

УДК 615.243.4: 616.33: 547.785.51



ПРОТИВОЯЗВЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИДАЗО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛА ПРИ ГЕЛИКОБАКТЕРОПОДОБНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

М.В. Черников, М.А. Оганова, А.С. Герасименко, Е.А. Артемьев

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
357500, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

Поиск новых лекарственных средств, обеспечивающих эффективную и безопасную терапию кислото-зависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта, продолжает оставаться актуальной проблемой современной фармакотерапии. Одним из наиболее значимых патогенетических механизмов развития данных заболеваний является, ассоциированное с *Helicobacter pylori*, повреждение слизистой оболочки желудка. **Целью** данного исследования явилось экспериментальное изучение противоязвенной активности субстанции 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола (далее субстанция, производное бензимидазола) на модели геликобактероподобного повреждения слизистой желудка в сочетании с иммобилизационным стрессом. **Материалы и методы.** Для моделирования повреждения слизистой оболочки экспериментальным животным (белые крысы-самцы линии Wistar) вводили 120 ммоль/л раствора аммиака после 24-часового иммобилизационного стресса. В качестве препаратов сравнения были выбраны официальные противоязвенные средства, широко применяемые в клинической практике: ранитидин (30 мг/кг, 10 мг/кг и 3 мг/кг) и омепразол (3 мг/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг). Изучаемое соединение использовалось в дозах 30 мг/кг, 10 мг/кг и 3 мг/кг. Максимальные дозы препаратов сравнения рассчитывались исходя из максимальной суточной дозы для человека с учетом межвидового коэффициента пересчета. Максимальная доза исследуемого вещества была подобрана экспериментально. Для удобства дальнейших расчетов значения ED_{50} был использован логарифмический диапазон доз. Все исследуемые объекты вводились внутрижелудочно с помощью атравматичного зонда. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что изучаемая субстанция достоверно относительно контрольных значений снижала площадь повреждения слизистой оболочки при моделировании геликобактероподобного повреждения, спровоцированного введением раствора аммиака на фоне ишемии слизистой желудка после 24-часовой иммобилизации. При этом, в группах животных, получавших производное бензимидазола в дозе 30 мг/кг, ингибирование образования эрозий достигло 78%, в то время как в группах, получавших ранитидин и омепразол 66% и 50% соответственно. Расчетные значения ED_{50} для изучаемой субстанции составили 16,03 мг/кг, а для ранитидина – 15,99 мг/кг. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что изучаемое производное бензимидазола превосходит аналоги по способности подавлять изъязвление слизистой желудка, спровоцированное геликобактероподобным воздействием, что подтверждает актуальность дальнейшего исследования противоязвенной активности и разработки готовой лекарственной формы на его основе.

Ключевые слова: 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазол, противоязвенное действие, геликобактероподобная язва

Для цитирования:

Черников М.В., Оганова М.А., Герасименко А.С., Артемьев Е.А.
ПРОТИВОЯЗВЕННАЯ АКТИВНОСТЬ
ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНО-
ЭТИЛИМИДАЗО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛА ПРИ
ГЕЛИКОБАКТЕРОПОДОБНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА.
Фармация и фармакология. 2018;6(4):367-379.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-367-379
© Черников М.В., Оганова М.А., Герасименко А.С.,
Артемьев Е.А., 2018

For citation:

Chernikov M.V., Oganova M.A., Gerasimenko A.S.,
Artemyev E.A.
ANTIULCER ACTIVITY OF DINITRATE
2-PHENYL-9-DIETHYLAMINOETHYL-
AMINE[1,2-A]BENZIMIDAZOLE WITH
HELICOBACTER PYLORI-LIKE DAMAGE
OF GASTRIC MUCOSA.
Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(4):367-379. (In Russ.)
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-367-379

ANTIULCER ACTIVITY OF DINITRATE 2-PHENYL-9-DIETHYLAMINOETHYLAMINE[1,2-A]BENZIMIDAZOLE WITH HELICOBACTER PYLORI-LIKE DAMAGE OF GASTRIC MUCOSA

M.V. Chernikov, M.A. Oganova, A.S. Gerasimenko, E.A. Artemyev

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

The search for new drugs providing effective and safe therapy of acid-dependent diseases of the gastrointestinal tract, continues to be an actual problem of modern pharmacotherapy. One of the most significant pathogenetic mechanisms of these diseases is associated with *Helicobacter pylori* damage to the gastric mucosa. **The aim** of this study is the experimental investigation of the antiulcer effect of 2-phenyl-9-diethylaminoethylamine [1,2-a] benzimidazole substance (hereinafter a Benzimidazole derivative substance) on the model of *Helicobacter pylori*-like gastric mucosal injury in combination with immobilization stress (a restraint). **Materials and methods.** For modeling a mucous membrane damage to experimental animals (white Wistar male rats), they were injected 120 mmol/l ammonia solution after a 24-hour immobilization stress (restraint). As reference drugs, the following official anti-ulcer drugs widely used in clinical practice, had been chosen: Rranitidine (30 mg/kg, 10 mg/kg and 3 mg/kg) and Omeprazole (3 mg/kg, 1 mg/kg and 0.3 mg/kg). The study substance was used in the doses of 30 mg/kg, 10 mg/kg and 3 mg/kg. The maximum doses of the reference drugs were calculated on the basis of maximum daily doses for humans, taking into consideration the interspecies conversion factor. The maximum dose of the substance under study was selected experimentally. The logarithmic dose range was used for the convenience of further calculations of the ED_{50} value. All the studied objects were introduced intragastrically through a non-traumatic tube. **Results and discussion.** It has been established that the studied substance significantly reduced the area of mucosal damage relative to the control values in modeling *Helicobacter pylori*-like gastric mucosal injury provoked by the administration of ammonia solution against the background of gastric mucosal ischemia after a 24-hour restraint. At the same time, the inhibition of ulceration reached 78%, while in the groups receiving Ranitidine and Omeprazole, it reached 66% and 50%, respectively. The calculated ED_{50} values were the following: for the substance under study – 16.03 mg/kg, and for Ranitidine – 15.99 mg/kg. **Conclusion.** The gained results indicate that the studied Benzimidazole derivative is superior to analogs in its ability to suppress gastric mucosal ulceration provoked by *Helicobacter pylori*-like gastric mucosal injury, which confirms the relevance of further study of anti-ulcer activity and the development of the pharmaceutical dosage form based on it.

Keywords: 2-phenyl-9-diethylaminoethylamine[1,2-a] benzimidazole, antiulcer effect, *Helicobacter pylori*-like ulcer

ВВЕДЕНИЕ. Изостерность бензимидазольного ядра с пуриновыми основаниями ДНК, а также его присутствие в структуре витамина B_{12} , обуславливает ему роль привилегированной структуры с точки зрения разработки молекул с терапевтическим свойствами [1, 2]. Спектр биологической активности производных бензимидазолов включает противовирусную [3], противогрибковую [4, 5], антимикробную [6], противораковую [7, 8], антигельминтную [9], анальгетическую и жаропонижающую [10, 11], антидиабетическую [12], антипротозойную [13], антиоксидантную [14], противоконвульсивную [5, 15], антипсихотическую [16], противоязвенную [17], противотуберкулезную [18], анестезирующую [19] и др. виды активности.

