

На правах рукописи

Мокроусов Иван Сергеевич

**КАРДИОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАЦЕТАМОВ И НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ
МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД – 2017

Работа выполнена на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Научный руководитель: **Тюренков Иван Николаевич**
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант: **Перфилова Валентина Николаевна**
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Мирзоян Рубен Симонович**
заведующий лабораторией фармакологии
цереброваскулярных расстройств ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», заслуженный
деятель науки РФ, доктор медицинских наук,
профессор,
Покровская Татьяна Григорьевна
доктор медицинских наук, профессор кафедры
фармакологии ФГАОУ ВО Белгородского
государственного национального
исследовательского университета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар

Защита состоится «___» декабря 2017 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 фундаментальной 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 «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной преждевременной смертности и ранней инвалидизации населения, при этом ишемическая болезнь сердца (ИБС) составляет 50% случаев гибели населения РФ (Здравоохранение в России, 2015).

В основе ИБС и инфаркта миокарда лежат многочисленные процессы. Нарушения кровоснабжения сердца, вызванные вазоконстрикцией и/или агрегацией тромбоцитов, а также снижением гемореологии, приводят к изменению метаболизма в кардиомиоците. Происходит переход с β -окисления длинноцепочечных жирных кислот на анаэробный гликолиз, что стимулирует синтез лактата и развитие ацидоза в ткани (de la Roche J., 2016) Понижение pH в миокарде вызывает увеличение уровня Na^+ , а затем и Ca^{2+} в клетке (Hall A.R. et al., 2016), что в свою очередь запускает каскад внутриклеточных процессов, в ходе которых нарушается работа дыхательной цепи митохондрий (Piper H. M., 2004). Вследствие этого при функционировании комплексов дыхательной цепи образуются АФК, запускаются процессы ПОЛ и снижается синтез АТФ. АФК повреждают мембрану митохондрий, открывается неспецифический канал «Mitochondrial Permeability Transition Pore, mPTP» (McCommis, 2012), приводящий к развитию митоптоза, апоптоза кардиомиоцита и некроза ткани. На фоне этих процессов нарушается функционирование миокарда, что связано с дефицитом АТФ, угнетением работы сократительных белков (Kentish J.C., 1986, Elliott A.C, 1992), гиперосмолярностью ткани и увеличением содержания интерстициальной жидкости (Steenbergen C., 1985).

Учитывая сложный патогенез поражения миокарда, необходима его многовекторная фармакологическая коррекция. Одним из потенциальных вариантов такой терапии может быть применение линейных и циклических производных ГАМК, обладающих кардио- и стресспротекторными (Меерсон Ф.З., 1984, Тюренков И.Н. и др., 2000; Карнаух Э.В., 2013), антиаритмическими (Карнаух Э.В., 2013), антиагрегантными (Stockmans F, 1998) свойствами. Производные ГАМК ограничивают процессы ПОЛ (Капелько В.И. 2004) и защищают митохондрии при окислительном стрессе (Gupta S., 2014).

В связи с этим является актуальным поиск среди рацетамов новых веществ с кардиопротекторным эффектом, основанном на мультитаргетном влиянии на различные патогенетические звенья повреждения миокарда.

Степень разработанности проблемы

Роль ПОЛ и митохондриальной дисфункции в патофизиологических механизмах повреждения миокарда под действием различных факторов, таких как ишемия, реперфузия, стресс весьма велики. Поэтому фармакологическая коррекция этих явлений находится в сфере теоретической и практической медицины (Gorenkova N., 2013; Yang M., 2014; Murphy M.P., 2016; Chouchani E.T., 2016). Рацетамы лимитируют развитие некроза и выраженность ишемии в сердце (Кресюн В.И., 1990; Чичканов Г.Г, 1991), что обусловлено противогипоксическим (Колесникова Т. А., 2006; Sendrowski K, 2011; Багметов М. Н., 2006; Hokonohara T., 1992), антиаритмическим (Карнаух Э.В., 2013),

антиагрегантным действием (Жилюк и др., 2013), снижением окислительного стресса и защитой митохондрий от повреждений (Gupta S, 2014). ГАМК, являясь медиатором стресс-лимитирующей ГАМК-ергической системы, ограничивает синтез и секрецию гормонов стресса (Carrasco G.A. et al., 2003; Verkuyl J.M. et al., 2005). Эти данные обосновывают поиск в ряду рацетамов - веществ с кардиопротекторным действием, т.к. несмотря на очевидную перспективность, на текущий момент времени не существует препаратов из группы рацетамов, используемых в клинической практике при лечении ИБС

Цель исследования

Оценка кардиотропных свойств новых, оригинальных по структуре рацетамов и изучение некоторых аспектов механизма кардиопротекторного действия.

Задачи исследования

1. Провести скрининг среди рацетамов веществ с противоишемическим действием на модели окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии.
2. Проанализировать зависимость доза-эффект и химическая структура-фармакологическая активность в ряду производных альфа-пирролидона.
3. Изучить влияние соединения-лидера на размер зоны некроза миокарда.
4. Оценить антиаритмическое действие наиболее активного вещества на различных моделях нарушений ритма сердца и воздействие на ионные каналы.
5. Исследовать влияние соединения – лидера на функциональные резервы сердца в условиях острого стрессорного воздействия.
6. Изучить аспекты возможного механизма кардиопротекторного действия наиболее активного вещества: антигипоксический эффект, действие на процессы ПОЛ, активность ферментов антиоксидантной системы, митохондриальную функцию, влияние на агрегацию и гемостаз.

Научная новизна исследования

Впервые проведен скрининг соединений с кардиопротекторным действием среди 12 новых рацетамов в условиях 30-минутной ОНВЛКА с последующей 30-минутной реперфузией, проанализирована зависимость между химической структурой исследуемых соединений и их антиангинальной эффективностью. Выявлено вещество с лабораторным шифром РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты), обладающее выраженной противоишемической активностью, о чем говорит снижение площади под кривой интервала ST ЭКГ в течение 30-минутной ОНВЛКА и последующей 30-минутной реперфузией. Выявлены противоаритмические свойства соединения РГПУ-207 при реперфузионных и хемоиндуцированных (аконитин, хлорид кальция) нарушениях сердечного ритма, установлено влияние соединения РГПУ-207 на ионные токи. Изучены вероятные механизмы действия вещества, выявлено его антистрессорное действие, антиагрегантный, антигипоксический эффекты, влияние на процессы ПОЛ, активность антиоксидантных ферментов и функционирование митохондрий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты выявленных закономерностей между кардиопротекторным действием рацетамов и их химической структурой могут служить основой для

дальнейшего направленного синтеза, поиска и разработки высокоактивных веществ с кардиопротекторной активностью. По итогам доклинического изучения вещества под лабораторным шифром РГПУ-207, оказывающего кардиопротекторное действие, можно говорить о перспективности проведения дальнейшего углубленного изучения его специфических свойств, а также лекарственной безопасности, создания на его основе нового препарата для возможного клинического применения в кардиологии. Результаты проведенных экспериментов используются при подготовке к лекциям и практическим занятиям на кафедрах фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ВолгГМУ, Ростовского государственного медицинского университета и для обучения фармацевтических специалистов, а также в научной работе лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии при ВолгГМУ.

Методология исследования

Для изучения кардиопротекторных эффектов рацетамов был применен комплексный подход. Использовали модели длительной (30 минут) и кратковременной (10 минут) ишемии миокарда с последующей 30-минутной реперфузией (Миронов А.Н. и др., 2012), острого иммобилизационно-болевого стресса (Ковалев Г.В. и др., 1983) и аконитиновые, хлорикальциевые и реперфузионные модели аритмии (Миронов А.Н. и др., 2012).

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

При планировании экспериментов использовали методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н. и др., 2012). Полученные данные были обработаны с помощью рекомендованных методов статистического анализа данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Скрининг веществ с кардиотропным действием среди рацетамов является перспективным направлением поиска новых высокоактивных соединений.

2. Соединение РГПУ-207 обладает противоишемической активностью при 10-минутной и 30-минутной окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии с последующей реперфузией, сопоставимой с верапамилом.

3. В условиях аконитиновой, хлоридкальциевой и реперфузионной аритмии соединение РГПУ-207 ограничивает развитие нарушений ритма сердца.

4. Соединение РГПУ-207 улучшает ино- и хронотропную функции сердца крыс при остром иммобилизационно-болевым стрессорном воздействии, сопоставимо с фенибутом и пирацетамом.

5. Соединение РГПУ-207 оказывает антигипоксическое, антиагрегантное действие, улучшает дыхательную функцию митохондрий, ограничивает процессы ПОЛ, повышает активность ферментов антиоксидантной системы в клетках головного мозга и кардиомиоцитах, влияет на калиевые, натриевые и кальциевые трансмембранные ионные токи.

Личный вклад автора

Автор провел поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по теме диссертации. При его непосредственном участии разработаны дизайн исследования и протоколы экспериментов. Самостоятельно выполнил практическую часть работы, провел ее статистический анализ и описал результаты. Принимал участие в формулировании выводов и научно-практических рекомендаций, оформлении статей по теме диссертации.

Степень достоверности и апробации результатов

Экспериментальные данные получены на достаточном количестве экспериментальных животных с использованием современного высокотехнологичного оборудования, которые были статистически обработаны с использованием общепринятых тестов и критериев, что свидетельствует о высокой степени достоверности результатов исследования. Материалы работы докладывались и обсуждались на XVIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2013, 2017), 72-й, 73-й и 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2017 - диплом III степени). По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, 5 из которых - в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 162 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 2 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, включающего 206 источников, из них 65 отечественных и 141 зарубежного автора. Работа содержит 20 таблиц и 24 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе, посвященной обзору отечественных и зарубежных исследований о механизмах ишемического и стрессорного повреждения сердца, о роли ПОЛ в этих процессах, показано, что при недостаточном количестве кислорода в клетке изменяется функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий, в результате чего образуется большое количество АФК, обладающих выраженным повреждающим действием на внутрицеллюлярные компоненты и мембрану клеток (Piper, H. M., 2004). Эти процессы ведут к митоптозу, а затем и к апоптозу клетки.

