

Садикова Наталья Владимировна

**КОРРЕКЦИЯ ПРОИЗВОДНЫМИ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ
СТРЕССОРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЕРДЦА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

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

- Научный руководитель:** **Тюренков Иван Николаевич**
член-корреспондент РАН, профессор,
доктор медицинских наук
- Научный консультант:** **Перфилова Валентина Николаевна**
доктор биологических наук
- Официальные оппоненты:** **Мирзоян Рубен Симонович**
заслуженный деятель науки РФ, профессор,
доктор медицинских наук, заведующий
лабораторией фармакологии
цереброваскулярных расстройств ФГБНУ
«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»
Покровский Михаил Владимирович
заслуженный деятель науки РФ, профессор,
доктор медицинских наук, заведующий
кафедрой фармакологии Белгородского
государственного национального
исследовательского университета
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздрава
России

Защита состоится « ____ » _____ 2016 г. в ____ часов
на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
(400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский
государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу:
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) продолжают оставаться ведущей причиной инвалидизации и смертности взрослого населения (Беленков Ю.Н. и др., 2006; De Paula J.G. et al., 2014). По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2012 году от ССЗ умерло 17,5 миллиона человек, что составило 31% всех случаев смерти в мире¹. Наиболее часто болезни сердца возникают в результате воздействия стресса, который по данным крупномасштабных международных исследований (INTERHEART) был признан третьим по значимости среди 9 независимых факторов риска развития острого коронарного синдрома (Yusuf S. et al., 2004).

Проблема стресса с годами становится все более острой в связи с ростом отрицательного влияния социальных факторов на здоровье человека, что провоцирует рост сердечно-сосудистых заболеваний (коронарная недостаточность, инфаркт миокарда, аритмии, гипертоническая болезнь, атеросклероз) (Templin C. et al., 2015; Kop W.J. et al., 2015; Lampert R., 2015; 2016; Inan B. et al., 2016; Crump C. et al., 2016; Yano Y. et al., 2016).

Известно, что длительное и интенсивное стрессорное воздействие вызывает депрессию сократительной функции, что проявляется снижением скорости сокращения и расслабления миокарда, ударного и минутного объемов, а так же ино- и хронотропных резервов сердца (Меерсон Ф.З. и др., 1988; Пшенникова М.Г., 2000; Перфилова В.Н. и др., 2007; 2009; Prasadam I. et al., 2012; Jain M. et al., 2013; Champion S. et al., 2015; Cohen R. et al., 2016; Fontes M.A. et al., 2016).

Степень патогенного воздействия при развитии стресс-реакции во многом определяется состоянием NO- и ГАМК-ергической стресс-лимитирующих систем, способных оказывать ограничивающее влияние при действии стрессорного фактора на центральном и периферическом уровнях (Малышев И.Ю. и др., 2000; Манухина Е.Б. и др., 2000; Vaiva G. et al., 2004; Gulati K. et al., 2006).

С возрастом в сердечно-сосудистой системе (ССС) происходят морфофункциональные изменения, вызывающие снижение функциональных резервов сердца и развитие сердечной недостаточности. Физиологические изменения ССС, возникающие при старении, приводят к снижению способности миокарда оптимально реагировать на повреждающие стрессорные воздействия (Khan M. et al., 2012; Kwak H.B., 2013; Zhang Y. et al., 2014; Ikeda Y. et al., 2014).

В связи с вышеизложенным является актуальным поиск и создание новых эффективных кардиопротекторных лекарственных препаратов, способных активировать стресс-лимитирующие системы, ограничивать последствия стрессорного воздействия у пациентов разного возраста за счет влияния на его патогенетические звенья.

В качестве таких веществ можно рассматривать глутаминовую кислоту (ГК) и ее производные, так как в многочисленных экспериментальных и

¹Сердечно-сосудистые заболевания. Информационный бюллетень ВОЗ. - № 317. - Январь 2015г.

клинических исследованиях показано наличие у них кардиопротекторных, противоаритмических, противофибрилляторных, антигипоксических свойств, а также способности ограничивать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повышать активность антиоксидантных ферментов (Удинцев Н.А. и др., 1984; Калинина Е.В. и др., 2003, 2007; Филатова Н.М. и др., 2009; 2012; Блинов Д.С. и др., 2012; Игнатов Ю.Д. и др., 2012; Багметова В.В. и др., 2012; Гогина Е.Д. и др., 2012; Максимова Л.Н. и др., 2013; Крыжановский С.А. и др., 2013).

Степень разработанности проблемы

Повреждение сердца при длительном стрессорном воздействии и поиск эффективных способов его ограничения и предупреждения является в последние десятилетия предметом комплексных физиологических, биохимических, цитологических и фармакологических исследований (Перфилова В.Н. и др., 2007; 2009; Прохоренко И.О. и др., 2011; Крыжановский Г.Н., 2011; Хугаева В.К. и др., 2012; Prasadam I. et al., 2012). В качестве потенциальных стресс- и кардиопротекторов рассматриваются производные нейроактивных аминокислот. Стресс-реакция, вызванная различными факторами, сопряжена с активацией ГАМК-ергической стресс-лимитирующей системы в головном мозге и, в первую очередь, с повышением интенсивности биосинтеза ГАМК в 2-3 раза, ингибиторным влиянием ее на секрецию «гормонов и медиаторов стресса» - кортикотропин-рилизинг-фактора, адренкортикотропного гормона, вазопрессина и катехоламинов (Carrasco G.A. et al., 2003; Verkuyl J.M. et al., 2005; Blacktop J.M. et al., 2016; Goddard A.W., 2016; Partridge J.G. et al., 2016). Известно, что один из метаболитов ГАМК-ергической системы - γ -оксимасляная кислота - подавляет стресс-реакцию, способствует снижению концентрации кортикостерона и катехоламинов в надпочечниках, плазме крови и миокарде (Меерсон Ф.З., 1984). Вальпроевая кислота – ингибитор ГАМК-трансферазы – ограничивает развитие окислительного стресса в сердце. Фенибут и его производное цитрокард (цитрат фенибута) ингибируют процессы ПОЛ, повышают функциональные резервы сердца в постстрессорный период (Тюренков И.Н. и др., 1981).

Глутаминовая кислота является предшественником ГАМК, обладает способностью поддерживать при операционном стрессе сократительную функцию миокарда в раннем послеоперационном периоде при операциях на сердце, снижать степень миокардиальной контрактуры и защищать сердце от реперфузионных повреждений, улучшать коронарное кровообращение (Шмерельсон М.Б. и др., 1990). У ГК и ее производных выявлены антигипоксические и антиоксидантные свойства (Удинцев Н.А. и др., 1984; Макарова Л.М. и др., 2013). Вместе с тем, взаимодействие производных глутаминовой кислоты со стресс-лимитирующими системами и их кардиопротекторные эффекты в условиях стресса не изучены.

Цель исследования

Поиск веществ с кардиопротекторной активностью среди новых производных глутаминовой кислоты в условиях стрессорного повреждения миокарда и изучение некоторых аспектов механизма их действия.

Задачи исследования

1. Провести скрининг веществ с кардиопротекторным действием среди производных глутаминовой кислоты.
2. Проанализировать зависимость между химической структурой и специфической активностью исследуемых веществ.
3. Определить зависимость кардиопротекторного эффекта наиболее активного соединения от дозы, острую суточную токсичность и широту терапевтического действия.
4. Исследовать влияние нового производного глутаминовой кислоты на функциональные резервы сердца стрессированных животных в условиях блокады NO- и ГАМК-ергической систем.
5. Оценить влияние наиболее активного соединения на ино- и хронотропную функции сердца у животных разного возраста, подвергшихся острому иммобилизационно-болевному и хроническому стрессированию.
6. Изучить действие исследуемого соединения на вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия стрессированных животных.
7. Исследовать влияние на процессы ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов, мембранопротекторные и антигипоксические свойства нового производного глутаминовой кислоты у крыс в условиях стрессорного воздействия.

Научная новизна исследования

Впервые проведен целенаправленный поиск веществ с кардиопротекторным действием среди 9 новых производных глутаминовой кислоты в условиях стрессорного повреждения миокарда, проанализирована зависимость между химической структурой исследуемых веществ и их специфической активностью. Выявлено соединение под лабораторным шифром РГПУ-238, обладающее выраженной способностью ограничивать повреждающее влияние острого и хронического стрессорного воздействия на миокард, о чем свидетельствует его способность повышать функциональные резервы сердца у животных разных возрастных групп и модулировать NO-ергическую систему и ГАМК_A-рецепторы. Впервые изучены некоторые аспекты механизма действия исследуемого вещества в условиях стресса, показано влияние его на вазодилатирующую и антитромботическую функции эндотелия животных, на процессы ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в сердце, мембранопротекторные и антигипоксические свойства.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты выявленных закономерностей между кардиопротекторным действием новых производных глутаминовой кислоты и их химической структурой могут служить основой для направленного синтеза, дальнейшего поиска и разработки высокоактивных и малотоксичных веществ со стресс- и кардиопротекторной активностью. Способность соединения РГПУ-238 ограничивать негативное влияние острого и хронического стресса на миокард у животных разных возрастных групп свидетельствует о возможности и

перспективности разработки на его основе лекарственного препарата для предупреждения стрессорных повреждений миокарда.