Как известно, одной из наиболее частых причин возникновения эрозивно-язвенных дефектов слизистой оболочки является грамотрицательная анаэробная палочка *Helicobacter pylori* [20]. Эта бактерия обладает уреазной активностью. Уреаза превращает мочевины в аммиак, который нейтрализует соляную кислоту, вызывая местное ощелачивание, способствующее пенетрации бактерии вглубь слизистой оболочки сквозь защитный слизистый барьер. Амми-

ак, в свою очередь, раздражает G-клетки, вырабатывающие гастрин, стимулирующий выработку соляной кислоты. Часть бактерий проникает в слизистую, разрушая межэпителиальные контакты, вызывая дистрофию и атрофию клеток за счет своей фосфолипазной активности. Разрушение защитных белковых компонентов и муцина способствует проникновению бактерий вглубь слизистой желудка, формируя язвенные дефекты. Аммиак вызывает повреждение D-клеток, вырабатывающих соматостатин. При этом выброс гастрина, регулируемый соматостатином, перестает контролироваться, что, в итоге, еще больше усиливает выработку соляной кислоты [21].

На фоне воздействия *Helicobacter pylori* в подслизистом слое формируется воспалительный инфильтрат, происходит некроз эпителия с образованием язвенного дефекта, а гастрин-опосредованная гиперсекреция соляной кислоты обеспечивает его прогрессию [22].

Одной из наиболее распространенных методик моделирования геликобактероподобных язвенных повреждений является монохлорамин-индуцированная язва, так как монохлорамин быстро распадается до аммиака, воздействие которого на

слизистую оболочку желудка служит основным патогенетическим звеном *Helicobacter pylori*, ассоциированного язвообразования. Так как *Helicobacter pylori*, как правило, вызывает развитие язвенных дефектов на фоне снижения протекторного действия слизисто-бикарбонатного барьера, наиболее часто опосредованного ишемическими состояниями, одной из методик геликобактероподобной язвы было моделирование дефектов слизистой при введении аммиака на фоне острой ишемии, вызванной снижением системного объема циркулирующей крови за счет кровопускания из сонной артерии. Данная методика позволяет достичь высокой воспроизводимости, однако сопряжена с хирургическими манипуляциями, что увеличивает трудоемкость и риск гибели животных [23, 24]. В связи с этим была предложена модификация методики моделирования геликобактероподобной язвы с использованием иммобилизационного стресса в качестве провоцирующего ишемического фактора.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Экспериментальное исследование противоязвенной активности субстанции 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо [1,2-а] бензимидазола на модели геликобактероподобного повреждения слизистой желудка в сочетании с иммобилизационным стрессом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Животные. Исследование фармакологической активности было выполнено на аутбредных крысах-самцах *Wistar* (возраст 10–12 недель) весом 180,0–250,0 г. Разброс по исходной массе животных в группе не превышал 10% [25].

Условия содержания животных соответствовали требованиям постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997) [26, 27].

Дизайн исследования. Оценка противоязвенного действия изучаемой субстанции проводилась в дозах 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг. В качестве объектов сравнения были использованы субстанции омепразола 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг (*Sigma Aldrich*, США), субстанция ранитидина 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг (*Sigma Aldrich*, США).

Максимальный объем для внутрижелудочного введения крысам не превышал 3 мл для животных массой до 200 г, 5 мл для животных от 200 до 240 г и 6 мл для животных массой более 240 г.

С целью снижения активности защитного слизисто-бикарбонатного барьера был использован иммобилизационный стресс (24 часа) с принудительным введением воды. Через 24 часа иммобилизации животным вводили раствор аммиака в концентрации 120 ммоль/л.

В ходе экспериментального исследования животные были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой. Контрольная группа получала раствор аммиака (120 ммоль/л) из расчета 1 мл на 100 г внутрижелудочно однократно. Изучаемое производное бензимидазола и препараты сравнения вводились за 1 час до введения раствора аммиака в опытных группах. Эвтаназию животных проводили через 2 часа после введения раствора аммиака.

Определяемые показатели. Для оценки тяжести повреждения при исследовании противоязвенного действия при моделировании всех патологических состояний применяли систему баллов [28].

В каждой группе подсчитывают сумму баллов, из которой выводили среднюю арифметическую величину, характеризующую среднюю степень изъязвления в группе.

Кроме того, в группе рассчитывают индекс изъязвления (ИИ). В индексе изъязвления отражены как процент частоты животных с язвами, так и степень дистрофических нарушений в желудке.

Статистическая обработка. Полученные экспериментальные данные анализировались с использованием метода вариационной статистики. В итоговых таблицах представлены средние значения по группе (M) и стандартная ошибка среднего значения (m). Межгрупповые различия анализировались с помощью непараметрического критерия – U -критерий Манна–Уитни. Различия определялись при 0,05 уровне значимости. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ «StatPlus 2009».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С целью оценки эффективности сочетания иммобилизационного стресса и воздействия раствора аммиака при моделировании эрозивно-язвенных дефектов слизистой, предварительно были проведены эксперименты по изучению влияния 24-часового иммобилизационного стресса (без воздействия раствора аммиака) и воздействия раствора аммиака без предварительной иммобилизации как независимых ulcerогенных факторов. Полученные результаты показали, что в слизистой желудка некоторых животных (20–30%) наблюдались незначительные повреждения, которыми, в целом, можно было пренебречь, как не влияющим на статистические расчеты при оценке комбинированного химического и стрессогенного воздействия.

Сочетание иммобилизационного стресса с введением раствора аммиака способствовало развитию эрозивных повреждений слизистой, площадь которых колебалась от 20 до 170 мм²/животное (рис. 1). Воспроизводимость метода составила 90–100%.

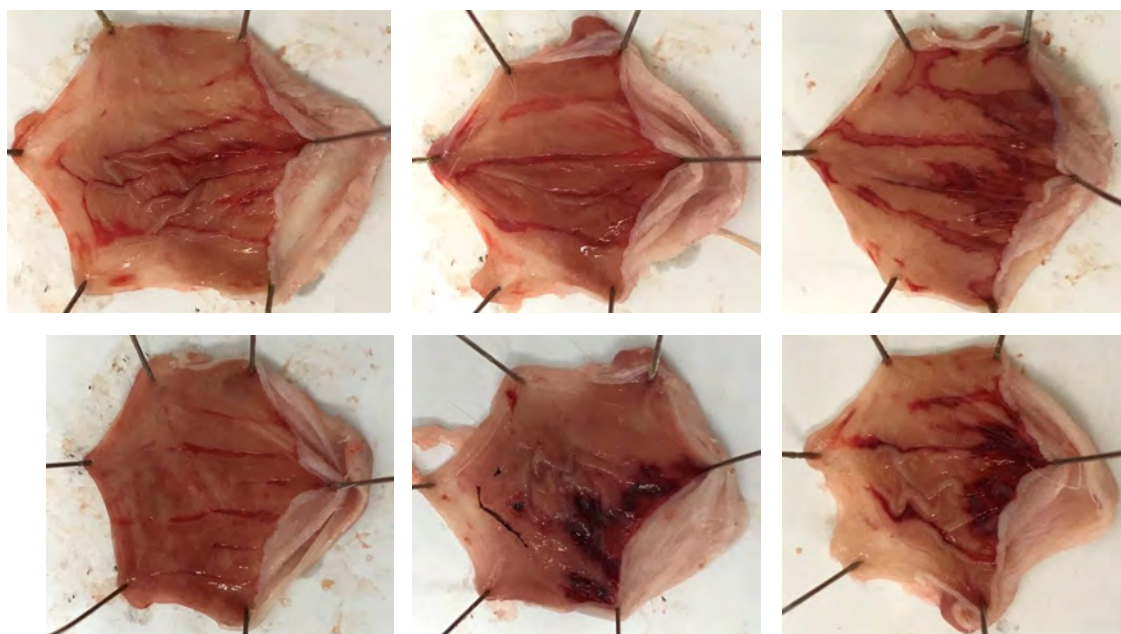


Рисунок 1 – Макрофотографии контрольной группы животных, получавших раствор аммиака 120 мл/100 г в сочетании с иммобилизационным стрессом (масштаб 1:1)

Профилактическое введение изучаемой субстанции, ранитидина и омепразола в указанных дозах способствовало снижению количества и площади образующихся эрозивных дефектов достоверно относительно контроля. Изучаемая субстанция, ранитидин и омепразол проявили дозозависимый противоязвенный эффект на данной модели патологии.