Известно также, что стрессорные повреждения сердца играют большую роль в патогенезе ишемии миокарда. Тахикардия и гипертензия, развивающиеся при гипердреналинемии, усиливают нагрузку на сердце и увеличивают потребность миокарда в кислороде. На фоне вазоконстрикции и активации тромбоцитов, возникающих под действием катехоламинов, нарастает недостаточность кислорода в кардиомиоцитах, что приводит к ишемии сердца (Пшенникова М.Г., 2000).

Описанные выше изменения в ишемизированных кардиомиоцитах влияют на работу их ионных каналов. Вследствие этого изменяются электрические свойства клеток, что стимулирует появление реперфузионных аритмий (Ватутин Н.Т., 2013).

Показано, что рацетамы обладают антигипоксическим (Кресюн В.И., 1990), противострессорным (Карнаух Э.В. 2013), антиаритмическим, мембраностабилизирующим (Карнаух Э.В. 2013), антиагрегантными эффектами (Stockmans F, 1998), способностью ограничивать процессы ПОЛ (Кресюн В.И., 1993), повышать активность ферментов антиоксидантной защиты (Stockburger C, 2013), улучшать функцию митохондрий (Gupta S., 2014), поддерживать сопряжение дыхания и фосфорилирования. Таким образом, можно считать перспективным поиск среди рацетамов веществ с кардиопротекторным действием.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования, которое было выполнено в 3 этапа.

На *первом этапе* был проведен поиск среди 12 новых рацетамов соединения, оказывающего противоишемическое действие. Соединения синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им.А.И.Герцена (г.Санкт-Петербург) под руководством профессора Берестовицкой В.М.¹). Наркотизированным крысам-самцам (хлоралгидрат 400 мг/кг внутрибрюшинно) проводили 30-минутную окклюзию нисходящей ветви левой коронарной артерии (ОНВЛКА) с последующей реперфузией (Миронов А.Н. и др., 2012). и оценивали функциональное состояние очага ишемии (ФСОИ) по изменению площади под кривой интервала ST (Richard E. Et al., 2013). ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия). Соединения вводили внутривенно за 10 минут до ОНВЛКА в дозе 1/10 от молекулярной массы. В качестве препарата сравнения был использован верапамил в дозе 0,8 мг/кг (ОАО «Биосинтез», Россия).

Эксперименты выполнены на 527 белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. и 6 кроликах-шиншиллах. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово» Ленинградская область) и содержались в условиях вивария ВолгГМУ. Уход за ними осуществлялся согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Международных рекомендаций «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [The European Convention, 1986]. Эксперименты были одобрены региональным независимым этическим комитетом ВолгГМУ (протокол № 176-2013 от 08.05.2013 г).

На *втором этапе* изучали кардиопротекторные свойства соединения-лидера по ФСОИ в условиях кратковременной и длительной ОНВЛКА с

¹ *Выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой органической химии РГПУ им.А.И.Герцена, з.д.н., д.х.н., проф. Берестовицкой В.М., к.х.н., доц. Васильевой О.С. и всем сотрудникам кафедры, принимавшим участие в синтезе предоставленных нам для исследования веществ*

анализом зависимости доза-эффект, оценивали антиаритмическую активность в 3-х дозах соединения-лидера на аконитиновой, хлоридкальциевой и реперфузионных моделях аритмий, изучали влияние на размер зон некроза миокарда и исследовали влияние на функциональные резервы сердца в условиях острого иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия. Зависимость противоишемического действия от дозы соединения-лидера исследовали на модели кратковременной (10-минутной) и длительной (30-минутной) ОНВЛКА с 30-минутной реперфузией (см. выше). Критерием эффективности соединения служила площадь под кривой интервала ST. Соединение РГПУ-207 вводили в дозах 9,4, 18,7 и 37,5 мг/кг. В качестве препаратов сравнения при кратковременной ишемии был выбран верапамил дозах 0,4; 0,7 и 1,4 мг/кг, при длительной - верапамил в дозах 0,4, 0,8 и 1,6 мг/кг, ивабрадин в дозах 5,3, 10,5 и 21 мг/кг (Sigma-Aldrich, США) и мексидол (ООО «НПК «Фармасофт», Россия) в дозах 10, 20 и 40 мг/кг.

Противоишемическое действие оценивали также по размеру очага некроза с помощью метода двойного окрашивания. Ишемию вызывали у наркотизированных (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) белых беспородных крыс-самцов путем ОНВЛКА на 30 минут с последующей 30-минутной реперфузией (Миронов А.Н. и др., 2012). Соединение РГПУ-207 вводили в дозе 9,4 мг/кг, в качестве препаратов сравнения были использованы верапамил (1,6 мг/кг), мексидол (40 мг/кг) и ивабрадин (21 мг/кг). Визуализацию анатомической зоны риска и зоны некроза производили с помощью методики "двойного окрашивания" синим Эванса (Sigma, США) и трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) (Sigma, США). Эффект соединения оценивали по размеру зоны инфаркта, рассчитанного как отношение объема ТТС-негативных участков к объему Эванс-негативных участков (в процентах) (Сыренский А.В. и др., 2008).

Исследование антиаритмической активности проводили на аконитиновой, хлоридкальциевой и реперфузионной модели нарушений ритма сердца (НРС).

Реперфузионные НРС. Наркотизированным (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) крысам осуществляли ОНВЛКА на 10 (кратковременная) и 30 (длительная) минут с последующей 30-ти минутной реперфузией в связи с развитием разных видов аритмий с отличными друг от друга механизмами (Baumeister P, 2016). Исследуемые вещества и препараты сравнения вводили в\в медленно за 10 мин до ОНВЛКА (Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., 2012) соединение РГПУ-207 в дозах 9,4, 18,7 и 37,5 мг/кг. При кратковременной ишемии в качестве референтных использовали следующие антиаритмические препараты: новокаинамид в дозе 40 мг/кг, этmozин в дозе 20 мг/кг, верапамил в дозе 0,7 мг/кг. При длительной ишемии были взяты верапамил в дозе 0,8 мг/кг, ивабрадин – 10,5 мг/кг и мексидол - 40 мг/кг. Соединение РГПУ-207 вводили в дозах 9,4, 18,7 и 37,5 мг/кг. Антиаритмический эффект оценивали по тяжести НРС, времени возникновения фибрилляций, проценту выживших животных. Тяжесть аритмии оценивали по балльной системе: 0 - нет нарушений ритма; 1- единичные экстрасистолы, синусовые тахи- и брадикардии; 2 – множественные экстрасистолы, блокады; 3 – пароксизмальная тахикардия, электромеханическая

диссоциация; 4 – фибрилляция, асистолия (Гурова Н.А. и др., 2013). ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия).

Изучение действия соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи нейронов моллюсков².

Для изучения влияния соединения на трансмембранные ионные токи выделяли изолированные нейроны диаметром 60–100 мкм брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) и катушки роговой (*Planorbarius corneus*). Исследуемое вещество добавляли в перфузирующий раствор. Для измерения трансмембранных ионных токов применяли метод внутриклеточной перфузии изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала (Вислобоков А.И. и др., 2010; Вислобоков А.И. и др., 2006; Костюк П.Г. и др., 1981) с использованием электрофизиологической установки 12-разрядный АЦП-ЦАП с временем квантования 40 мкс и усилители с полосой пропускания от 0 до 100 кГц обеспечивали адекватность регистрации токов. Регистрировали входящие (натрий-кальциевые) и выходящие (быстрый и медленный) калиевые токи. После регистрации суммарных ионных токов производили замену внутриклеточного и наружного растворов на растворы для регистрации отдельного тока (кальциевого, натриевого и калиевого).

Аконитиновую и хлоридкальциевую аритмии моделировали путем внутривенного введения аконитина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 50 мкг/кг и хлорида кальция (ФГУП НПО «Микроген», Россия) в дозе 200 мг/кг (Галенко-Ярошевский П.А., Миронов А.Н., 2012). Исследуемое соединение вводили внутривенно за 10 минут до аритмогена в дозах 9,4; 18,7 и 37,5 мг/кг. В качестве препарата сравнения на аконитиновой модели использовали новокаиномид в дозе 20 мг/кг, лидокаин в дозе 7,5 мг/кг этмозин в дозе 10 мг/кг; на хлоридкальциевой модели - верапамил в дозе 0,3 мг/кг и лидокаин в дозе 3,5 мг/кг. ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия) в течение 30 мин после введения агента. Антиаритмическую активность оценивали по времени возникновения фибрилляций, проценту животных с фибрилляциями и количеству выживших животных.

Острое иммобилизационно-болевое стрессорное воздействие. моделировали подвешиванием крыс за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа (Ковалев Г.В., и др., 1983). Интактным и стрессированным животным (за 10 минут до подвешивания) вводили внутрибрюшинно соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг и препараты сравнения фенибут в дозе 25 мг/кг и пирацетам в дозе 400 мг/кг. У всех животных до и после стрессирования регистрировали среднее артериальное давление (срАД) с хвоста с помощью прибора для неинвазивного измерения Kent Scientific Corporation (Канада).

Оценка функциональных резервов сердца стрессированных животных осуществлялась после оперативной подготовки и введения катетера,

² Работа была выполнена в лаборатории электрофизиологии института фармакологии им. Вальдмана при участии д.б.н. Анатолия Ивановича Вислобокова.

соединенного с датчиком давления, через верхушку сердца в левый желудочек (Biopac systems, США). С помощью интерфейсного универсального модуля UIM100C полиграфа MP150 (Biopac systems, США) на базе программы AcqKnowledge 4 регистрировали скорость сокращения (+dP/dt) (мм рт.ст./сек), скорость расслабления (-dP/dt) (мм рт.ст./сек) миокарда, левожелудочковое давление (ЛЖД) (мм рт.ст.) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) (уд/мин). Максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) определяли расчетным способом ((ЛЖД ср x ЧССср)/(масса левого желудочка+1/3 межжелудочковой перегородки)) (мм рт.ст./мг*мин) (Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., 2012). Исследуемые показатели регистрировали после проведения функциональных тестов: нагрузка объемом, проба на адренореактивность и максимальная изометрическая нагрузка (Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., 2012).

На *третьем* этапе проводили исследование некоторых механизмов действия. Оценивали антигипоксическую эффективность, выраженность процессов ПОЛ, активность ферментов антиоксидантной системы (АОС), функциональное состояние митохондрий и определяли показатели гемостаза, степень и скорость агрегации тромбоцитов.