Методология и методы исследования

В проведенном исследовании использовался комплексный подход по изучению кардиопротекторных свойств новых производных глутаминовой кислоты в условиях стрессорного повреждения миокарда. Оценка влияния соединения РГПУ-238 на функциональные резервы сердца проводилась при блокаде стресс-лимитирующих систем, а также у разных возрастных групп с использованием моделей острого и хронического стрессирования.

Дизайн исследования соответствовал международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

В качестве теоретической и методологической основы использовались методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, с применением рекомендованных методов статистической обработки данных.

Реализация результатов

Результаты проведенного исследования включены в материалы лекций и практических занятий для студентов на кафедрах фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, Ростовского государственного медицинского университета, Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко, Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ВолгГМУ, для интернов и фармацевтических специалистов, проходящих последипломное усовершенствование на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ. Методические подходы к поиску, доклиническому фармакологическому изучению веществ с кардиопротекторными свойствами используются в научно-исследовательской работе кафедр фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, НИИ фармакологии ВолгГМУ, кафедре фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института.

Положения, выносимые на защиту

1. Актуален поиск высокоэффективных соединений с кардиопротекторными свойствами в ряду производных глутаминовой кислоты.
2. Соединение РГПУ-238 повышает функциональные резервы стрессированного миокарда животных и в условиях блокады NO-ергической системы и ГАМК_A-рецепторов.
3. При остром и хроническом стрессе соединение РГПУ-238 улучшает ино- и хронотропную функции сердца у крыс различного возраста, более существенно в группе старых животных.
4. Соединение РГПУ-238 нормализует вазодилатирующую и антитромботическую функции эндотелия стрессированных животных, ограничивает процессы ПОЛ, повышает активность антиоксидантных ферментов в сердце, оказывает мембранопротекторное и антигипоксическое действие.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, применением специализированного и высокотехнологичного оборудования, общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Материалы работы докладывались и обсуждались на VI съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), 70-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2012), V Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2013» (Санкт-Петербург, 2013), 72-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014, диплом II степени).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, в том числе 8 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 2 патента на изобретения.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 4 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 297 источников, из них 136 отечественных и 161 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 9 таблицами и 14 рисунками.

Личный вклад

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по изучаемой проблеме, выполнена экспериментальная часть работы, проведены статистическая обработка и описание результатов исследования. Автор принимал участие в формулировке задач, выводов и научно-практических рекомендаций. При его участии проведен подбор методов и дизайн исследования, разработаны протоколы экспериментов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен литературный обзор работ, отражающих современные представления о повреждающем действии стресса на сократимость миокарда. Показано, что основная роль ограничения стрессорных повреждений сердца принадлежит стресс-лимитирующим системам, к которым относятся ГАМК- и NO-ергическая. Рассмотрены возрастные морфофункциональные изменения в сердечно-сосудистой системе, вызывающие снижение инотропной и насосной функций сердца и обуславливающие повышение чувствительности миокарда к повреждающему действию стрессорных факторов. Проанализированы

фармакологические свойства глутаминовой кислоты и ее производных, позволяющие предположить наличие у них кардиопротекторных свойств.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследований, использовавшихся при выполнении поставленных в диссертации задач. В работе были изучены производные глутаминовой кислоты и их композиции с органическими кислотами, синтезированные на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И.Герцена (г. Санкт-Петербург, Россия)². Исследования проводили на 433 нелинейных крысах и 68 белых мышах. Животные были получены из питомника «Столбовая» РАМН, Московская обл. и ФГПУ «Рапполово» РАМН (Ленинградская область), содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 1000.4-96), а также приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики», в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием животных (Zutphen L.F. et al., 1993). Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук и международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Эксперименты были одобрены комитетом по этической экспертизе доклинических исследований ВолгГМУ (протокол № 132-2011 от 09 марта 2011 года).

В работе использовались модели острого и хронического стрессорного воздействия. Острый иммобилизационно-болевого стресс моделировался путем подвешивания крыс за дорсальную шейную кожную складку зажимом Кохера на 24 часа (Ковалев Г.В. и др., 1983). Хроническое стрессирование осуществлялось в течение 7 дней (ежедневно по 30 минут) в специальной установке (6 изолированных отсеков одинакового объема) со сменой разномодальных стрессорных раздражителей (пульсирующий свет, громкий звук и вибрация) каждые 5 минут по стахостической схеме (Тюренков И.Н. и др., 2013). Инотропные резервы сердца определяли с использованием нагрузочных проб: нагрузки объемом (быстрое внутривенное введение животным физиологического раствора из расчета 0,3 мл/на 100 г массы); пробы на адренореактивность (внутривенное введение адреналина в разведении 10^{-7} г/мл из расчета 0,1 мл/100 г массы животного); максимальной изометрической нагрузки (пережатие восходящей части дуги аорты в течение 30 с) (Тюренков И.Н. и др., 1981; Спасов А.А. и др., 2006; Перфилова В.Н., 2009).

Животным предварительно проводили следующую оперативную подготовку: после наркотизации (хлоралгидрат, 400 мг/кг в/бр), интубации трахеи и перевода на искусственную вентиляцию легких в четвертом межреберье

² Выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой органической химии РГПУ им.А.И.Герцена, д.х.н., проф. Берестовицкой В.М., к.х.н., доц. Васильевой О.С. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

осуществляли торакотомию, затем перикардотомию. Через верхушку сердца в полость левого желудочка вводили катетер и посредством компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы ВЕАТ (Россия, Москва) регистрировали показатели кардиогемодинамики: максимальную скорость сокращения (+dP/dt max, мм рт.ст/сек), максимальную скорость расслабления миокарда (-dP/dt max, мм рт.ст/сек), левожелудочковое давление (ЛЖД, мм рт.ст.), частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин). Максимальная интенсивность функционирования структур (МИФС) определялась расчетным способом ((ЛЖД ср x ЧССср)/(масса левого желудочка+1/3 межжелудочковой перегородки)) (мм рт.ст./мг*мин).

Скрининг веществ с кардиопротекторным действием среди производных ГК был проведен на модели острого стресса. Все изучаемые соединения вводили внутривенно (в/вр) в дозах 1/10 от молекулярной массы за 10 минут до и через 10 минут после стрессирования. В качестве препарата сравнения использовали фенибут (25 мг/кг) (синтезирован на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И.Герцена, г. Санкт-Петербург, Россия), которая согласно проведенным ранее исследованиям является наиболее эффективной (Перфилова В.Н. и др., 2006; Самотруева М.А. и др., 2008; Молодавкин Г.М. и др., 2009). Острую токсичность определяли на мышцах-самцах при внутривенном введении. LD₅₀ рассчитывали по методу Литчфилда и Уилкоксона в изложении М.Л.Беленького (1963), терапевтический индекс (ТИ) - по формуле LD₅₀/ED₅₀. Класс токсичности определяли по Н.Ф. Измерову (1977).

Изучение действия соединения РГПУ-238 в дозе 28,7 мг/кг на инотропные резервы сердца стрессированных животных в условиях блокады NO-синтаз и ГАМК_A-рецепторов осуществляли в условиях острого иммобилизационно-болевого стресса с использованием неселективного блокатора NO-синтаз - N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME, Sigma, США) (10 мг/кг, в/вр), селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы -7-нитроиндазола (Sigma, США) (50 мг/кг, в/вр), индуцибельной – аминоксантина (Sigma, США) (50 мг/кг, в/вр). В качестве блокатора ГАМК_A-рецепторов применяли бикакулин (Sigma, США) (2 мг/кг, в/вр). Препараты вводили за 10 минут до и сразу после стрессирования.

Исследование кардиопротекторного действия соединения РГПУ-238 в дозе 28,7 мг/кг у стрессированных животных разных возрастных групп (6, 12 и 24 месяца) проводили на модели острого (вещество вводили в/вр за 10 минут до и после стресса) и хронического стрессирования (вещество вводили в дозе 28,7 мг/кг перорально 1 раз в день за 30 мин до стрессирования в течение недели).

Влияние соединения РГПУ-238 на вазодилатирующую функцию эндотелия изучали в условиях хронического стрессорного воздействия по изменению кровотока в проекции среднемозговой артерии при модификации синтеза эндогенного NO внутривенным введением анализаторов – ацетилхолина (АЦХ) (0,01 мг/кг, Acros organics, США); и нитро-L-аргинина - блокатора синтеза NO (10

мг/кг, Acros organics, США) с использованием метода высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К», г. Санкт-Петербург) (Тюренков И.Н. и др., 2007). Эндотелийнезависимую вазодилатацию регистрировали после внутривенного введения нитроглицерина (0,007 мг/кг, МТХ, Москва).