Использование даже минимальных доз изучаемой

субстанции, ранитидина и омепразола способствовало снижению площадей повреждения слизистой почти в 3 раза. Введение субстанции производного бензимидазола в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, субстанции ранитидина в дозах 1 мг/кг и омепразола в дозе 3 мг/кг омепразола способствовало снижению зон слизистой оболочки с эрозивными дефектами в 5–10 раз относительно контрольных значений (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1 – Макроскопический анализ влияния субстанции производного бензимидазола на слизистую оболочку желудка при введении раствора аммиака в сочетании с иммобилизационным стрессом (крысы-самцы), $n=10$, $M \pm m$

Вещество	Доза	Площадь эрозивного повреждения (мм ² /животное)	Процент животных с эрозивными повреждениями в группе	Степень изъязвления	Индекс изъязвления	Процент снижения индекса изъязвления (%) относительно контроля
Контрольная группа животных	Раствор аммиака 120 ммоль/л	100,3±23,5	100%	3,88±0,13	3,80	—
Производное бензимидазола	3 мг/кг	38,0±7,3*	100%	3,20±0,29*	3,20	16
Производное бензимидазола	10 мг/кг	19,95±7,6*	80%	2,60±0,50*	2,08	45
Производное бензимидазола	30 мг/кг/	15,85±6,19*	60%	1,40±0,45*	0,84	78
Ранитидин	3 мг/кг	30,3±5,9*	100%	3,00±0,33	3,00	21
Ранитидин	10 мг/кг	15,9±6,4*	80%	2,10±0,41*	1,68	56
Ранитидин	30 мг/кг	8,6±2,1*	80%	1,60±0,34*	1,28	66
Омепразол	0,3 мг/кг	44,4±10,1*	100%	3,30±0,30	3,30	13
Омепразол	1 мг/кг	25,7±8,9*	90%	2,20±0,44*	1,98	48
Омепразол	3 мг/кг	13,5±4,8*	90%	2,10±0,48*	1,89	50

Примечание: * – достоверность относительно контроля $P < 0,05$

При этом достоверных отличий между эффектами изучаемой субстанции производного бензимидазола и препаратов сравнения по показателю абсолютных значений средних площадей поражения не зафиксировано. Однако при оценке противоязвенной активности изучаемых соединений, наряду с показателями площадей эрозивного повреждения, важную роль играет частота формирования эрозий в группе животных, подвергшихся воздействию ulcerогенного фактора. Так, в груп-

пе животных, получавших производное бензимидазола в дозе 30 мг/кг, частота проявления эрозивных дефектов была на 20% ниже, чем в группах, получавших ранитидин в дозе 30 мг/кг и омепразол в дозе 3 мг/кг. В связи с этим процент снижения индекса изъязвления в группе, получавшей производное бензимидазола в дозе 30 мг/кг, составил 78%, в то время как в группах, получавших ранитидин и омепразол, ИИ был снижен на 66% и 50%, соответственно (табл. 1, рис. 2).

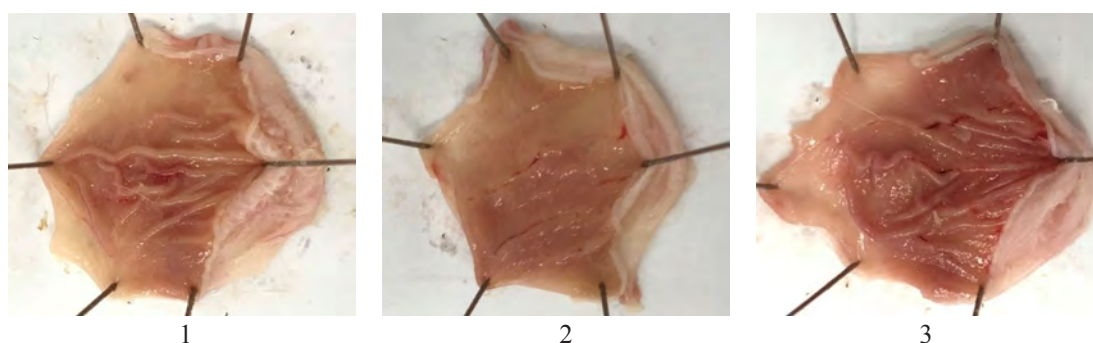


Рисунок 2 – Макрофотографии желудков крыс опытных групп при моделировании эрозий, вызванной введением раствора аммиака (120 ммоль/л) в сочетании с иммобилизационным стрессом (масштаб 1:1):
1 – Производное бензимидазола 30 мг/кг, 2 – Ранитидин 30 мг/кг, 3 – Омепразол 3 мг/кг

Основываясь на зависимости процента снижения индекса изъязвления от дозы, были произведены расчеты значений ED_{50} для производного бензимидазола и ранитидина, так как они использовались в одинаковых дозах и являются аналогами по предполагаемому

механизму действия, связанному с блокадой H_2 -гистаминовых рецепторов.

Расчетные значения ED_{50} для производного бензимидазола составили 16,03 мг/кг, а для ранитидина – 15,99 мг/кг (диаграмма 1, 2).