Изучение антигипоксического действия. Острую гипоксию моделировали путем пережатия выделенной трахеи у наркотизированных крыс-самцов массой 200-250 г. У животных регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия). Оценивали продолжительность биоэлектрической активности сердца, сохранявшейся после наступления гипоксии (Каркищенко Н.Н., 2017). Соединение РГПУ-207 вводили в дозе 9,4 мг/кг, в качестве препаратов сравнения были использованы верапамил (1,6 мг/кг), мексидол (40 мг/кг) и ивабрадин (21 мг/кг).

Исследование развития процессов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов. В гомогенате ишемизированных сердец, а также в гомогенате мозга и сердца стрессированных крыс определяли концентрацию продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (Ушкалова В.Н., и др., 1993) и малонового диальдегида (МДА) (Андреева Л. И. и др., 1988). Исследовали активность ферментов антиоксидантной системы (АОС): супероксиддисмутазы (СОД) (Костюк В.А. и др., 1990), глутатионпероксидазы (ГП) (Моин В.М., 1986) и каталазы (Королук М. А. и др., 1988). Для измерения оптической плотности растворов использовали спектрофотометр Helios γ («TermoElectronCorporation», Англия).

Изучение функционального состояния митохондрий кардиомиоцитов и клеток головного мозга. Из гомогената сердца и мозга выделяли митохондрии методом дифференциального центрифугирования (Lanza IR et al., 2009). Окислительную и фосфорилирующую функции митохондрий изучали полярографическим методом с помощью электрода Кларка на приборе "Эксперт-001-4(01)" ("Эконикс-Эксперт", Россия). Регистрировали следующие показатели: V3 – скорость поглощения кислорода при добавлении АДФ до конечной концентрации 200 мкМ, V4 – скорость поглощения кислорода после истощения АДФ, ДКЧ – дыхательный контроль по Чансу находили расчетным

способом как соотношение V3/V4 (Brand MD et al., 2011). Изучали активность I (NADH-дегидрогеназа) и II комплекса дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа), а также их совместную работу (Lanza IR et al., 2009). Для оценки сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях используют коэффициент дыхательного контроля, который рассчитывался по Чансу (ДКЧ) как отношение стимулированной скорости поглощения кислорода к нестимулированной (V3/V4).

Определение показателей коагулограммы, степени и скорости агрегации тромбоцитов. В плазме крови стрессированных животных определяли протромбиновое время (ПВ), фибриноген (ФГ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) с помощью оптико-механического коагулометра - Минилаб 701 с использованием наборов производства НПО РЕНАМ, Россия. Агрегацию тромбоцитов изучали согласно методу Born G. в модификации Габбасова З.А. и соавт. (Габбасов З.А. и др., 1989) на двухканальном лазерном анализаторе научно-производственной фирмы «Биола» (г. Москва, Россия). Учитывали степень агрегации (%) и скорость агрегации тромбоцитов (%/мин). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ («Renal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ «Statistica 6.0» с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Для нормальных выборок использовали при парном сравнении *t*-критерий Стьюдента, при множественном - критерий Ньюмена-Кейлса, для ненормальных: *U*-критерий Манна-Уитни - при парном сравнении, *U*-критерий Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони и критерий Крускала-Уоллиса с пост-хок тестом Данна – при множественном. Для сравнения данных с альтернативной формой реакции использовали точный критерий Фишера. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

В **третьей главе** приведены результаты скрининга веществ с противоишемическим действием среди 12 новых рацетамов и выявлено соединение соединение РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты), обладающее наиболее выраженным эффектом (Рис. 1). Снижение площади под кривой интервала ST в условиях 30-минутной окклюзии с последующей реперфузией, у животных, получавших соединение РГПУ-207, составляло 50% по сравнению с показателями контрольной группы, что было сопоставимо с препаратом сравнения верапамиллом.

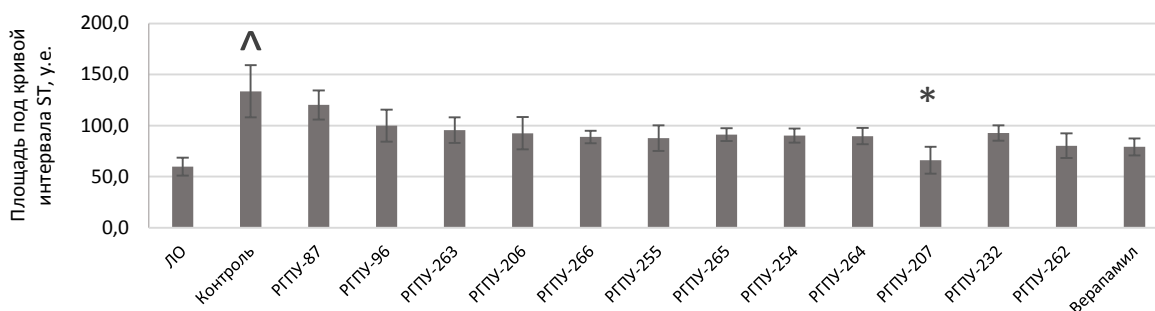


Рисунок 1. Результаты скрининга среди рацетамов по противоишемической активности на модели 30-минутной окклюзии и последующей реперфузией.

^ - в сравнении с ложнооперированной группой при $p < 0,05$ U-критерий Манна–Уитни;

* - в сравнении с контрольной группой при $p < 0,05$ критерий Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана; ЛО – ложнооперированная группа.

Затем была изучена зависимость противоишемического действия соединения-лидера от его дозы в условиях кратковременной (10 минут) и длительной (30 минут) ишемии с последующей 30-минутной реперфузией.

В условиях 10-ти и 30-ти минутной ишемии соединение РГПУ-207 оказывало равное во всех дозах противоишемическое действие, сопоставимое с препаратами сравнения, на что указывает снижение площади под кривой интервала ST у животных, получавших соединение и референтные препараты, по сравнению с контрольной группой (таб. 1, 2)

Таблица 1. Влияние различных доз исследуемого соединения и верапамила на площадь под кривой интервала ST в условиях 10-ти минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией ($M \pm \sigma$)

Группа	Кол-во крыс, n	Площадь под кривой, у.е.
Ложнооперированная	6	21,0±3,4
Контрольная	12	52,1±15,8 [^]
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	27,3±7,7*
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	6	22,8±6,3*
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	6	22,6±6,6*
Верапамил, 0,4 мг/кг	6	32,1±20,3
Верапамил, 0,7 мг/кг	6	34,9±14,1
Верапамил, 1,4 мг/кг	6	25,1±5,7*

Примечания: * данные статистически достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса по сравнению с контрольной группой животных при $p < 0,05$;

^ - данные статистически достоверны по t-критерию Стьюдента по сравнению с ложнооперированной группой животных при $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние различных доз исследуемого соединения и препаратов сравнения верапамила, мексидола и ивабрадина на площадь под кривой интервала ST в условиях 30-ти минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией ($M \pm \sigma$)

Группа	Кол-во крыс, n	Площадь под кривой, у.е.
Ложнооперированная	6	59,6±6,4
Контрольная	19	127,9±37,5 [^]
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	68,1±11,0*
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	6	61,0±9,3*

Группа	Кол-во крыс, n	Площадь под кривой, у.е.
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	6	60,3±8,2*
Мексидол, 10 мг/кг	6	107,8±14,8
Мексидол, 20 мг/кг	9	103,7±20,3
Мексидол, 40 мг/кг	9	69,4±22,2*
Ивабрадин, 5,3 мг/кг	8	125,0±34,0
Ивабрадин, 10,5 мг/кг	6	96,6±30,7
Ивабрадин, 21 мг/кг	8	80,3±11,2*
Верапамил, 0,4 мг/кг	6	106,6±18,2
Верапамил, 0,8 мг/кг	6	83,0±19,2*
Верапамил, 1,6 мг/кг	7	61,3±19,6*

Обозначения: как в таб. 1.

Выявлено также, что соединение РГПУ-207 уменьшает размер зоны некроза миокарда сопоставимо с препаратами сравнения: верапамилом, ивабрадином и мексидолом (таб. 3).

Таблица 3. Влияние соединения РГПУ-207, верапамила, ивабрадина и мексидола на размеры зон риска и некроза в условиях 30-ти минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией ($m \pm \sigma$)

Группы животных	кол-во животных	Размер зоны риска (% сердца)	Размер зоны некроза (% к зоне риска)
Контрольная группа	8	27,6 ±6,3	42,5±9,0
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	22,6±7,1	24,1±5,6*
Верапамил, 1,6 мг/кг	6	26,8±8,7	20,7±3.5*
Мексидол, 40 мг/кг	6	22,2±3,2	22,3±4,7*
Ивабрадин, 21 мг/кг	6	29,9±6,0	23,8±4,0*

* данные статистически достоверны по критерию Крускала-Уоллиса и пост-хок тест Дана по сравнению с контрольной группой животных при $p \leq 0,05$.

Нарушения ритма сердца зачастую сопровождают другие патологии сердечно-сосудистой системы, такие как ИБС. В этой связи было изучено антиаритмическое действие соединения. В развитии ишемических аритмий выявлено две фазы (Baumeister P, 2016). В первые 2-10 минут после окклюзии наступает фаза 1a, характеризующаяся появлением коротких периодов желудочковых тахикардий, вызванных механизмом *re-entry*. Через 20-40 минут после окклюзии (с максимумом около 30 минут) регистрируется фаза 1b. Для этой фазы описаны более тяжелые аритмии с развитием фибрилляций желудочков (Carmeliet E, 1999). Поэтому мы исследовали антиаритмический эффект соединения РГПУ-207 на моделях кратковременной (10 минут) и длительной (30 минут) ишемии с последующей 30-минутной реперфузией.

При кратковременной 10-минутной ишемии миокарда с реперфузией отмечено развитие тяжелых нарушений ритма сердца у 100% животных контрольной группы с их дальнейшей гибелью. Соединение РГПУ-207 снижало выраженность реперфузионных аритмий и число погибших животных в трех исследуемых дозах, превосходя по эффективности препараты сравнения этмозин и верапамил (таб. 4).