Исследование действия соединения РГПУ-238 на тромботическую функцию эндотелия проводили на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов НПФ «Биола» (модель 220 LA) (г. Москва, Россия) по методу Born G. в модификации Габбасова З.А. и соавт. (1989).

Показатели системы гемостаза определяли на программируемом оптико-механическом коагулометре - Миналаб 701 (Россия) с использованием наборов для определения протромбинового времени, тромбин-теста, фибриноген-теста, активированного частичного тромбопластинового времени (производство НПО РЕНАМ, Россия) (Габбасов З.А. и др., 1989). Забор крови производили из брюшного отдела аорты. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1.

Оценку мембранопротекторных свойств соединений осуществляли с использованием моделей кислотного и осмотического гемолиза. Исследование кислотной резистентности эритроцитов проводили на лазерном анализаторе агрегации «Биола» с использованием методики Терского И.А. и Гительсона И.И. (1961). Осмотическую резистентность эритроцитов определяли по концентрации экстрацеллюлярного гемоглобина согласно методике Katoh M. (2001) с использованием спектрофотометра ПЭ-5400В Экрос (Россия).

Противогипоксические свойства соединений изучали на мышцах-самцах с использованием модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (Торкунов П.А. и др., 2000; Воронина Т.А. и др., 2000; Хабриев Р.У., 2005; Миронов А.Н., 2012).

Измерение концентрации продуктов ПОЛ диеновых конъюгатов и diketонов определяли в митохондриальной фракции сердца по методу Ушкаловой В.Н. и соавт. (1993), МДА - по методу И.Д. Стальной (1977) на спектрофотометре Helios (Великобритания). Активность супероксиддисмутазы оценивали по методу В.А. Костюка (1990), каталазы – Королюка М.А. и др., (1988), глутатионпероксидазы - по убыли восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (Моин В.М., 1986).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ «Statistika 10». В работе использовались параметрические и непараметрические методы, с учетом предварительной проверки выборок на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления различий между выборками применяли t-критерий Стьюдента для парных сравнений и с поправкой Бонферрони – для множественных, критерии Краскела-Уоллиса с пост-хок тестом Данна, Манна-Уитни для множественных сравнений. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

В третьей главе представлены результаты поиска веществ с кардиопротекторным действием среди 9 новых производных глутаминовой кислоты на модели острого иммобилизационно-болевого 24-х часового стрессирования. Исследуемый эффект был выявлен у соединения РГПУ-135 (гидрохлорид 3-фенилглутаминовой кислоты), РГПУ-238 (диметиловый эфир 3-фенилглутаминовой кислоты), а также у композиций 3-фенилглутаминовой кислоты с лимонной (соединение РГПУ-222) и янтарной (соединение РГПУ-223) кислотами. Соединения РГПУ-239 (диэтиловый эфир 3-фенилглутаминовой кислоты), РГПУ-240 (диметиловый эфир гидрохлорида 3-(4-хлорфенил)-глутаминовой кислоты), РГПУ-241 (диметиловый эфир гидрохлорида 3-(пиридил-3)-глутаминовой кислоты) обладали менее выраженной специфической активностью у стрессированных животных, а композиции 3-фенилглутаминовой кислоты с яблочной (соединение РГПУ-233) и салициловой (соединение РГПУ-234) практически не влияли на функциональные резервы сердца. Таким образом, наиболее выраженный прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и МИФС относительно исходных значений при проведении нагрузочных проб наблюдался у соединения РГПУ-238, которое было использовано для дальнейшего исследования.

При изучении зависимости «доза-эффект» соединения РГПУ-238 на животных, подвергшихся острому иммобилизационно-болевому стрессированию, выявлено, что наибольший прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД, ЧСС и МИФС по отношению к исходным данным в условиях проведения функциональных проб наблюдался при введении исследуемого вещества в дозе 28,7 мг/кг, которая была выбрана для дальнейшего исследования (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние различных доз соединения РГПУ-238 на прирост скорости сокращения (+dP/dt max), скорости расслабления миокарда (-dP/dt max), левожелудочкового давления (ЛЖД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и максимальной интенсивности функционирования структур (МИФС) у стрессированных животных при проведении нагрузочных проб (M±m).

Группы животных (n=6)	Проба на адренореактивность, прирост показателей в %			
	+dP/dt max	-dP/dt max	ЛЖД	ЧСС
Интактная	61,4±9,2	45,1±7,6	62,4±9,6	20,8±8,8
Стресс+физ. р-р (контрольная)	25,1±4,1*	37,5±4,0	32,7±8,1*	25,0±6,7
Стресс+РГПУ-238 14,5 мг/кг	38,0±7,3	34,4±7,3	49,3±7,8	18,9±7,2
Стресс+РГПУ-238 28,7 мг/кг	54,3±4,5 [#]	64,2±10,3 [#]	70,1±9,2 [#]	39,8±4,8
Стресс+РГПУ-238 57,4 мг/кг	50,0±8,5	49,5±6,9	54,8±9,7 [#]	29,2±9,0

Максимальная изометрическая нагрузка, прирост показателей в %								
Группы животных (n=6)	+dP/dt max		-dP/dt max		ЛЖД		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная	59,4±7,2	41,6±7,0	52,2±8,7	31,2±5,8	64,4±7,0	42,9±9,0	104,1±16,1	61,3±17,2
Стресс+физ. р-р (контрольная)	35,2±7,9	14,4±8,2*	39,6±9,3	13,3±8,3*	24,3±2,9*	5,4±4,9*	53,8±10,6*	12,9±7,1*
Стресс+РГПУ-238 14,5 мг/кг	54,6±9,1	32,3±9,7	49,4±8,5	29,2±9,6	71,5±7,5#	55,4±6,2#	114,0±22,8	75,0±19,1
Стресс+РГПУ-238 28,7 мг/кг	63,2±8,2	39,6±4,6#	60,8±6,5#	33,9±5,0#	111,7±7,1#	92,9±6,4#	208,5±25,6#	154,8±22,3#
Стресс+РГПУ-238 57,4 мг/кг	60,7±5,8	39,5±5,5#	57,7±9,9#	36,6±9,8	105,5±13,2#	82,3±12,9#	185,2±29,1#	129,8±23,7#

Примечание:

* - изменения достоверны относительно интактной группы;

- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ с использованием U-критерия Манна–Уитни.

При изучении острой токсичности на мышах установлено, что при внутрибрюшинном введении соединения РГПУ-238 ЛД₅₀ равна 1619,8 (1339,0-1959,5) мг/кг. Терапевтический индекс (ТИ) равен 56,4. Исследуемое соединение является малотоксичным веществом и соответствует 5 классу токсичности.

В четвертой главе представлены результаты изучения кардиопротекторного действия соединения РГПУ-238 в условиях блокады стресс-лимитирующих систем.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что 24-часовое иммобилизационно-болевое стрессирование приводит к снижению стрессоустойчивости крыс, была зарегистрирована гибель 3 животных, получавших физиологический раствор, из 18 после проведения нагрузки адреналином.

Подавление продукции синтеза оксида азота введением стрессированным животным неселективного блокатора NO-синтаз - L-NAME - вызывало выраженное снижение устойчивости к стрессу и хирургическому вмешательству: 8 животных из 31 погибло во время стресса, 5 животных после наркоза, 6 животных при вскрытии грудной клетки и 5 после проведения пробы на адренореактивность. В группе животных, получавших препарат сравнения фенибут и L-NAME, 6 животных из 12 погибло во время стресса и одно после проведения нагрузки адреналином. В других группах случаев гибели не наблюдалось. Исследуемое соединение повышает стрессоустойчивость животных в условиях блокады NO-ергической стресслимитирующей системы, на что указывает отсутствие случаев гибели стрессированных крыс, получавших L-NAME и более выраженный прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и ЧСС при введении адреналина и окклюзии восходящей части дуги аорты, чем у стрессированных животных при ингибировании NO-синтаз. Препарат сравнения фенибут во многих случаях уступал по эффективности исследуемому соединению (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на скорость сокращения (+dP/dt max) и расслабления миокарда (-dP/dt max), ЛЖД, ЧСС и МИФС у стрессированных животных в условиях блокады различных NO-синтаз при проведении нагрузочных проб (M±m).