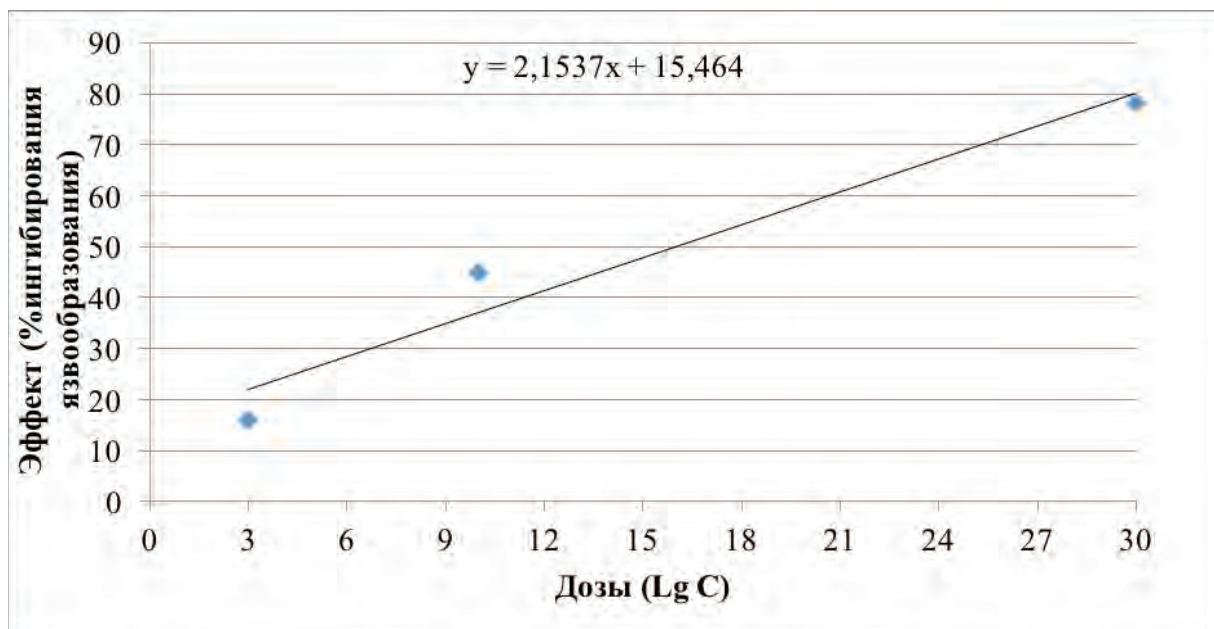


Диаграмма 1 – Расчет ED_{50} для субстанции производного бензимидазола

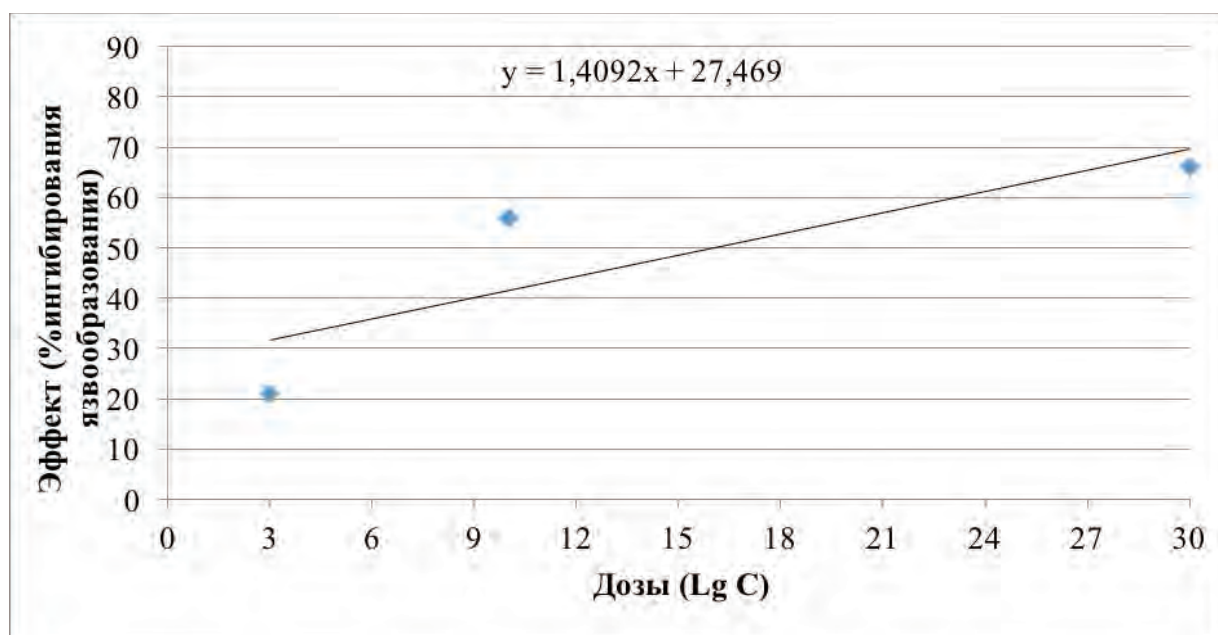


Диаграмма 2 – Расчет ED_{50} для ранитидина

Примечание: X – доза вещества, используемая в эксперименте

Y – эффект снижения индекса изъязвления (процент снижения индекса изъязвления)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Статистический анализ показал, что изучаемое производное бензимидазола способствовало достоверному относительно контроля и сходному со стандартными препаратами снижению абсолютного значения площади повреждения слизистой оболочки на геликобактероподобной модели повреждения. Однако, в группе, получавшей производное бензимидазола в дозе 30 мг/кг, частота проявления эрозивных дефектов составила 60% по сравнению с 80% и 90% в группах, получавших ранитидин и омепразол в максимальных дозах. В свя-

зи с этим процент подавления образования эрозий в группе, получавшей производное бензимидазола в дозе 30 мг/кг, составил 78%, а в группах, получавших ранитидин и омепразол 66% и 50%, соответственно.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о высокой степени противоязвенной активности нового производного бензимидазола, превосходящей антиульцерогенное действие аналогов, и перспективности дальнейшего изучения фармакологических эффектов данного соединения.

INTRODUCTION. The isosteric nature of the benzimidazole nucleus with purine DNA bases, as well as its presence in the structure of vitamin B12, determines its role as a privileged structure in terms of the development of molecules with therapeutic properties [1, 2]. The spectrum of biological activity of Benzimidazole derivatives includes antiviral [3], antifungal [4, 5], antimicrobial [6], anticancer [7, 8], anthelmintic [9], analgesic and antipyretic [10, 11], antidiabetic [12], antiprotozoic [13], antioxidant [14], anticonvulsive [5, 15], antipsychotic [16], antiulcer [17], anti-tuberculosis [18], anesthetic [19] and other types of activity.

It is known that one of the most common causes for erosive and ulcerative defects of the mucous membrane is a gram-negative anaerobic bacillus *Helicobacter pylori* [20]. This bacterium has an urease activity. Urease converts urea into ammonia, which neutralizes hydrochloric acid, causing local alkalizing, contributing to the penetration of bacteria into the interior of the mucous membrane through the protective mucous barrier. Ammonia, in its turn, irritates G-cells that produce gastrin, which stimulates the production of hydrochloric acid. Some of the bacteria penetrate the mucosa, destroying

intercellular contacts, causing degeneration and atrophy of the cells due to their phospholipase activity. The destruction of the protective protein components and mucin promotes the penetration of bacteria into the mucosa of the stomach, forming ulcers. Ammonia causes damage to D-cells which produce somatostatin. At the same time, the release of gastrin regulated by somatostatin, ceases to be controlled, which, as a result, further enhances the production of hydrochloric acid [21].

Against the background of *Helicobacter pylori* intervention, an inflammatory infiltrate is formed in the submucosal layer, epithelial necrosis occurs with the formation of an ulcer defect, and gastrin-mediated hypersecretion of hydrochloric acid ensures its progression [22].

One of the most common techniques for modeling *Helicobacter pylori*-like ulcers is a monochloramine-induced ulcer, as monochloramine rapidly decomposes to ammonia, the effect of which on the gastric mucosa is the main pathogenetic part of *Helicobacter pylori* associated ulceration. Since *Helicobacter pylori*, as a rule, causes the development of ulcerative defects against the background of reducing the protective effect of the mu-

cous-bicarbonate barrier, most often mediated by ischemic conditions, one of the techniques of *Helicobacter pylori*-like ulcer was modeling of mucosal defects by the administration of ammonia solution against the background of acute ischemia caused by a decrease of the systemic volume of circulating blood due to bleeding from the carotid artery. This technique allows to achieve high reproducibility, but is associated with surgical procedures. That increases the complexity and risk of animal death [23, 24]. In this regard, a modification of the method of modeling *Helicobacter*-like damage of the gastric mucosa using immobilization stress as a provoking ischemic factor was proposed.

THE AIM of the study is the experimental research of the antiulcer activity of 2-phenyl-9-diethylaminoethylamine [1,2-a] benzimidazole on the model of *Helicobacter*-like damage of the gastric mucosa with immobilization stress (a restraint).

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study of pharmacological activity was performed on outbred white Wistar male rats (aged 10–12 weeks) weighing 180.0–250.0 g. Variation in the initial weight of the animals in the group did not exceed 10% [27].

