в диапазоне концентраций 1×10^{-8} – 1×10^{-6} М от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров был найден общий показатель, предположительно обеспечивающий устойчивое наличие NHE-1-ингибирующей активности — это сумма зарядов на атомах второго окружения Q_2 от центрального атома углерода (первое окружение атомов азота в гуанидиновой группировке). Обращает на себя тот факт, что с уменьшением концентрации число статистически значимых электронных

параметров возрастает от одного до трех и до пяти соответственно. Это может свидетельствовать о том, что именно в низких концентрациях в большей степени проявляется специфичность взаимодействия изучаемых соединений с мишенью, тогда как в высоких концентрациях наблюдается менее селективное взаимодействие.

С учетом граничных условий был определен прогнозный спектр уровней активности по данным дискриминантного анализа для каждого из испытанных циклических гуанидинов в концентрации 1×10^{-6} , 1×10^{-7} ,

1×10^{-8} М. Индекс активности соединения принимается равным 1, если значение его электронного параметра соответствовало пороговому условию; в противном случае индекс активности полагали равным 0.

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

Таблица 1

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

Электронный параметр	Системы дискриминатных функций для 3 исследуемых концентраций		
	1×10^{-8} М	1×10^{-7} М	1×10^{-6} М
Q₀	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -17,54 + 106,41 \cdot Q_0 \text{ (1)} \\ g_{\text{act}} = -29,79 + 137,53 \cdot Q_0 \\ N=25; F(1,23) = 15,96; p = 5,7 \cdot 10^{-4}; \\ F_0=0,840; F_{\text{inact}} = 1,000; F_{\text{act}} = 0,500; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_0 > 0,394 \end{cases}$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -16,44 + 84,27 \cdot Q_0 \text{ (6)} \\ g_{\text{act}} = -12,36 + 71,63 \cdot Q_0 \\ N=25; F(1,23) = 4,17; p = 5,3 \cdot 10^{-2}; \\ F_0=0,792; F_{\text{inact}} = 600; F_{\text{act}} = 0,929; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_0 > 0,322 \end{cases}$	
Q₁	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -30,18 - 58,52 \cdot Q_1 \text{ (2)} \\ g_{\text{act}} = -45,08 - 71,07 \cdot Q_1 \\ N=25; F(1,23) = 14,92; p = 7,9 \cdot 10^{-4}; \\ F_0=0,840; F_{\text{inact}} = 1,000; F_{\text{act}} = 0,500; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_1 < -1,187 \end{cases}$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -26,23 - 44,92 \cdot Q_1 \text{ (7)} \\ g_{\text{act}} = -21,19 - 39,95 \cdot Q_1 \\ N=25; F(1,23) = 3,67; p = 6,8 \cdot 10^{-2}; \\ F_0=0,625; F_{\text{inact}} = 0,500; \\ F_{\text{act}} = 0,714; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_1 < -1,0130 \end{cases}$	
Q₂	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -0,47 + 6,26 \cdot Q_2 \text{ (3)} \\ g_{\text{act}} = -1,35 - 9,91 \cdot Q_2 \\ N=25; F(1,23) = 6,01; p = 2,2 \cdot 10^{-2}; \\ F_0=0,800; F_{\text{inact}} = 0,880; F_{\text{act}} = 0,630; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_2 < 0,054 \end{cases}$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -0,55 - 3,28 \cdot Q_2 \text{ (8)} \\ g_{\text{act}} = -1,11 + 11,29 \cdot Q_2 \\ N=25; F(1,23) = 4,69; p = 4,1 \cdot 10^{-2}; \\ F_0=0,625; F_{\text{inact}} = 0,700; \\ F_{\text{act}} = 0,571; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_2 > 0,038 \end{cases}$	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -1,37 + 10,16 \cdot Q_2 \text{ (9)} \\ g_{\text{act}} = -0,41 - 3,27 \cdot Q_2 \\ N = 25; F(1,23) = 4,39; p = 4,7 \cdot 10^{-2}; \\ F_0 = 0,640; F_{\text{inact}} = 0,000; \\ F_{\text{act}} = 0,941; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_2 > 0,0715 \end{cases}$
Q₃	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -4,14 - 14,81 \cdot Q_3 \text{ (4)} \\ g_{\text{act}} = -2,11 - 7,52 \cdot Q_3 \\ N=25; F(1,23) = 9,90; p = 4,5 \cdot 10^{-3}; \\ F_0=0,800; F_{\text{inact}} = 0,941; F_{\text{act}} = 0,500; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_3 > -0,279 \end{cases}$		
Q₄	$\begin{cases} g_{\text{inact}} = -5,53 - 12,85 \cdot Q_4 \text{ (5)} \\ g_{\text{act}} = -11,60 - 18,31 \cdot Q_4 \\ N=25; F(1,23) = 10,15; p = 4,1 \cdot 10^{-3}; \\ F_0=0,840; F_{\text{inact}} = 1,00; F_{\text{act}} = 0,500; \\ \text{Граничные условия} \\ \text{для активных соединений} \\ Q_4 < -1,110 \end{cases}$		

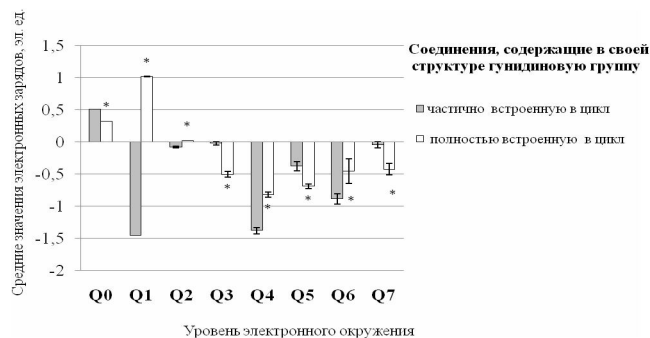
Примечание. g_{inact} — дискриминатная функция для класса неактивных соединений; g_{act} — дискриминатная функция для класса активных соединений; N — количество исследуемых соединений; F (1,23) — значение критерия Фишера для числа степеней свободы; F_0 — общая точность прогноза; F_{inact} — точность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

Таблица 2

Общий прогнозный спектр циклических гуанидинов, испытанных на NHE-1-ингибирующую активность (данные ансамблевого дискриминантного анализа)

№	Соединение	Индекс активности соединения (в исследуемой концентрации, М)			
		1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	Σ
N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола					
1	РУ-0185	2	2	0	4
2	РУ-0376	1	3	0	4
3	РУ-87	0	3	0	3
4	РУ-35	1	2	0	3
5	РУ-67	0	3	0	3
6	РУ-284	1	2	0	3
7	РУ-285	1	2	0	3
8	РУ-292	1	2	0	3
9	РУ-293	0	2	1	3
10	РУ-294	1	2	0	3
11	РУ-374	1	2	0	3
12	РУ-474	1	2	0	3
13	РУ-1205	1	2	0	3
14	РУ-64	1	1	0	2
15	РУ-17	0	2	0	2
16	РУ-66	1	1	0	2
17	РУ-273	0	2	0	2
18	РУ-1193	0	2	0	2
19	РУ-1204	0	2	0	2
20	РУ-1189	0	1	0	1
21	РУ-1191	1		0	1
2-аминобензимидазола					
22	РУ-1199	5	2	0	7
23	РУ-1200	5	2	0	7
24	РУ-1355	5	2	0	7
25	РУ-1390	5	2	0	7

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



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

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях *in silico* методом молекулярной механики и квантовой химии рассчитаны гуанидинцентрированные электронные параметры для соединений с частично (производные 2-аминобензимидазола) и полностью (производные N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола) встроенной в цикл гуанидиновой группой. Методом ансамблевого дискриминантного анализа проведена оценка зависимости NHE-1-ингибирующей активности от данных показателей.

Было выявлено, что электронные параметры второго порядка Q_2 , характеризующие ближайшее окружение атома азота гуанидинового фрагмента, оказывают статистически значимое влияние на уровень активности во всех изученных концентрациях и предположительно определяют наличие устойчивой NHE-1-ингибирующей активности. Наиболее статистически значимые результаты были получены для концентрации 1×10^{-8} М, что, скорее всего, связано с усилением роли селективных взаимодействий в формировании NHE-1-ингибирующей активности.

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

Работа частично финансировалась в рамках базовой части внутреннего гранта Южного Федерального университета (Ростов-на-Дону), тема № 213.01-2014/005.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурова Н. А., Спасов А. А., Питерсен А. С. // Вестник ВолГМУ. — 2011. — № 2 (38). — С. 70—72.
2. Спасов, А. А., Гурова Н. А., Харитонова М. В. // Экспер. и клин. фармакол. — 2013. — Т. 76, № 1. — С. 43—48.
3. Тимофеева, А. С. Фармакологические свойства производных циклических гуанидинов — ингибиторов Na^+/H^+ обмен: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Волгоград, 2015. — 24 с.
4. Kusumoto K., Igata H., Abe A., et al. // British Journal of Pharmacology. — 2002. — Vol. 135. — P. 1995—2003.
5. Orłowski J., Grinstein S. // Compr Physiol. — 2011. — Vol. 1 (4). — P. 2083—100.
6. Roskopf D., Morgenstern E., Scholz W., et al. // Journal of Hypertension. — 1991. — Vol. 9. — P. 231—238.
7. Zhang R., Lei L., et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2007. — Vol. 17. — Vol. 9. — P. 2430—2433.

Контактная информация

Васильев Павел Михайлович — старший преподаватель кафедры фармакологии, старший научный сотрудник НИИ фармакологии. Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: pvassiliev@mail.ru