Проба на адренореактивность, прирост показателей в %				
Группы животных	+dP/dt max	-dP/dt max	ЛЖД	ЧСС
Интактная (n=14)	60,4±7,7	62,6±9,6	58,9±8,1	50,9±6,9
Стресс+физ. р-р (контрольная) (n=18)	30,5±2,4 [^]	29,8±3,5 [^]	30,4±3,7 [^]	25,6±3,9 [^]
Стресс+аминогуанидин (n=6)	31,7±4,0	36,8±7,7	53,2±7,3	16,9±3,1
Стресс+аминогуанидин+РГПУ-238 (n=6)	49,5±3,3 ^{**}	58,4±6,8 ^{**}	65,8±6,0 ^{**}	32,4±2,7
Стресс+аминогуанидин+фенибут (n=6)	40,3±9,6	27,9±5,8	62,3±13,5	18,7±6,6
Стресс+7-нитроиндазол (n=6)	21,3±1,5	18,8±3,5	25,1±3,1	16,4±2,2
Стресс+7-нитроиндазол+РГПУ-238 (n=6)	35,8±3,0 [#]	33,7±4,6 [#]	42,8±3,4 [#]	17,5±2,9
Стресс+7-нитроиндазол+фенибут (n=6)	40,1±7,0	37,3±5,3	52,8±10,2	22,0±4,6
Стресс+L-NAME (n=12)	12,8±2,6 [*]	17,6±7,4	18,4±4,4	13,3±6,3
Стресс+L-NAME+РГПУ-238 (n=6)	41,1±4,7 ^{##}	40,2±5,5 ^{##}	38,1±2,1 ^{##}	31,3±4,8
Стресс+L-NAME+фенибут (n=6)	26,3±2,8	25,9±2,5	25,6±2,2	29,2±7,0
Максимальная изометрическая нагрузка, прирост показателей в %				
Группы животных	+dP/dt max		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная (n=14)	59,7±5,9	45,6±5,9	168,7±22,1	133,0±21,7
Стресс+физ. р-р (контрольная) (n=15)	42,5±4,0 [^]	21,3±3,4 [^]	98,4±7,9 [^]	45,4±4,5 [^]
Стресс+аминогуанидин (n=6)	49,7±6,2	23,7±7,6	140,6±29,7	68,9±27,7
Стресс+аминогуанидин+РГПУ-238 (n=6)	49,3±6,6	27,8±7,6	176,8±36,6	97,9±40,8
Стресс+аминогуанидин+фенибут (n=6)	39,5±13,6	22,0±10,2	120,2±27,6	77,3±25,3
Стресс+7-нитроиндазол (n=6)	42,5±5,6	5,1±2,6 [*]	95,9±9,4	40,8±8,1
Стресс+7-нитроиндазол+РГПУ-238 (n=6)	60,9±11,1	39,2±9,9 [#]	183,2±21,2	119,3±18,5
Стресс+7-нитроиндазол+фенибут (n=6)	52,3±5,7	36,4±4,3 [#]	97,3±34,6	53,9±23,3
Стресс+L-NAME (n=7)	22,4±4,7 [*]	-0,1±4,8 [*]	36,1±2,3	13,1±2,2
Стресс+L-NAME+РГПУ-238 (n=6)	32,3±1,2 ^{**}	14,5±2,8 ^{**}	147,8±16,3 ^{**}	104,5±20,9 ^{**}
Стресс+L-NAME+фенибут (n=5)	26,8±2,5	6,3±1,6	66,5±1,2	16,4±2,8

Примечание:

[^] - изменения достоверны относительно интактной группы;

^{*} - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных;

^{**} - изменения достоверны относительно группы стрессированных животных, получавших аминогуанидин;

[#] - изменения достоверны относительно группы стрессированных животных, получавших 7-нитроиндазол;

^{##} - изменения достоверны относительно группы стрессированных животных, получавших L-NAME, при p<0,05 (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

Введение соединения РГПУ-238 стрессированному животному в условиях блокады ГАМК_A-рецепторов вызывало достоверное увеличение прироста скорости сокращения, расслабления миокарда, ЛЖД и МИФС при проведении нагрузочных проб по сравнению с показателями контрольной группы животных (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на скорость сокращения (+dP/dt max) и расслабления миокарда (-dP/dt max), ЛЖД, ЧСС и МИФС у стрессированных животных в условиях блокады ГАМКА-рецепторов при проведении нагрузочных проб (M±m).

Группы животных	Проба на адренореактивность, %			
	+dP/dt max	-dP/dt max	ЛЖД	ЧСС
Интактная (n=14)	60,4±7,7	62,6±9,6	58,9±8,1	50,9±6,9
Стресс+физ. р-р (n=18)	30,5±2,4 [^]	29,8±3,5 [^]	30,4±3,7 [^]	25,6±3,9 [^]
Стресс+бикукулин (n=6)	20,7±5,6	19,5±5,3	23,1±4,5	29,0±5,5
Стресс+бикукулин+РГПУ-238 (n=6)	72,9±8,6 [#]	62,1±9,3 [#]	62,2±9,0	31,7±2,8
Стресс+бикукулин+фенибут (n=6)	54,4±5,2 [#]	63,5±6,7 [#]	53,8±4,6	51,6±9,4
Максимальная изометрическая нагрузка, %				
Группы животных	ЛЖД		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная (n=14)	95,5±12,2	80,5±12,7	168,7±22,1	133,0±21,7
Стресс+физ. р-р (n=15)	60,6±4,5	37,8±5,2 [^]	98,4±7,9 [^]	45,4±4,5 [^]
Стресс+бикукулин (n=6)	56,3±5,8	30,6±7,5	88,4±21,5	38,3±17,6
Стресс+бикукулин+РГПУ-238 (n=6)	149,1±28,7	134,8±27,1 [#]	244,9±52,4	187,3±37,6 [#]
Стресс+бикукулин+фенибут (n=6)	85,4±7,1	72,1±5,6	154,3±9,9	110,3±11,8

Примечание:

[^] - изменения достоверны относительно интактной группы;

[#] - изменения достоверны относительно группы стрессированных животных, получавших бикукулин, при p<0,05 (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

В пятой главе изучалась оценка кардиопротекторного действия соединения РГПУ-238 у животных разных возрастных групп в условиях острого и хронического стрессирования.

Обнаружено зависимое от возраста снижение инотропной функции сердца у интактных животных, что доказывала статистически значимая разница прироста показателей у 24-х месячных самок по сравнению с крысами в возрасте 6-ти и 12-ти месяцев при проведении нагрузочных тестов. В группах животных, подвергшихся 24-х часовому иммобилизационно-болевному стрессированию, был выявлен меньший прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД, МИФС и ЧСС в ответ на нагрузки по сравнению с таковыми интактных крыс, особенно низкие показатели отмечались у крыс в возрасте 24-х месяцев. В группах стрессированных животных всех возрастов, получавших соединение РГПУ-238, при проведении нагрузочных проб были получены более высокие показатели по сравнению с таковыми крыс контрольных групп. При этом наиболее выраженный прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и МИФС отмечался у 24-х месячных животных по сравнению с 6-ти и 12-ти месячными. Препарат сравнения фенибут улучшал исследуемые показатели в равной степени у всех возрастных групп стрессированных животных (рис. 1).