The conditions of keeping the animals met the requirements of the Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated 29.08.2014 №51 “On approval of SP 2.2.1.3218-14” Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivaria)”.

Manipulations with experimental animals were performed in accordance with the generally accepted ethical standards adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986) and taking into account the International recommendations of the European Convention for the protection of vertebrate animals used in experimental studies (1997) [25, 26].

Study design

Evaluation of the antiulcer action of the studied substances was carried out at the doses of 3 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg. As the reference substances, the following substances were used: Omeprazole – 0.3 mg/kg, 1 mg/kg and 3 mg/kg (Sigma Aldrich, USA), and Ranitidine – 3 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg (Sigma Aldrich, USA).

The maximum volume for intragastric administration to rats did not exceed 3.0 ml for the animals weighing up to 200 g, 5.0 ml for the animals from 200g to 240 g and 6.0 ml for the animals weighing more than 240 g.

In order to reduce the activity of the protective mucous-bicarbonate barrier, a 24-hour immobilization stress (restraint) with a forced administration of water was used. After a 24-hour restraint, the animals were injected ammonia solution at the concentration of 120 mmol/l.

During the experimental study, the animals were divided into 4 groups of 10 individuals in each. The control group received ammonia solution (120 mmol/l) at the rate of 1 ml/100g intragastrically given as a single dose. The studied benzimidazole derivative and reference drugs were administered 1 hour before the administration of ammonia solution in the experimental groups. Euthanasia of animals was performed 2 hours after the administration of ammonia solution.

Defined indicators. To assess the severity of injury in the study of anti-ulcer effects in modeling all pathological conditions, a score system was used [28].

In each group, the sum of scores was calculated, from which the arithmetic mean value characterizing the average degree of ulceration in the group was derived.

Besides, the ulcer index for each group was calculated. The ulcer index reflects both the percentage of the frequency of animals with ulcers and the degree of dystrophic disorders in their stomachs.

Statistical processing. The obtained experimental data were analyzed using the method of variation statistics. The summary tables show the group averages (M) and the standard error of the mean (m). Intergroup differences were analyzed using the nonparametric Mann – Whitney U-test. Differences were determined at 0.05 significance point. For statistical processing of the results the software package “Status 2009” was used.

RESULTS AND DISCUSSION. In order to assess the effectiveness of the combination of immobilization stress and the effects of ammonia solution in modeling erosive and ulcerative defects of the mucosa, the experiments were previously conducted to study the effect of 24-hour immobilization stress (without ammonia solution) and the effects of ammonia solution without prior immobilization as independent ulcerogenic factors. The obtained results showed that in the gastric mucosa of some animals (20–30%) a minor damage was observed, which in general could be neglected as not affecting the statistical calculations in the evaluation of the combined chemical and stressful effects. The combination of immobilization stress with the administration of ammonia solution contributed to the development of erosive mucosal damage, the area of which ranged from 20 mm² to 170 mm² / animal (Fig. 1). The within-test reproducibility was 90–100%.

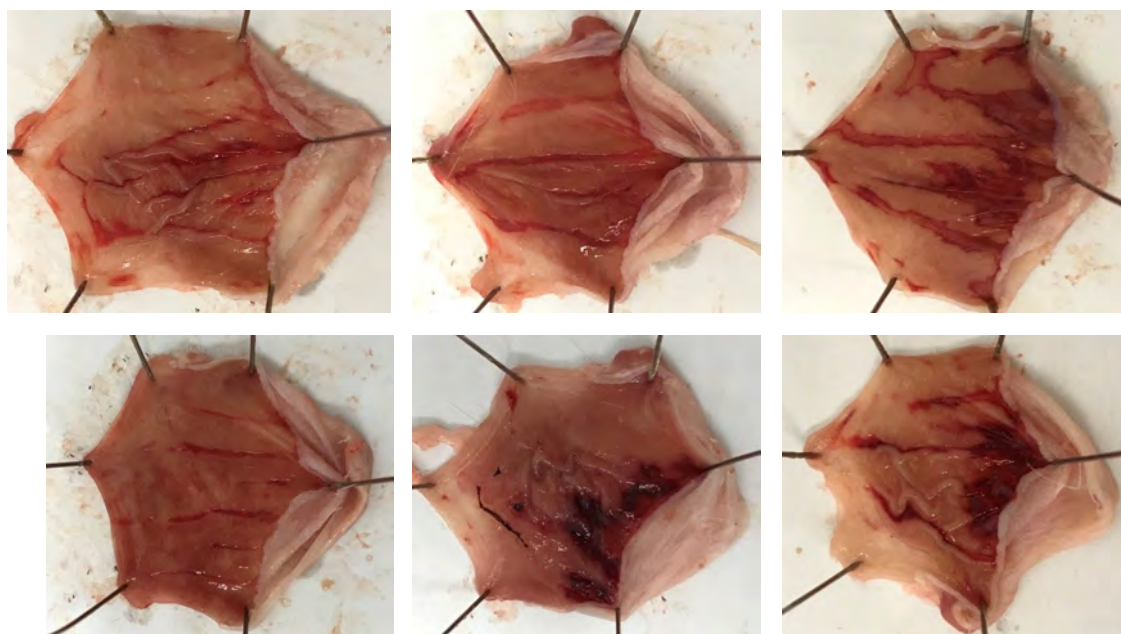


Figure 1 – Macrophotography of the control group of animals (ammonia solution 120 ml/100 g) in combination with immobilization stress (Scale 1: 1)

Prophylactic administration of the studied substance, Ranitidine and Omeprazole, in these doses contributed to the decrease in a number and area of erosive defects formed reliably relative to control. The studied substance, Ranitidine and Omeprazole, showed a dose-dependent antiulcer effect on this pathology model. The use of even minimal doses of the studied substance, Ranitidine and Omeprazole, con-

tributed to the reduction of mucosal damage areas almost 3 times.

The administration of Benzimidazole derivative at the doses of 10 mg / kg and 30 mg / kg, Ranitidine at the doses of 1 mg / kg and Omeprazole at the dose of 3 mg / kg contributed to the reduction of mucosal zones with erosive defects by 5–10 times relative to the control values (Table 1, Fig. 2).

Table 1 – Macroscopic analysis of the effect of the Benzimidazole derivative substance on the gastric mucosa with the administration of ammonia solution in combination with immobilization stress (male rats), n=10, m±m

Substance	Dose	Area of erosive damage (mm ² /animal)	Percentage of animals with erosive damage per group	Degree of ulceration	Ulcer index	Percentage of reduction of ulcer index (%) relative to the control
Control group of animals	Ammonia solution 120 mmol / l	100.3±23.5	100%	3.88±0.13	3.80	—
Benzimidazole derivative	3 mg/kg	38.0±7.3*	100%	3.20±0.29*	3.20	16
Benzimidazole derivative	10 mg/kg	19.95±7.6*	80%	2.60±0.50*	2.08	45
Benzimidazole derivative	30 mg/kg /	15.85±6.19*	60%	1.40±0.45*	0.84	78
Ranitidine	3 mg/kg	30.3±5.9*	100%	3.00±0.33	3.00	21
Ranitidine	10 mg/kg	15.9±6.4*	80%	2.10±0.41*	1.68	56
Ranitidine	30 mg/kg	8.6±2.1*	80%	1.60±0.34*	1.28	66
Omeprazole	0.3 mg/kg	44.4±10.1*	100%	3.30±0.30	3.30	13
Omeprazole	1 mg/kg	25.7±8.9*	90%	2.20±0.44*	1.98	48
Omeprazole	3 mg/kg	13.5±4.8*	90%	2.10±0.48*	1.89	50

Note: * – statistically valid differences compared to control values $p < 0.05$

At the same time, there were no statistically valid differences between the effects of the studied substance of the Benzimidazole derivative and the reference drugs in terms of the absolute values of the average lesion areas obtained. However, the frequency of formation of erosions in the group of animals exposed to ulcerogenic factor, plays an important role in assessing the antiulcer activity of the studied compounds, along with indicators of the areas of the erosive damage. Thus, in the group

of the animals treated with benzimidazole derivative at the dose of 30 mg/kg, the frequency of erosive defects was 20% lower than in the groups treated with ranitidine at the dose of 30 mg/kg and omeprazole at the dose of 3 mg/kg. In this regard, the percentage of the ulcer index reduction in the group receiving a benzimidazole derivative at the dose of 30 mg/kg was 78%, while in the groups receiving ranitidine and omeprazole, the ulcer index was reduced by 66% and 50%, respectively (Table 1, Fig. 2).