Таблица 4. Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на реперфузионной модели (с ишемией 10 минут) нарушений ритма сердца

Группы животных	Тяжесть аритмии после реперфузии, баллы (Me, (25 кв, 75 кв))	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
Ложнооперированная	0,0 (0,0;1,0)	6	0	100,0
Контроль	4,0 (4,0;4,0)^	0	7	0,0#
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	1,5 (1,0;4,0)*	4	2	66,7&
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	2,0 (1,0;2,0)*	5	1	83,3&
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	1,5 (1,0;2,0)*	4	2	66,7&
Этмозин, 20 мг/кг	2,0 (0,0;4,0)	3	3	50,0
Верапамил, 0,7 мг/кг	2,0 (0,0;4,0)	3	3	50,0
Новокаинамид, 40 мг/кг	1,0 (0,0;4,0)*	4	2	66,7&

Примечание: ^ различия статистически достоверны по U-тесту Манна-Уитни по сравнению с ложнооперированной группой животных при $p < 0,05$; * различия статистически достоверны по U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони по сравнению с контрольной группой животных при $p < 0,05$; # различия статистически достоверны по точному критерию Фишера в сравнении с ложнооперированной группой животных при $p < 0,05$; & различия статистически достоверны по точному критерию Фишера в сравнении с контрольной группой животных при $p < 0,05$.

В условиях 30-минутной ишемии миокарда с последующей реперфузией соединение РГПУ-207 во всех исследуемых дозах оказывало существенный антиаритмический эффект, снижая тяжесть реперфузионных НРС и увеличивая выживаемость животных. По выраженности действия исследуемое соединение превосходило эталонные препараты.

Таблица 5. Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на реперфузионной модели (с ишемией 30 минут) нарушений ритма сердца

Группы животных	Тяжесть аритмии после реперфузии, баллы (Me, (25 кв, 75 кв))	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
Ложнооперированная	0,0 (0,0;0,0)	6	0	100,0
Контрольная	4,0 (3,0;4,0) ^	4	10	28,6#
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	0,5 (0,0; 1,0)*	5	1	83,3&
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	0,5 (0,0;1,0)*	6	0	100,0&
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	0,5 (0,0; 1,0)*	6	0	100,0&
Верапамил, 0,8 мг/кг	1,0 (0,0;4,0)	4	2	66,7
Ивабрадин, 10,5 мг/кг	2,5 (2,0; 4,0)	4	2	66,7
Мексидол, 40 мг/кг	2,0 (2,0;4,0)	4	2	66,7

Обозначения: как в таб. 4.

Можно было предположить, что антиаритмический эффект соединения на модели реперфузионных аритмий обусловлен его способностью модулировать ионные каналы кардиомиоцитов. В этой связи было изучено влияние соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи. Показано незначительное увеличение амплитуды калиевых ионных токов нейронов моллюсков в концентрации 1 мкМ. Такое действие можно расценивать как активирующее. В более высоких концентрациях (1000 мкМ) соединение РГПУ-207 оказывало

обратимое ингибирующее действие на натриевые, кальциевые и калиевые трансмембранные токи (рис. 2).

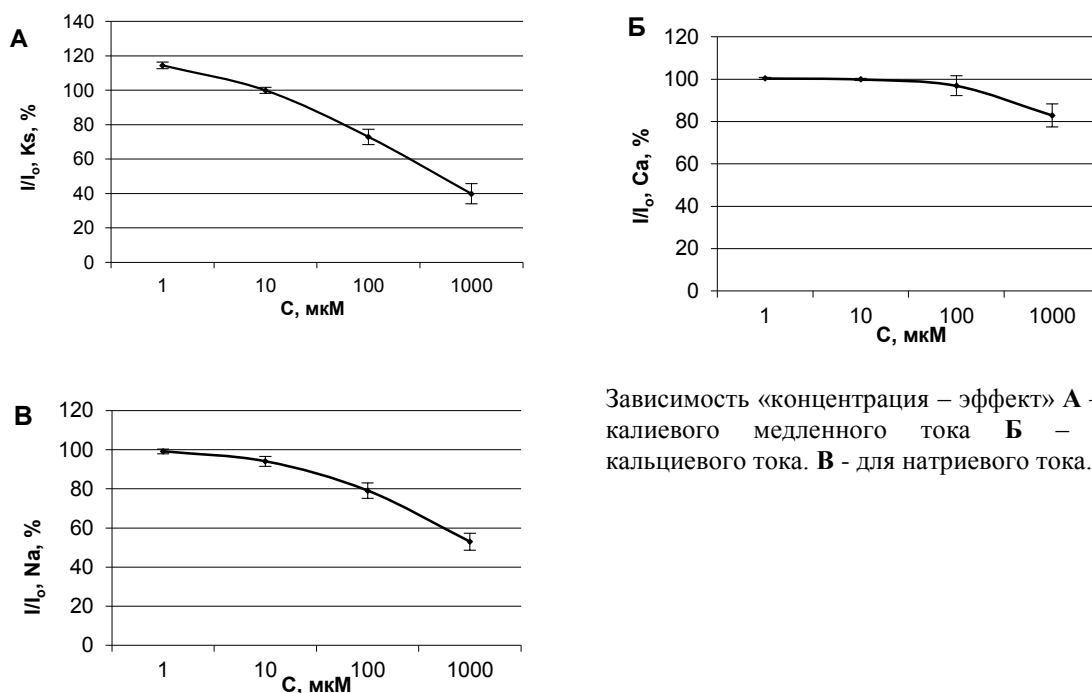


Рисунок 2. Изменения ионных токов нейронов моллюсков под влиянием соединения РГПУ-207.

Учитывая влияние исследуемого соединения на ионные каналы, было изучено его антиаритмическое действие на других моделях.

На аконитиновой модели нарушений ритма сердца выявлена выраженная антиаритмическая активность соединения РГПУ-207 во всех исследуемых дозах и снижение летальности по сравнению с контрольной группой. Наибольшее антиаритмическое действие исследуемое соединение оказывало в дозе 9,4 мг/кг. По эффективности соединение незначительно уступало референтным препаратам новокаинамиду, этмозину и лидокаину (таб. 6).

Таблица 6. Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

Группы животных	Кол-во крыс с фибрилляциями	Кол-во крыс без фибрилляций	% крыс без фибрилляций	Кол-во выживших крыс	Кол-во погибших крыс	% выживших крыс
контрольная	9	3	25,0	3	9	25,0
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	2	6	75,0*	6	2	75*
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	3	7	70,0*	7	3	70*
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	3	9	75,0*	8	4	66,7*
Этмозин, 10,0 мг/кг	0	6	100,0*	6	0	100*
Лидокаин, 7,5 мг/кг	0	6	100,0*	6	0	100*
Новокаинамид, 20 мг/кг	1	5	83,3*	4	2	66,7

Примечание: * различия статистически достоверны по точному критерию Фишера в сравнении с контрольной группой животных при $p < 0,05$.

На модели НРС, вызванных хлоридом кальция, исследуемое соединение ограничивало развитие аритмий и летальность сопоставимо с препаратами сравнения (таб. 7).

Таблица 7. Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на хлоридкальциевой модели нарушений ритма сердца

Группы животных	Кол-во крыс с фибрилляциями	Кол-во крыс без фибрилляций	% крыс без фибрилляций	Кол-во выживших крыс	Кол-во погибших крыс	% выживших крыс
контроль	6	3	33,3	2	7	22,2
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	4	2	33,3	4	2	66,7
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	2	4	66,7	5	1	83,3*
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	0	6	100*	5	1	83,3*
Верапамил, 0,3 мг/кг	1	5	83,3	4	2	66,7
Лидокаин, 3,5 мг/кг	1	5	83,3	4	2	66,7
контроль	6	3	33,3	2	7	22,2

Обозначения: как в таб. 6.

Таким образом, соединение РГПУ-207 обладает равновыраженным антиангинальным эффектом при длительной и кратковременной ОНВЛКА равным во всех исследуемых дозах и антиаритмическим действием, наиболее выраженным в дозе 9,4 мг/кг. Поэтому в дальнейших экспериментах использовалась эта доза.

Известно, что стрессорные воздействия могут провоцировать ишемию миокарда и вызывать нарушения сердечного ритма. Внутриклеточные изменения в условиях стресса сильно сопряжены с ишемическими. В этой связи было исследовано кардиопротекторное действие соединения РГПУ-207 в условиях стрессорного повреждения миокарда. Для оценки функциональных резервов сердца были использованы нагрузочные тесты (Тюренков И.Н., 1981).

На фоне проведения нагрузки объемом у интактных и стрессированных самцов соединение РГПУ-207 увеличивало прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЧСС и ЛЖД по сравнению с показателями животных контрольной группы. По эффективности исследуемое соединение превосходило препараты сравнения фенибут и пирацетам (таб. 8).

У интактных животных соединение не влияло на сократимость миокарда при проведении пробы на адренореактивность. У стрессированных крыс прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЧСС и ЛЖД были в 2 раза меньше по сравнению с контролем. Соединение РГПУ-207 предотвращало снижение прироста, также, как и препарат сравнения фенибут (таб. 9).

Таблица 8. Влияние соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама на прирост показателей кардиодинамики в условиях нагрузки объемом (M ±m) (через 10 с после начала нагрузки по отношению к исходу)

Группы животных	+dP/dt, мм рт.ст./с	-dP/dt, мм рт.ст./с	ЛЖД, мм рт.ст./с	ЧСС, уд/мин
Позитивный контроль (интактные)	27,0±6,3	42,2±4,3	23,1±3,4	36,5±5,2
Интактная группа +РГПУ-207	55,8±6,6^	65,6±5,6^	49,5±6,2^	60,1±7,2^
Интактная группа +фенибут	38,9±5,4	49,9±5,4	26,2±5,7	39,3±6,8
Интактная группа +пирацетам	32,4±6,7	44,6±5,8	22,8±5,2	33,4±7,2

Группы животных	+dP/dt, мм рт.ст./с	-dP/dt, мм рт.ст./с	ЛЖД, мм рт.ст./с	ЧСС, уд/мин
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	10,3±1,9*	23,8±2,1*	13,0±2,2*	12,1±3,7*
Стресс+РГПУ-207	49,4±4,4#	61,2±11,7#	43,7±6,3#	57,8±9,2#
Стресс+фенибут	24,3±2,7#	53,0±10,0#	32,1±4,6#	40,3±5,5#
Стресс+пирацетам	27,9±2,5#	55,6±9,4#	25,2±4,6	27,7±5,0

Примечания: * -относительно интактных животных контрольной группы по t-критерию Стьюдента; ^ - по критерию Ньюмена-Кейлса; p<0,05; # относительно стрессированных животных контрольной группы по критерию Ньюмена-Кейлса; p<0,05.

Таблица 9. Влияние соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама на прирост показателей кардиодинамики при стимуляции адренорецепторов сердца (M ±m) (через 10 с после начала нагрузки по отношению к исходу)

Группы животных	+dP/dt, мм рт.ст./с	-dP/dt, мм рт.ст./с	ЛЖД, мм рт.ст./с	ЧСС, уд/мин
Позитивный контроль (интактные)	105,5±14,1	159,6±4,7	64,3±9,8	104,3±11,4
Интактная группа +РГПУ-207	110,5±9,4	163,5±5,7	66,1±2,5	114,3±5,1
Интактная группа +фенибут	106,0±9,4	159,5±9,2	75,5±6,3	105,5±11,2
Интактная группа +пирацетам	96,6±5,3	122,5±7,4	63,6±13,5	79,9±3,6
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	57,5±9,4*	51,5±8,5*	36,9±4,6*	42,3±7,8*
Стресс+РГПУ-207	110,7±12,6#	129,8±15,0#	69,1±4,4#	116,6±11,0#
Стресс+фенибут	109,3±10,7#	161,6±9,8#	77,2±7,0#	97,0±10,1
Стресс+пирацетам	92,9±9,6#	105,0±9,9#	58,0±6,3#	67,0±5,1#

Примечания: как в таб. 8.

При проведении изометрической нагрузки у интактных животных, получавших соединение РГПУ-207, прирост исследуемых показателей не отличался от контрольной группы. У стрессированных крыс прирост показателей был меньше по сравнению с группой позитивного контроля. При введении соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на фоне острого стрессорного воздействия прирост показателей был больше, чем у стрессированных животных (таб. 10).

Таким образом, соединение обладает кардиопротекторным действием при стрессорном повреждении миокарда.

Таблица 10. Влияние соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама на прирост показателей кардиодинамики в условиях максимальной изометрической нагрузки (M ±m) (через 30 с после начала нагрузки по отношению к исходу)

Группы животных	+dP/dt, мм рт.ст./с	-dP/dt, мм рт.ст./с	ЛЖД, мм рт.ст./с	ЧСС, уд/мин	МИФС мм рт.ст./ мг*мин
Позитивный контроль (интактные)	19,5±2,0	52,4±6,1	47,3±8,9	36,4±4,1	102,4±16,7
Интактная группа +РГПУ-207	35,1±9,3^	55,2±13,6	55,4±9,6	48,0±3,3	129,0±12,4
Интактная группа +фенибут	53,8±11,6	61,5±11,0	51,6±10,9	40,0±7,6	114,3±24,0
Интактная группа +пирацетам	38,9±8,7	47,2±7,0	55,4±9,3	34,5±4,7	111,4±19,3
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	6,1±3,3*	8,2±4,5*	3,2±5,7*	7,6±5,3*	12,9±9,6*
Стресс+РГПУ-207	35,3±6,1#	50,2±3,4#	54,9±5,1#	47,7±6,1	129,9±13,2
Стресс+фенибут	51,7±4,9#	60,6±8,3#	55,5±6,9#	31,5±8,7	107,3±20,0
Стресс+пирацетам	38,4±6,4#	45,7±12,1#	54,1±5,2	32,5±3,5#	104,6±9,6#

Примечания: как в таб. 8.

В четвертой главе изложены результаты изучения предполагаемого механизма действия соединения РГПУ-207.

При прогрессировании ишемии нарушается метаболизм и развивается локальная гипоксия тканей. Поэтому было исследовано антигипоксическое действие изучаемого соединения в дозе 9,4 мг/кг. Выявлено повышение времени биоэлектрической активности сердца в условиях гипоксии при введении соединения РГПУ-207 и верапамила, что свидетельствует о наличии у них исследуемого эффекта (рис. 3).

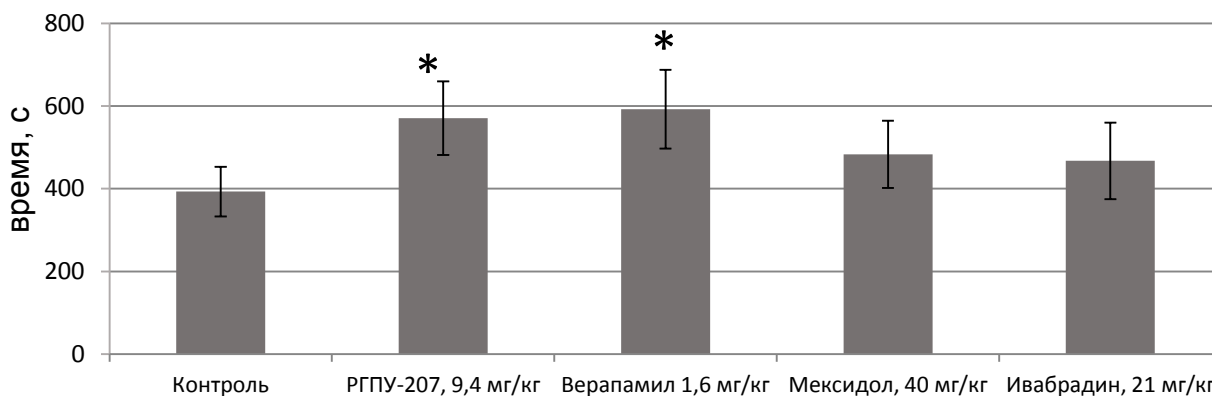


Рисунок 3. Влияние соединения РГПУ-207 на продолжительность биоэлектрической активности сердца

Примечание: * данные статистически достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса по сравнению с контрольной группой животных при $p < 0,05$.

Известно, что в ишемическом и стрессорном поражении сердца большую роль играют процессы ПОЛ, приводящие к повреждению мембраны кардиомиоцитов и митохондрий. Образованные АФК в норме элиминируются ферментами АОС - каталазой, СОД и ГП (Bauer G., 2017). При усиленном образовании АФК или недостаточной активности инактивирующих ферментов АОС развивается оксидативный стресс. Образующиеся гидроксиперекиси липидов, нарушая структуру бислоевой мембраны, уменьшают ее текучесть, вызывают инактивацию мембранно-связанных белков (Ademowo OS. et al., 2017). В этой связи было изучено влияние соединения РГПУ-207 на состояние оксидантно/антиоксидантной системы.

В условиях 30-минутной ишемии миокарда с последующей реперфузией наблюдалась активизация процессов ПОЛ в кардиомиоцитах, о чем свидетельствует высокая концентрация кетодиенов, ДК и МДА, а также снижение активности ферментов АОС (каталазы, СОД и ГП), что согласуется с литературными данными (Qiao Z. et al., 2016, Yu L. et al., 2017). Аналогичные изменения происходят и в условиях иммобилизационно-болевого стресса в митохондриях клеток сердца и мозга. Соединение РГПУ-207 и препараты сравнения ограничивали процессы ПОЛ и усиливали антиоксидантную защиту в митохондриях клеток мозга и сердца в условиях стрессорного и ишемического повреждения (рис. 4, рис. 5, рис. 6, рис. 7).

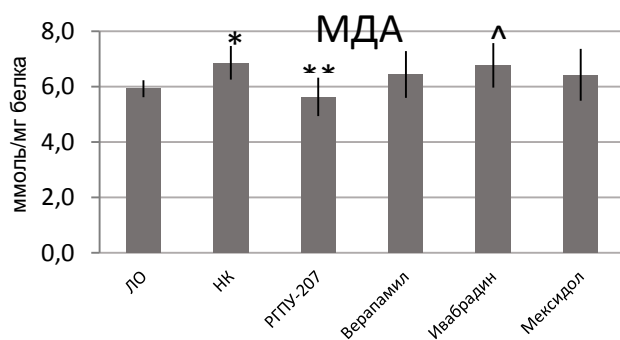
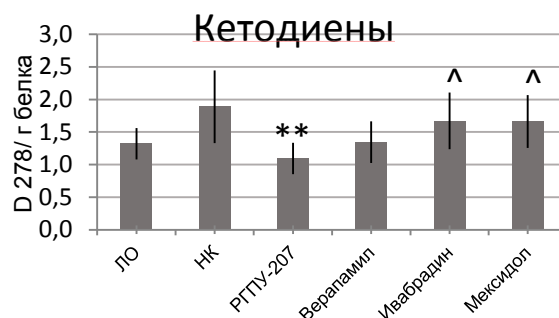
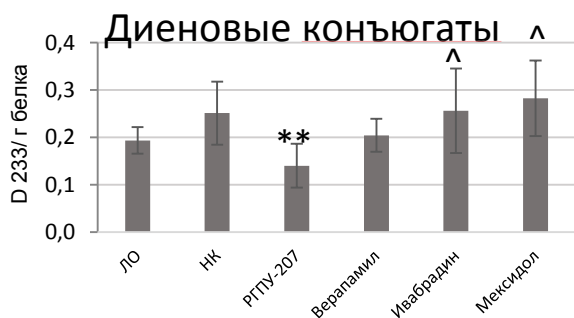


Рисунок 4. Влияние соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на содержание продуктов ПОЛ в гомогенате сердца крыс после 30-минутной окклюзии и реперфузии.

*- $p < 0,05$ изменения достоверны относительно ЛО животных по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана;

** - $p < 0,05$ изменения достоверны относительно животных НК по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана; ^- $p < 0,05$ изменения достоверны относительно животных, получавших соединение РГПУ -207 по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана. ЛО – ложнооперированные, НК – негативный контроль

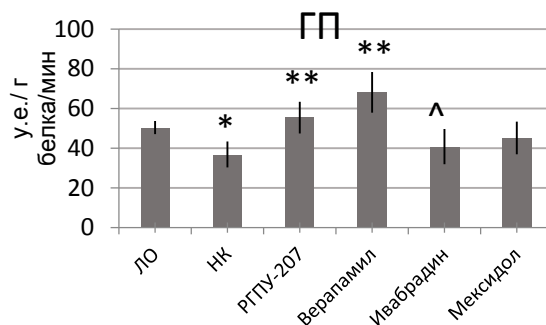
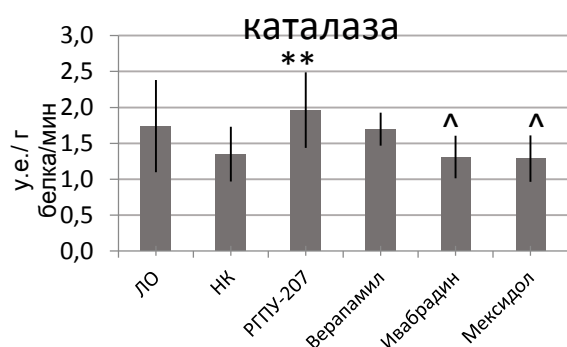


Рисунок 5. Влияние соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на активность ферментов АОС в гомогенате сердца крыс после 30-минутной окклюзии и реперфузии

* $p < 0,05$ изменения достоверны относительно ЛО животных по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана;

** - $p < 0,05$ изменения достоверны

относительно животных НК по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана; ^ - $p < 0,05$ изменения достоверны относительно животных, получавших соединение РГПУ -207 по критерию Краскела-Уоллиса и пост-хок тест Дана. ЛО – ложнооперированные, НК – негативный контроль

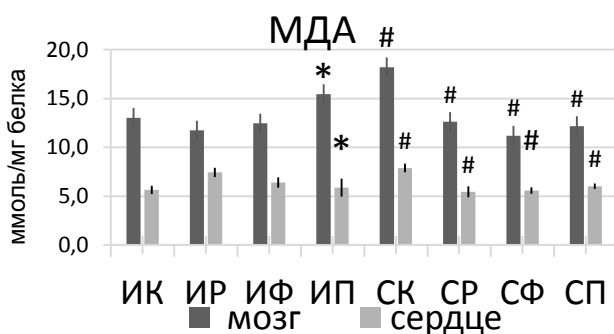
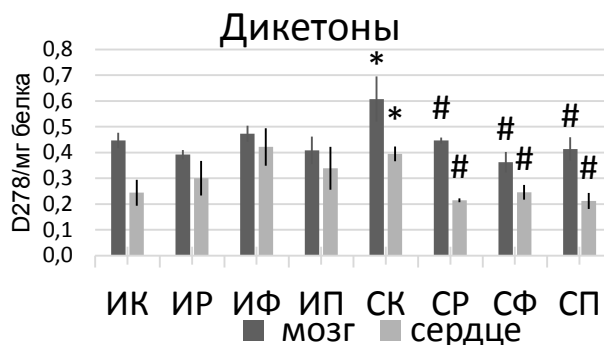
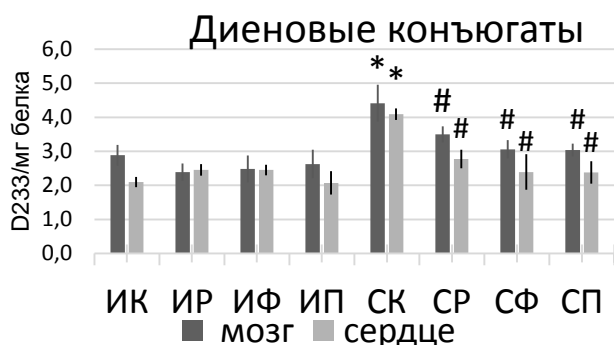


Рисунок 6. Влияние соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на содержание продуктов ПОЛ в митохондриях клеток головного мозга и сердца интактных и стрессированных крыс *- $p < 0,05$ изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно

ИК; # - $p < 0,05$ изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК. ИК-интакт-контроль, ИР- интакт – РГПУ-207, ИФ – интакт-фенибут, ИП – интакт-пирацетам, СК-стресс-контроль, СР- стресс – РГПУ-207, СФ – стресс-фенибут, СП – стресс- пирацетам

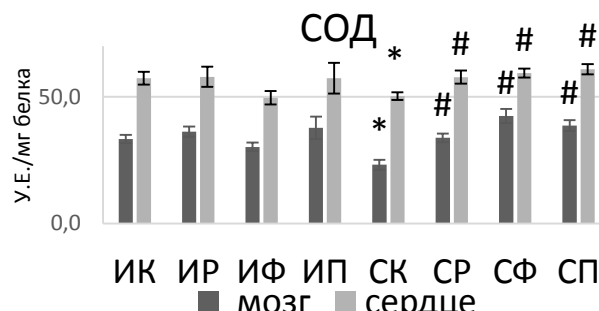
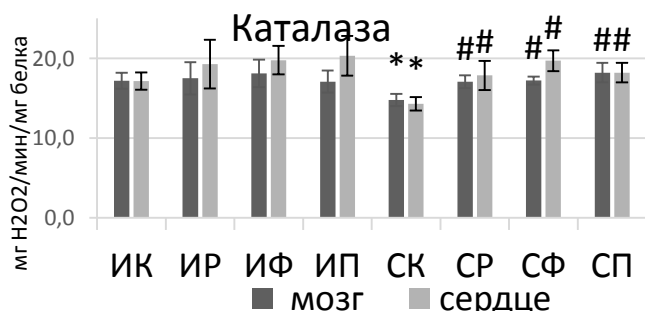


Рисунок 7. Влияние соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на активность ферментов АОС в митохондриях клеток головного мозга и сердца интактных и стрессированных крыс

*- $p < 0,05$ изменения достоверны по

критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # - $p < 0,05$ изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК. ИК-интакт-контроль, ИР- интакт – РГПУ-207, ИФ – интакт-фенибут, ИП – интакт-пирацетам, СК-стресс-контроль, СР- стресс – РГПУ-207, СФ – стресс-фенибут, СП – стресс- пирацетам

Активация ПОЛ при стрессе может быть следствием синтеза митохондриального супероксида, образуемого в I комплексе дыхательной цепи (Chouchani ET et al, 2016, Murphy MP, 2016). В проведенных нами исследованиях выявлено, что в митохондриях мозга стрессированных животных повышается нестимулированная скорость потребления кислорода (V4) при работе I и II комплексов дыхательной цепи, что может указывать на увеличение проницаемости мембраны митохондрий, вероятно из-за активации процессов ПОЛ (рис. 8).

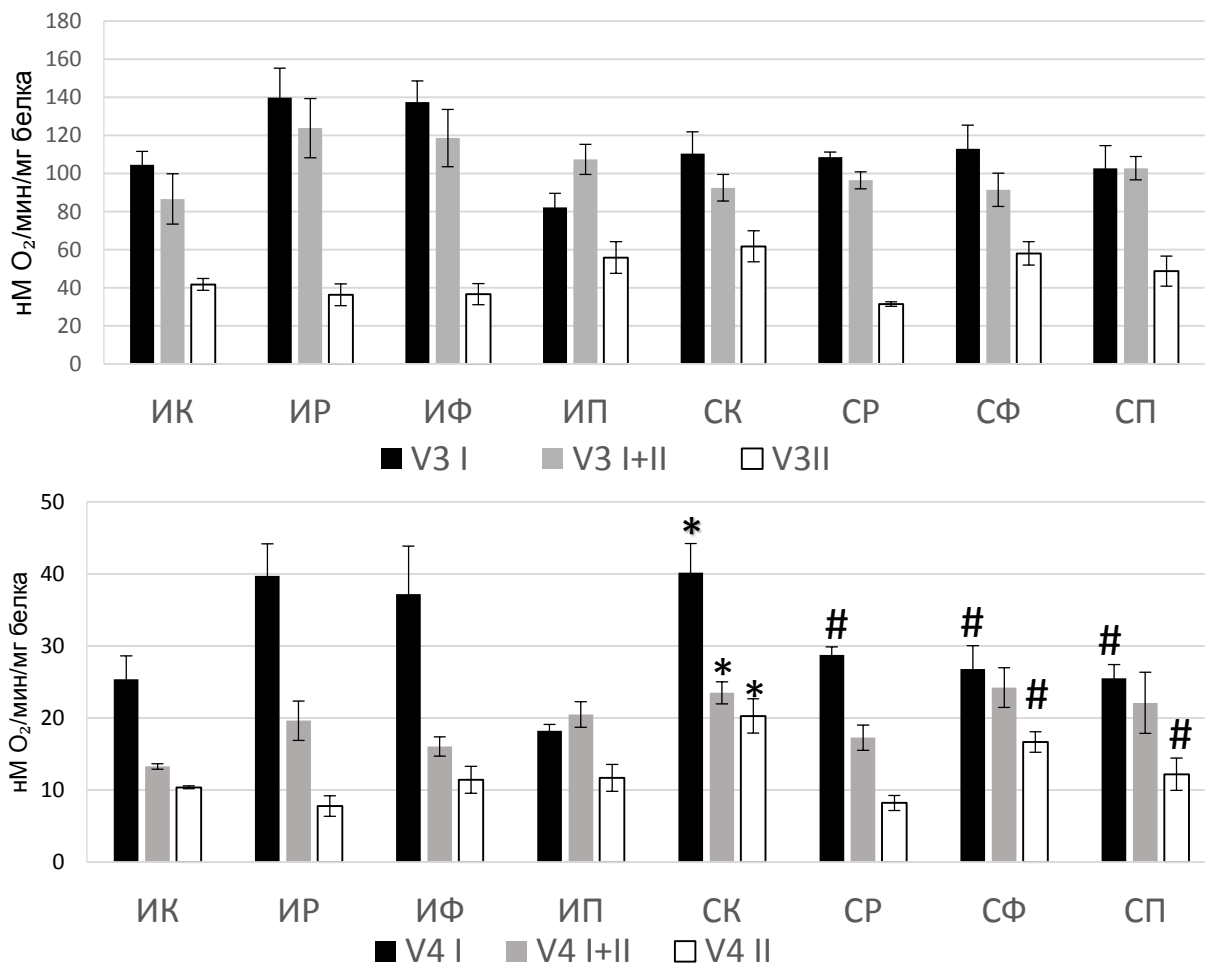


Рисунок 8. Влияние производных ГАМК и референтных препаратов на V3 и V4 митохондрий клеток головного мозга.

Примечания: как на рис. 7.

В митохондриях клеток сердца стрессированных крыс происходит замедление стимулированной скорости поглощения кислорода V3 в условиях работы I и I+II комплексов. У стрессированных животных на фоне рацетама и препаратов сравнения выявлено повышение скорости V3 (Рис. 9).

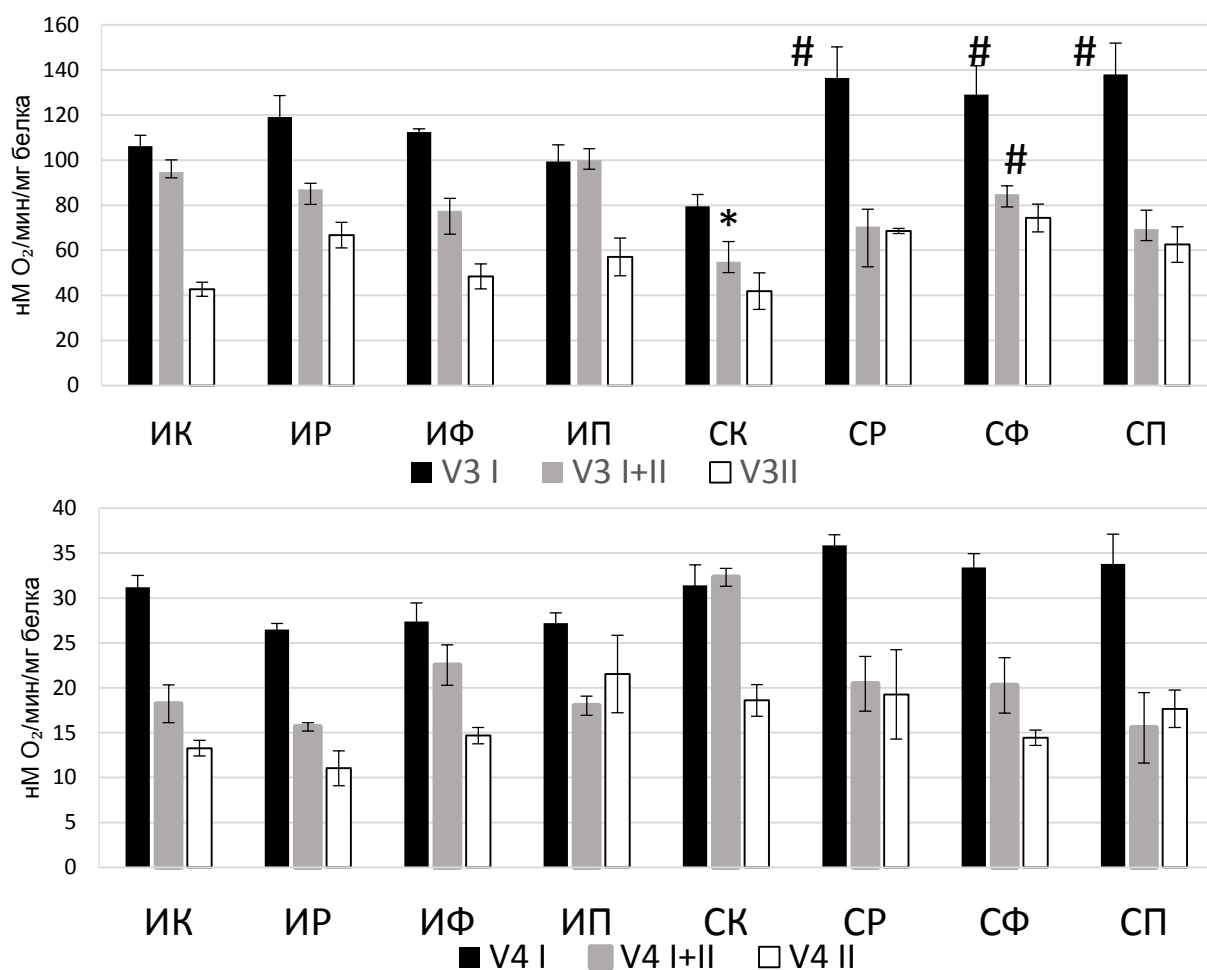


Рисунок 9. Влияние производных ГАМК и референтных препаратов на V3 и V4 митохондрий кардиомиоцитов. Примечания: как на рис. 7.

При стрессорном повреждении кардиомиоцитов в митохондриях клеток сердца при функционировании I и I+II комплексов снижался ДКЧ (рис. 10). В митохондриях мозга – коэффициент уменьшался при раздельном функционировании I и II комплексов (рис. 11). Введение исследуемого соединения и препаратов сравнения способствовало повышению показателя (рис. 10, 11).

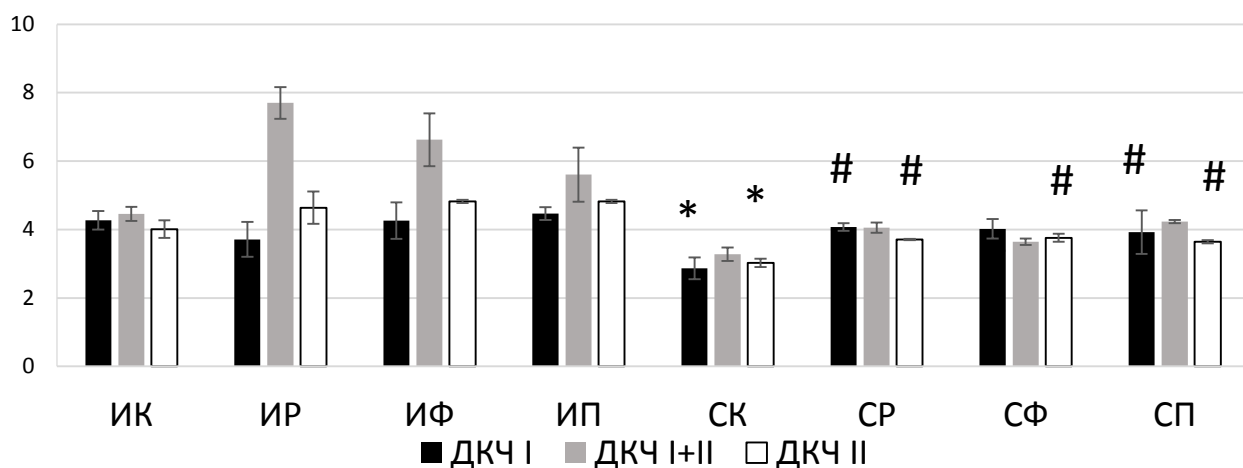


Рисунок 10. Изменение коэффициента дыхательного контроля митохондрий клеток головного мозга по Чансу под влиянием соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама

*- $p < 0,05$ изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # - $p < 0,05$ изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК. ИК-интакт-контроль, ИР- интакт – РГПУ-207, ИФ – интакт-фенибут, ИП – интакт-пирацетам, СК-стресс-контроль, СР- стресс – РГПУ-207, СФ – стресс-фенибут, СП – стресс- пирацетам.

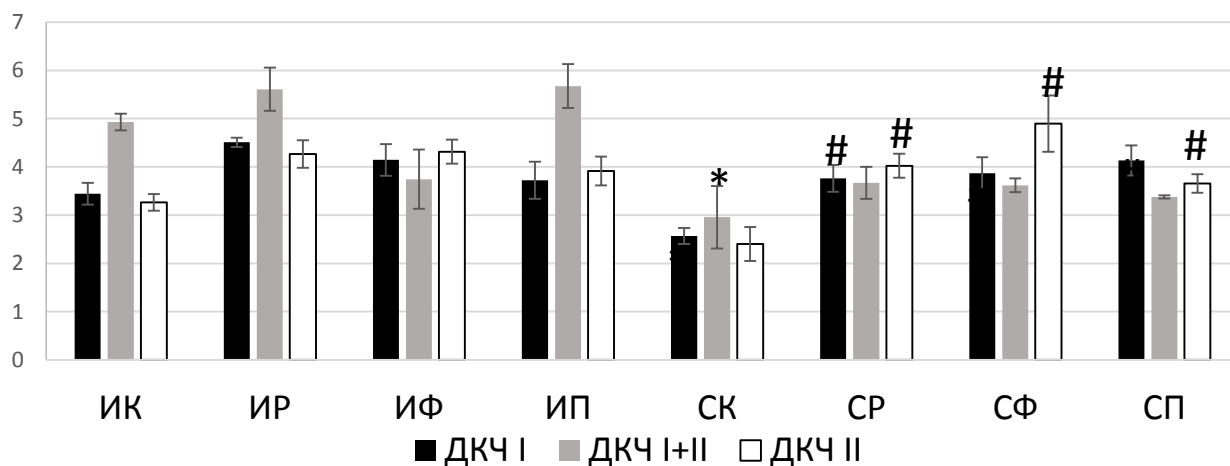


Рисунок 11. Изменение коэффициента дыхательного контроля митохондрий кардиомиоцитов по Чансу под влиянием соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама

Примечания: как в рис. 10.

Известно, что ИБС сопровождается инициацией тромбообразования как за счет стимуляции тромбоцитарного звена, так и за счет активации плазменных факторов свертывания. В этой связи было изучено влияние соединения РГПУ207 на тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз. Выявлено, что исследуемое соединение и препараты снижают концентрацию фибриногена в плазме крови стрессированных животных, скорость и степень агрегации тромбоцитов у стрессированных животных. (таб. 11).

Таблица 11. Влияние соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама на показатели плазменно-коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза интактных и стрессированных животных (M±σ).

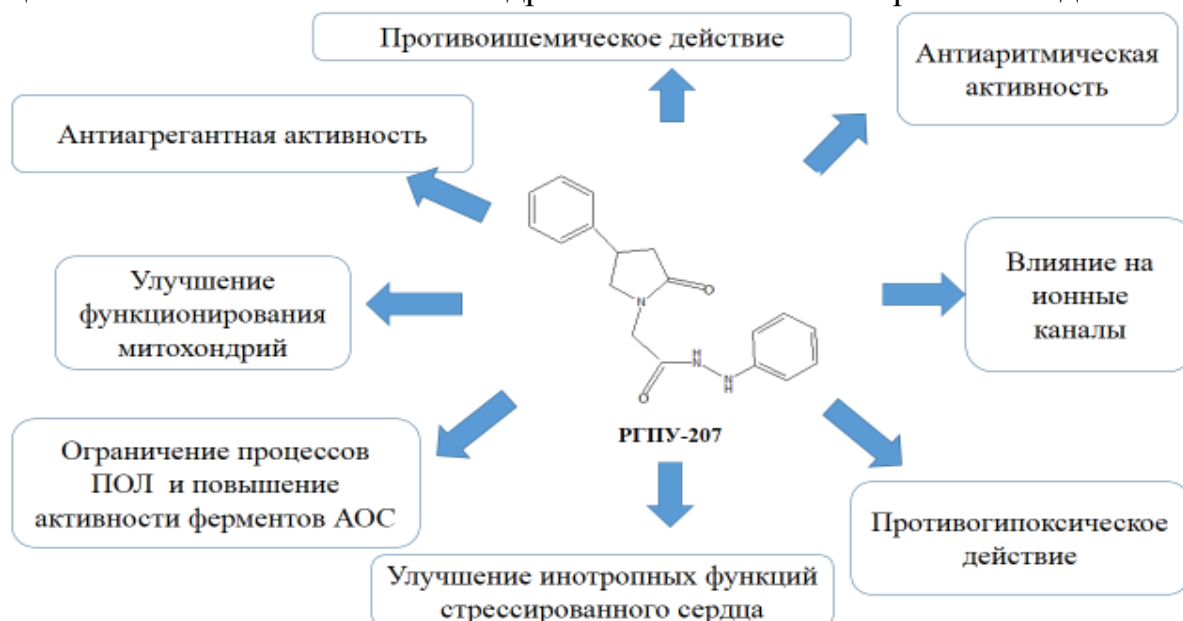
Группы животных	Степень агрегации тромбоцитов, %	Скорость агрегации тромбоцитов, %/мин	АЧТВ, с	ПВ, с	ФГ, г/л
Интактная	27,6±2,5	23,1±2,0	18,8±2,1	23,9±3,4	4,0±0,6
Интакт- РГПУ-207	23,6±4,3	20,6±8,2	18,4±2,8	17,0±4,2	4,6±0,9
Интакт- фенибут	26,2±7,3	21,8±7,1	18,1±3,3	17,7±3,2	3,8±0,7
Интакт-пирацетам	23,6±6,2	19,6±6,9	17,7±4,2	18,6±5,1	3,8±0,3
Стресс+физ.р-р	33,8±4,08*	28,7±2,9*	14,9±3,6*	17,5±2,2*	4,9±0,5*
Стресс+ РГПУ-207	25,0±4,7#	22,7±3,8#	14,1±3,6	14,8±2,3	4,2±0,5#
Стресс+ фенибут	27,6±4,6#	22,6±6,9#	13,8±2,8	18,0±1,2	4,2±0,3#
Стресс+ пирацетам	26,2±4,7#	22,1±4,0#	13,5±1,7	17,3±2,5	4,3±0,2#

Примечания: * - изменения достоверны относительно животных интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самцов (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В **Обсуждении** приводится анализ полученных результатов исследования, их интерпретация с учетом литературных данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного скрининга среди 12 новых рацетамов было выявлено соединение РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты), оказывающее кардиопротекторное действие в условиях 10-ти и 30-минутной ОНВЛКА. Продемонстрировано, что новое производное α-пирролидона обладает антиаритмическим действием, модулирует функционирование ионных каналов мембран, обладает противогипоксическим эффектом, улучшает инотропную функцию стрессированного миокарда, ограничивает процессы ПОЛ, повышает активность ферментов АОС, сохраняет функциональное состояние митохондрий и оказывает антиагрегантное действие.



ВЫВОДЫ

1. Среди 12 производных пирролидона-2 (рацетамов) обнаружено соединение РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты), которое в дозе 9,4 мг/кг оказывает максимально выраженный противоишемический эффект в условиях 30-минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией. При увеличении дозы до 18,7 и 37,5 мг/кг значительного усиления действия не было обнаружено. Исследуемое вещество в условиях 30-минутной ишемии и реперфузии снижает размер зоны некроза миокарда на 44 % по отношению к значениям группы негативного контроля.

2. На основании анализа зависимости противоишемической активности рацетамов от химической структуры выявлено, что наибольшим кардиопротекторным эффектом обладают соединения, у которых в 1-м положении пирролидинового цикла находится фенилацетилгидразидный радикал. Среди этой группы соединений максимальный противоишемический эффект оказывает соединение РГПУ-207, в структуре которого в 4-м положении пирролидинового цикла находится фенильный радикал.

3. На фоне введения аконитина соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг оказывает антиаритмический эффект, снижает частоту появления фибрилляций и смертность в 3 раза по отношению к показателям контрольной группы. В условиях хлоридкальциевой аритмии исследуемое вещество в дозе 37,5 мг/кг уменьшает долю животных с грубыми нарушениями ритма сердца в 3 раза, а гибель – в 3,8 раз по сравнению с контрольной группой. При моделировании реперфузионных аритмий соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 снижает тяжесть нарушений ритма сердца и летальность среди крыс по отношению к контрольной группе.

4. У животных, перенесших острый иммобилизационно-болевого стресс, соединение РГПУ-207 оказывает кардиопротекторное действие, о чем свидетельствует прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, в 1,5 раза при проведении нагрузки объемом и пробы на адренореактивность, при изометрической нагрузке – в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

5. Соединение РГПУ-207 при апноэ обладает антигипоксическим эффектом, удлиняет время биоэлектрической активности сердца на 34% по отношению к таковому контрольной группы, увеличивает продолжительность жизни в условиях гипоксии. У животных, получавших соединение РГПУ-207 и подвергшихся 24-часовому иммобилизационно-болевному стрессу, скорость и степень агрегации тромбоцитов, а также уровень фибриногена был ниже соответственно на 21%, 26% и 15% по сравнению с показателями стрессированных животных контрольной группы.

6. Исследуемое соединение способствует ограничению процессов ПОЛ, развивающихся вследствие ишемического поражения миокарда, на что указывает более низкий уровень ДК, кетодиенов и МДА и более высокая активность СОД, каталазы и ГП по сравнению с показателями крыс контрольной группы. Аналогичный эффект проявляется и в условиях острого стресса в клетках мозга и сердца. Уменьшение содержания продуктов ПОЛ при введении соединения РГПУ-207 составляет в среднем 32%, повышение активности

ферментов АОС - на 26 % по отношению к таковым стрессированных животных, получавших физ. р-р.

7. Соединение РГПУ-207 оказывает защитное действие на митохондрии сердца и мозга при стрессорном воздействии. Скорость потребления кислорода V_4 при работе I комплекса дыхательной цепи митохондрий мозга снижается на 42%, при этом дыхательный контроль возрастает на 42% при окислении малата и на 37% при окислении сукцината по отношению к показателям контрольной группы. В митохондриях сердца при работе I комплекса скорость V_3 повышается на 72%, а дыхательный контроль I и II комплексов – на 46% и 67% соответственно по сравнению с таковыми контрольной группы.

8. Соединение РГПУ-207 влияет на работу ионных каналов мембраны моллюсков. В концентрации 1 мкМ вещество активирует калиевый ток, в более высоких концентрациях (1000 мкМ) соединение обратимо подавляет натриевые, кальциевые и калиевые трансмембранные токи.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно продолжение углубленного изучения кардиотропных свойств соединения РГПУ-207 с целью создания на его основе лекарственного препарата для предупреждения и лечения ишемического и стрессорного поражения миокарда.

2. Даны рекомендации по направленному синтезу и дальнейшему скринингу новых соединений с кардиопротекторным действием среди циклических аналогов ГАМК (рацетамов).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Игнатов Ю.Д., Тюренков И.Н., Вислобоков А.И., Перфилова В.Н., Мокроусов И.С. Изменения трансмембранных ионных токов нейронов моллюсков под влиянием соединения РГПУ-207 // Биологические мембраны. - 2013. - Т.30. №3. - С.206-213.

2. Игнатов Ю.Д., Тюренков И.Н., Вислобоков А.И., Перфилова В.Н., Мокроусов И.С. Влияние соединения РГПУ-207 и амиодарона на ионные токи нейронов моллюсков // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. Т.76. - № 8. - 2013. С. 3-8.

3. Мокроусов И. С. Кардиопротекторный эффект соединения РГПУ-207 в условиях 30-минутной ишемии миокарда и реперфузии // Вестник ВолгГМУ. - 2014. - №3 (51). - С.44-47.

4. Перфилова В.Н., Тюренков И.Н., Попова Т.А, Мокроусов И.С., Прокофьев И.И., Михайлова Л.И., Жакупова Г.А., Мирошникова А.С. Влияние нового производного ГАМК на развитие окислительного стресса у крыс в условиях 30-минутной ишемии и реперфузии миокарда // Экспериментальная и клиническая фармакология. – Т. 78. - № 9. – 2015. – С. 8-12.

5. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Мокроусов И.С., Зайпуллаев Г.И., Прокофьев И.И., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Кардиопротекторное действие нового производного ГАМК – соединения РГПУ-207 – в условиях

острого иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия // Современные проблемы науки и образования. - № 4. - 2016. - С. 100. URL: <https://www.science-cation.ru/ru/article/view?id=25042> (дата обращения: 07.10.2016).

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Мокроусов И.С., Бородин Д.Д. Изучение противоаритмического действия производного ГАМК соединения РГПУ-207 // Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств: материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием. Вестник ВолгГМУ (приложение). - Волгоград. - 2012. - С. 124-125.

2. Мокроусов И.С. Противоишемическое и противоаритмическое действие соединения РГПУ-207 в условиях ишемии миокарда крыс с последующей реперфузией // Материалы XVIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. - Волгоград, 5-8 ноября 2013 г. - С. 33-35.

3. Мокроусов И.С. Противоишемическое действие в условиях 30-минутной ишемии миокарда крыс с последующей реперфузией // Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 16-19 апреля 2014 г. - С. 232-233.

4. Мокроусов И.С., Половнева Ю.И. Влияние соединения РГПУ-207 на выраженность ишемического и реперфузионного повреждения миокарда // Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», посвященной 80-летию ВолгГМУ. - Волгоград, 22-25 апреля 2015 г. – С. 327-328.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система

АФК - активные формы кислорода

АЧТВ – активированное частичное
тромбопластиновое время

ГП – глутатионпероксидаза

ДК – диеновые конъюгаты

ДКЧ – дыхательный контроль по
Чансу

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ЛЖД - левожелудочковое давление

МДА - малоновый диальдегид

МИФС-максимальная интен-
сивность функционирования
структур

НРС – нарушения ритма сердца

ОНВЛКА – окклюзия нисходящей
ветви левой коронарной артерии

ПВ – протромбиновое время

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СОД — супероксиддисмутаза

ФГ - фибриноген

ФСОИ – функциональное состояние
очага ишемии

ЧСС - частота сердечных сокращений

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

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

**Мокроусов
Иван Сергеевич**

**КАРДИОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАЦЕТАМОВ И НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ
МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать __.__. 2017 г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная Усл. -печ. л. __.
Усл. изд. л. __ Тираж 100 экз. Заказ __
Отпечатано в типографии