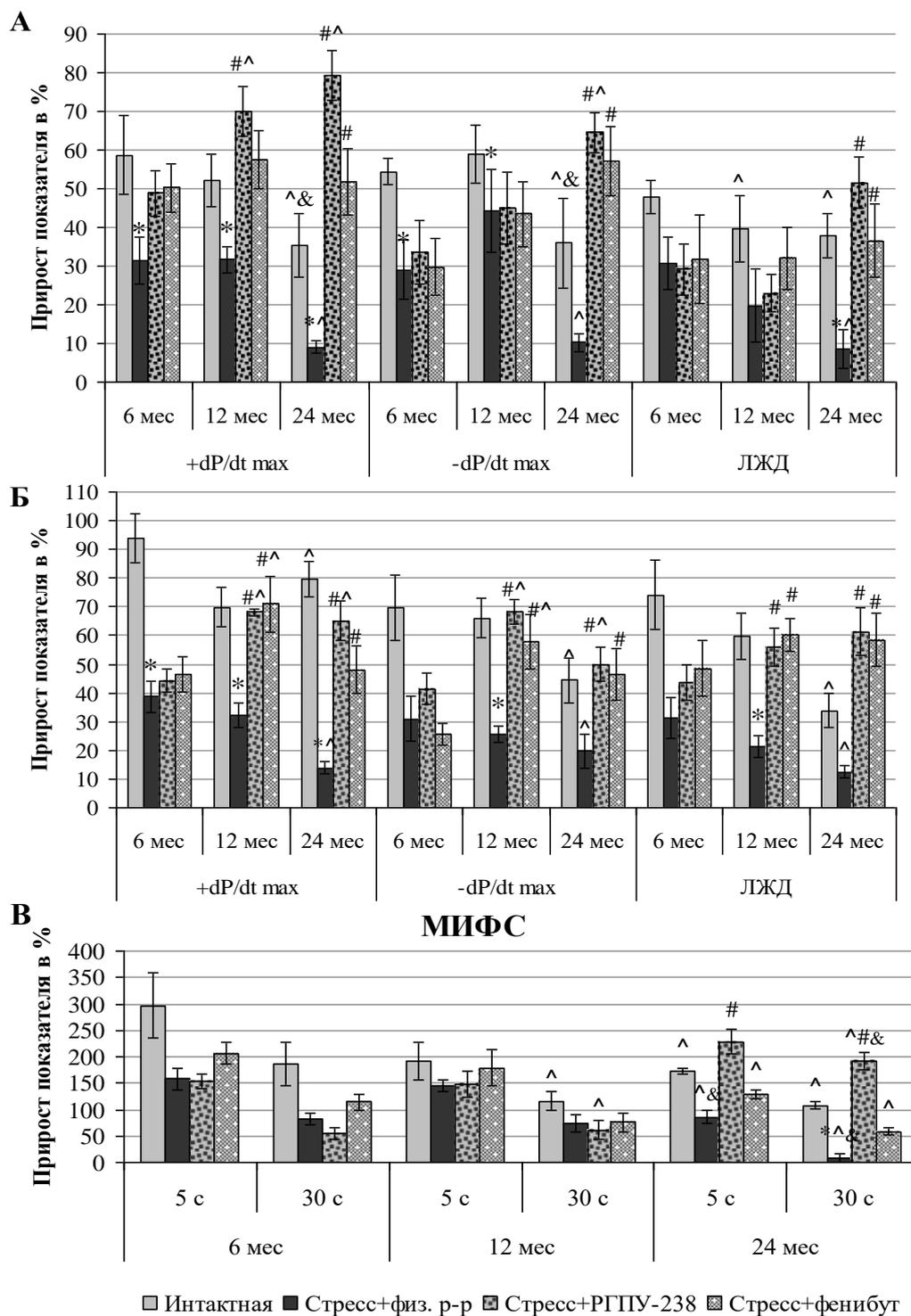


Рисунок 1. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на скорость сокращения (+dP/dt max) и расслабления миокарда (-dP/dt max), ЛЖД и МИФС у стрессированных животных разного возраста в условиях острого иммобилизационно-болевого стрессирования при проведении нагрузки объемом (А), пробы на адренореактивность (Б), изометрической нагрузки (В)

* - изменения достоверны относительно интактной группы;

- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных;

^ - изменения достоверны относительно аналогичной группы животных в возрасте 6 месяцев;

& - изменения достоверны относительно аналогичной группы животных в возрасте 12 месяцев при $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса, с пост-хоком Данна).

В условиях длительного стрессорного воздействия у животных в возрасте 12 и 24 месяцев также было обнаружено истощение функциональных резервов сердца, что проявлялось более низким приростом показателей сократимости миокарда, ЛЖД, ЧСС и МИФС при проведении нагрузочных проб по сравнению с таковыми группы интактных животных (рис. 2, табл. 4).

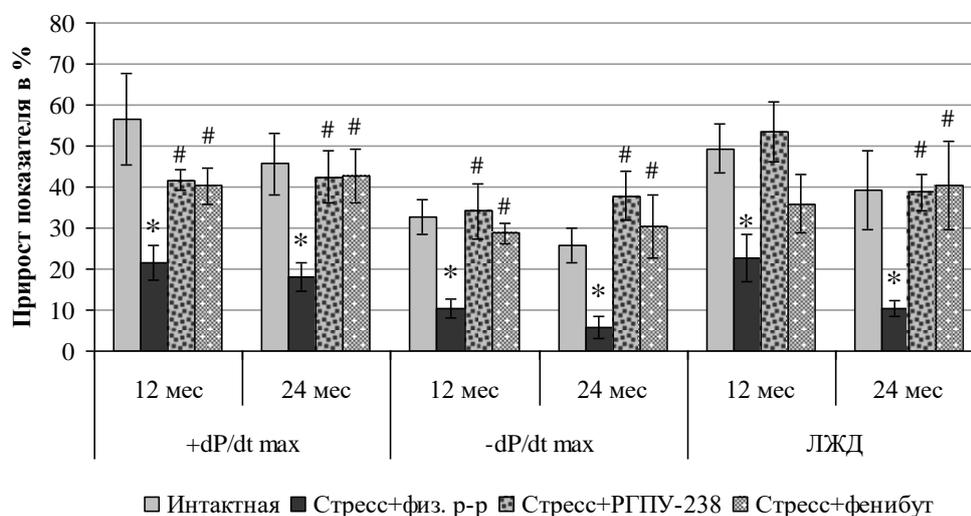


Рисунок 2. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на скорость сокращения (+dP/dt max) и расслабления миокарда (-dP/dt max) и ЛЖД у стрессированных животных разного возраста, подвергшихся хроническому стрессированию, при проведении нагрузки объемом
 * - изменения достоверны относительно интактной группы;
 # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса, с пост-хоком Данна).

Таблица 4. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на ЛЖД и МИФС у животных разного возраста, подвергшихся хроническому стрессированию, при проведении изометрической нагрузки ($M \pm m$).

Возраст 12 месяцев				
Группы животных (n=10)	ЛЖД		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная	82,3±8,1	64,3±6,3	189,6±24,6	105,9±17,3
Стресс+физ. p-r	58,0±5,6	30,3±9,4	120,8±20,0*	25,8±9,3*
Стресс+ РГПУ-238	108,7±10,0	81,3±8,2	204,0±11,9	120,2±13,0#
Стресс+ фенибут	90,4±8,7	68,0±9,3	165,6±21,3	94,9±15,4
Возраст 24 месяца				
Группы животных (n=10)	ЛЖД		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная	122,1±15,3	87,6±11,6	217,6±34,1	102,8±19,8
Стресс+физ. p-r	52,6±6,0*	20,4±7,2*	76,7±7,4*	11,3±8,9*
Стресс+ РГПУ-238	103,5±9,7#	73,3±9,5#	200,9±24,5#	89,8±14,8#
Стресс+ фенибут	90,7±10,2	67,2±7,4#	150,3±11,0	74,3±8,9#

Примечание:
 * - изменения достоверны относительно интактной группы;
 # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

Новое производное глутаминовой кислоты ограничивало стрессорное нарушение сократительной функции миокарда, о чем свидетельствовал более выраженный прирост исследуемых показателей у животных обеих возрастных групп, получавших препарат, по сравнению с таковыми крыс контрольной группы в ответ на проведение функциональных тестов. Наиболее высокий прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД, ЧСС и МИФС наблюдался в группе животных 24-х месячного возраста, что совпадало с результатами исследования на модели острого стрессирования. Препарат сравнения фенибут также повышал функциональные резервы сердца во всех исследуемых группах животных в ответ на проведение нагрузочных проб, однако, соединение РГПУ-238 превосходило его по силе кардиопротекторного действия (рис. 2, табл. 4).

В шестой главе представлены результаты изучения механизма кардиопротекторного действия соединения РГПУ-238 у стрессированных животных.

Существенную роль в патогенезе стрессорного повреждения миокарда играет повышение уровня катехоламинов, что влечет за собой образование и накопление активных форм кислорода (АФК), интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (Khanna D. et al., 2006; Bacon S.L. et al., 2006; Derian W. et al., 2007; Sawai A. et al., 2007; Lee Y.P. et al., 2008; Chen F. et al., 2009; Prasadam I. et al., 2012), под действием которых происходит повреждение целостности клеточных мембран кардиомиоцитов, нарушение работы ионных каналов клеток сердца, развитие кальциевой контрактуры и гибели клеток (Меньшикова Е.Б. и др., 2006; 2008). Повреждение эндотелиоцитов АФК может привести к эндотелиальной дисфункции, а также к снижению антитромбогенного потенциала сосудистой стенки.

При оценке антиоксидантных свойств у стрессированных животных выявлено повышенное образование первичных и вторичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов, дикетонов и МДА, а также снижение активности СОД, ГП и каталазы в митохондриях сердца по сравнению с таковыми группы интактных животных. Соединение РГПУ-238 и препарат сравнения фенибут ограничивали процессы ПОЛ, снижали концентрацию диеновых конъюгатов, дикетонов и МДА по сравнению с показателями стрессированных животных контрольной группы (рис. 3).

Введение исследуемого соединения и фенибута способствовало повышению активности антиоксидантных ферментов - СОД, ГП и каталазы (рис.4).

Выявлено достоверное увеличение продолжительности жизни в группах мышей, получавших соединение РГПУ-238 и фенибут, в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией в 1,2 раза по сравнению с показателями животных контрольной группы, что свидетельствует о наличии у соединений антигипоксической активности.