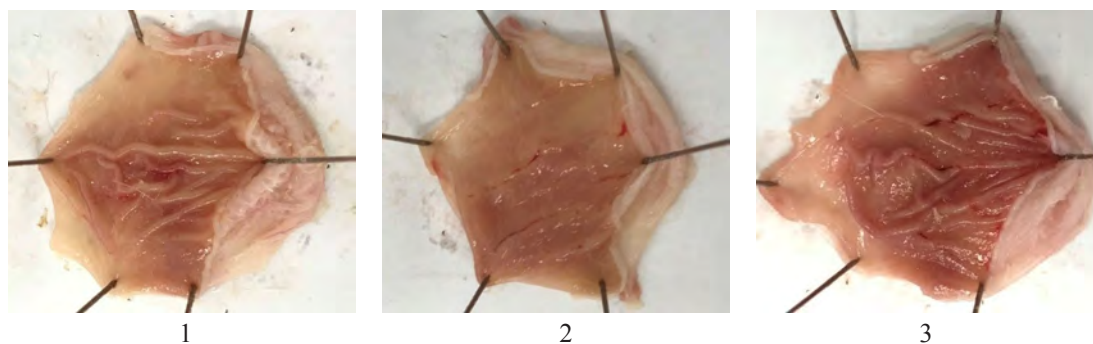


Figure 2 – Macrophotography of rats' stomachs of experimental groups with modeled ulcers caused by ammonia solution administration (120 mmol/l) in combination with immobilization stress (Scale 1: 1):

1 – 30 mg/kg of Benzimidazole derivative, 2 – 30 mg/kg of Ranitidine,

3 – 3 mg / kg of Omeprazole

The calculations of ED_{50} values for Benzimidazole derivatives and Ranitidine were made on the basis of the dependence of the reduction percentage of the ulcer index on the doses, since in the experiment they were used in the same doses and being analogs in respect of

the proposed mechanism of the action associated with the blockade of H_2 – histamine receptors.

The calculated ED_{50} values were: for the Benzimidazole derivative – 16.03 mg/kg, and for Ranitidine – 15.99 mg/kg (Fig. 1.2).

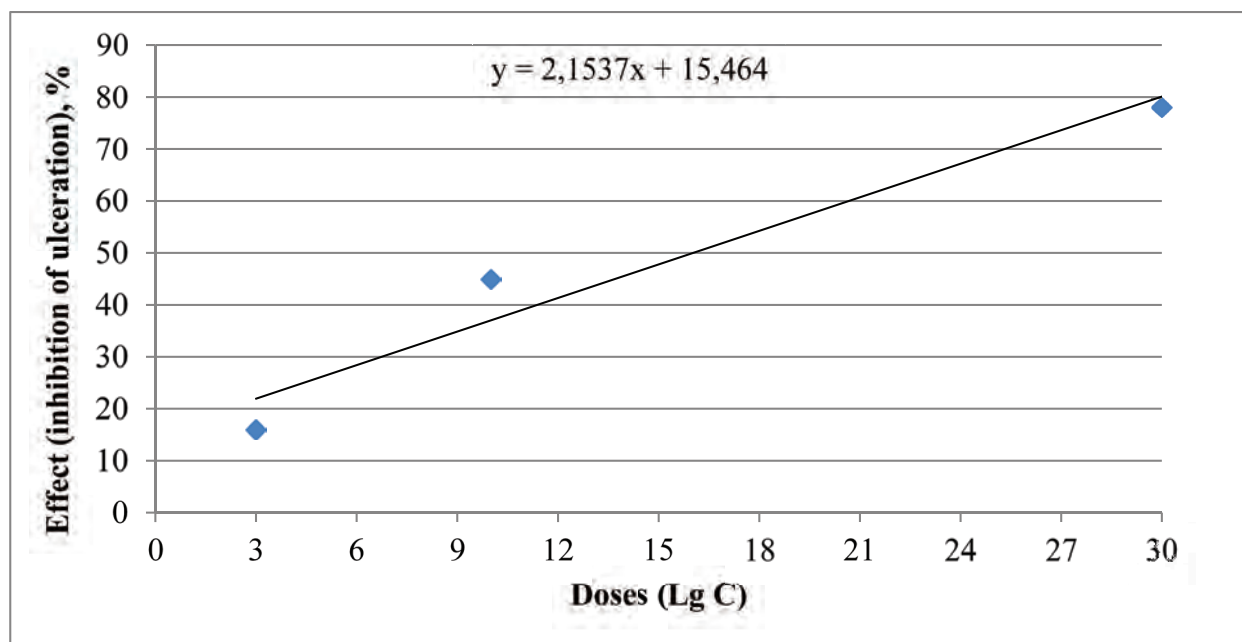


Fig. 1 – Calculation of ED_{50} for Benzimidazole derivative

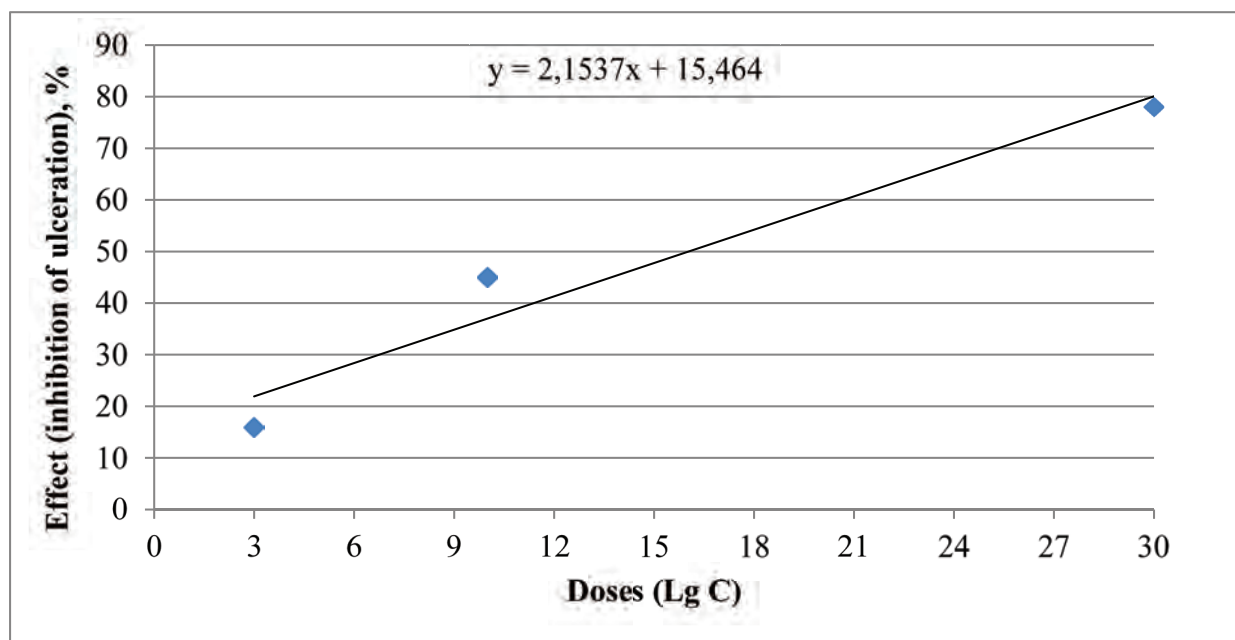


Fig. 2 – Calculation OF ED_{50} for Ranitidine

Note: X – dose of the substance used in the experiment

Y – the effect of inhibition of ulceration (percentage decrease of ulcer index)

CONCLUSION. The statistical analysis showed that the studied Benzimidazole derivative contributed to the reductions of the absolute value of the mucosal damage area on the Helicobacter-like damage model statistically significantly compared to the control group of rats and similar with to the reference drugs.

However, in the group receiving a Benzimidazole derivative at the dose of 30 mg/kg, the frequency of formation of erosive defects was 60%, compared to 80% and 90% in the groups receiving Ranitidine and Omeprazole at the maximum doses. In this regard, the

percentage of inhibiting the formation of erosions in the group receiving a Benzimidazole derivative at the dose of 30 mg/kg was 78%, and in the groups receiving Ranitidine and Omeprazole it was 66% and 50%, respectively.

The obtained results make it possible to arrive at the conclusion about a high degree of antiulcer activity of a new Benzimidazole derivative, superior to the antiulcerogenic effect of the analogs, and the evidence of the prospects for further study of the pharmacological effects of this compound.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Тема работ: «Доклинические исследования H2-гистаминоблокирующего лекарственного средства, снижающего геликобактероподобные повреждения, на основе производного бензимидазола», государственный контракт №14.N08.11.1042 от 14.11.2017.

The study was carried out in accordance with the Federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond”. The topic of work: “Preclinical studies of H2-histamine-blocking drug that reduces Helicobacter-like damage based on benzimidazole derivative”, state contract № 14.N08.11.1042 from 14.11.2017.

Библиографический список

1. Krishna Prasad P.M., Avdhut K. Potent biological agent benzimidazole—a review // Int. J. of Pharmacy and Pharm. Sciences. 2016. Vol. 8. Is. 12. P. 22–33.
2. Shah K., Chhabra S., Shrivastava S.K., Mishra P. Benzimidazole: A promising pharmacophore // Med. Chem. Research. 2013. Vol. 22. Is. 11. P. 5077–5104.
3. Abu-Bakr S.M., Bassyouni F.A., Rehim M.A. Pharmacological evaluation of benzimidazole derivatives with potential antiviral and antitumor activity // Research on Chemical Intermediates. 2012. Vol. 38. Is. 9. P. 2523–2545.
4. Lutz P. Benzimidazole and its derivatives – from fungicides to designer drugs. A new occupational and environmental hazards // Medycyna pracy. 2012. Vol. 63. Is. 4. P. 505–513.
5. Keri R.S., Rajappa C.K., Patil S.A., Nagaraja B.M. Benzimidazole-core as an antimycobacterial agent // Pharmacological Reports. 2016. Vol. 68. Is. 6. P. 1254–1265.
6. Singh N., Pandurangan A., Ranaet K. Benzimidazole: A short review of their antimicrobial activities // Int. Current Pharm. J. 2012. Vol. 1. Is. 5. P.119–127.

7. Yadav S., Narasimhan B., Kaur H. Perspectives of Benzimidazole derivatives as anticancer agents in the new era // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2016. Vol. 16. No. 11. P. 1403–1425.
8. Shrivastava N., Naim M.J., Alam Md.J. Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship // *Archiv der Pharmazie.* 2017. Vol. 350. Is. 6. P. 1–80. DOI: 10.1002/ardp.201700040
9. Furtado L.F.V., de Paiva Bello A.C.P., Rabelo É.M.L. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis // *Acta Tropica.* 2016. No. 162. P. 95–102.
10. Achar K.C.S., Hosamani K.M. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives // *Eur. J. Med. Chem.* 2010. No. 45. P. 2048–2054.
11. Gaba M., Singh S., Mohan C. Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. No. 76. P. 494–505.
12. Kim R.M., Chang J., Lins A.R. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. No. 18. P. 3701.
13. Perez-Villanueva J., Hernandez-Campos A., Yopez-Mulia L. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-{{2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl}sulfanyl}-1H-benzimidazole derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. Vol. 23. Is. 14. P. 4221–4224.
14. Ates-Alagoz Z. Antioxidant activities of retinoidal benzimidazole or indole derivatives in In vitro model systems // *Current Med. Chem.* 2013. Vol. 20. Is. 36. P. 4633–4639.
15. Vasil'ev P.M., Kalitin K.Yu., Spasov A.A. Prediction and study of anticonvulsant properties of benzimidazole derivatives // *Pharm. Chem. J.* 2017. Vol. 50. Is. 12. P. 775–780.
16. Jain Z.J., Kankate R.S., Chaudhari B.N., Kakad R.D. Action of benzimidazolo-piperazinyl derivatives on dopamine receptors // *Med. Chem. Research.* 2013. Vol. 22. Is. 2. P. 520–530.
17. Patil A., Ganguly S., Surana S. A systematic review of benzimidazole derivatives as an antiulcer agent // *Rasayan J. Chem.* 2008. Vol. 1. Is. 3. P. 447–460.
18. Sharma K., Dudhe A. A review on various heterocyclic moieties and their antitubercular activity // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2011. Vol. 65. Is. 4. P. 244–251.
19. Галенко-Ярошевский П.А., Галенко-Ярошевский А.П., Анисимова В.А., Чемоданова П.С. Производные бензимидазола: местноанестезирующие свойства, механизмы действия, перспективы использования в офтальмологии // Монография. Краснодар: Просвещение_ЮГ. 2015. 781 с.
20. *Microb Pathog.* 2018 Jun 21. pii: S0882-4010(17)31766-7.
21. Патологическая физиология: учебник: в 2 т. / ред. В.В. Новицкого, Е.Д. Гольдберга, О.И. Уразовой. 4-е изд., перераб. и доп. ГЭОТАР-Медиа, 2009. Т. 1. 848 с.
22. Маев И.В., Самсонов А.А., Голубев Н.Н. Хеликобактер-ассоциированная форма язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки: проблемы терапии // *Фарматека.* 2011. № 2. С. 10–17.
23. Спасов А.А. Пат. Лекарственная субстанция для подавления геликобактероподобных эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка / RU 2395282; № 2008136173/15; заявл. 09.09.2008; опубл. 10.04.10. URL: http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_servlet
24. Spasov A.A., Chernikov M.V., Speranskaya A.S., Zaichenko S.I. Effects of Misoprostol and Taurine on Monochloramine Ulcerogenesis in Rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2006. Vol. 141. No. 3.
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. А.Н. Миронов, Н.Д. Бунарян, А.Н. Васильев / М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
26. ГОСТ Р 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики (OECD Guide 1:1998, IDT). М.: Стандартинформ, 2015. 11 с.
27. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. N 199н "Об утверждении «Правил надлежащей лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 15 августа 2016 г. N 43232) / Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. N 37, 12.09.16
28. Adinortey M.B., Ansah C., Galyon I., Nyarko A. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer // *Ulcers.* 2013. Vol. 2013. P. 1–12. DOI: 10.1155/2013/796405

References

1. Krishna Prasad PM, Avdhut K. Potent biological agent benzimidazole—a review. *Int. J. of Pharmacy and Pharm. Sciences.* 2016;8(12):22–33.
2. Shah K, Chhabra S, Shrivastava SK, Mishra P. Benzimidazole: A promising pharmacophore. *Med. Chem. Research.* 2013;22(11):5077–104.
3. Abu-Bakr SM, Bassyouni FA, Rehim MA. Pharmacological evaluation of benzimidazole derivatives with potential antiviral and antitumor activity. *Research on Chemical Intermediates.* 2012;38(9):2523–45.
4. Lutz P. Benzimidazole and its derivatives – from fungicides to designer drugs. A new occupational and environmental hazards. *Medycyna pracy.* 2012;63(4):505–13.
5. Keri RS, Rajappa CK, Patil SA, Nagaraja BM. Benzimidazole-core as an antimycobacterial agent. *Pharmacological Reports.* 2016;68(6):1254–65.
6. Singh N, Pandurangan A, Ranaet K. Benzimidazole: A short review of their antimicrobial activities. *Int. Current Pharm. J.* 2012;1(5):119–27.
7. Yadav S, Narasimhan B, Kaur H. Perspectives of Benzimidazole derivatives as anticancer agents in the new era. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2016;16(11):1403–25.

8. Shrivastava N, Naim MJ, Alam MdJ. Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship. *Archiv der Pharmazie*. 2017;350(6):1–80. DOI: 10.1002/ardp.201700040
9. Furtado LFV, de Paiva Bello ACP, Rabelo ÉML. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Tropica*. 2016;162:95–102.
10. Achar KCS, Hosamani KM. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2010;45:2048–54.
11. Gaba M, Singh S, Mohan C. Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2014;76:494–505.
12. Kim RM, Chang J, Lins AR. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008;18:3701.
13. Perez-Villanueva J, Hernandez-Campos A, Yepez-Mulia L. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-{{[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl}-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013;23(14):4221–4.
14. Ates-Alagoz Z. Antioxidant activities of retinoidal benzimidazole or indole derivatives in In vitro model systems. *Current Med. Chem.* 2013;20(36):4633–9.
15. Vasil'ev PM, Kalitin KYu, Spasov AA. Prediction and study of anticonvulsant properties of benzimidazole derivatives. *Pharm. Chem. J.* 2017;50(12):775–80.
16. Jain ZJ, Kankate RS, Chaudhari BN, Kakad RD. Action of benzimidazolo-piperazinyl derivatives on dopamine receptors. *Med. Chem. Research*. 2013;22(2):520–30.
17. Patil A, Ganguly S, Surana S. A systematic review of benzimidazole derivatives as an antiulcer agent. *Rasayan J. Chem.* 2008;1(3):447–60.
18. Sharma K, Dudhe A. A review on various heterocyclic moieties and their antitubercular activity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2011;65(4):244–51.
19. Galenko-Yaroshevsky PA, Galenko-Yaroshevsky AP, Anisimov VA, Chemodanova PS. Proizvodnye benzimidazola: mestnoanesteziruyushchie svoystva, mekhanizmy dejstviya, perspektivy ispol'zovaniya v oftal'mologii [Derivatives of benzimidazole: local anesthetic properties, mechanisms of action, prospects for use in ophthalmology]. Monograph. Krasnodar: Prosveshchenie;2015. 781 p. Russian.
20. Microb Pathog. 2018 Jun 21. pii: S0882-4010(17)31766-7.
21. Patofiziologiya [Pathophysiology]: textbook: in 2 Vol. Novitskogo VV, Goldberg ED, Urazova OI, editors. 4th ed. I DOP. GEOTAR-Media, 2009;1:848. Russian.
22. Mayev IV, Samsonov AA, Golubev NN. Helikobakter-assotsirovannaya forma yazvennoj bolezni zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki: problemy terapii [Helicobacter-associated form of gastric ulcer and duodenal ulcer: problems of therapy]. *Pharmateca*. 2011;2:10-7. Russian.
23. Spasov AA. Pat. Lekarstvennaya substanciya dlya podavleniya gelikobakteropodobnyh erozivno-yazvennyh povrezhdenij slizistoj obolochki zheludka The drug substance for suppressing gelikobakterioza erosive-ulcerative lesions of the gastric mucosa. RU 2395282; No. 2008136173/15; Appl. 09.09.2008; publ. 10.04.10. Available from: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet Russian.
24. Spasov AA, Chernikov MV, Speranskaya AS, Zaichenko SI. Effects of Misoprostol and Taurine on Monochloramine Ulcerogenesis in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006;141(3).
25. Principy nadležhashchej laboratornoj praktiki [Russian government technical requirements R 33044-2014]. The principles of good laboratory practice. (OECD Guide 1:1998, IDT). Moscow: STANDARTINFORM, 2015. 11 p. Russian.
26. Prikaz Ministerstva zdravoohraneniya RF ot 1 aprelya 2016 g. N 199n "Ob utverzhdenii «Pravil nadležhashchej laboratornoj praktiki» [Order of the Ministry of health of the Russian Federation of April 1, 2016 N 199n "About the approval Of rules of good laboratory practice"] (Registered in the Ministry of justice of the Russian Federation on August 15, 2016 N 43232). *Bulletin of regulations of Federal Executive authorities*. N 37. 12.09.16 Russian.
27. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv [Guidelines for preclinical studies of drugs]. Part I. Mironov AN, Bunatyan ND, Vasil'ev AN, editors. Moskva: Vulture and K, 2012. 944 p. Russian.
28. Adinortey MB, Ansah C, Galyuon I, Nyarko A. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer. *Ulcers*. 2013;2013:1–12. DOI: 10.1155/2013/796405

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы

Черников Максим Валентинович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии и физиологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакология, клиническая фармакология. E-mail: pharmax@list.ru

Оганова Марина Альбертовна – кандидат фар-

Authors

Chernikov Maxim Valentinovich –PhD (Medicine), Head of the Department of Biology of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: pharmacology, clinical pharmacology. E-mail: pharmax@list.ru

Oganova Marina Albertovna – PhD (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Biology of Py-

мацевтических наук, доцент кафедры биологии и физиологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакология, клиническая фармакология. E-mail: marina-oganova81@mail.ru

Герасименко Анна Сергеевна – преподаватель кафедры патологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакология, клиническая фармакология. E-mail: ger_ann5@ro.ru

Артемьев Евгений Альбертович – аспирант кафедры биологии и физиологии, патологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакология, клиническая фармакология. E-mail: johni1001@rambler.ru

atigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: pharmacology, clinical pharmacology. E-mail: marina-oganova81@mail.ru

Gerasimenko Anna Sergeevna – lecturer of the Department of pathology of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: pharmacology, clinical pharmacology. E-mail: ger_ann5@ro.ru

Artemyev Evgeny Albertovich – post-graduate student of the Department of biology and physiology of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: pharmacology, clinical pharmacology. E-mail: johni1001@rambler.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2018
Отправлена на доработку: 03.08.2018
Принята к печати: 27.08.2018

Received: 11.07.2018
Sent back for revision: 03.08.2018
Accepted for publication: 27.08.2018