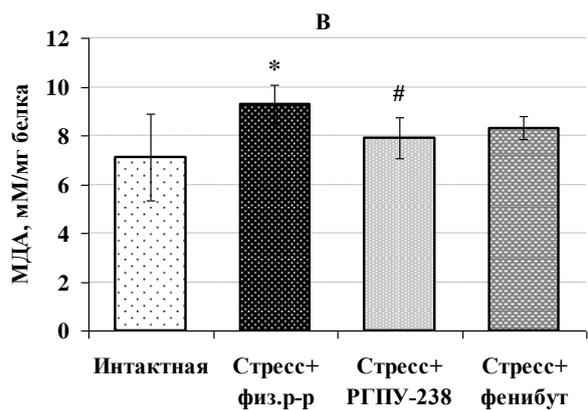
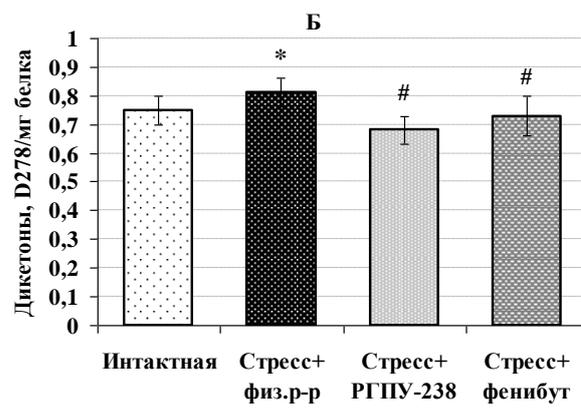
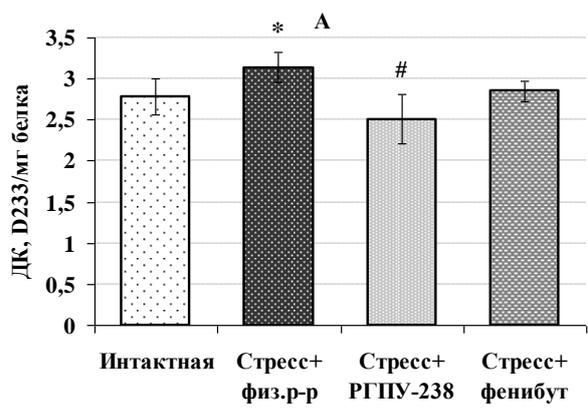


Рисунок 3. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на концентрацию диеновых конъюгатов (А), дикетонов (Б) и малонового диальдегида (В) в митохондриях сердца стрессированных животных

* - изменения достоверны относительно интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);
- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

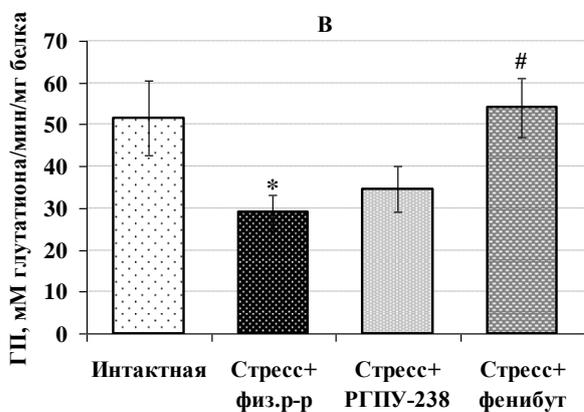
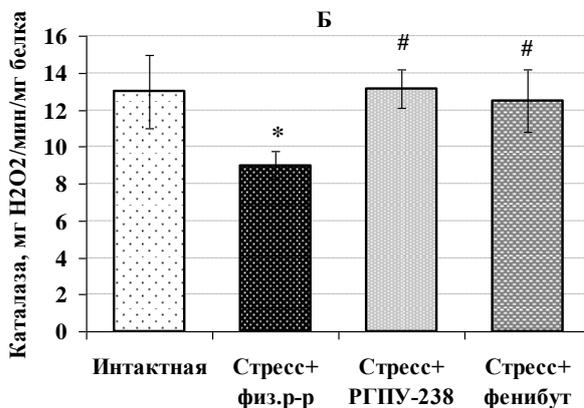
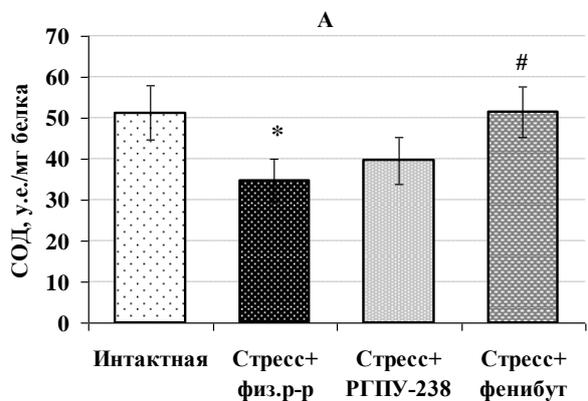


Рисунок 4. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на активность супероксиддисмутазы (А), каталазы (Б) и глутатионпероксидазы (В) в митохондриях сердца стрессированных животных

* - изменения достоверны относительно интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);
- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

При оценке эндотелиопротекторных свойств было обнаружено ослабление реакции сосудов на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина у животных после длительного стрессирования по сравнению с показателями крыс интактной группы. Соединение РГПУ-238 ограничивало нарушение функции эндотелия при хроническом стрессорном воздействии, что проявилось увеличением МК в ответ на введение АЦХ и снижением при введении нитро-L-аргинина. В группе стрессированных животных, получавших фенибут, достоверных различий с показателями, полученными в контрольной группе, отмечено не было (рис. 5, 6).

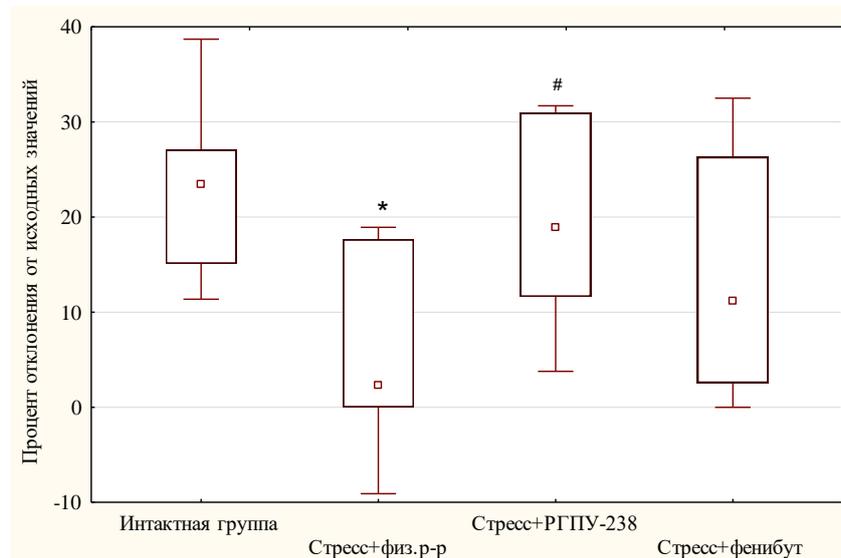


Рисунок 5. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на мозговой кровоток стрессированных животных в условиях введения ацетилхолина

* - изменения достоверны относительно интактной группы; # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

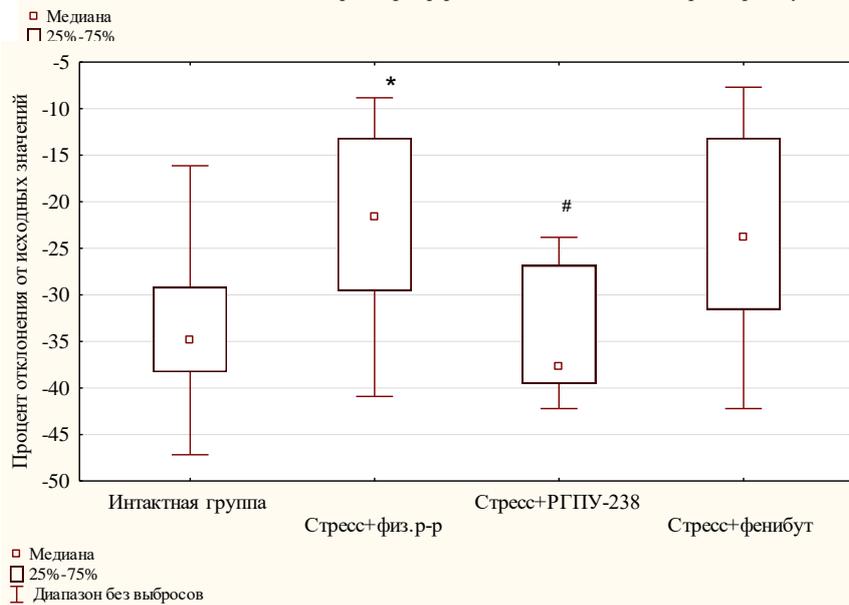


Рисунок 6. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на мозговой кровоток стрессированных животных в условиях введения нитро-L-аргинина

* - изменения достоверны относительно интактной группы; # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

Соединение РГПУ-238 не влияло на эндотелийнезависимую вазодилатацию (рис. 7).

При изучении влияния хронического стрессорного воздействия на показатели системы гемостаза были выявлены выраженные сдвиги в сторону гиперкоагуляции и гиперагрегации в плазменно-коагуляционном и сосудисто-тромбоцитарном звеньях гемостаза. Соединение РГПУ-238 и фенибут ограничивали эти процессы, что проявилось удлинением АЧТВ, ТВ, ПВ,

снижением концентрации фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с показателями контрольной группы стрессированных животных (табл. 5).

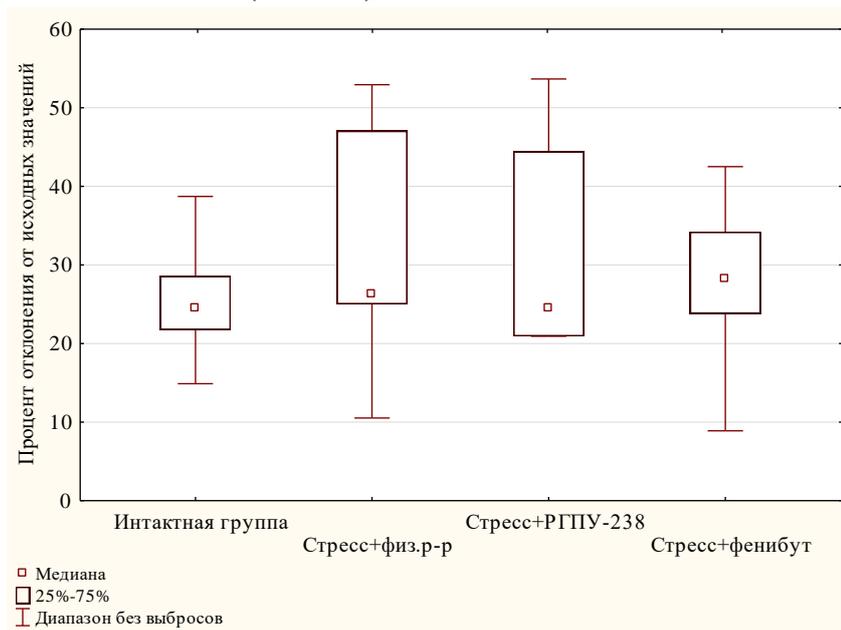


Рисунок 7. Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на мозговой кровоток стрессированных животных в условиях введения нитроглицерина

При изучении влияния хронического стрессорного воздействия на показатели системы гемостаза были выявлены выраженные сдвиги в сторону гиперкоагуляции и гиперагрегации в плазменно-коагуляционном и сосудисто-тромбоцитарном звеньях гемостаза. Соединение РГПУ-238 и фенибут ограничивали эти процессы, что проявилось удлинением АЧТВ, ТВ, ПВ, снижением концентрации фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с показателями контрольной группы стрессированных животных (табл. 5).

Таблица 5.

Влияние соединения РГПУ-238 и фенибута на показатели гемостаза стрессированных животных (M±m).

Показатели гемостаза	Группы животных (n=10)			
	Интактная	Стресс +физ. р-р	Стресс +РГПУ-238	Стресс +фенибут
АЧТВ, с	36,9±9,7	24,0±7,3*	35,7±6,8#	31,8±6,2
ПВ, с	31,4±6,2	25,3±6,2	33,3±7,5	25,4±8,3
ТВ, с	20,3±3,9	14,9±3,1*	19,6±2,9#	18,4±3,6
Фибриноген, г/л	2,9±0,5	3,7±0,1*	2,9±0,6#	3,1±0,4#
Степень агрегации, %	17,3±4,6	29,9±5,9*	21,1±2,9#	20,6±4,1#
Скорость агрегации, %/мин	22,6±4,8	40,7±8,5*	25,9±5,1#	26,9±4,1#

Примечание:

* - изменения достоверны относительно интактной группы;

- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

Выявлено, что стрессорное воздействие вызывает повреждение клеточных мембран, на что указывало снижение кислотной и осмотической резистентности

эритроцитов в группах стрессированных животных по сравнению с интактными. Установлено, что соединение РГПУ-238 и препарат сравнения фенибут обладают мембранопротекторными свойствами, о чем свидетельствовало повышение устойчивости мембран эритроцитов к действию повреждающих агентов (рис. 8).

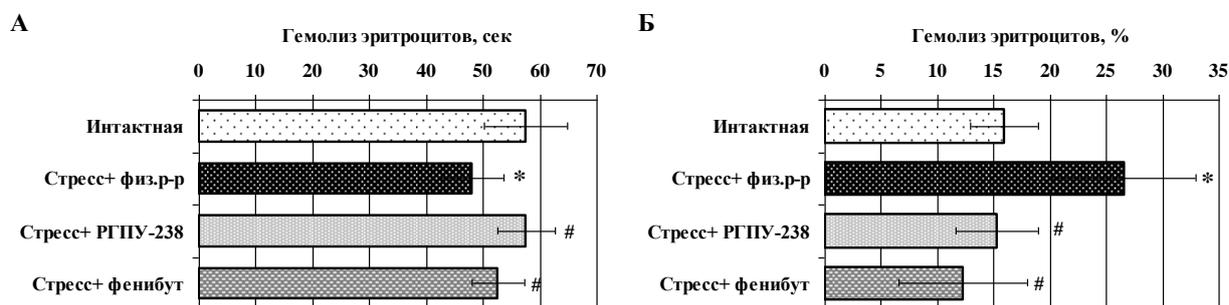


Рисунок 8. Влияние соединения РГПУ-238 на кислотную (А) и осмотическую (Б) резистентность эритроцитов стрессированных животных

* - изменения достоверны относительно интактной группы;

- изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных животных при $p < 0,05$ (критерий Краскела — Уоллиса, с пост-хоком Данна).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате целенаправленного поиска среди 9 новых производных глутаминовой кислоты было выявлено соединение РГПУ-238, обладающее выраженным кардиопротекторным действием у стрессированных животных. Установлено, что исследуемое соединение способно модулировать активность NO- и ГАМК-ергической стресс-лимитирующих систем.

Известно, что возрастзависимые морфофункциональные изменения в миокарде, нарушение обменных процессов и нейрогуморальной регуляции сердца в совокупности приводят к снижению его функциональных резервов и повышению уязвимости организма к действию стрессорного агента. (Hua Y. et al., 2011; Khan M. et al., 2012).

Установлено, что соединение РГПУ-238 повышает прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и МИФС, наиболее выражено у 24-х месячных животных по сравнению с 6-ти и 12-ти месячными в условиях острого и хронического стрессорного воздействия. Выявлено наличие у исследуемого соединения антиагрегантных, мембранопротекторных, антигипоксических свойств, а также способность ограничивать нарушение вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия, процессы ПОЛ и повышать активность антиоксидантных ферментов.

ВЫВОДЫ

1. Среди новых производных глутаминовой кислоты выявлено соединение РГПУ-238 (диметилловый эфир гидрохлорида 3-фенилглутаминовой кислоты), обладающее наиболее выраженным кардиопротекторным действием в условиях 24-х часового стрессорного воздействия.
2. Анализ зависимости специфической активности исследуемых веществ от химической структуры показывает, что кардиопротекторный эффект базового

соединения - гидрохлорида 3-фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135) - максимально усиливается при замещении водорода в карбоксильных группах метильными радикалами (соединение РГПУ-238). Модификация фенильного кольца атомами хлора (соединение РГПУ-240) и азота (соединение РГПУ-241), а также композиции 3-фенилглутаминовой кислоты с органическими кислотами (лимонной, яблочной, янтарной, салициловой) не приводит к усилению кардиопротекторного эффекта гидрохлорида 3-фенилглутаминовой кислоты.

3. Проведенный анализ зависимости «доза-эффект» выявил, что у животных, подвергшихся стрессорному воздействию, наиболее высокие показатели сократимости миокарда в условиях нагрузочных проб наблюдаются при введении соединения РГПУ-238 в дозе 28,7 мг/кг. Острая суточная токсичность при внутрибрюшинном введении составила 1619,8 (1339,0-1959,5) мг/кг, терапевтический индекс равнялся 56,4.
4. Неизбирательное и селективное ингибирование NOS, а также ГАМК_A-рецепторов до стрессорного воздействия приводит к усугублению нарушения сократимости миокарда. Соединение РГПУ-238 модулирует активность NO- и ГАМК-ергической стресс-лимитирующих систем, способствует уменьшению негативного действия стресса на миокард, о чем свидетельствуют более высокие функциональные резервы сердца в условиях проведения нагрузочных тестов.
5. Острое и хроническое стрессорное воздействие вызывает снижение инотропных резервов сердца у 6-ти, 12-ти и 24-х месячных крыс. Соединение РГПУ-238 улучшает ино- и хронотропную функции сердца стрессированных животных всех возрастов, но наиболее выражено у 24-х месячных, на что указывает повышение прироста скорости сокращения миокарда при проведении нагрузочных проб в среднем в 2,4, скорости расслабления - в 2,2, ЛЖД - в 2,1, МИФС - в 2,0 раза относительно данных, полученных у крыс контрольной группы.
6. Длительное стрессорное воздействие приводит к нарушению вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия. У стрессированных крыс, получавших в течение 7 дней соединение РГПУ-238, на более высоком уровне сохранялась эндотелийзависимая вазодилатация в ответ на введение АЦХ и снижение реакции на нитро-L-аргинин по сравнению с показателями стрессированных животных контрольной группы, регистрировалось удлинение АЧТВ в 1,5, ТВ и ПВ - в 1,3, снижение концентрации фибриногена - в 1,3, а также степени и скорости агрегации тромбоцитов - в 1,4 и 1,6 раза.
7. Соединение РГПУ-238 способствует снижению количества ДК, МДА, кетодиенов в среднем в 1,2 раза и повышению активности антиоксидантных ферментов - СОД, каталазы и ГП в среднем в 1,25 раза по сравнению с показателями стрессированных крыс контрольной группы. Исследуемое вещество оказывает мембранопротекторное и антигипоксическое действие, на

что указывает снижение в среднем в 1,6 раза степени кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов и увеличение продолжительности жизни мышей в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией в 1,2 раза по сравнению с показателями животных контрольной группы.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленная способность соединения РГПУ-238 ограничивать негативное влияние острого и хронического стресса на миокард у животных разных возрастных групп свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки на его основе лекарственного препарата для предупреждения стрессорных повреждений миокарда.
2. Целесообразно продолжить синтез и дальнейший поиск среди новых производных глутаминовой кислоты для последующей разработки высокоактивных и малотоксичных веществ со стресс- и кардиопротекторной активностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Влияние иммобилизационно-болевого стресса на ино- и хронотропные функции сердца животных в условиях подавления синтеза оксида азота. Тюренков И.Н. Перфилова В.Н. Арсенова Н.В. Российский физиологический журнал им.И.М.Сеченова. 2012. Т.98(9). С.1131-1139.
2. Изменение ино- и хронотропных резервов сердца стрессированных животных в условиях блокады различных NO-синтаз. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В. Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. № 1-2. С. 46-50.
3. Влияние нового производного глутаминовой кислоты — глүфимета на систему гемостаза стрессированных животных. Садикова Н.В., Мокроусов И.С., Прокофьев И.И., Бородин Д.Д. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2014. № 1 (49). С. 70-72.
4. Кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты при стрессорном воздействии. Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 9. С. 13-17.
5. Влияние нового производного глутаминовой кислоты на показатели сократимости миокарда стрессированных животных в условиях блокады синтеза оксида азота. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 3. С. 366-368.
6. Влияние глүфимета на ино- и хронотропные резервы стрессированного миокарда. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Бородин Д.Д., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Фармация. 2014. № 7. С. 40-43.
7. NO-зависимый механизм кардиопротекторного действия фенибута при стрессорном нарушении сократительной функции сердца. Тюренков И.Н.,

- Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Прокофьев И.И. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78. № 11. С. 8-11.
8. Кардиопротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты — глуфимета в условиях острого иммобилизационно-болевого стресса у животных разного возраста. Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Прокофьев И.И., Иноземцев О.В., Тюренков И.Н. Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. № 1. С. 116-122.
9. Заявка № 2013147657 на выдачу патента. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В. Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Остроглядов Е.С. «Средство, обладающее кардиопротекторными свойствами в условиях стрессорного воздействия». Приоритет от 24.10.2013 г. *Решение о выдаче патента на изобретение от 27.06.2014. Номер патента 2531082*
10. Заявка № 2013147655 на выдачу патента. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В. Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Остроглядов Е.С. «Средство, обладающее кардиопротекторными, антиагрегантными, антикоагулянтными и мембранопротекторными свойствами в условиях стрессорного воздействия». Приоритет от 24.10.2013 г. *Решение о выдаче патента на изобретение от 01.07.2014. Номер патента 2531080*

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

11. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Арсенова Н.В. Изменение инотропной и хронотропной функции сердца у стрессированных животных в условиях блокады синтеза оксида азота // Сборник материалов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва, 23-27 апреля 2012 г. - С. 432.
12. Арсенова Н.В. Влияние соединения РГПУ-223 на сократимость миокарда у стрессированных животных в условиях ингибирования синтеза оксида азота // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы юбилейной 70-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. - Волгоград, 11-14 апреля 2012 г. - С. 324-325.
13. Арсенова Н.В., Перфилова В.Н. Влияние композиции 3-фенилглутаминовой и лимонной кислоты на сократимость миокарда у стрессированных животных в условиях ингибирования синтеза оксида азота // Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств. Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием. В сб.: Вестник ВолгГМУ, приложение. - Волгоград: ВолгГМУ, 29-31 октября 2012 г. - С. 95-96.
14. Перфилова В.Н., Бородин Д.Д., Тюренков И.Н., Остроглядов Е.С., Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Арсенова Н.В. Синтез и строение новых пирролидонкарбоксилатов-базовых веществ в получении арил(гетерил)-глутаминовых кислот // В сб.: Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств. Приложение к журналу Вестник ВолгГМУ. - Волгоград, 29-31 октября 2012 г. - С. 56-57.

15. Перфилова В.Н., Арсенова Н.В., Бородин Д.Д. Кардиопротекторные эффекты нового производного глутаминовой кислоты в условиях блокады синтеза оксида азота // Материалы VI съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 18-21 сентября 2012 г. - С. 148.
16. Садикова Н.В. Стресспротекторные свойства РГПУ-238 при блокаде нейрональной NO-синтазы // V международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения». - Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2013 г. - С. 357.
17. Садикова Н.В. Мембранопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты в условиях длительного стрессирования животных // Материалы V всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых с международным участием. - Волгоград, 6-8 ноября 2013 г. - С. 114-115.
18. Садикова Н.В. Влияние соединения РГПУ-135 на функциональные резервы сердца стрессированных животных при изменении преднагрузки // Материалы XVIII региональной конференции молодых исследователей волгоградской области. - Волгоград, 5-8 ноября 2013 г. - С. 42-43.
19. Садикова Н.В. Стресспротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты // Материалы 67-ой итоговой научной конференции молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета с международным участием. - Ростов, 19 апреля 2013 г. - С. 425-426.
20. Садикова Н.В. Влияние соединения РГПУ-135 на ино- и хронотропную функции миокарда стрессированных животных при ингибировании NO-синтаз // Материалы 72-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». - Волгоград, 16-19 апреля 2014 г. - С. 240-241.
21. Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Прокофьев И.И., Иноземцев О.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Тюренков И.Н. Изменение функциональных резервов сердца стрессированных животных под действием нового производного глутаминовой кислоты-глуфимета при блокаде индуцибельной NO-синтазы // В сб.: Труды научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета. - Волгоград, 2015. - С. 32-35.
22. Перфилова В.Н., Садикова Н.А., Тюренков И.Н., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Роль оксида азота в кардиопротекторном действии производных нейроактивных аминокислот при стрессорном нарушении сократимости миокарда // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - Санкт-Петербург, 29 июня – 2 июля 2015 г. - Т. 13, № S1. - С. 125-126.
23. Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Прокофьев И.И., Иноземцев О.В., Тюренков И.Н. Влияние соединения РГПУ-238 на функциональные резервы сердца

стрессированных животных разных возрастных групп // В сборнике материалов 6-ой международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». - Москва, 9-13 ноября 2015 г. - Т. 78, № 999. - С. 49.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А – адреналин

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

АФК – активные формы кислорода

В/бр - внутрибрюшинно

ГАМК - гамма-аминомасляная кислота

ГК – глутаминовая кислота

ГП – глутатионпероксидаза

ДК – диеновые конъюгаты

ЛД₅₀ – среднелетальная доза

ЛЖД - левожелудочковое давление

МДА - малоновый диальдегид

МИФС - максимальная интенсивность функционирования структур

ПВ – протромбиновое время

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СОД — супероксиддисмутаза

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ССС – сердечно-сосудистая система

ТВ – тромбиновое время

ТИ – терапевтический индекс

Физ. р-р – физиологический раствор

ЧСС - частота сердечных сокращений

+dP/dt max - скорость сокращения миокарда (первая производная левожелудочкового давления)

-dP/dt max - скорость расслабления миокарда (вторая производная левожелудочкового давления)

L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир

NO - оксид азота

**Садикова
Наталья Владимировна**

**Коррекция производными глутаминовой кислоты
стрессорных повреждений сердца**

*АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук*