

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
**«Волгоградский государственный медицинский университет»**  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Мокроусов Иван Сергеевич**

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

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

Научный консультант:  
профессор кафедры фармакологии  
и биофармации ФУВ,  
доктор биологических наук  
Перфилова Валентина Николаевна

ВОЛГОГРАД, 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ИШЕМИЧЕСКОЕ И СТРЕССОРНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	10
1.1. Ишемическое, реперфузионное и стрессорное повреждение миокарда ..	11
1.1.1. Метаболические изменения в миокарде при ишемии и реперфузии .....	11
1.1.1.1. Роль окислительного стресса в патогенезе ишемического и реперфузионного поражения сердца .....	15
1.1.1.2. Митохондриальная дисфункция при окислительном стрессе .....	17
1.1.2. Стрессорное повреждение миокарда .....	21
1.1.3. Аритмогенные эффекты ишемии и стресса .....	24
1.2. Фармакологические эффекты рацетамов .....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: .....	38
ГЛАВА 3. СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ С АНТИАНГИНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ рацетамов .....	52
3.1. Изучение влияния соединений на функциональное состояние очага ишемии миокарда при окклюзии коронарной артерии .....	52
3.2. Исследование зависимости «доза-эффект» соединения-лидера РГПУ-207 .....	57
3.3. Оценка влияния РГПУ -207 на размеры зон риска ишемии и некроза миокарда в условиях 30-минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией .	60
3.4. Изучение противоритмического действия соединения РГПУ -207 на различных моделях нарушений ритма сердца (аконитиновая, хлоридкальциевая, реперфузионная модели) .....	62
3.4.1. Изучение противоритмического влияние соединения РГПУ -207 на реперфузионной модели аритмий. ....	63

3.4.1.1. Исследование противоаритмического действия соединения РГПУ - 207 при кратковременной 10-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией. .....	63
3.4.1.2. Оценка противоаритмического эффекта соединения РГПУ -207 при длительной 30-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией.....	66
3.4.2. Оценка действия соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи нейронов моллюсков.....	68
3.4.3. Исследование противоаритмического эффекта соединения РГПУ -207 на аконитиновой модели аритмий.....	73
3.4.4. Оценка противоаритмического действия соединения РГПУ -207 на хлоридкальциевой модели аритмий.....	75
3.5. Изучение влияния соединения РГПУ-207 на функциональные резервы сердца при стрессе .....	77
4. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ-207 .....	86
4.1. Исследование антигипоксанта действия соединения РГПУ-207 .....	86
4.2. Изучение влияние соединения РГПУ-207 на развитие окислительного стресса в условиях 30-минутной окклюзии и реперфузии НВЛКА .....	87
4.3. Оценка действия соединения РГПУ -207 на развитие процессов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в условиях стресса.....	92
4.4. Исследование эффекта соединения РГПУ -207 на функциональное состояние митохондрий миокарда и мозга при стрессе.....	104
4.5. Изучение влияния соединения РГПУ -207 на состояние системы гемостаза в условиях стресса .....	115
5. ОБСУЖДЕНИЕ .....	119
ВЫВОДЫ.....	132
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	138

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

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  $\beta$ -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  $\text{Na}^+$ , а затем и  $\text{Ca}^{2+}$  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 и методы 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**

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 апробация 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 ВолгГМУ 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 машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 4 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.

## **ГЛАВА 1. ИШЕМИЧЕСКОЕ И СТРЕССОРНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Болезни системы кровообращения (БСК) занимают лидирующую роль в структуре причин смертности населения Российской Федерации (940,5 тыс. чел. из 1878,0 тыс. чел. на 2014 год), из них половину случаев занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС) (492,3 тыс. чел.) и 63,9 тыс. чел. – инфаркт миокарда (Здравоохранение в России, 2015). Описанное соотношение причин смертности сохраняется неизменным на протяжении 10 лет (в 2005 г. 56 % случаев БСК, 27% - ИБС и 3% - инфаркт миокарда. Притом заболеваемость ИБС в России нарастает в течение 5 лет (495,2 чел. на 100 000 чел. в 2010 г. против 673,8 чел. на 100 000 чел. в 2014 г.).

Существует большое количество классификаций данной нозологии. ИБС представляет собой поражение миокарда, вызванное нарушением кровотока по коронарным артериям заболевание миокарда (Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца, 2013). Из множества существующих классификаций ИБС в России широко распространена утвержденная в 1984 г в ВКНЦ АМН СССР и основанная на Международной Классификации Болезней IX пересмотра и рекомендациях Комитета экспертов ВОЗ (1979 г) (Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца, 2013). Согласно ей к ИБС относят большое количество видов нозологии, такие как стенокардия напряжения, инфаркт миокарда и др. Все эти формы имеют общие звенья патогенеза.

## **1.1. Ишемическое, реперфузионное и стрессорное повреждение миокарда**

### **1.1.1. Метаболические изменения в миокарде при ишемии и реперфузии**

В кардиомиоците существуют 2 альтернативных пути энергообразования, отличающиеся между собой по эффективности продукции АТФ и потреблению кислорода, но приводящие к синтезу ацетил-КоА. Первый путь состоит в  $\beta$ -окислении длинноцепочечных жирных кислот, второй заключается в окислении глюкозы (гликолиза) или лактата. В митохондриях ацетил-КоА включается в цикл Кребса, где образуются молекулы НАДН и ФАДН. цепь переноса электронов (ЦПЭ) запасает энергию, выделяющуюся в ходе окисления НАДН и ФАДН молекулярным кислородом в форме трансмембранного протонного потенциала за счёт последовательного переноса электрона по цепи, сопряжённого с перекачкой протонов через мембрану (Рисунок 1). Протонный потенциал преобразуется АТФ-синтазой в энергию химических связей АТФ. Сопряжённая работа ЦПЭ и АТФ-синтазы носит название окислительного фосфорилирования.

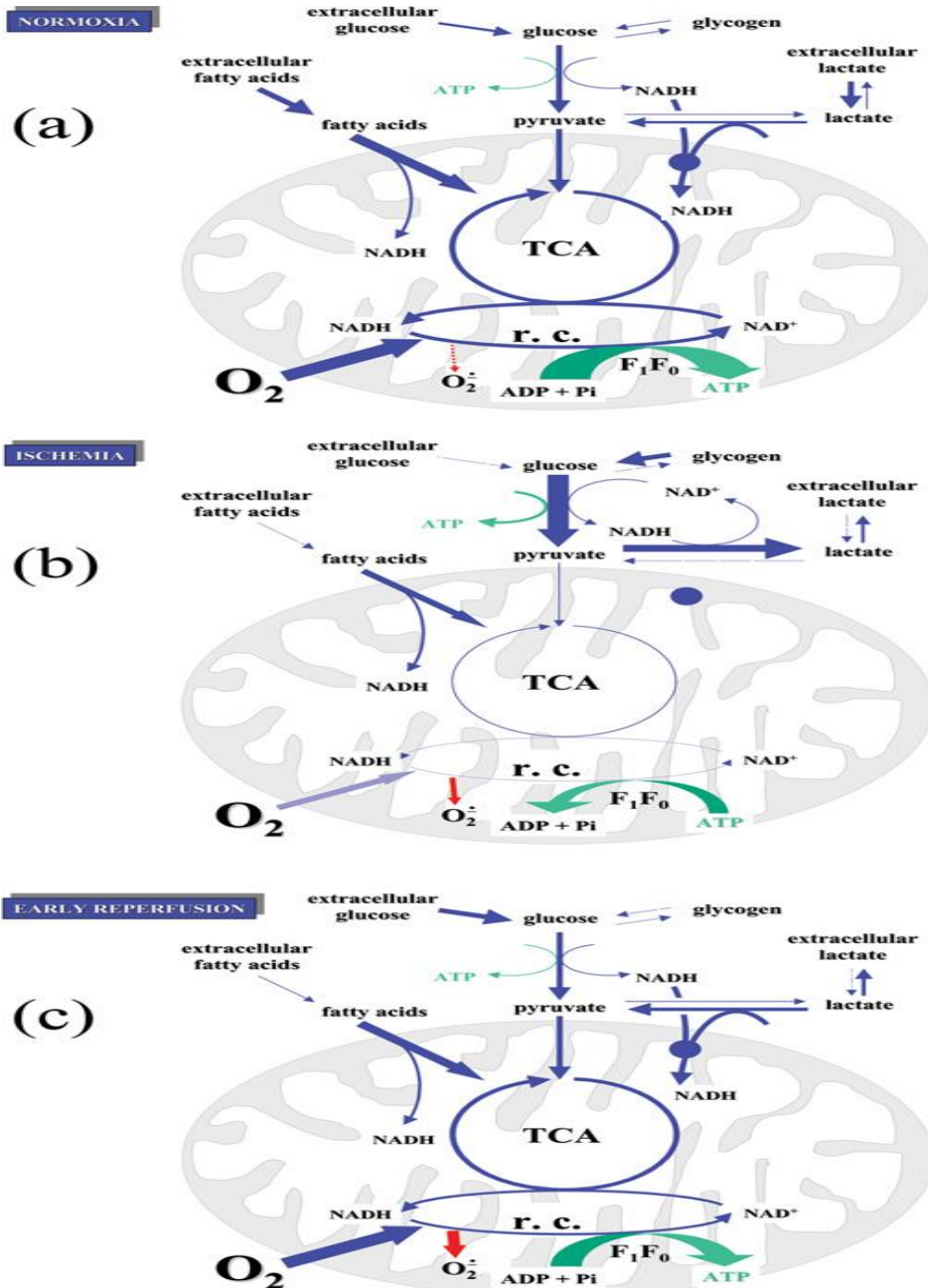


Рисунок 1 Изменения метаболизма клетки в условиях ишемии и реперфузии (Solaini, 2005).

При нормоксии (А) окисление жирных кислот обеспечивает большую часть АТФ. В условиях ишемии (В) гликолиз является основным источником АТФ. Ранняя реперфузия (С) приводит к увеличению производства активных форм кислорода (АФК). Синие стрелки указывают на метаболические потоки; зеленые стрелки означают производство и гидролиз АТФ; красные стрелки показывают производство АФК (ROS); r.c. - ЦПЭ; O<sub>2</sub><sup>-</sup> указывает на все АФК; толщина стрелки означает относительную интенсивность потоков.

В условиях нормоксии преобладает  $\beta$ -окисление, так как оно эффективнее по числу образованных молекул ацетил-КоА, но этот путь требует большого количества кислорода. Поэтому в условиях гипоксии в ткани преобладает анаэробный гликолиз, в процессе которого глюкоза окисляется до пирувата. Активность пируватдегидрогеназного комплекса подавляется в присутствии продуктов реакции (ацетил-КоА и NADH+H) и жирных кислот (как компонента альтернативного пути образования ацетил-КоА при  $\beta$ -окислении). Поэтому при недостаточности кислорода пируват под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ) переходит в лактат, что приводит к развитию ацидоза клетки (после 30 минут ишемии pH падает до 5,5-6,0 (de la Roche J, 2016, Smith, D. R., Trueblood, 2000) и запуску патологических реакций (Рисунок 2).

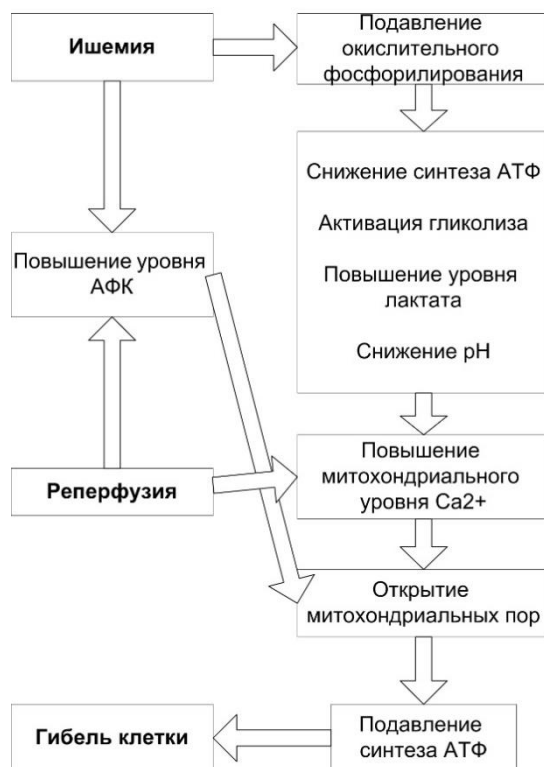


Рисунок 2. Механизм ишемического и реперфузионного повреждения клетки

Вероятно, в ответ на понижение pH при ишемии и реперфузии (Lee JC, 2015) ионы  $\text{Na}^+$  проникают в клетку через сарколемный  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменник (Ronchi C et al., 2017, Yamamoto, S., 2002). Исследования указывают на то,

что внутриклеточная концентрация  $\text{Na}^+$  возрастает примерно в 2 раза в перфузируемом сердце в течение 20-30 мин ишемии с дальнейшим увеличением на 50-150% в течение 30-60 мин реперфузии (Varadarajan S.G., 2001, Iwai T., 2002). Во время реперфузии для увеличения рН  $\text{Na}^+$  продолжает поступать в клетку (через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменник и  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  симпорт) (Van Borren M.M.G.J., 2004). Повышенный уровень  $\text{Na}^+$  вызывает набухание митохондрий и аномальную митохондриальную проницаемость (Iwai T., 2002) и стимулирует обратную работу сарколемного  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменника, что приводит к повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и, следовательно, к перегрузке  $\text{Ca}^{2+}$  (Hall AR et al., 2016).

В течение ишемии цитоплазматический уровень  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает значительно, так как АТФ-зависимые каналы (в частности саркоплазматический  $\text{Ca}^{2+}$  насос) становятся менее активными. Митохондриальная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  также имеет тенденцию к росту, но этот подъем ограничен пониженным мембранным потенциалом. Выраженное увеличение митохондриального уровня  $\text{Ca}^{2+}$  происходит во время реперфузии, когда реполяризуется митохондриальная мембрана (Cheema Y et al., 2011). Исследования Varadarajan и др. (2001) на сердцах морских свинок показали, что во время ишемии митохондриальная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  поднимается приблизительно в 2 раза, в то время как при реперфузии - в 4-5 раз. Они также показали, что высокий уровень  $\text{Ca}^{2+}$  сохраняется до 1 ч во время реперфузии, несмотря на то, что концентрация его в цитоплазме возвращается к норме в течение 10 мин, предполагая, что ишемия провоцирует нарушения обмена  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях.

Говоря о повышенном содержании кальция в сарколемме, необходимо указать на то, что  $\text{Ca}^{2+}$  является одним из важнейших вторичных мессенджеров и участвует во внутриклеточной передаче сигнала с активацией протеинкиназ и усилении экспрессии регуляторных и структурных белков, необходимых для адаптации в условиях ишемии.

Вполне вероятно, что это ненормальное распределение  $\text{Ca}^{2+}$  играет важную роль в ишемическом/реперфузионном повреждении клеток. Некоторые исследователи показали, что если блокируется вход  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии, то повреждение клеток значительно снижается. Известно, что рутений красный, который блокирует митохондриальный унипорт  $\text{Ca}^{2+}$ , оказывает защитное действие (Foskett JK et al., 2015), как и другие соединения, препятствующие входу  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии (Yamamoto, S., 2002, Iwai, T., 2002, Arieli, Y., 2004, Rodrigo, G. C., 2002).

Также обнаружено, что чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимому ингибированию окислительного фосфорилирования и открытию митохондриальной поры различается между двумя субпопуляциями миокардиальных митохондрий: субсарколеммных и межфибриллярных. Субсарколеммные митохондрии более уязвимы к воздействию  $\text{Ca}^{2+}$  перегрузки чем межфибриллярные (Ekhsen L., 2012).

#### **1.1.1.1. Роль окислительного стресса в патогенезе ишемического и реперфузионного поражения сердца**

В кардиомиоцитах, как и во многих других клетках, образуются активные формы кислорода (АФК). При нормальных физиологических условиях 1-2% от потока электронов через дыхательную цепь приводят к образованию АФК (Gnaiger, E. 2002,). Некоторые защитные реакции индуцируются низкими уровнями АФК, в частности, транскрипция генов и пролиферация клеток (Ristow M et al., 2014), но более высокие уровни, в конечном счете, приводят к гибели клеток путем апоптоза или некроза (Kang, P. M. , 2000, Levrant, J., 2003).

В нормальных условиях механизмы обезвреживания избытка АФК работают быстро. Супероксиддисмутаза (СОД) инактивирует супероксид – анион ( $\text{O}_2^-$ ) в цитозоле (Cu/Zn-СОД) и в митохондриях (Mn-СОД) (Bi Z et al., 2014), полученный в результате  $\text{H}_2\text{O}_2$  удаляется с помощью каталазы, глутатионпероксидазы и пероксиредоксина (Bauer G., 2017). Но эти защитные механизмы могут не справиться при повышенном уровне АФК,

что является важной причиной ишемического / реперфузионного повреждения. Значимость АФК в отношении индукции ишемического повреждения показана при исследовании защитного эффекта у трансгенных мышей с гиперэкспрессией Mn-SOD при перфузии сердца (Campos JC et al., 2016). Работа Yu L. и др. (2017) указывает на уменьшение активности СОД при ишемии, но в то же время другие исследования говорят о повышении активности, связанной с митохондриальной защитой и снижением апоптоза, возможно, через механизм с участием белков теплового шока (Hsp72) (Suzuki, K., 2002).

Показано, что комплексы I и III цепи переноса электронов в своем восстановленном состоянии способны образовывать АФК, в том числе через убисемихиноновые радикалы (Quinlan CL, 2013). Исследования указывают на то, что комплекс II может также производить АФК (Mráček T., 2014).

В последнее время было показано, что накопленный сукцинат в гораздо большей степени, чем любой другой митохондриальный метаболит в условиях ишемии способен присоединять электрон, который затем используется комплексом I для образования супероксида путем ОПЭ во время реперфузии (Chouchani, E.T, 2014). Сукцинат, который накапливается в течение долгого времени в ишемических тканях, при реперфузии очень быстро окисляется, вызывая образование АФК (Chouchani, E.T, 2014).

Реперфузия приводит к гиперконтрактуре миокарда и повреждению мембраны с последующей гибелью кардиомиоцитов (Piper, H. M., 2004). Эти явления объясняются изменением уровня  $Ca^{2+}$  в клетке, связанного с обратной работой  $Na^+/Ca^{2+}$  обменника, в ходе которого увеличивается концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, что в сочетании с восстановлением  $\Delta\mu_{H^+}$  приводит к накоплению  $Ca^{2+}$  в митохондрии через унипорт (Рисунок 2). Кроме того, быстрое окисление сукцината способствует образованию АФК и повреждению мембран кардиомиоцитов.

Общепринятым является мнение, что при длительной ишемии активность ферментов дыхательной цепи уменьшается, а тяжесть



повреждения зависит от продолжительности воздействия. Это связано со структурными изменениями митохондрий, необратимыми повреждениями кардиомиоцитов и с потерей способности митохондрий окислять НАД-связанные субстраты (Scolletta S et al., 2010, Onwugbufor M, 2016).

### **1.1.1.2 Митохондриальная дисфункция при окислительном стрессе**

Многие исследователи определили комплекс I в качестве основного места повреждения дыхательной цепи при ишемии (Yang M. et al., 2014, Baniene R, et al, 2016, Gorenkova N et al.,2013). Они наблюдали снижение скорости окисления НАДН-связанных субстратов до 60%. Как правило, скорость окисления сукцината не изменялась, что означает снижение активности только комплекса I. Отмечено, что при реперфузии инактивация ферментов может усилиться (Paradies, G., 2004).

Проведены прямые измерения активности комплекса I в митохондриях сердца собак после полной окклюзии левой передней нисходящей коронарной артерии (Akhnokh МК, 2016, Gadicherla АК, 2012). Активность заметно уменьшилась после 20-30 мин ишемии, что может быть связано с инактивацией фермента при закислении среды (Akhnokh МК, 2016). Аналогичные эффекты наблюдаются в сердце крысы. Gorenkova и др. (2013) обнаружили снижение активности комплекса I в 2 раза в сердцах крыс в условиях 12 минутной глобальной ишемии. Cairns и др. (1997) показали, что повреждения усугублялись реперфузией. Одной из причин ингибирования считают разрушение митохондриального кардиолипина при развитии окислительного стресса (Paradies, G., 2002).

И комплекс II, и комплекс III, как представляется, относительно устойчивы к ишемии и реперфузии. D. P. Lindsay и др. (2015) было установлено, что активность комплекса III уменьшалась в митохондриях ишемического сердца собаки, но медленнее, чем комплекса I. Это снижение совпадало с сукцинат-зависимым потреблением кислорода, что указывает на отсутствие негативного влияния ишемии или реперфузии на комплекс II

(Solaini G. et al., 2005). Petrosillo и др. (2003) показали, что значительный вклад в торможение дыхания следует связать с деградацией кардиолипина вследствие влияния АФК.

Некоторые авторы показали, что активность комплекса IV практически не меняется при ишемии (Bosetti, F., 2004, Solaini G. et al., 2005). Было продемонстрировано, что на комплекс IV не влияла 60-минутная ишемия и 30 минутная реперфузия (Solaini G. et al., 2005).

Тем не менее, в митохондриях, выделенных из ишемизированного сердца, уменьшается поток электронов, проходящий через комплекс IV (Borutaite V., 1996, Lesnefsky E. J., 1997). Это может быть связано с потерей цитохрома с, который опосредует перенос электронов между комплексами III и IV в межмембранном пространстве у субсарколеммных митохондрий во время ишемии. Borutaite и др. (1996) показали, что активность цитохром с оксидазы снизилась почти на 30% при ишемии и что полностью показатели дыхания восстанавливаются при добавлении цитохрома с. Эти авторы также считают, что цитохром с может выходить из митохондрий сердца при воздействии ишемии/реперфузии (Borutaite V., 1996). Наоборот, Veitch и др. (1992) утверждают, что содержание цитохрома с в митохондриях существенно не изменилось после ишемии. Paradies и др. (1999) показали, что, несмотря на то, что уровень цитохрома  $aa_3$  не изменился, его каталитический потенциал был снижен на 25% через 25 минут ишемии и на 15 минуте реперфузии - на 51%. Другие авторы (Cairns C. B., 1997) наблюдали, что ишемия и реперфузия сердца вызывали увеличение отношения окисленный /восстановленный цитохром  $aa_3$ , что указывает на ингибирование ввода электронов в этом комплексе. Также они показали, что после ишемии окислительно-восстановительный баланс может быть скорректирован при введении сукцината, но не цитохрома с. Большинство повреждений комплекса IV происходят после ишемии и во время реперфузии. Возможные механизмы включают потерю или окисление

кардиолипина (Paradies G., 1999, Lesnefsky E. J., 2004), или образование 4-гидроксиноненал-аддуктов (Chen J., 2001).

Можно предположить, что ингибирование цитохромоксидазы либо путем непосредственного повреждения, либо при потере цитохрома с, не имеет большого влияния на скорость дыхания *in vivo*. Этот фермент обычно присутствует в избытке для потребностей дыхания и, таким образом, ограниченное ингибирование комплекса IV вряд ли будет фактором уменьшения окислительного фосфорилирования в пост-ишемических состояниях. Тем не менее, Gnaiger и др. (2000; 2002) отмечают, что исследования активности цитохромоксидазы, как правило, осуществляются в условиях, далеких от физиологических. При низком напряжении кислорода, которое может превалировать *in vivo*, активность цитохромоксидазы может стать фактором, ограничивающим скорость дыхания, как было продемонстрировано Kunz и др. (2000).

В ответ на раздражители, такие как окислительный стресс,  $Ca^{2+}$  перегрузки, гипоксии и цитотоксические препараты АТФ/АДФ-антипортер в мембране митохондрий превращается в неспецифический канал - пору «Mitochondrial Permeability Transition Pore, mPTP», проницаемый для любых низкомолекулярных веществ (McCommis, 2012). Открытие mPTP вызывает деполяризацию внутренней мембраны (ИММ) митохондрий и набуханию матрикса, что приводит к неспецифическому разрыву внешней митохондриальной мембраны (ОММ) из-за большей площади поверхности ИММ, чем ОММ (Kinnally, 2007).

Традиционно mPTP рассматривалась как мультимерный комплекс, который предпологаемо состоит из вольтажзависимого анионного канала (VDAC) в ОММ, периферический бензодиацепиновый рецептор (BPR) в ОММ, адениннуклеотид-транслоказы (ANT) в ИММ, циклофилин D (CyD) - белок митохондриального матрикса, который проявляет пептидилпролил-цис-транс-изомеразную активность, а также некоторые другие белки, такие

как гексокиназа (НК), креатинкиназа (СК) и анти- и проапоптотические белки Bcl-2 and Bax (Mathupala et al., 2006; Gogvadze et al., 2009a).

Открытие mPTP приводит к набуханию и потере нуклеотидов (особенно  $\text{NAD}^+$  и АДФ) и других малых молекул из митохондриального матрикса (Crompton, M. 1990). АФК и неэстерифицированные жирные кислоты также способствуют формированию mPTP. Если повышенная проницаемость остается прежней, митохондрии становятся не способными сохранять субстраты или мембранный потенциал, АТФ и  $\text{NAD}^+$  подвергаются гидролизу, наступает некротическая гибель клетки.

Большое количество погибших кардиомиоцитов создает очаг некроза миокарда, который позже подвергается ремоделированию и приводит к раннему разрыву стенки желудочка, формированию аневризмы или рубца с вовлечением всего пораженного отдела сердца и постепенным развитием дилатации, гипертрофии миокарда (Перуцкий Д.Н., 2011).

Описанные выше биохимические изменения в кардиомиоцитах на фоне нарастающего некроза приводят к нарушению функционирования сердца. Так уже на 60 секунде ишемии сердца у собак снижается инотропная функция и развивается диастолическая дисфункция (Jennings R.B., 2013), несмотря на наличие энергетических запасов. Это явление может объясняться несколькими механизмами. Во-первых, неорганический фосфат, образованный при метаболизме креатинфосфата, ингибирует функцию сократительных белков (Kentish J.C., 1986, Elliott A.C., 1992). Во-вторых, внутриклеточный ацидоз снижает связывание кальция с сократительными белками, подавляя сокращение (Solaro R.J., 1988, Steenbergen C., 1977). Поскольку транспорт кальция и потенциал действия сохраняются на ранних стадиях ишемии, ишемическая систолическая дисфункция, видимо, связана с угнетением функций сократительных белков. Ранние нарушения функционирования ишемизированного сердца являются полностью обратимым, если кровоток быстро восстанавливается в течение 4-5 минут после окклюзии коронарной артерии. Однако более длительные интервалы

коронарной ишемии связаны с длительной дисфункцией несмотря на полное восстановление кровотока, даже если продолжительность окклюзии не достаточно большая, чтобы вызвать гибель кардиомиоцитов (Frangogiannis N.G., 2015).

В дополнение к систолической дисфункции, ишемия миокарда также вызывает диастолическую дисфункцию. Это может быть объяснено образованием побочных продуктов метаболизма (например, лактата), которые вызывают повышение гиперосмолярности ткани, что приводит к увеличению содержания интерстициальной жидкости и снижению эффективности работы миокарда (Steenbergen C., 1985). Также при расслаблении мышечной ткани дефицитная АТФ затрачивается на возврат  $\text{Ca}^{2+}$  в цистерны саркоплазматического ретикулума против диффузионного градиента (Pouleur H., 1990).

Развившийся при ишемии ацидоз вкупе с такими медиаторами как аденозин, брадикинин, гистамин, серотонин, нейропептид Р вызывает активацию ноцицептивных рецепторов симпатического и блуждающего нервов, что приводит к появлению ангинозных болей и развитию стресс-реакции (Sutherland S.P., 2000).

### **1.1.2. Стрессорное повреждение миокарда**

Стресс - это событие, которое представляет собой угрозу гомеостазу и является ответом на стрессор и состоит из активации гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГГА) оси и вегетативной нервной системы (ВНС). Селье был первым, признавшим реакцию на стресс, как запрограммированный, скоординированный и адаптивный процесс выживания (Селье, Г., 1979).

Воздействуя на анализаторы или рецепторы периферической нервной системы, стрессоры активируют вегетативную нервную систему, вызывая образование рилизинг-факторов в гипоталамусе. Рилизинг-фактор и аргинин-вазопрессин высвобождаются из паравентрикулярного ядра гипоталамуса

для контроля секреции адренокортикотропного гормона (АКТГ) из передней доли гипофиза (Stephens M.A., 2016). АКТГ на уровне коркового слоя надпочечников вызывает секрецию глюкокортикоидов, которые обеспечивают гипергликемию, усиление глюконеогенеза, катаболизма белков и обладают иммуносупрессивным эффектом (Рисунок 3).

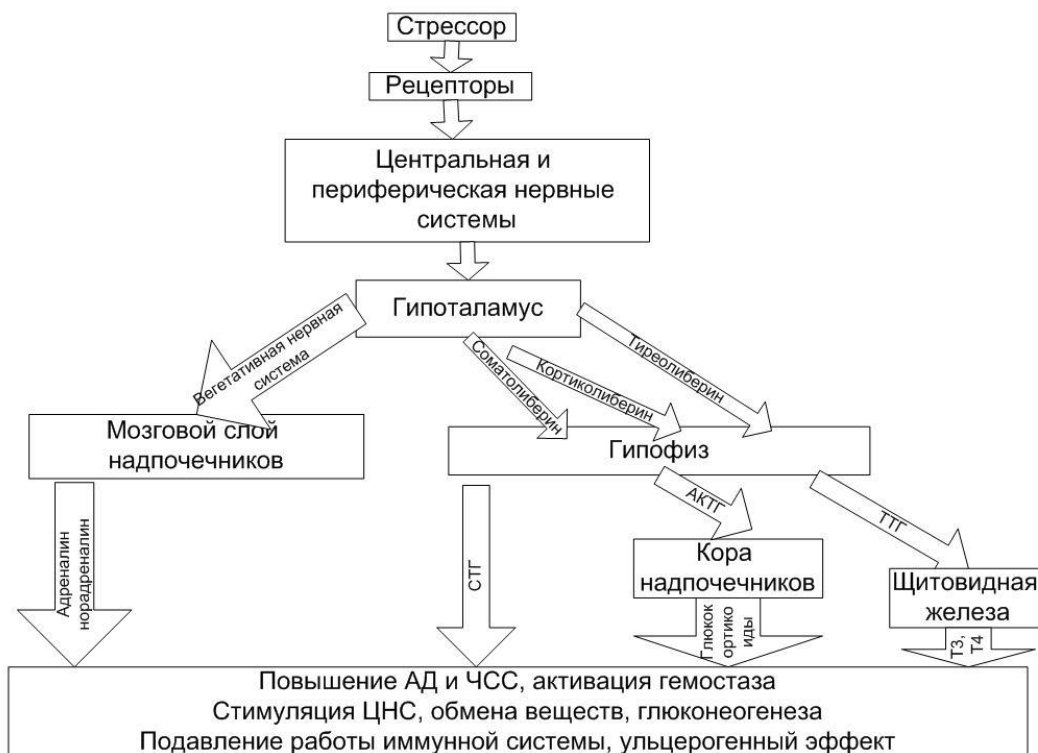


Рисунок 3. Механизм развития стресс-реакции

Наряду с этим активация нейрогипофиза приводит к выбросу катехоламинов из мозговой части надпочечников. Адреналин и норадреналин стимулируют распад гликогена, глюконеогенез, обладают положительными ино- и хронотропными эффектами, что в итоге приводит к адаптации организма и восстановления гомеостаза после воздействия стрессора.

Однако при продолжительном воздействии стрессора происходит срыв адаптационных механизмов за счет истощения ресурсов организма. Воздействие стрессорных гормонов приводит к выраженной вазоконстрикции (Шабалина И.А., 2012), что на фоне усиленной агрегации тромбоцитов (Алисиевич С.В., 2006; Matsuhisa F., 2014), возросших ЧСС и АД вызывает ишемию миокарда. Кроме того, сама ишемия часто

сопровождается болевым синдромом, является сильным стрессом и может вызвать повреждения неишемизированного миокарда (Пшенникова М.Г., 2000). Гиперхолестеринемия, дислипидемия, гипертриацилглицеридемия, развивающиеся вследствие стрессорного нарушения обменных процессов в печени (Фоменко С.Е., 2013), могут играть важную роль в развитии стеноза коронарных сосудов и ишемии миокарда (Рисунок 4).

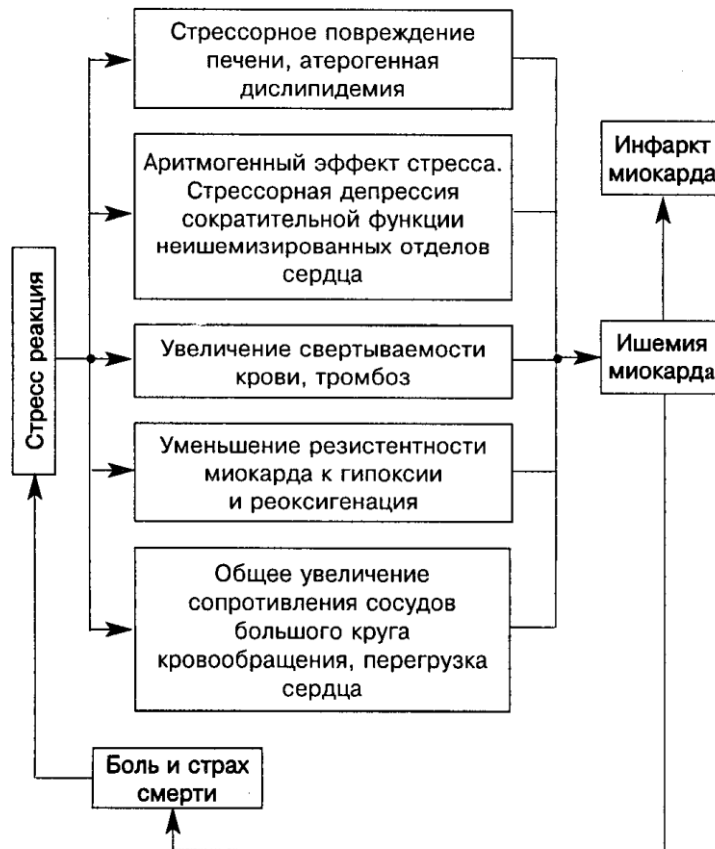


Рисунок 4. Связь стрессорного и ишемического повреждения сердца (Меерсон Ф.З. 1984)

Одним из известных механизмов действия глюкокортикоидов является иммуносупрессорная активность, вызывающая торможение созревания и дифференцировки лимфоцитов, их апоптоз, что в итоге приводит к инволюции тимуса и селезенки. Другим эффектом, вызываемым гиперкортизолемией, является снижение защитных функций слизистой оболочки желудка за счет ингибирования секреции простагландинов, что на фоне спазма кровеносных сосудов приводит к появлению язв и эрозий слизистой желудка. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой

оси приводит к гипертрофии коры надпочечников (Меерсон Ф.З., 1984) Таким образом, развивается «стрессорная триада» (Fink G, 2017).

Внутриклеточные изменения в условиях стресса сильно сопряжены с ишемическими воздействиями: происходит накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, развивается кальциевая триада (повреждения миофибрилл, нарушение работы митохондрий, активация протеаз и фосфолипаз), активируются процессы ПОЛ. Эти процессы в итоге приводят к развитию митопоптоза, апоптоза или некроза, которые подтверждаются данными электронной микроскопии: митохондрии набухают, в сарколемме встречается большое количество лизосом и фагосом, происходит разволокнение миофибрилл, уменьшается содержание гликогена (Меерсон Ф.З., 1984; Э.В. Карнаух, 2011).

В условиях длительного стресса у крыс наблюдается снижение инотропной функции миокарда с уменьшением скорости его сокращения и расслабления, ударного и минутного объема и снижением функциональных резервов сердца (Меерсон Ф.З. и др., 1988; Пшенникова М.Г., 2000; Перфилова В.Н. и др., 2007). Также было показано, что у людей на фоне эмоционального стресса повышается АД, ЧСС, возрастает уровень адреналина крови и нарушается кровоснабжение миокарда (Hammadah M., 2016).

### **1.1.3. Аритмогенные эффекты ишемии и стресса**

Нарушения ритма сердца могут быть по двум причинам: возникновение эктопического очага возбуждения и формирования петли «re-entry» (Hoffman B.F., 1987).

Петля re-entry (повторный вход возбуждения) образуется в связи с изменениями электрических, механических и биохимических свойств миокарда, когда импульс, совершая круговое движение, повторно или многократно возбуждает одни и те же участки миокарда. Механизм



формирования петли следующий: если в данном участке миокарде находятся 2 канала проведения импульса, образующих петлю, при этом один из путей односторонне блокирован для проведения сигнала вследствие ишемии или некроза ткани. Когда до пораженного участка импульс не прошел, он возбуждается через второй канал. Так как длина и время прохождения сигнала разное, окружающие нормальные ткани в момент возбуждения ишемизированного миокарда выходят из состояния рефрактерности и сами способны к возбуждению (Antzelevitch С., 2001).

Другим механизмом развития аритмии является формирование эктопического очага, заключающегося в более высоком уровне автоматизма. При ишемическом и стрессорном поражении сердца выражено изменяется внутри- и внеклеточное содержание ионов и работа ионных каналов, что может привести к изменению потенциала мембраны кардиомиоцита и повышению его автоматизма (Пелипецкая, Е.Ю., 2012). Особенно важна роль  $Ca^{2+}$  - во время реперфузии, когда возникают чередующиеся захват и выброс кальция саркоплазматическим ретикулумом, что приводит к высокоамплитудным колебаниям его концентрации в цитоплазме и возникновению реперфузионных аритмий (Ватутин Н.Т., 2013). Если степень выраженности автоматизма зоны ишемии превышает автоматизм основного водителя ритма, такая зона является аритмогенной.

Острая ишемия является динамичным процессом, эффекты которого прогрессируют с ходом окклюзии коронарной артерии, поэтому частота сопутствующих аритмий также возрастает. Выявлено, что аритмии происходят в двух различных фазах (Baumeister P, 2016). Первый этап (фаза 1a) занимает примерно 2-10 минут после окклюзии (с пиком аритмогенеза на уровне 6 минут), вторая фаза (фаза 1b) происходит приблизительно через 20-40 минут (с максимумом около 30 минут). Кроме того, эффекты неоднородны по ишемической области, особенно они выражены у границы ишемии. Эти неоднородности, такие как увеличение возбудимости и укорочение

рефрактерного периода в пограничной зоне, являются важными факторами для формирования аритмий.

Природа и механизмы, лежащие в основе двух фаз аритмий острой ишемии также различны. Аритмии этапа 1a обычно не смертельны, проявляющиеся только как короткие периоды желудочковых тахиаритмий. Эти аритмии в основном вызваны импульсами, образуемыми вблизи пограничной зоны и проходящими через ишемизированную ткань множественными расходящимися кругами вокруг области блока проводимости. Аритмии фазы 1b являются более опасными (и считаются основным источником внезапной сердечной смерти), так как они часто перерождаются в фибрилляции желудочков. Механизм их образования менее ясен. В фазе 1b, и в сократительных, и в проводящих кардиомиоцитах возникает большая степень эктопического возбуждения, чем в фазе 1a, скорее всего, в результате комбинации растяжения ткани на границе зоны ишемии и увеличения концентрации  $Ca^{2+}$ . В то же время, склонность к триггерной активности, приводящая к re-entry, усиливается с уменьшением скорости и дальнейшим увеличением внеклеточной концентрации  $K^+$  (Carmeliet E, 1999).

Так как воздействие стресса тесно связано с ишемическими процессами, в кардиомиоцитах стрессированных животных также наблюдаются изменение электрических свойств, появление эктопических очагов автоматизма, ишемия создает предпосылки для формирования петли «re-entry»: развиваются брадиаритмии, нарушения внутрисердечной проводимости и процессов реполяризации (Карнаух Э.В., 2011). В ретроспективном исследовании среди датчан, переживших гибель своего супруга, в течение первого года после утраты частота возникновения фибрилляции предсердий была достоверно выше по сравнению с контрольной группы, что еще раз показывает связь эмоционального стресса и развития нарушения ритма сердца (Graff S, 2016). Предполагают, что эмоциональный стресс вызывает несимметричную активность мозговых

структур, таких как дорсомедиальные ядра гипоталамуса, что приводит к несбалансированной вегетативной иннервации сердца, неоднородной реполяризации и электрической нестабильности сердца и аритмий (Marco A. P. F., 2017). В экспериментах на собаках показано, что после стрессирования ударами электрического тока на протяжении 3-х дней снижался порог развития желудочковых экстрасистол, что было связано с активацией симпатической нервной системы (Ziegelstein RC, 2007).

## 1.2. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЦЕТАМОВ

Рацетамы представляют собой группу соединений, в основе химической структуры которых лежит пирролидон -2 (циклическая форма ГАМК) (Рисунок 5).

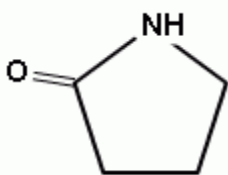


Рисунок 5 Химическая структура пирролидона-2.

Пионером среди препаратов этой группы является пирацетам. Он был синтезирован в бельгийской биофармацевтической компанией UCB (Union Chimique Belge) Pharmaceutical ближе к середине XX века. На текущий момент зарегистрированными лекарственными препаратами или находящимися в третьей фазе клинических испытаний являются следующие рацетамы (Сычев Д. А., 2011): анирацетам, бриварацетам, леветирацетам, оксирацетам, пирацетам, прамирацетам, селетрацетам, фенилпирацетам.

Для данной группы соединений описан ряд свойств, который может обеспечивать стресспротекторное и противоишемическое действие.

ГАМК взаимодействует с рецепторами различных структур головного мозга, подавляет синтез и секрецию молекул, участвующих в реализации стресс-реакции: кортиколиберина, АКТГ, вазопрессина и катехоламинов (Romanov R., 2001; Carrasco G.A. et al., 2003; Verkuyl J.M. et al., 2005). Показано, что введение экзогенного кортиколиберина увеличивает

пресинаптическое высвобождение ГАМК из нейронов центрального ядра миндалевидного тела (Kang-Park M., 2015), а активация синтеза эндогенного кортиколиберина увеличивает нейротрансмиссию ГАМК (Nie E.T. et al., 2004). При хроническом стрессе в условиях высокого уровня глюкокортикоидов снижается ГАМК-контроль за гипоталамо-гипофизарно-адреналовой осью, (Verkuyl J.M. et al., 2005). Действительно, при некоторых условиях, кортизол может изменить поглощение и высвобождение ГАМК, уменьшить связывание с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором и бензодиазепиновым рецептором в гиппокампе и миндалине. При повторном введении кортизола крысам в гиппокампе снижается уровень GAD65 (изоформа глутаматдекарбоксилазы, синтезирующей ГАМК из глутамата) и увеличивается уровень белка VGLUT2 (везикулярный транспортер глутамата). В миндалевидном теле снижается содержание GAD67 и  $\alpha 2$  субъединицы ГАМКА-рецептора (Lussier A.L., 2013).

Пирацетам обладает противоишемической активностью, на что указывает менее выраженный подъем сегмента ST у кошек, получавших препарат, в условиях окклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии по сравнению с показателем животных контрольной группы (Цорин И.Б., 1986). При сочетанном ишемическом и стрессорном воздействии, смоделированном введением питуитрина и эмоциональным стрессом у крыс, пирацетам способствовал восстановлению показателей ЭКГ (ЧСС и амплитуда зубца T). Как предполагает Карнаух Э.В., подобный эффект пирацетама связан с ограничением стресс-реакции (Карнаух Э.В., 2011). Препарат ограничивал зону некроза у крыс, о чем свидетельствовало отсутствие морфологических изменений в перишемической зоне (Кресюн В.И., 1990, Цорин И.Б., 1997). При оценке функционального состояния сердца у кошек была показана стабилизация показателей гемодинамики и сократительной деятельности сердца, среднее ускорение кровотока в аорте, систолический и сердечный выбросы (Цорин И. Б., 1997).

В условиях ишемии миокарда у животных, получавших пирарцетам, скорость прироста соотношения лактат/пируват в крови была ниже, чем в контрольной группе на протяжении 60 минут (Чичканов Г.Г., 1991), что свидетельствует об уменьшении степени ишемии сердца под влиянием пирарцетама.

Гипоксия формирует базис для патологических изменений в органах и тканях при различных нозологиях, особенно при атеросклеротических поражениях и спазме сосудов. Описано, что пирарцетам повышает устойчивость миокарда к гипоксии при моделировании инфаркта миокарда у крыс (Кресюн В.И., 1990). Колесниковой Т. А. и соавт. (2006) отмечено, что назначение пирарцетама при родах снижает вероятность осложнений новорожденных, связанных с перенесенной внутриутробной гипоксией (Колесникова Т.А., 2006). Полагают, что подобное действие препарата возникает в связи с изменением метаболизма, снижающим чувствительность ткани к уменьшению уровня кислорода (Воронина Т.А., 1998).

Была продемонстрирована способность пирарцетама повышать устойчивость головного мозга крыс к гипоксии на модели глобальной церебральной ишемии. Так, в контрольной группе летальность составила 70,5%, тогда как у опытных крыс - 49%. Функциональная активность мозга страдала в меньшей степени: такие признаки ишемии как увеличение  $\Delta$ -ритма во всех отведениях, выраженное снижение  $\beta$ -ритма в корковых отведениях и  $\theta$ -ритма в гиппокампе были менее выражены после введения пирарцетама. Было отмечено психостимулирующее действие пирарцетама, о чем говорит представительство высокочастотных диапазонов активности в коре, особенно  $\beta$ -ритма еще до моделирования ишемии головного мозга. (Ганцгорн Е.В. и др., 2012).

В экспериментах на культуре клеток гиппокампа также был показан антигипоксический эффект пирарцетама: в условиях 3-часовой гипоксии (95%  $N_2$  и 5%  $CO_2$ ) с последующей одночасовой реоксигенацией (21%  $O_2$ , и 5%  $CO_2$ ) в присутствии 1мМ пирарцетама значительно ограничили клеточные

повреждения, о чем свидетельствовали интенсивное витальное окрашивание культуры нейтральным красным, снижение активности ЛДГ и ацетилхолинэстеразы в буферном растворе и отсутствие падения митохондриального мембранного потенциала (Solanki P., 2011).

Для леветирацетама также на культуре клеток гиппокампа показан антигипоксический эффект. Инкубация нейронов при 20% CO<sub>2</sub> и менее 1% O<sub>2</sub> в течение суток в среде, содержащей 100 мкМ и 300 мкМ леветирацетама, путем изучения прижизненного окрашивания трипановым синим и оценки активности лактатдегидрогеназы в культуральной среде продемонстрировано снижение количества погибших клеток (Sendrowski K., 2011).

При гистологическом исследовании было выявлено нейропротекторное действие леветирацетама в форме снижения активности апоптоза нейронов на модели гипоксического-ишемического повреждения головного мозга новорожденных крыс (Griesmaier E., 2014)

У фенотропила также был выявлен антигипоксический эффект. При снижении барометрического давления применение фенотропила приводило к достоверному повышению продолжительность жизни в десять раз (Епишина В.В., 2006). В условиях гиперкапнической и гемической гипоксии препарат увеличивал продолжительность жизни мышей (Багметов М.Н., 2006).

В работе Т. Ноконohара (Hokonohara T., 1992) было показано, что инкубация в растворе оксирацетама ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М) срезов коры головного мозга крыс перед помещением их в гипоксическую среду (0-25% кислорода) приводила к ограничению снижения амплитуды вызванных потенциалов и сокращала время их исчезновения, что свидетельствует о нейропротекторном действии препарата.

Таким образом, можно предположить, что антигипоксическое действие рацетамов может быть одним из механизмов его противоишемической активности (Hokonohara T., 1992).

Карнаух Э.В. был опубликован ряд работ, посвященных кардиопротекторному действию пираретама в условиях эмоционального стресса. Так, был показан мембраностабилизирующий эффект пираретама, на что указывало снижение активности ЛДГ<sub>1</sub> и протеаз сыворотки и в ткани сердца по отношению к значениям в контрольной стрессированной группе. Полученные данные свидетельствуют о сохранении целостности мембраны кардиомиоцитов (Карнаух Э.В., 2013).

Выявлено, что в условиях стресса на фоне введения пираретама снижается уровень адреналина и увеличивается соотношение норадреналин/адреналин (Карнаух Э.В., 2013), что говорит о стресспротекторном действии в связи с тем, что норадреналин менее активен, чем адреналин.

Кроме того, пираретам снижает влияние эмоционального стресса на сердечно-сосудистую систему, не допуская выраженного повышения МОК, УОК, АД и амплитуды зубца Т (Карнаух Э.В. 2013). Также показано, что пираретам предотвращает развитие тяжелых аритмий, вызванных хлоридом кальция и потенцированных эмоциональным стрессом (Карнаух Э.В., 2013).

При изучении структуры кардиомиоцита обнаружено, что после введения стрессированным крысам пираретама, стрессорные повреждения становятся менее выраженными: сохраняется энергетический баланс (содержание гликогеновых гранул), в митохондриях нет признаков напряжения и истощения, в капиллярах не наблюдается маркеров поражения эндотелиоцитов, а в срезах нет обширных очагов деструкции (Карнаух Э.В., 2011).

В исследованиях Л. Г. Жамгарян и др. на модели гипокинезии крыс было показано, что пираретам способствует усилению синтеза АТФ, на что указывает более активное фосфорилирование АДФ в митохондриях сердца у животных, получавших препарат по сравнению с показателем контрольной группы (Жамгарян Л.Г., 2007). Акопян и др. (1998) выявили тенденцию к повышению АТФазной активности в митохондриях у крыс, подвергшихся

ограничению движения на фоне введения пирацетама, на основании чего можно предполагать положительное влияние препарата на энергетический обмен (Акопян В.П., 1998).

Как уже было сказано выше, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в большой степени задействованы в ишемическом и стрессорном поражении миокарда. В этой связи антиаритмическое действия пирацетама было изучено на модели кальциевой аритмии, потенцированной эмоциональным стрессом (10%  $\text{CaCl}_2$  вводили сразу после окончания острого эмоционального стресса). По результатам эксперимента был выявлен синдром «взаимного отягощения»: аритмогенный фон был детектирован у 100 % животных и способствовал возникновению более ранних и тяжелых форм аритмий и повышению летальности с 17% в группе стрессированных крыс до 67% при сочетании стресса и аритмогенного агента. После введения пирацетама в дозе 200 мг/кг подкожно все животные на фоне сочетанной нагрузки выжили. При этом был показан выраженный антиаритмический эффект препарата: нормализовалась проводимость и сократимость желудочков сердца, ЧСС стало выше чем у крыс контрольной группы, но не достигло значений интактной, ускорилось время полной нормализации показателей ЭКГ, а также уменьшились признаки ишемии миокарда (Карнаух Э.В., 2012)

Было проведено плацебо-контролируемое исследование на 52 здоровых добровольцах по изучению аритмогенного действия леветирацетама. Naoum P. Issa был зарегистрирован атипичный случай удлинения сегмента QT (771 мс) с развитием пируэтной тахикардии у 24-летней девушки, страдавшей эпилепсией, на фоне повышения уровня леветирацетама в сыворотке до 34 мг/мл. При обследовании у пациентки обнаружилась точечная мутация в калиевом канале  $\text{KCNH2}$  (Met645Ile).  $\text{KCNH2}$  участвует в реполяризации мембраны кардиомиоцита, а мутации в этом гене связаны с синдромом LQT2, которые могут проявляться как удлинением интервала QT, так и судорогами. Этот случай может говорить о



том, что леветирацетам влияет на сердечную проводимость у пациентов с мутациями белка KCNH2 (Issa N. P., 2015).

Показано, что молекула пирацетама увеличивает текучесть мембраны, связываясь с полярными «головками» фосфолипидов (Leuner K., 2010). Известно, что в ходе старения нарушается плотность рецепторов и высвобождение нейротрансмиттеров, что может быть модулировано свойствами мембраны. В этой связи в исследованиях W. Muller (Muller W., 1997) было продемонстрировано, что пирацетам влияет только на мембраны мозга старых крыс и мышей, не воздействуя при этом на таковые молодых. Препарат способствует сохранности мембранного потенциала митохондрий, на что указывает протекторный эффект пирацетама в условиях обработки митохондрий фибриллярным бета-амилоидным пептидом (Leuner K., 2010).

Пирацетам уменьшал токсическое действие липополисахаридов, что выражалось в предотвращении транслокации эндонуклеазы G к ядру астроцита, снижения активности митохондриальных дегидрогеназ, развития окислительного стресса, митохондриальной дисфункции (Gupta S., 2014).

В условиях хронической алкоголизации крыс также отмечено повышение резистентности мембран эритроцитов к механическому воздействию под влиянием пирацетама (Перфилова В.Н., 2006).

Известно, что процессы свободно-радикального окисления играют важную роль в развитии ишемического и стрессорного повреждения миокарда, в первую очередь, вызывая деструкцию митохондрий и нарушение их функционирования.

Показано, что пирацетам снижал уровень малонового диальдегида (МДА) в миокарде, подвергшемся экспериментальному инфаркту миокарда (ЭИМ) (Кресюн В.И., 1993, Капелько В.И. 2004, Leducq N., 2003). При моделировании окислительного стресса обработкой культуры астроцитов липополисахаридами пирацетам повышал мембранный потенциал митохондрий и активность дегидрогеназ (Gupta S., 2014).

Пирацетам при добавлении к культуре клеток РС3 подавлял образование митохондриальных пор и гибель клеток, стимулированных симвастатином (Costa R.A.P., 2013), что может быть связано с сохранением текучести мембраны и подавлением  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого образования супероксида.

В экспериментах, проведенных Namrata Singh (2016), было изучено прямое влияние пирацетама на функциональную активность интактных митохондрий коры головного мозга свиней *in vitro* в концентрации 10 нмоль/л. Обнаружено, что в присутствии пирацетама недостоверно повышалась активность дыхательных комплексов I и II+III, тогда как у активности IV комплекса была тенденция к понижению. В условиях ингибирования I и III комплексов добавление пирацетама также не повлияло на образование  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Изменений в работе цитратсинтазы также не выявлено. На основании этого авторы приходят к выводу, что прямое действие пирацетама на работу митохондрий малозначимо.

В проведенных исследованиях (Stockburger C, 2013), посвященных протекторному действию пирацетама на митохондрии с моделированием возрастных изменений и накоплением  $\beta$ -амилоида на нескольких клеточных линиях было показано, что при стимуляции окислительного стресса  $\text{H}_2\text{O}_2$  или нитропруссидом натрия, депривации эмбриональной телячьей сыворотки или введении  $\beta$ -амилоида, пирацетам сохранял мембранный потенциал митохондрий (МПМ), индуцировал синтез АТФ. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией  $\beta$ -амилоида кроме повышения МПМ и образования АТФ, наблюдалось и снижение уровня  $\beta$ -амилоида. При исследовании на клеточной линии РС12 добавление пирацетама препятствовало снижению количества отростков нейронов, вызванного присутствием олигомерного  $\beta$ -амилоида<sub>1-42</sub>. Для изучения влияния пирацетама на возрастные изменения митохондрий были взяты 22-месячные мыши, которым *per os* вводили пирацетам в дозе 500 мг/кг. Обнаружено, что кроме сохранения МПМ, уменьшалась активность антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы,

глутатионредуктазы и СОД), которая обычно повышается с возрастом. Таким образом, пирацетам защищает митохондрии при различных состояниях, связанных с окислительным стрессом, включая старение (Stockburger C, 2013).

При изучении влияния пирацетама на морфологию митохондрий в условиях ПОЛ было обнаружено, что органеллы возвращаются к удлинённым формам, в то время как на интактных митохондриях такого эффекта не обнаружено. На клеточной линии SY5Y при торможении комплекса I ротеноном было выявлено, что добавление пирацетама препятствовало увеличению точечных и уменьшению тубулярных митохондрий (Stockburger C, 2013).

Хотя пирацетам не взаимодействует с какой-либо конкретной мишенью в человеческом мозге (рецептор, фермент, переносчик, ионные каналы и т.д.), он связывается с полярными головками фосфолипидов мембраны и тем самым улучшает текучесть нейрональных и митохондриальных мембран (Leuner K, 2010), особенно на фоне окислительного стресса, приводящего к ее снижению.

При моделировании эпилептического статуса было показано, что леветирацетам в дозе 1000 мг/кг повышает активность митохондриальных ферментов –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, аконитазы и дыхательного комплекса I, а также восстанавливает уровень глутатиона, при этом не влияя на активность цитратсинтазы и комплексов II+III (Gibbs JE, 2006).

В экспериментах *in vitro* было выяснено, что леветирацетам снижает набухание митохондрий гиппокампа мозга мышей, вызванное открытием mPTP при добавлении хлорида кальция или атрактилозида (Stockburger C, Miano D, 2016). Авторы считают, что защитное действие препарата основано на взаимодействии с транспортным белком SV2A (синаптический везикулярный протеин в пресинаптических терминалях), что было доказано при ингибировании экспрессии белка с помощью siRNA, когда протекторный эффект нивелировался.

Показано, что тромбообразование играет важную роль в развитии патологии сердца и сосудов (Jiang W, 2015).

Пирацетам усиливает региональный мозговой кровоток у больных с острым инсультом (Orgogozo J.M., 2001), что может быть связано с влиянием на реологические свойства циркулирующей крови за счет изменения активности тромбоцитов и способности к деформации эритроцитов, ведущей к предполагаемому уменьшению высвобождения АДФ поврежденными эритроцитами.

Предполагается, что антиагрегантный эффект пирацетама связан не только с изменением текучести мембран тромбоцитов. Считают, что с этим эффектом связаны снижение чувствительности к АДФ и ингибирование синтеза тромбоксана  $A_2$  (Stockmans F, 1998, Moriau M, 1993). Есть информация, что пирацетам стимулирует синтез простаглицлина эндотелием сосудов и снижает секрецию фактора Виллебранда из телец Вайбеля-Палладе (Moriau M, 1993).

В эксперименте Жилюк и др. (2013) выявлено, что в условиях хронической аллоксановой гипергликемии пирацетам проявлял антиагрегантную активность в дозе 500 мг/кг только при индукции 20 мкмоль/л АДФ, тогда как фенилпирацетам в дозе 100 мг/кг и прамирацетам в дозе 300 мг/кг подавляли активность тромбоцитов и при индукции 5 и 20 мкмоль/л АДФ, и коллагеном. Авторы предположили, что активность прамирацетама основана на снижении синтеза тромбоксана  $A_2$ , а действие фенилпирацетама связано с восстановлением функционирования конститутивной синтазы NO в тромбоцитах и эндотелии сосудов.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что рацетамамы обладают антигипоксическим, противострессорным, антиаритмическим, мембраностабилизирующим, антиагрегантным эффектами, способностью ограничивать процессы ПОЛ, повышать активность ферментов антиоксидантной защиты, улучшать функцию митохондрий, сохранять сопряжение дыхания и фосфорилирования. Таким

образом, можно считать перспективным поиск среди рацетамов веществ с кардиопротекторным действием.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

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). Изучение влияния соединения РГПУ-207 было проведено с использованием 15 моллюсков прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) и 15 особей катушки роговой (*Planorbarius corneus*).

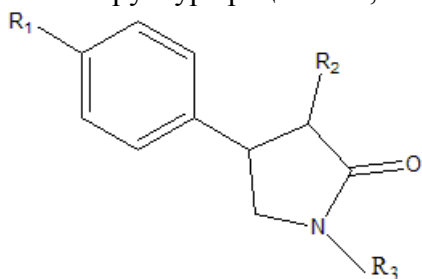
В работе изучено 12 новых рацетамов (таблица 1). Все исследуемые соединения синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им.А.И.Герцена (г.Санкт-Петербург) под руководством профессора Берестовицкой В.М. <sup>1)</sup>

---

<sup>1</sup> *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*

Таблица 1.

Химическая структура рацетамов, замещенных по углероду.



№ п/п	Шифр соединения	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Доза мг/кг
1	РГПУ-87	H <sub>3</sub> C-O-	H-		24,8
2	РГПУ-96	Cl-	H-		26,6
3	РГПУ-207	H-	H-		37,5
4	РГПУ-263	H <sub>3</sub> C-O-	H-		26,3
5	РГПУ-232	H <sub>3</sub> C-O-	H-		33,9
6	РГПУ-262	CH <sub>3</sub> -	H-		32,3
7	РГПУ-206	H-	H-		23,3
8	РГПУ-266	CH <sub>3</sub> -		H-	23,3
9	РГПУ-255	H <sub>3</sub> C-O-		H-	24,9
10	РГПУ-265	CH <sub>3</sub> -		H-	21,8
11	РГПУ-254	H <sub>3</sub> C-O-		H-	23,4
12	РГПУ-264	H-		H-	21,9

**Оценка влияния новых рацетамов на функциональное состояние очага ишемии миокарда.** Эксперименты выполнены на 108 наркотизированных (хлоралгидрат 400 мг/кг, внутривенно) белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Были сформированы 15 групп по 6 животных: 1- группа контрольная, с окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии (ОНВЛКА), получавшая физ р-р внутривенно за 10 мин до окклюзии, 2- ложнопериорированная, которой вскрывали грудную клетку, но не проводили ОНВЛКА, 3- группа опытная, получавшая препарат сравнения верапамил (ОАО «Биосинтез», Россия) в дозе 0,8 мг/кг, с 4 по 15 – опытные, получавшие исследуемые препараты в дозах, равных 1/10 от молекулярной массы. Животным проводили трахеотомию, подключали к аппарату ИВЛ. Затем после торакотомии и перикардотомии ОНВЛКА на границе верхней и средней трети на 30 минут вызывали ишемию с последующей 30-минутной реперфузией (Миронов А.Н. и др., 2012). ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия). О ФСОИ судили по изменению площади под кривой интервала ST (Richard E. Et al., 2013), который измеряли в начале эксперимента, на 30 секунде, 1, 5, 10, 20 и 30 минутах ишемии и реперфузии.

#### **Изучение зависимости доза – противоишемическое действие.**

Исследования проведены на 108 белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Для изучения зависимости противоишемического действия от дозы препарата проводили на модели кратковременной (10-минутной) длительной (30-минутной) ОНВЛКА с 30-минутной реперфузией (см. выше). Для критерия эффективности соединения использована площадь под кривой интервала ST. При кратковременной ишемии были сформированы следующие группы: 1- контрольная, получавшая физ р-р, 2- ложнопериорированная, получавшая физ р-р, 3-5 – опытные, получавшие верапамил в дозах 0,4; 0,7 и 1,4 мг/кг; 6-8 – опытные, получавшие соединение



РГПУ-207 в дозах 9,4, 18,5 и 37,5. В опытных и ложнооперированной группах было по 6 животных, в контрольной – 12.

В качестве препаратов сравнения при длительной ишемии были выбраны верапамил в дозе 0,8, 1,6 и 0,4 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. Животные были разделены на 14 групп: 1- контрольная (n=19), получавшая физ р-р, 2- ложнооперированная (n=6), получавшая физ р-р, 3-5 – опытные, получавшие соединение РГПУ-207 в дозах 9,4 (n=6), 18,5 (n=6) и 37,5 (n=6) мг/кг, 6-8 – опытные, получавшие препарат сравнения верапамил в дозах 0,4 (n=6), 0,8 (n=6), 1,6 (n=7) мг/кг, 9-11 – опытные, получавшие препарат сравнения ивабрадин в дозах 5,3 (n=8), 10,5 (n=6) и 21 мг/кг (n=8) и 12-15 – опытные, получавшие препарат сравнения мексидол в дозах 40 (n=9); 20 (n=9) и 10 мг/кг (n=6).

**Оценка влияния исследуемого соединения на размер очага некроза с помощью метода двойного окрашивания.** Эксперименты выполнены на наркотизированных (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) белых беспородных крысах-самцах. Ишемию вызывали ОНВЛКА на границе верхней и средней трети на 30 минут с последующей 30-минутной реперфузией (Миронов А.Н. и др., 2012) Исследуемое соединение и референсные препараты вводили внутривенно за 10 мин до окклюзии. ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия). Соединение РГПУ-207 вводили в дозе 9,4 мг/кг (n=8), в качестве препаратов сравнения были использованы верапамил (1,6 мг/кг) (n=6), мексидол (40 мг/кг) (n=6) и ивабрадин (21 мг/кг) (n=6). Визуализацию анатомической зоны риска и зоны некроза производили с помощью методики "двойного окрашивания" синим Эванса (Sigma, США) и трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) (Sigma, США). Готовили пять поперечных срезов одинаковой толщины (2 мм) с помощью матрицы TM-S-12 (Braintree, США). Изображения базальных поверхностей пяти срезов фотографировали цифровой камерой Panasonic DMC-FS11 (Япония) для

последующего определения площади анатомической зоны риска (Эванс-негативные участки) и неишемизированного миокарда (Эванс-позитивные участки). Расчет площадей осуществляли на компьютере с помощью программы Image J. Размер зоны риска определяли отношением объемов Эванс-негативных участков к общему объему сердца (в процентах). 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 внутрибрюшинно) крысам осуществляли торакотомию, перевод животного на ИВЛ, перикардотомию и 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). Формирование групп см. раздел «Изучение зависимости доза – противоишемическое действие». Исследуемые вещества и препараты сравнения вводили в\в медленно за 10 мин до ОНВЛКА (Миронов А.Н. и др., 2012). 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).

При кратковременной ишемии в качестве референсных использовали антиаритмические препараты по классификации E.M. Vaughan Williams IA класса -новокаиномид в дозе 40 мг/кг (n=6), IC класса -этмозин в дозе 20 мг/кг (n=6) и IV класса -верапамил в дозе 0,7 мг/кг (n=6). Группе

ложнооперированных крыс проводили торакотомию с перикардотомией без ОНВЛКА. В опытных и ложнооперированной группе состояло по 6 самцов, в контрольной – 7.

Оценка противоаритмического действия соединения РГПУ-207 на модели 30-минутной ишемии была проведена в рамках исследования ФСОИ. Поэтому были использованы следующие препараты сравнения: верапамил в дозе 0,8 мг/кг (n=6), ивабрадин – 10,5 мг/кг (n=6), и мексидол - 40 мг/кг (n=6). Группы животных, получавших соединение РГПУ-207 в дозах 9,4, 18,7 и 37,5 мг/кг по 6 самцов в каждой. Контрольная группа включала 14 крыс, ложнооперированная – 6 животных.

Аконитиновая модель. Наркотизированным животным (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) производили трахеотомию, интубацию трахеи полиэтиленовой трубкой для обеспечения свободного спонтанного дыхания и катетеризацию яремной вены. Исследуемые соединения вводили за 10 мин до аконитина. ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (электрокардиограф компьютерный «Поли-Спектр-8/В», Россия) в течение 30 мин после введения аконитина. Аконитин (Sigma-Aldrich, США) вводили внутривенно в дозе 50 мкг/кг (Миронов А.Н. и др., 2012). В основе нарушений ритма сердца, возникающих при введении аконитина, лежит блокада быстрых трансмембранных потенциалзависимых натриевых каналов с нарушением функциональной активности трансмембранных потенциалзависимых  $Ca^{2+}$  каналов с развитием фибрилляций желудочков. Поэтому в качестве препаратов сравнения были взяты антиаритмические препараты I класса по классификации E.M. Vaughan Williams: IA класс (новокаинамид в дозе 20 мг/кг), IB класс (лидокаин в дозе 7,5 мг/кг) и IC класс (этmozин в дозе 10 мг/кг). Соединение РГПУ-207 вводили в дозах 9,4 (n=8), 18,7 (n=10) и 37,5 мг/кг (n=12). Контрольная группа включала 12 крыс. Антиаритмическую активность оценивали по времени возникновения фибрилляций, проценту животных с фибрилляциями и доле выживших животных.

Хлоридкальциевые аритмии моделировали на наркотизированных (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) крысах внутривенным введением хлорида кальция (ФГУП НПО «Микроген», Россия) в дозе 200 мг/кг в/в. Исследуемые вещества и препараты сравнения вводили внутривенно медленно за 10 мин до хлорида кальция (Миронов А.Н. и др., 2012). В качестве референтных препаратов на этой модели аритмий использовали антиаритмик IV класса (верапамил в дозе 0,3 мг/кг) и антиаритмик I B класса (лидокаин в дозе 3,5 мг/кг). Животные получали соединение в дозах Соединение РГПУ-207 вводили в дозах 9,4, 18,7 и 37,5 мг/кг. Всех опытных группах было по 6 животных, в контрольной – 9 крыс. Параметрами оценки эффективности действия веществ были время возникновения фибрилляций, процент животных с фибрилляциями и доля выживших животных.

### **Изучение действия соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи нейронов моллюсков<sup>2</sup>.**

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. Программа для ЦАП с широкими возможностями позволяла формировать последовательности прямоугольных (для оценки амплитуд и кинетики токов или построения

---

<sup>2</sup> Работа была выполнена в лаборатории электрофизиологии института фармакологии им. Вальдмана д/н Анатолием Ивановичем Вислобоковым

вольт-амперных характеристик (ВАХ) мембраны) или пилообразных импульсов (для регистрации ВАХ мембраны).

Для изготовления микропипетки с порой использовали тонкую полиэтиленовую трубку длиной 3 см, сгибали ее V-образно в струе горячего воздуха и на сгибе тонкой стальной проволокой движением изнутри формировали выступ. Затем на вершине выступа под бинокулярной лупой горячей иглой делали отверстие и соединяли пипетку с системой растворов, а по величине сопротивления (порядка 200–400 кОм) оценивали пригодность микропипетки для дальнейшей работы. Изолированную клетку помещали на полиэтиленовую пипетку (в большинстве случаев при фиксированном потенциале  $-90$  мВ). При гиперполяризующем сдвиге мембранного потенциала на экране осциллографа были видны емкостные токи мембраны и неспецифический ток утечки, который электронным способом «вычитали» из общего тока. При переключении тестирующего импульса на деполяризацию регистрировали входящие (натрий-кальциевые) и выходящие (быстрый и медленный) калиевые токи. После регистрации суммарных ионных токов производилась замена внутриклеточного и наружного растворов на растворы для регистрации отдельного тока.

**Изучение антигипоксического действия.** Острую нормобарическую 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). Контрольной группе животных вводили физ. р-р. Все группы включали по 7 крыс.

**Моделирование острого стрессорного воздействия.** Острый стресс моделировали подвешиванием крыс за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа (Ковалев Г.В., и др., 1983).

У всех животных до и после стрессирования регистрировали среднее артериальное давление (срАД) с хвоста с помощью прибора для неинвазивного измерения Kent Scientific Corporation (Канада). Крыс предварительно приучали к нахождению в пластиковых пеналах-держателях в течение одного часа на протяжении трех дней.

Были сформированы следующие группы животных: 1- группа позитивного контроля - интактные животные ( $n=7$ ), получавшие физ. р-р в объеме 0,2 мл/100 г массы, 2- опытная группа – интактные животные, которым вводили соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг, 3-4 - опытные группы – интактные животные, получавшие препараты сравнения фенибут в дозе 25 мг/кг и пирацетам в дозе 400 мг/кг, 5 - группа негативного контроля - стрессированные животные ( $n=7$ ), получавшие физ. р-р в объеме 0,2 мл/100 г массы, 6- опытная группа – стрессированные животные, которым вводили соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг, 7-8 - опытные группы – стрессированные животные, получавшие препараты сравнения фенибут в дозе 25 мг/кг и пирацетам в дозе 400 мг/кг (Тюренков И.Н., 2007, Перфилова В. Н., 2009). В каждой группе было по 7 животных, физ. р-р, исследуемое соединение и препараты сравнения вводили внутривентриально за 10 мин до стрессирования.

**Оценка функциональных резервов сердца стрессированных животных.** Для исследования изменений кардиодинамики всем группам животных проводили оперативную подготовку: после перевода на искусственную вентиляцию легких осуществляли торакотомию, затем перикардотомию. Через верхушку сердца в левый желудочек вводили катетер, соединенный с датчиком давления (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 ( $(\text{ЛЖД ср} \times \text{ЧСС ср}) / (\text{масса левого желудочка} + 1/3 \text{ межжелудочковой перегородки})$ ) (мм рт.ст./мг\*мин) (Миронов А.Н. и др., 2012).

По окончании проведения функциональных тестов у животных рассчитывали относительную массу надпочечников (ОМН) и тимуса (ОМТ) (абсолютная масса органа/абсолютная масса животного, мг/г). После вскрытия желудка оценивали тяжесть поражения слизистой оболочки желудка (СОЖ), выражаемой в баллах (0 балл – отсутствие поражений, 1 балл – эрозии, 2 балла – единичные язвы, 3 балла – множественные язвы, 4 балла – прободные язвы) (Виноградов В.А. и др., 1983).

**Исследование развития процессов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов.** Наркотизированных (хлоралгидрат 400 мг/кг внутрибрюшинно) животных, подвергшихся острому иммобилизационно-болевному или ОНВЛКА, декапитировали. У крыс забирали сердца, промывали их ледяным физиологическим раствором, гомогенизировали и в гомогенате определяли активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов ПОЛ. Для изучения концентрации ТБК-реактивных продуктов использовали метод Стальной И.Д. в модификации Андреевой Л.И. и соавт. (Андреева Л. И. и др., 1988). В пробирку к 0,6 мл 1,3 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 0,04 мл +0,6%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , добавляли 0,2 мл гомогената и 0,2 мл 0,7% тиобарбитуровой кислоты. Смесь кипятили на водяной бане 30 мин, центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. Супернатант фотометрировали на спектрофотометре Helios  $\gamma$  («TermoElectronCorporation», Англия) при  $\lambda=532$  нм против контроля, в который вместо гомогената была добавлена дистиллированная вода. Расчет концентрации МДА производили при

помощи молярного коэффициента экстинкции ( $1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}$ ), выражали в ммоль/л/мг белка.

Исследование уровня диеновых конъюгатов (ДК) в гомогенате проводили в единицах оптической плотности по методу Плацера в модификации В.Н. Ушкаловой (Ушкалова В.Н., и др., 1993) при длинах волн поглощения 233 нм (определяются диеновые конъюгаты) и 278 нм (определяются дикетоны) на 1 г белка. В 1 мл гептана вносили 1 мл изопропилового спирта, 0,4 мл дистиллированной воды и 0,1 мл пробы, встряхивали 10 мин. Пробирки центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Измеряли оптическую плотность верхней фракции с помощью спектрофотометра Helios  $\gamma$  («TermoElectronCorporation», Англия) на соответствующих длинах волн против гептана в кварцевой кювете.

Активность суммарной супероксиддисмутазы (СОД) изучали по степени торможения реакции окисления кверцетина по методу Костюка В.А. (Костюк В.А. и др., 1990). В пробирку с 3,4 мл 0,8 мМ ТЭМЭД в фосфатном буфере (рН=7,8) добавляли 100 мкл раствора кверцетина, разведенного 0,2 мг в 1 мл ДМСО, и 150 мкл гомогената. В контрольную пробу вместо гомогената добавляли 150 мкл дист.  $\text{H}_2\text{O}$ . Непосредственно после добавления кверцетина в реакционную смесь и через 20 минут измеряли экстинцию раствора на спектрофотометре Helios  $\gamma$  («TermoElectronCorporation», Англия) против холостой пробы, где вместо кверцетина был добавлен чистый ДМСО. Рассчитывали процент ингибирования (I) по формуле:

$$I = 100 - ((A_{\text{опыт}}^{0'} - A_{\text{опыт}}^{20'}) / (A_{\text{контроль}}^{0'} - A_{\text{контроль}}^{20'})) * 100$$

где  $A_{\text{опыт}}^{0'}$  и  $A_{\text{контроль}}^{0'}$  – исходные оптические плотности опытной и контрольной пробы соответственно,  $A_{\text{опыт}}^{20'}$  и  $A_{\text{контроль}}^{20'}$  – оптические плотности опытной и контрольной пробы соответственно через 20 минут инкубирования. Активность СОД выражали в УЕ на мг белка

Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли по убыли восстановленного глутатиона согласно методу Моина В.И. (Моин В.М., 1986). В опытных пробах к 0,05 мл гомогената добавляли 0,4 мл 4,8 мМ



глутатиона в трис-буфере (pH=8,5) и 0,05 мл 10 мМ ГПТБ. После 5 минут инкубации при комнатной температуре останавливали реакцию внесением 0,1 мл 20% ТХУК. Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. К 2,0 буфера добавляли 0,05 мл супернатанта и 0,05 мл 10 мМ ДТНБ, растворенного в этаноле. В контрольных пробах ТХУК добавлялась до инкубирования. Через 7 минут измеряли оптическую плотность раствора против холостой пробы при  $\lambda=415$  нм, где вместо супернатанта была добавлена дист.  $H_2O$ . Активность ГП определяли по разности концентраций GSH в опытной и контрольной пробах, расчёт активности проводили в ммоль глутатиона на 1 мг белка за 1 мин.

Активность каталазы определяли по методике, предложенной Королюком М.А. с соавт. (Королюк М. А. и др., 1988), основанной на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. К 1 мл 0,03%  $H_2O_2$  в фосфатном буфере (pH=6,8) добавляли 0,25 мл гомогената и 0,25 мл дистиллированной воды, инкубировали 20 мин при 37°C. После этого в смесь вносили 0,5 мл 4% молибдата аммония и центрифугировали пробирки 20 мин при 8 тыс об/мин. В контрольную пробу вместо гомогената добавляли 0,5 мл дист.  $H_2O$ . Определяли экстинцию при  $\lambda=410$  нм против дист.  $H_2O$ . Расчёт производили по формуле:

$$\text{Активность} = 13.64 - 1.55y$$

$$y = 4.7052x^2 + 0.9456x + 0.1876$$

$$x = \Delta E (\text{контр} - \text{опыт}).$$

Активность выражали в 1мккат  $H_2O_2$  за 1 мин в мг белка.

### **Изучение функционального состояния митохондрий кардиомиоцитов.**

По окончании стрессирования животным внутрибрюшинно вводили раствор хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. У наркотизированных крыс выделяли головной мозг и сердце, промывали их ледяным физиологическим раствором и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера, затем

на холоду 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). Концентрацию белка определяли с использованием коммерческого набора «Pierce™ BCA Protein Assay Kit» (Thermo Scientific, США). Регистрировали следующие показатели: V3 – скорость поглощения кислорода при добавлении АДФ до конечной концентрации 200 мкМ, V4 – скорость поглощения кислорода после исчерпания АДФ, ДКЧ – дыхательный контроль по Чансу находили расчетным способом как соотношение V3/V4 (Brand MD et al., 2011). Для изучения активности I комплекса дыхательной цепи использовали в качестве субстрата окисления малат (0,5 мМ) (Sigma, США) и глутамат (0,5 мМ) (Sigma, США). Затем при добавлении сукцината (Sigma, США) в концентрации 5 мМ определяли суммарную активность I и II комплексов дыхательной цепи. Для расчета активности II комплекса дыхательной цепи в полярографическую ячейку вносили 0,5 мМ раствор ротенона (Sigma, США) (ингибитор I комплекса) (Lanza IR et al., 2009).

#### **Определение показателей коагулограммы, степени и скорости агрегации тромбоцитов.**

После окончания стрессирования животных наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг, проводили лапаротомию и из брюшного отдела аорты брали кровь в пластиковую пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для получения плазмы на изучение показателей плазменно-коагуляционного звена гемостаза кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Показатели гемостаза (протромбинового времени (ПВ), фибриногена (ФГ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)) определяли с помощью оптико-механического коагулометра - Минилаб 701 с использованием наборов производства НПО РЕНАМ, Россия.

Для получения бедной и богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин и 20 мин при 4000 об/мин соответственно. 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 (максимальное приращение светопропускания, выражается в %) и скорость агрегации тромбоцитов (максимальный наклон кривой светопропускания, измеряется в %/мин). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ («Renal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ.

Изучение влияния исследуемых соединений на агрегацию *in vitro* проводили аналогичным способом по Born G. Кровь получали у кроликов из ушной краевой вены, подготовка плазмы осуществлялась вышеуказанным методом. При изучении антиагрегантной активности соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмой добавляли 10 мкл раствора исследуемого соединения в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

#### **Методы статистической обработки данных:**

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-хоком теста Данна – при множественном. Для сравнения данных с альтернативной формой реакции использовали точный критерий Фишера. Статистически достоверными различия считали при значимости  $p < 0,05$ .

## **ГЛАВА 3. СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ С АНТИАНГИНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ РАЦЕТАМОВ**

### **3.1. Изучение влияния соединений на функциональное состояние очага ишемии миокарда при окклюзии коронарной артерии**

Элевация интервала ST является важным индикатором ишемического поражения сердца (Schmidt MR et al, 2017). В связи с этим антиангинальную активность исследуемых соединений изучали по степени подъема интервала ST эпикардиальной электрограммы по отношению к таковой у животных контрольной группы в условиях 30-минутной ОНВЛКА с последующей 30-минутной реперфузией. В качестве препарата сравнения использовали верапамил в дозе 0,8 мг/кг. Все соединения вводили внутривенно за 10 минут до ОНВЛКА.

У животных контрольной группы, подвергшихся ОНВЛКА, было выявлено увеличение площади под кривой интервала ST в два раза по сравнению с ложнооперированными крысами ( $p < 0,05$ ). Препарат сравнения верапамил предотвращал подъем интервала ST, о чем свидетельствует снижение площади под кривой на 41% в сравнении с самцами контрольной группы (Таб. 1).

При исследовании противоишемической активности соединения РГПУ-87 (амид(4-метоксифенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты) было выявлено снижение площади под кривой на 10% по отношению к значениям крыс контрольной группы (Таб. 1).

Замена ацетамидной группы в 1-м положении лактамного кольца соединения РГПУ-87 на водород и введение в 3-е положение формамидного радикала привело к образованию соединения РГПУ-254. У исследуемого вещества снижение площади под кривой составило 32% по отношению к контрольной группе. Замещение в структуре соединения РГПУ-254

метоксильной группы на метильную в пара-положении (соединение РГПУ-265) не привело к усилению противоишемической активности, площадь под кривой интервала ST также была ниже, чем в контрольной группе на 32%. Схожее влияние на исследуемую активность оказала замена формиламидной группы в пара-положении соединения РГПУ-265 на формилгидразидную (соединение РГПУ-266). При замещении в структуре соединения РГПУ-266 метильного радикала в пара-положении на водород антиангинальная активность практически не изменялась (снижение площади под кривой интервала ST составляло 34% в сравнении с контрольной группой) (Таб. 1).

Замена в 1-м положении лактамного кольца в структуре соединения РГПУ-87 ацетамидной группы на ацетилгидразидную (соединение РГПУ-263) вызывала усиление притивоишемического действия. При ОНВЛКА площадь под кривой интервала ST уменьшилась на 28% по отношению к значениям животных контрольной группы. Степень выраженности эффекта была подобной и при замене в структуре соединения РГПУ-263 метоксильной группы на водород в пара-положении (соединение РГПУ-206). В этом случае снижение площади под кривой составило 31% (Таб. 1).

Замещение ацетамидной группы в 1-м положении лактамного кольца в структуре соединения РГПУ-87 на изобутирамидный радикал (соединение РГПУ-96) и метоксильной группы на хлор в пара-положении также привело к увеличению антиангинального действия. В условиях ОНВЛКА при введении РГПУ-96 наблюдалось уменьшение площади под кривой на 25% при сравнении с таковой у контрольных крыс, в то время как в группе крыс, получавших соединение РГПУ-87, снижение составляло 10% (Таб. 1).

Наибольшую противоишемическую активность проявляли соединения, в состав которых входил фенилацетилгидразидный радикал в 1-м положении пирролидинового цикла. При введении в пара-положение метильного радикала (соединение РГПУ-262) площадь под кривой интервала ST уменьшилась на 40% по отношению к таковой животных контрольной группы. Соединение РГПУ-232, характеризующееся наличием метоксильной

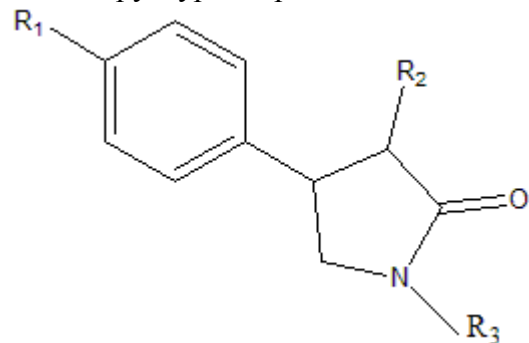
группы в пара-положении, снижало площадь под кривой интервала ST на 42%. При замене метоксильной группы на водород (соединение РГПУ-207), наблюдалась максимальная антиангинальная активность. Площадь под кривой была в 2 раза меньше в сравнении с показателями самцов контрольной группы ( $p < 0,05$ ) (таб 2).

Таким образом, на основании результатов проведенного скрининга антиангинальных свойств 12 циклических производных ГАМК было выявлено соединение РГПУ-207 с наиболее выраженной противоишемической активностью. Снижение площади под кривой интервала ST в условиях 30-минутной окклюзии с последующей реперфузией составляло 50% в сравнении с показателями контрольной группы. По эффективности действия соединение РГПУ-207 сопоставимо с препаратом сравнения верапамилом.

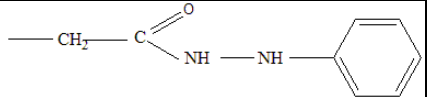
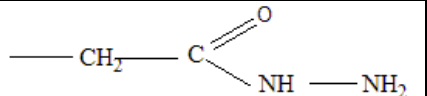
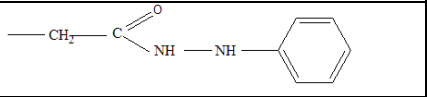
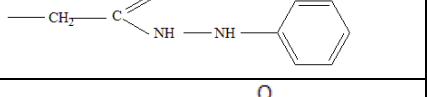
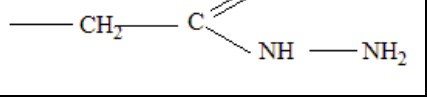
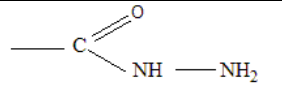
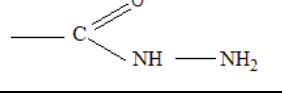
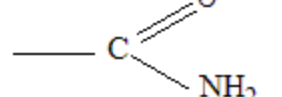
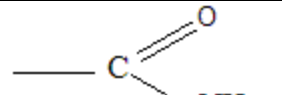
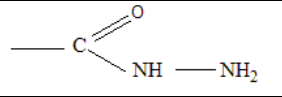
В этой связи для дальнейшего исследования было выбрано соединение РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты).

Таблица 2.

Химическая структура и противоишемическая активность рацетамов, замещенных по углероду



N п/ п	Шифр соединения	Кол-во крыс, n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Доза мг/кг	Площадь под кривой интервала ST, у.е.	
							У.Е.	% снижения площади под кривой по отношению к контролю
1	Ложноопери рованная	6					59,84	-55% #
2	Контрольная группа	24					133,53	
3	Верапамил	6				0,8	79,11	-41%
4	РГПУ-87	6	H <sub>3</sub> C-O-	H-		24,8	120,12	-10%
5	РГПУ-96	6	Cl-	H-		26,6	99,86	-25%

6	РГПУ-207	6	H-	H-		37,5	66,08	-51%*
7	РГПУ-263	6	H <sub>3</sub> C-O-	H-		26,3	95,50	-28%
8	РГПУ-232	6	H <sub>3</sub> C-O-	H-		33,9	92,68	-42%
9	РГПУ-262	6	CH <sub>3</sub> -	H-		32,3	80,29	-40%
10	РГПУ-206	6	H-	H-		23,3	92,49	-31%
11	РГПУ-266	6	CH <sub>3</sub> -		H-	23,3	88,78	-34%
12	РГПУ-255	6	H <sub>3</sub> C-O-		H-	24,9	87,67	-34%
13	РГПУ-265	6	CH <sub>3</sub> -		H-	21,8	91,07	-32%
14	РГПУ-254	6	H <sub>3</sub> C-O-		H-	23,4	90,1	-32%
15	РГПУ-264	6	H-		H-	21,9	89,65	-33%

Примечание: # - 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



### 3.2. Исследование зависимости «доза-эффект» соединения-лидера РГПУ-207

В контрольной группе животных, получавших за 10 минут до ОНВЛКА внутривенно физ р-р, площадь под кривой интервала ST была равна  $127,9 \pm 37,5$  у.е., что в 2 раза больше чем в группе ложнооперированных крыс ( $59,6 \pm 6,4$ ) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 3, рис.6).

На фоне введения соединения РГПУ-207 в дозе 37,5 мг/кг исследуемый показатель был ниже значения контрольной группы на 53% и составил  $60,3 \pm 8,2$  у.е. ( $p < 0,05$ ). При снижении дозы РГПУ-207 до 18,7 мг/кг площадь под кривой равнялась  $61,0 \pm 9,3$ , в дозе 9,4 мг/кг -  $68,1 \pm 11,0$  у.е., что было в 2 раза ниже показателя контрольной группы ( $p < 0,05$ ) (Таблица 3, рис.6).

При введении препарата сравнения мексидола в дозах 10 и 20 мг/кг была отмечена тенденция к снижению исследуемого показателя (значения площади под кривой составляли  $107,8 \pm 14,8$  и  $103,7 \pm 20,3$  соответственно). При увеличении дозы до 40 мг/кг исследуемый показатель был на 46% меньше, чем в контрольной группе ( $69,4 \pm 22,2$  у.е.) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 3, рис.6).

Площадь под кривой при введении верапамила в дозе 0,4 мг/кг достигала  $106,6 \pm 18,2$  у.е., что было незначительно ниже, чем в группе контрольных животных. У крыс, получавших препарат в дозах 0,8 и 1,6 мг/кг, был отмечен выраженный антиангинальный эффект. Показатели были на 35% и 52% меньше, чем в группе, получавшей физр-р ( $83,0 \pm 19,2$  и  $61,3 \pm 19,6$  у.е. соответственно) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 3, рис.6).

На фоне введения ивабрадина в дозе 5,3 мг/кг площадь под кривой интервала ST недостоверно снизилась в сравнении со значениями контрольной группы ( $125,0 \pm 34,0$  у.е.). При увеличении дозы до 10,5 показатель составил  $96,6 \pm 30,7$  у.е. Антиангинальный эффект ивабрадина был максимально выражен в дозе 21 мг/кг, площадь под кривой интервала ST была на 37% меньше таковой самцов контрольной группы ( $80,3 \pm 11,2$  у.е.) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 3, рис.6).

Таблица 3. 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±σ)

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

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

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

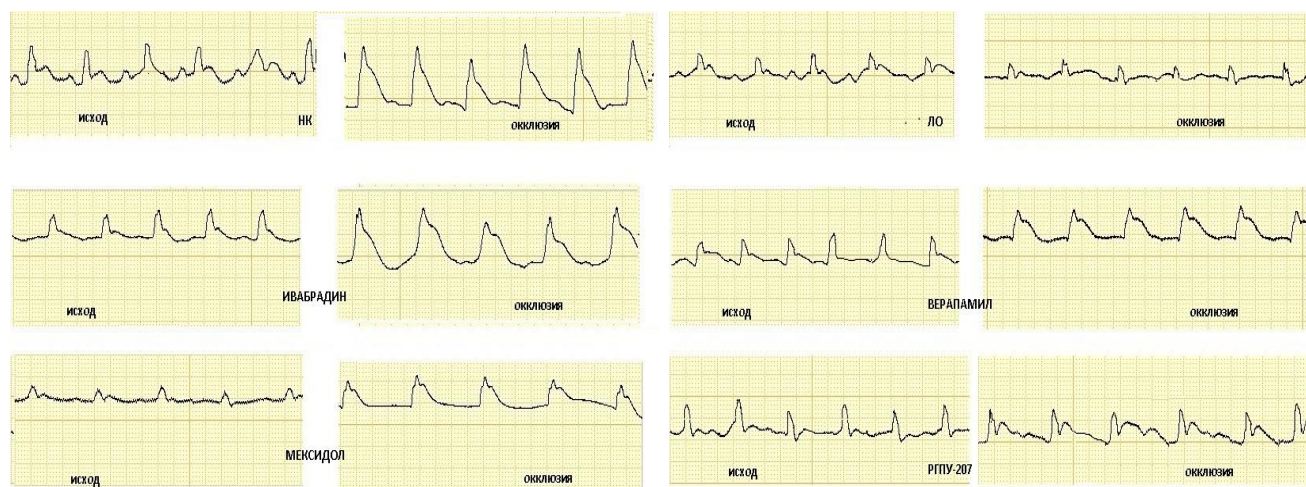


Рис. 6 ЭКГ крысы в экспериментальных группах.

Примечание: НК – контрольная группа, ЛО – ложнооперированная группа

Известно, что на 30-й минуте ишемии развивается гибель кардиомиоцитов. Поэтому было также исследовано действие соединения в условиях кратковременной ишемии

Выявлено, что площадь под кривой интервала ST в течение 10 минут ишемии миокарда и 30-минутной реперфузией у крыс контрольной группой составила  $52,1 \pm 15,8$  у.е., что было на 60% больше по сравнению со значениями группы ложнооперированных животных ( $21,0 \pm 3,4$ ) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4).

На фоне введения соединения РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг наблюдалось снижение исследуемого показателя по отношению к контрольной группе на 48% ( $p < 0,05$ ) ( $27,3 \pm 7,7$  против  $52,1 \pm 15,8$  у.е.). Повышение дозы соединения РГПУ-207 до 18,7 и 37,5 мг/кг не привело к значительному увеличению противоишемического действия, площадь под кривой интервала ST соответствовала  $22,8 \pm 6,3$  и  $22,6 \pm 6,6$  у.е.), что было на 56% и 57% соответственно меньше чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4).

У животных, получавших верапамил в дозах 0,4 и 0,7 мг/кг, исследуемый показатель был равен  $32,1 \pm 20,3$  и  $34,9 \pm 14,1$  у.е. соответственно, что было на 38% и 33% меньше по сравнению с контрольной группой. Увеличение дозы до 1,4 мг/кг привело к существенному усилению эффекта. Площадь под кривой интервала ST была равна  $25,1 \pm 5,7$  у.е., что было на 52% ниже по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4).

Таблица 4. 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	$21,0 \pm 3,4$
Контрольная	12	$52,1 \pm 15,8^{\wedge}$
РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	$27,3 \pm 7,7^*$
РГПУ-207, 18,7 мг/кг	6	$22,8 \pm 6,3^*$
РГПУ-207, 37,5 мг/кг	6	$22,6 \pm 6,6^*$
Верапамил, 0,4 мг/кг	6	$32,1 \pm 20,3$
Верапамил, 0,7 мг/кг	6	$34,9 \pm 14,1$
Верапамил, 1,4 мг/кг	6	$25,1 \pm 5,7^*$

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

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

Таким образом, соединение РГПУ-207 при длительной и кратковременной ОНВЛКА обладает выраженным антиангинальным действием практически равным во всех трех дозах. Поэтому в дальнейших экспериментах использовалась доза 9,4 мг/кг. Противоишемическое действие соединения РГПУ-207 было сопоставимо с таковым верапамила. Ивабрадин и мексидол обладали менее выраженным антиангинальным эффектом. В дальнейших

исследованиях препараты сравнения применялись в максимально эффективных дозах (мексидол – 40 мг/кг, верапамил – 1,6 мг/кг, ивабрадин – 21 мг/кг).

### **3.3. Оценка влияния РГПУ -207 на размеры зон риска ишемии и некроза миокарда в условиях 30-минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией**

Известно, что длительная ишемия миокарда является причиной биохимических и структурных изменений в клетке, что в дальнейшем приводит к некрозу кардиомиоцитов и развитию инфаркта миокарда (Перуцкий Д.Н., 2011), причем последующая реперфузия усиливает выраженность патологических процессов (Piper, H. M., 2004).

Для изучения воздействия соединения РГПУ-207 на размеры зон риска ишемии и некроза миокарда была проведена серия экспериментов на белых беспородных крысах-самцах массой 260-300 г с моделированием ОНВКА. Миокард прокрашивали синим Эванса, затем срезы инкубировали в растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТС). Для подсчета объема зоны риска ишемии считали отношение объемов Эванс-негативных участков к общему объему сердца, для нахождения объема зоны инфаркта рассчитывали отношение объемов ТТС-негативных участков к Эванс-негативным участкам.

Размер зоны некроза у животных группы негативного контроля после 30-минутной окклюзии/реперфузии составил  $42,5 \pm 9,0\%$  (Таб.5).

Соединение РГПУ-207 оказывало противоишемический эффект, снижая размер зоны некроза до  $24,1 \pm 5,6\%$ , что было на 44% меньше, чем в группе негативного контроля ( $p \leq 0,05$ ). Препарат сравнения верапамил снижал исследуемый показатель на 50% по сравнению с контрольной группой животных, показатель равнялся  $20,7 \pm 3,5\%$  ( $p \leq 0,05$ ). В группе животных, получавших мексидол, размер зоны некроза равнялся  $22,2 \pm 3,2\%$ , что на 40% ( $p \leq 0,05$ ) меньше по сравнению с контрольной группой. На фоне введения ивабрадина было отмечено снижение исследуемого показателя на 43% по

отношению с таковым у животных контрольной группы, что равнялось  $23,8 \pm 4,0\%$ .

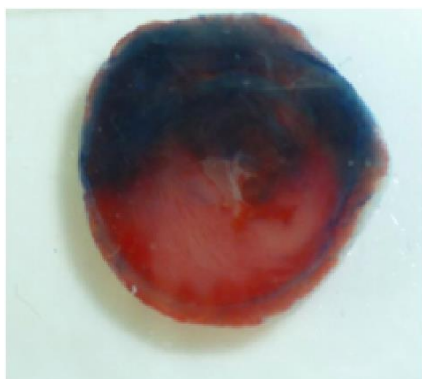
Достоверных различий в величинах анатомической зоны риска в экспериментальных группах выявлено не было (табл. 5, рис 7), что указывает на стандартный уровень ОНВЛКА и равные начальные условия ишемии во всех группах животных.

Таблица 5.

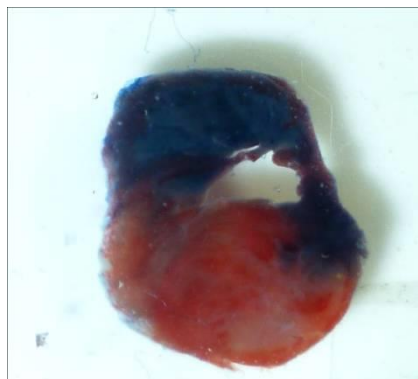
Влияние соединения РГПУ-207, верапамила, ивабрадина и мексидола на размер зоны риска и зоны некроза в условиях 30-ти минутной ОНВЛКА с последующей реперфузией ( $m \pm \sigma$ )

№ n/n	Группы животных	кол-во животных	Размер зоны риска (% сердца)	Размер зоны некроза (% к зоне риска)
1	Контрольная группа	8	$27,6 \pm 6,3$	$42,5 \pm 9,0$
2	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	$22,6 \pm 7,1$	$24,1 \pm 5,6^*$
3	Верапамил, 1,6 мг/кг	6	$26,8 \pm 8,7$	$20,7 \pm 3,5^*$
4	Мексидол, 40 мг/кг	6	$22,2 \pm 3,2$	$22,3 \pm 4,7^*$
5	Ивабрадин, 21 мг/кг	6	$29,9 \pm 6,0$	$23,8 \pm 4,0^*$

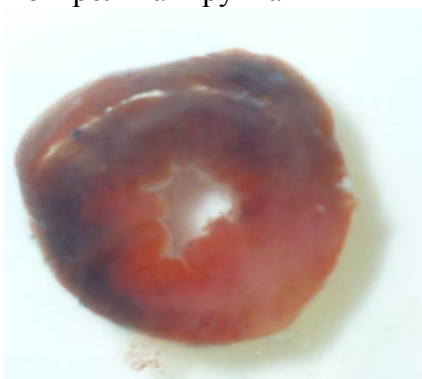
\* данные статистически достоверны по критерию Крускала-Уоллиса и пост-хок теста Дана по сравнению с контрольной группой животных при  $p \leq 0,05$



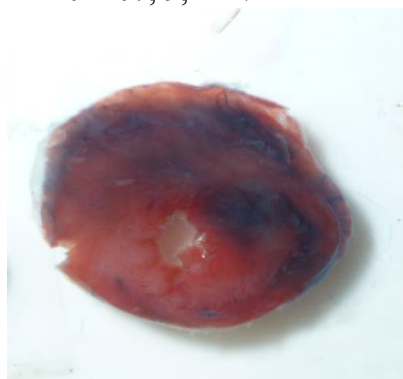
Контрольная группа



РГПУ-207, 9,4 мг/кг



Верапамил, 1,6 мг/кг



Мексидол, 40 мг/кг



Ивабрадин, 21 мг/кг

Рисунок 7. Влияние соединения РГПУ-207 на зоны риска ишемии и некроза миокарда на модели 30-ти минутной ишемии с последующей реперфузией.

Примечание: метод двойного окрашивания синим Эвансом и ТТС: тёмно-синие участки - зона здорового миокарда, розовая - зона риска, белые участки - зоны некроза.

Таким образом, соединение РГПУ-207 оказывает выраженное противоишемическое действие при ишемическом и реперфузионном повреждении, сопоставимое с препаратами сравнения верапамилом и мексидолом, ограничивая размер некротического поражения миокарда.

#### **3.4. Изучение противоаритмического действия соединения РГПУ -207 на различных моделях нарушений ритма сердца (аконитиновая, хлоридкальциевая, реперфузионная модели)**

Известно, что фибрилляция желудочков является одной из основных причин внезапной коронарной смерти (Sara J., 2011.) Нарушения ритма сердца зачастую сопровождается другими патологиями сердечно-сосудистой системы, такие как ИБС (Кароли Н.А. и др., 2017). Используются 3 модели аритмий по виду нарушений ритма сердца: желудочковые аритмии (хлоридкальциевая и реперфузионная модели), наджелудочковые аритмии (аконитиновая модель), (Миронов и др., 2012).

### **3.4.1. Изучение противоаритмического влияние соединения РГПУ - 207 на реперфузионной модели аритмий.**

В развитии ишемических аритмий выявлено две фазы (Baumeister P, 2016). В первые 2-10 минут после окклюзии (с максимумом на уровне 6 минут) 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. Считается, что в основе этой формы нарушений ритма сердца (НРС) лежит *re-entry*, усиленный электролитным дисбалансом в ткани. (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.

#### **3.4.1.1. Исследование противоаритмического действия соединения РГПУ -207 при кратковременной 10-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией.**

В группе ложнооперированных крыс гибели животных не наблюдалось, медиана тяжести возникших аритмий составил 0 баллов, тогда как в контрольной группе у всех крыс отмечался летальный исход ( $p < 0,05$ ), степень НРС составила 4,0 балла ( $p < 0,05$ ) (таблицы 6, 7).

Исследуемое соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг увеличило выживаемость среди самцов до 66,7%, что значительно превышало таковую в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), проявляя при этом противоаритмическую активность, тяжесть аритмий в этой группе составила 1,5 балла, ( $p < 0,05$ ). При увеличении дозы соединения РГПУ-207 до 18,7 мг/кг доля погибших животных составила 16,7%, тяжесть НРС была равна 2,0 баллам, что ниже, чем в контрольной группе на 83,3% ( $p < 0,05$ ) и 62,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При введении соединения РГПУ-207 в дозе 37,5 мг/кг летальность в группе составила 33,3%, выраженность аритмий - 1,5 балла, что меньше показателей

контрольной группы на 66,7% ( $p<0,05$ ) и 62,5% ( $p<0,05$ ) соответственно (таблицы 6,7).

Этмозин в дозе 20 мг/кг в условиях реперфузии миокарда животные выживали в 50% случаев, выраженность НРС была до 2,0 баллов. (таблицы 9,10). Препарат сравнения верапамил при введении в дозе 0,7 мг/кг была отмечена тенденция к антиаритмическому действию вводимого препарата. Доля выживших крыс составила 50%, тяжесть аритмий равнялась 2,0 баллам. (таблицы 6,7).

Летальность в группе крыс, получавших препарат в дозе 40 мг/кг, составила 33,3%, что на 66,7% меньше чем в контрольной группе ( $p<0,05$ ), степень НРС была ниже в сравнении с контрольной группой на 75% и равнялась 1 баллу ( $p<0,05$ ).

Фибрилляции в контрольной группе возникали в 5 раз раньше, чем в группе ложнооперированных животных ( $p<0,05$ ). При введении соединения РГПУ-207 выявлена тенденция к задержке развития фибрилляций: в дозах 9,4 и 18,7 мг/кг время возникновения грубых НРС в 3,5 раза больше чем в контрольной группы, в дозе 37,5 мг/кг – в 4,2 раза. Этмозин в дозе 20 мг/кг способствовал в 4 раза более медленному наступлению фибрилляций по сравнению с контрольной группой. При введении верапамила в дозе 0,7 мг/кг грубые НРС наступали позже в 5 раз, чем в контрольной группе. На фоне введения новокаинамида в дозе 40 мг/кг время возникновения фибрилляций возросло в 3,8 раз по отношению к контрольной группе.



Таблица 6. Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на реперфузионной модели (с ишемией 10 минут) нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Начало фибрилляций, с (M±σ)	Тяжесть аритмии после реперфузии, баллы (Me, (25 кв, 75 кв))
1.	ложнооперированная	1800,0±0,0	0,0 (0,0;1,0)
2.	контроль	359,9±651,0 <sup>^</sup>	4,0 (4,0;4,0) <sup>^</sup>
3.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	1501,7±730,8	1,5 (1,0;4,0)*
4.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	1272,0±823,9	2,0 (1,0;2,0)*
5.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	1248,5±855,7	1,5 (1,0;2,0)*
6.	Этмозин, 20 мг/кг	1800,0±0,0	2,0 (0,0;4,0)
7.	Верапамил, 0,7 мг/кг	1800,0±0,0	2,0 (0,0;4,0)
8.	Новокаинамид, 40 мг/кг	1374,4±658,9	1,0 (0,0;4,0)*

*Примечание: у крыс без фибрилляций на протяжении 30 минут мониторинга начало НРС отмечено как 1800 с.*

*<sup>^</sup> 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*

Таблица 7 Влияние соединения РГПУ-207 на выживаемость животных на реперфузионной модели (с ишемией 10 минут) нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
1.	ложнооперированная	6	0	100,0
2.	контроль	0	7	0,0 <sup>^</sup>
3.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	4	2	66,7*
4.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	5	1	83,3*
5.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	4	2	66,7*
6.	Этмозин, 20 мг/кг	3	3	50,0
7.	Верапамил, 0,7 мг/кг	3	3	50,0
8.	Новокаинамид, 40 мг/кг	4	2	66,7*

*Примечание: <sup>^</sup> 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*

На основании результатов проведенного эксперимента выявлено, что соединение РГПУ-207 в дозах 9,4; 18,7 и 37,5 мг/кг в условиях 10 минутной ишемии с последующей реперфузией обладает выраженным антиаритмическим действием, снижая тяжесть реперфузионных НРС и летальность животных.

### 3.4.1.2. Оценка противоаритмического эффекта соединения РГПУ - 207 при длительной 30-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией.

У животных контрольной группы тяжесть развивающихся реперфузионных аритмий составила 4,0 балла против ложнооперированной группы, где НРС не отмечено ( $p < 0,05$ ). Летальность в контрольной группе была равна 71,4% ( $p < 0,05$ ), в группе ложнооперированных животных гибели не наблюдалось (Таблица 8, 9).

В группе крыс, получавших соединение РГПУ-207 в дозах 9,4; 18,7 и 37,5 мг/кг, выраженность реперфузионных НРС снизилась в 8 раз до 0,5 балла ( $p < 0,05$ ). Выживаемость среди самцов составила 83,3%, 100% и 100% соответственно, что больше чем в контрольной группе (28,6%) ( $p < 0,05$ ) (Таблица 8, 9).

На фоне введения эталонного препарата верапамила в дозе 0,8 мг/кг выраженность НРС составила 1,0 балла, погибло 33,3% животных. (Таблица 11, 12). После введения ивабрадина в дозе 10,5 мг/кг у самцов развивались реперфузионные аритмии с выраженностью 2,5 балла, что в 1,6 раз меньше, чем у крыс контрольной группы. Выживаемость при этом составила 66,7% (в 2,3 раза больше чем в контрольной группе). (Таблица 8, 9).

У животных, получавших мексидол в дозе 40 мг/кг выраженность реперфузионных аритмий составила 2 балла, что было в 2 раза меньше по сравнению с контрольной группой. Летальность в группах составила 33,3% крыс, что было также меньше значений контрольной группы.

Таблица 8 Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на реперфузионной модели (30 минутной ишемией) нарушений ритма сердца

№	Группа	Начало фибрилляций, с ( $M \pm \sigma$ )	Тяжесть аритмии после реперфузии, баллы ( $Me$ , (25 кв, 75 кв))
1.	Ложнооперированная	1800,0 $\pm$ 0,0	0,0 (0,0;0,0)
2.	Контрольная	823,9 $\pm$ 653,1 &	4,0 (3,0;4,0) &
3.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	1510,8 $\pm$ 708,3	0,5 (0,0; 1,0)#
4.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	1800,0 $\pm$ 0,0	0,5 (0,0;1,0)#
5.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	1800,0 $\pm$ 0,0	0,5 (0,0; 1,0)#
6.	Верапамил, 0,8 мг/кг	1312,8 $\pm$ 780,6	1,0 (0,0;4,0)
7.	Ивабрадин, 10,5 мг/кг	1324,3 $\pm$ 737,6	2,5 (2,0; 4,0)
8.	Мексидол, 40 мг/кг	1360,8 $\pm$ 744,4	2,0 (2,0;4,0)

*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  $p < 0,05$ .*

Таблица 9 Влияние соединения РГПУ-207 на выживаемость животных на реперфузионной модели (30 минутной ишемией) нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
1.	Ложнооперированная	6	0	100,0
2.	Контрольная	4	10	28,6 <sup>^</sup>
3.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	5	1	83,3*
4.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	6	0	100,0*
5.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	6	0	100,0*
6.	Верапамил, 0,8 мг/кг	4	2	66,7
7.	Ивабрадин, 10,5 мг/кг	4	2	66,7
8.	Мексидол, 40 мг/кг	4	2	66,7

*Примечание: у крыс без фибрилляций на протяжении 30 минут мониторинга начало НРС отмечено как 1800 с.*

*<sup>^</sup> 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  $p < 0,05$*

У крыс контрольной группы тяжелые НРС наступали в 2 раза раньше, чем у животных ложнооперированной группы ( $p < 0,05$ ). Соединение РГПУ-207 в дозах 18,7 и 37,4 мг/кг удлиняло время возникновения фибрилляций в 2,2 раза.

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

Таким образом, соединение РГПУ-207 на аконитиновой, кратковременной и длительной реперфузионной моделях НРС проявил антиаритмическое действие во всех трех изучаемых дозах (9,4; 18,7 и 37,5 мг/кг), достоверно снижая тяжесть возникающих НРС (на реперфузионных моделях), вероятность развития фибрилляций (в условиях введения аконитина) и повышая выживаемость животных опытных групп. На хлоридкальциевой

модели НРС соединение РГПУ-207 оказывало антиаритмический эффект только в дозе 37,5 мг/кг, а в дозе 18,7 мг/кг отмечено достоверное снижение летальности крыс. 3.4.1.

### **3.4.2. Оценка действия соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи нейронов моллюсков**

После выявления антиаритмического эффекта соединения было изучено его влияние на трансмембранные ионные токи. В литературе указано, что пираретам влияет на работу кальциевых каналов нейронов, что по мнению авторов, может быть одним из возможных механизмов его ноотропной активности (Bravo-Martínez J. et al., 2012). Поэтому было изучено влияние соединения РГПУ-207 на трансмембранные ионные токи нейронов.

На рис. 22, Б продемонстрировано, что исследуемое соединение в концентрации 1000 мкМ подавляло все ионные токи. Сильнее был подавлен натриевый ток, чем кальциевый (рис. 22Г, натриевый ток - левая часть кривой 2, кальциевый – ее правая часть). Калиевый ток по сравнению с контролем подавлен сильнее (рис. 22, Б, кривая 3 в правой части), чем суммарный входящий (левая часть кривой 3,)

Соединение РГПУ-207 в концентрации 10 мкМ подавляло амплитуду натриевого тока на  $5,9 \pm 2,5\%$  (рис. 22, А), при увеличении содержания исследуемого соединения до 1000 мкМ подавление равнялось  $47 \pm 4,3\%$ . Было отмечено, что описанный эффект наступал быстро, а после отмывания медленно элиминировался. Кинетика развития натриевого тока (рис. 22, В) под влиянием соединения РГПУ-207 и положение максимума ВАХ не изменялись, что говорит об отсутствии взаимодействия препарата со структурами воротных механизмов натриевых каналов и о неизменности потенциала фиксированных зарядов мембраны вблизи них.

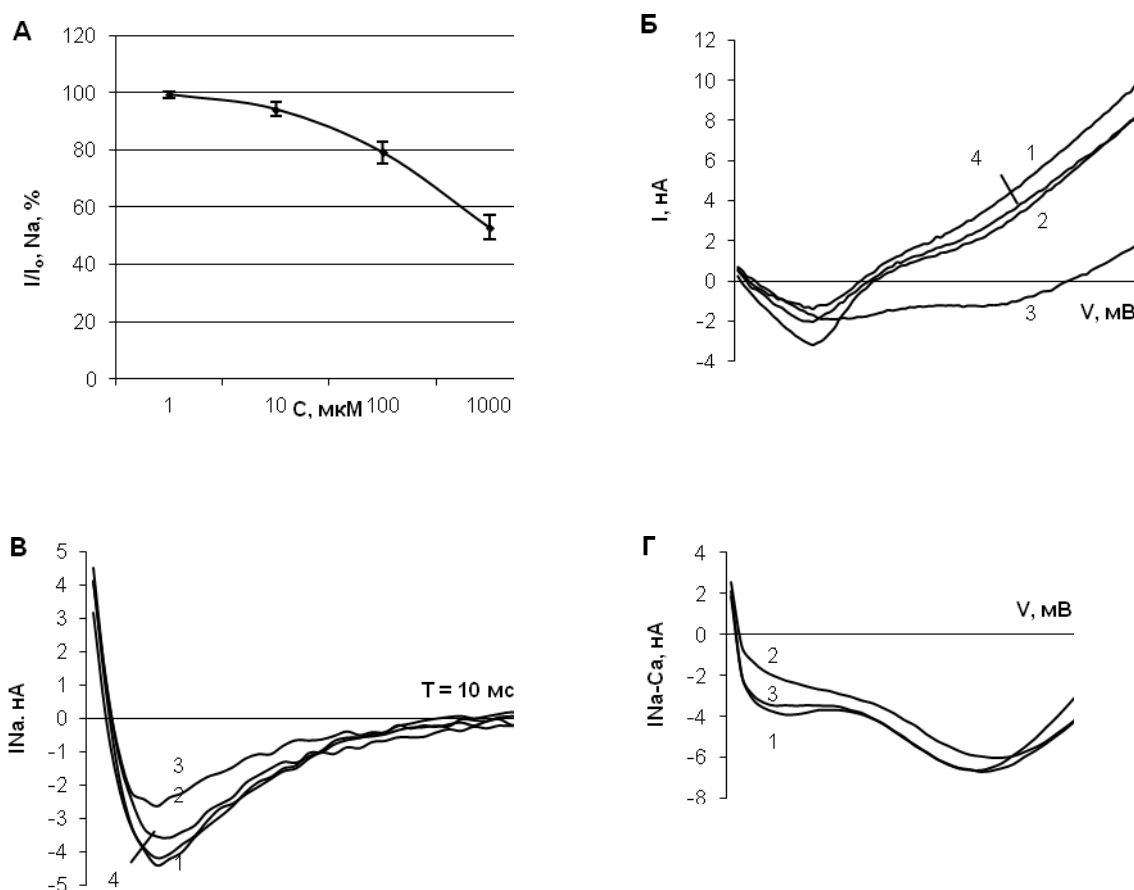


Рис. 22. Изменения ионных токов нейронов прудовика под влиянием соединения РГПУ-207.

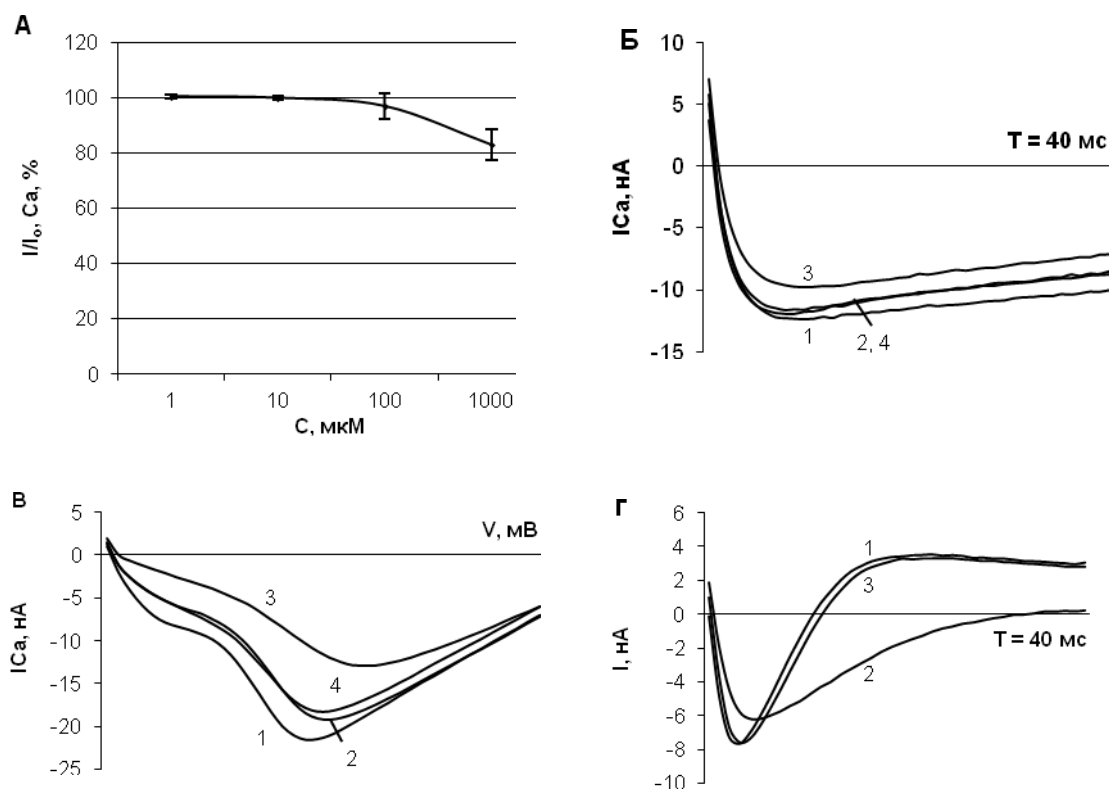
*Примечания: А – зависимость «концентрация – эффект» для натриевого тока. Б – изменения суммарных ВАХ (поддерживаемый потенциал  $V_h = -90$  мВ): 1 – контроль, 2 – 100 мкМ, 3 – 1000 мкМ, 4 – отмывание. В – изменения амплитуды и кинетики натриевого тока при прямоугольном смещении потенциала ( $V_h = -90$  мВ, тестирующий  $V_t = -10$  мВ): 1 – контроль, 2 – 10 мкМ, 3 – 1000 мкМ, 4 – отмывание, Г – ВАХ мембраны (натрий-кальциевые токи,  $V_h = -90$  мВ): 1 – контроль, 2 – 1000 мкМ 3 – отмывание.*

*По оси абсцисс: А – концентрация, Б и Г – пилообразное смещение мембранного потенциала от  $-40$  до  $30$  мВ за  $40$  мс, В – время; по оси ординат – ионный ток (А:  $I$  – при действии вещества,  $I_0$  – до действия);  $I_{\text{Na}}$  – натриевый ток; доверительные интервалы при  $p = 95\%$ .*

При концентрации соединения в 100 мкМ отмечалась тенденция к снижению кальциевого тока (рис. 23, А). В концентрации 1000 мкМ наблюдалось подавление кальциевого тока на  $17,1 \pm 5,5\%$  ( $p < 0,05$ ), которое наступало в течение одной минуты и исчезало при отмывании за 3–5 мин. Кинетика развития тока (рис. 23, Б) не менялась, а положение максимума ВАХ

мембраны (рис. 23, В, кривая 3) смещалось вправо по оси потенциалов на 7–10 мВ.

Отмечено, что в концентрации соединения РГПУ-207 1000 мкМ калиевый быстрый ток (рис. 23, Г правые части кривых 1 и 3) подавлялся сильнее кальциевого (рис. 23, Г, левые части кривых).



**Рис. 23.** Изменения кальциевого тока нейронов прудовика под влиянием соединения РГПУ-207.

*Примечания:* **А** – зависимость «концентрация – эффект» для кальциевого тока. **Б** – изменения амплитуды и кинетики тока ( $V_h = -90$  мВ,  $V_t = 0$  мВ): 1 – контроль, 2 – 100, 3 – 1000 мкМ, 4 – отмывание. **В** – ВАХ ( $V_h = -90$  мВ): 1 – контроль, 2 – 10 мкМ, 3 – 1000 мкМ, 4 – отмывание (кривые 2 и 4 сливаются). **Г** – суммарные кальций-калиевые токи ( $V_h = -90$  мВ,  $V_t = 0$  мВ): 1 – контроль, 2 – 1000 мкМ, 3 – отмывание.

По оси абсцисс: **А** – концентрация препарата, **Б и Г** – время, **В** – пилообразное смещение мембранного потенциала от  $-40$  до  $50$  мВ длительностью  $100$  мс; по оси ординат – ионный ток (**А**:  $I$  – при действии вещества,  $I_0$  – до действия);  $I_{Ca}$  – кальциевый ток; достоверные интервалы при  $p = 95\%$ .

В концентрации  $1$  мкМ соединение РГПУ-207 активизировало медленные калиевые токи на  $4,4 \pm 2,0\%$  (рис. 24, А), а в концентрации  $100$  и  $1000$  мкМ подавляло соответственно на  $26,1 \pm 4,5\%$  и  $60,2 \pm 5,9\%$ .

На фоне добавления исследуемого соединения было отмечено снижение амплитуды (рис. 24, Б) и после отмывания нейрона от вещества показано замедление активации калиевого медленного тока (рис. 24, Б, левая часть кривой 4), что свидетельствует о взаимодействии соединения с активационными воротами каналов, вероятно, при вхождении молекул РГПУ-207 в открытые каналы. На рис. 24, В (кривая 3) продемонстрировано уменьшение крутизны наклона ВАХ мембраны нейронов.

При изучении быстрых калиевых токов выявлено, что они в присутствии соединения РГПУ-207 изменяются подобно медленным калиевым токам (рис. 24, Г). В начале кривых отмечается их быстрый рост (что объясняется возникновением емкостных токов мембраны), затем идут выходящие быстрые калиевые токи, за ними следуют задержанные токи и в конце кривой опять записаны емкостные и «хвостовые» токи мембраны, направленные вниз и возникающие на выключение деполяризующего смещения потенциала. Под влиянием соединения РГПУ-207 продемонстрировано уменьшение амплитуды выходящих быстрых калиевых и задержанных токов (рис. 24, Г).

В концентрации 1–10 мкМ соединения РГПУ-207 неспецифические токи утечки мембраны уменьшались незначительно, при концентрации 100–1000 мкМ было отмечено их возрастание, что указывает на изменения неспецифической проводимости мембраны и соответственно на повышение и снижение ее стабильности.

На основании полученных данных можно говорить о том, что соединение РГПУ-207 в концентрации 1 мкМ оказывает активирующее действие на амплитуду трансмембранных калиевых ионных токов нейронов моллюсков. При повышении концентрации до 1000 мкМ соединение обратимо подавляло натриевые, кальциевые и калиевые трансмембранные токи.

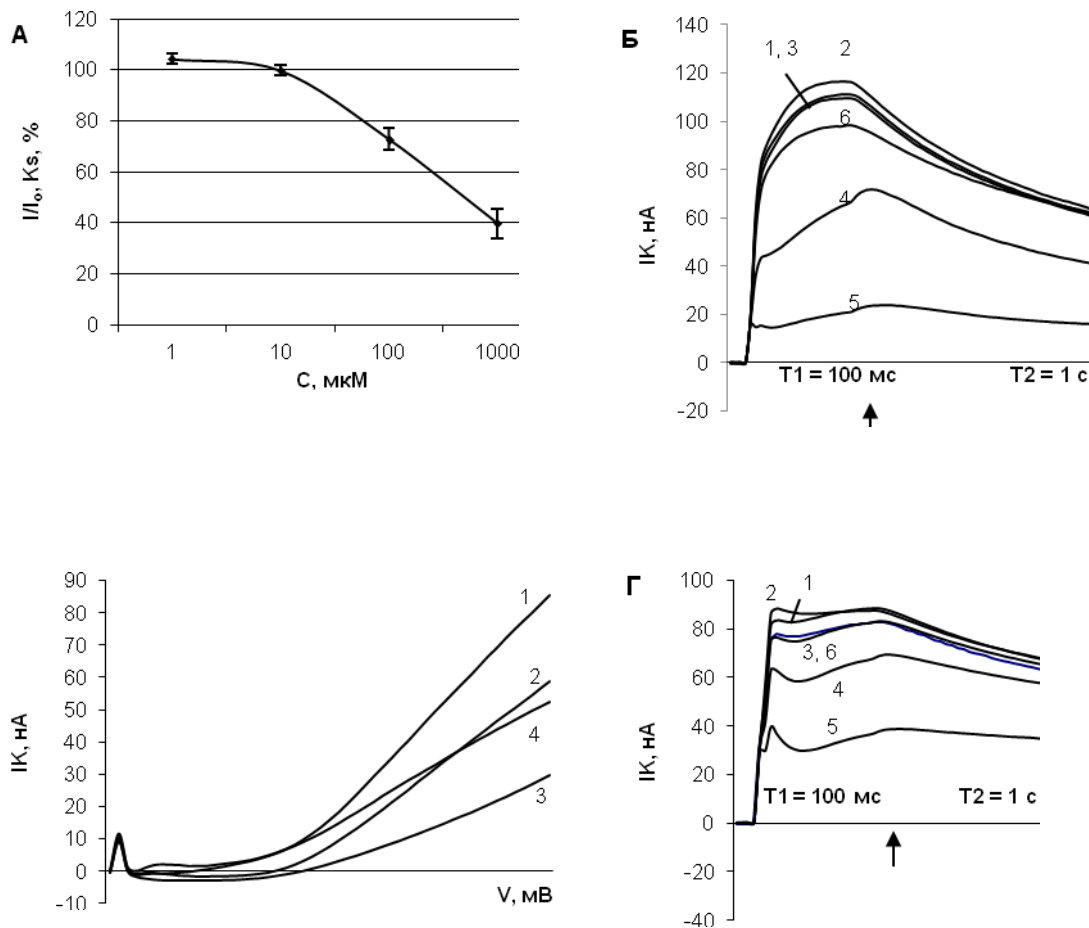


Рис. 24. Изменения калиевого медленного тока нейронов прудовика под влиянием соединения РГПУ-207 ( $n = 13$ )

*Примечания: А – зависимость «концентрация – эффект». Б – изменения амплитуды и кинетики тока ( $V_h = -90$  мВ,  $V_t = 40$  мВ): 1 – контроль, 2 – 1 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – 100, 5 – 1000 мкМ и 6 – отмывание. В – изменения ВАХ мембраны ( $V_h = -90$  мВ): 1 – контроль, 2 – 100 мкМ 3 – 1000 мкМ, 4 – отмывание. Г – изменения амплитуды и кинетики тока ( $V_h = -90$  мВ,  $V_t = 40$  мВ): в начале кривых – быстрый калиевый ток: 1 – контроль, 2 – 1 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – 100 мкМ, 5 – 1000 мкМ, 6 – отмывание; По оси абсцисс: А – концентрация; Б и Г – время:  $T_1$  – слева до стрелки, далее –  $T_2$ ; В – пилообразное смещение мембранного потенциала от  $-40$  до  $50$  мВ длительностью 100 мс; по оси ординат: ионные токи: (А:  $I$  – при действии вещества,  $I_0$  – до действия);  $I_{Ks}$  – медленный калиевый ток,  $I_K$  – суммарные калиевые токи (быстрый и медленный); доверительные интервалы при  $p = 95\%$ .*



### 3.4.3. Исследование противоаритмического эффекта соединения РГПУ -207 на аконитиновой модели аритмий.

В контрольной группе животных после введения аконитина у 75% из них возникли фибрилляции желудочков (рис. 9), все из которых погибли к 30 минуте после введения аритмогена. Соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг существенно ограничивало развитие НРС, только у четверти самцов были зарегистрированы фибрилляции, которые позже переросли в асистолию, что было в 3 ( $p < 0,05$ ) раза меньше, чем в контрольной группе. При повышении дозы соединения до 18,7 мг/кг, летальность и вероятность возникновения грубых нарушений ритма сердца были в 2,8 ( $p < 0,05$ ) раза меньше, чем у контрольной группы (фибрилляции и гибель отмечены у 30% животных). После введения соединения РГПУ-207 в дозе 37,5 мг/кг у четвертой части крыс были отмечены фибрилляции, погибли 33,3% животных ( $p < 0,05$ ), что было в 3 раза меньше, чем в контрольной группе (таблицы 5, 6).



Рисунок 9. Возникновение фибрилляций при введении аконитина

Примечание: А - исходное ЭКГ до введения аконитина

Б – фибрилляции, развившиеся после введения аконитина

На фоне введения референтного препарата этмозина в дозе 10 мг/кг была 100% выживаемость с полным отсутствием грубых НРС у животных, при этом в контрольной группе фибрилляции не отмечались у 25% крыс, которые не погибли в ходе эксперимента ( $p < 0,05$ ) (таблицы 5, 6).

Лидокаин в дозе 7,5 предотвращал возникновения НРС и летальные исходы у животных в 100% случаев, в то время как в контрольной группе фибрилляции были зарегистрированы у 75% крыс, которые погибли ( $p < 0,05$ ) (таблицы 5, 6).

Эталонный препарат новокаинамид в дозе 20 мг/кг обладал одинаковой антиаритмической активностью (фибрилляции развивались у 16,7% животных) и погибали 33,3% самцов, что было меньше соответственно в 3,3 ( $p < 0,05$ ) и 2,7 раза, чем в контрольной группе (таблицы 10, 11).

Соединение РГПУ-207 способствовало удлинению времени возникновения НРС в дозах 9,4; 18,7 и 37,5 мг/кг на 38%, 53% и 63% соответственно по сравнению с контрольной группой. При введении препаратов сравнения новокаинамида и лидокаина также наблюдалась тенденция к пролонгации параметра по отношению к контрольной группе. Эталонный препарат этмозин в дозе 10 мг/кг удлинял время возникновения НРС 106% соответственно относительно контрольной группы (таблица 10).

Таблица 10 Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Начало фибрилляций, с (M±σ)	Кол-во самцов с фибрилляциями	Кол-во самцов без фибрилляций	% самцов без фибрилляций
1.	контроль	872,2±578,2	9	3	25,0
2.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	1203,3±823,9	2	6	75,0*
3.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	1331,6±756,3	3	7	70,0*
4.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	1424,7±682,7	3	9	75,0*
5.	Этмозин, 10,0 мг/кг	1800,0±0,0	0	6	100,0*
6.	Лидокаин, 7,5 мг/кг	1800,0±0,0	0	6	100,0*
7.	Новокаинамид, 20 мг/кг	1606,3±474,4	1	5	83,3*

*Примечание: у крыс без фибрилляций на протяжении 30 минут мониторинга начало НРС отмечено как 1800 с.*

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

Таблица 11. Влияние соединения РГПУ-207 на выживаемость животных на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
---	-----------------	------------------------	------------------------	-------------------

1.	контроль	3	9	25,0
2.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	6	2	75*
3.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	7	3	70*
4.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	8	4	66,7*
5.	Этмозин, 10,0 мг/кг	6	0	100*
6.	Лидокаин, 7,5 мг/кг	6	0	100*
7.	Новокаинамид, 20 мг/кг	4	2	66,7

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

По результатам проведенных исследований выявлено, что соединение РГПУ-207 обладает выраженной антиаритмической активностью на аконитиновой модели НРС во всех трех исследуемых дозах, незначительно уступая новокаинамиду, этмозину и лидокаину. Важно отметить, что исследуемое вещество снижает летальность среди животных опытной группы сопоставимо с препаратами сравнения.

#### **3.4.4. Оценка противоаритмического действия соединения РГПУ -207 на хлоридкальциевой модели аритмий.**

Для оценки эффективности соединения в условиях хлоридкальциевой модели НРС в качестве эталонных были использованы антиаритмические препараты IB класса -лидокаин в дозе 3,5 мг/кг и IV класса -верапамил в дозе 0,3 мг/кг по классификации E.M. Vaughan Williams.

После введения хлорида кальция животным контрольной группы тяжелые нарушения ритма сердца наблюдались у 66,7% крыс, гибель в группе составила 77,8%. У крыс, получавших соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг, фибрилляции также были отмечены у 66,7% животных, в то время как летальность в группе упала в 2,3 раза по отношению к контрольной группе (33,3% погибших крыс) При увеличении дозы исследуемого соединения до 18,7 мг/кг доля животных с грубыми НРС снизилась в 2 раза в сравнении с контрольной группой (33,3% самцов с тяжелыми НРС), вероятность летального исхода снизилась в 3,8 раза ( $p < 0,05$ ) до 16,7%. При повышении дозы до 37,5 мг/кг соединение РГПУ-207 оказывало антиаритмический эффект,

предотвращая появление фибрилляций у 100% крыс, в то время как в контрольной группе грубые НРС отсутствовали у 33,3% самцов ( $p < 0,05$ ). Уровень гибели животных был в 3,8 раз меньше чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), достигая 16,7% (таблицы 12, 13).

При введении препарата сравнения верапамила 0,3 мг/кг частота возникновения фибрилляций составила 16,7%, что меньше чем в контрольной группы в 2,5 раза, вероятность летального исхода равнялась 33,3%, что было в 3 раза ниже такового контрольной группы. (таблицы 7, 8).

При введении референтного препарата лидокаина в дозе 3,5 мг/кг тяжелые формы НРС были выявлены в 16,7% случаев, что в 2,5 раза меньше, чем в контрольной группе. Частота гибели в опытной группе составила 33,3%, что в 3 раза реже, чем в контрольной. (таблицы 12, 13).

Соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг практически не влияло на время наступления НРС. При его введении в дозах 18,7 и 37,5 мг/кг время удлинилось в 2 и 3 раза соответственно. Препарат сравнения верапамил в дозе 0,3 мг/кг удлинил время начала фибрилляций в 2,5 раза. На фоне введения лидокаина в дозе 3,5 мг/кг время возникновения фибрилляций увеличилось в 2,4 раза (таблица 12).

Таким образом, показано, что исследуемое соединение РГПУ-207 в дозе 37,5 мг/кг обладает антиаритмическим эффектом на хлоридкальциевой модели НРС по эффективности сопоставимым с эталонными препаратами. Исследуемое соединение в большем количестве случаев предотвращает гибель животных, чем верапамил и лидокаин.

Таблица 12 Антиаритмическое действие соединения РГПУ-207 на хлоридкальциевой модели нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Начало фибрилляций, с (M±σ)	Кол-во самцов с фибрилляциями	Кол-во самцов без фибрилляций	% самцов без фибрилляций
1.	контроль	620,9±884,4	6	3	33,3
2.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	632,7±904,8	4	2	33,3
3.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	1210,0±914,0	2	4	66,7
4.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	1800,0±0,0	0	6	100*

5.	Верапамил, 0,3 мг/кг	1503,5±726,3	1	5	83,3
6.	Лидокаин, 3,5 мг/кг	1504,2±724,6	1	5	83,3

*Примечание: у крыс без фибрилляций на протяжении 30 минут мониторинга начало НРС отмечено как 1800 с.*

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

Таблица 13. Влияние соединения РГПУ-207 на выживаемость животных на хлоридкальциевой модели нарушений ритма сердца

№	Группы животных	Кол-во выживших самцов	Кол-во погибших самцов	% выживших самцов
1.	контроль	2	7	22,2
2.	РГПУ-207, 9,4 мг/кг	4	2	66,7
3.	РГПУ-207, 18,7 мг/кг	5	1	83,3*
4.	РГПУ-207, 37,5 мг/кг	5	1	83,3*
5.	Верапамил, 0,3 мг/кг	4	2	66,7
6.	Лидокаин, 3,5 мг/кг	4	2	66,7

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

### **3.5. Изучение влияния соединения РГПУ-207 на функциональные резервы сердца при стрессе**

У интактных самцов контрольной группы и получавших соединение РГПУ-207, препараты сравнения фенибут и пирацетам, достоверных изменений ОМН и ОМТ не выявлено, дефекты СОЖ не отмечались. У крыс контрольной группы на фоне острого стресса обнаружены эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки желудка ( $p < 0,05$ ), ОМН была на 21% ( $p < 0,05$ ) больше, а ОМТ на 52% ( $p < 0,05$ ) меньше по сравнению с показателями интактных животных. В условиях 24-часового стресса при введении соединения РГПУ-207 тяжесть поражения СОЖ была менее выраженной ( $p < 0,05$ ), ОМН была на 15 % ( $p < 0,05$ ) меньше, а ОМТ на 68% ( $p < 0,05$ ) больше по сравнению со значениями животных группы негативного контроля. На фоне введения фенибута и пирацетама у стрессированных крыс состояние СОЖ равнялось 1 баллу ( $p < 0,05$ ), ОМН была на 17% ( $p < 0,05$ ) и 13% ( $p < 0,05$ ) ниже, а ОМТ - на 68% ( $p < 0,05$ ) и 38% ( $p < 0,05$ ) соответственно выше по отношению к показателям стрессированных самцов контрольной группы (Табл.14).

Таблица 14. Влияние производных ГАМК на прирост срАД, ОМН, ОМТ ( $M \pm \sigma$ ) и тяжесть поражения СОЖ (Ме, (25 кв, 75 кв)) в условиях 24-часового стресса.

Группы животных	Прирост срАД, %	ОМН, мг/г	ОМТ, мг/г	Тяжесть поражения СОЖ, баллы
Позитивный контроль (интактные)	1,0±2,4	0,2±0,0	1,5±0,4	0 (0;0)
Интактные +РГПУ-207	-1,3±0,0	0,1±0,0	1,8±0,7	0 (0;0)
Интактные +фенибут	-0,8±0,0	0,1±0,0	1,4±0,4	0 (0;0)
Интактные +пирацетам	1,6±0,0	0,2±0,0	1,5±0,5	0 (0;0)
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	16,3±5,7*	0,2±0,0*	1,0±0,2*	2,5 (2; 3,5) ^
Стресс+РГПУ-207	4,0±0,0#	0,2±0,0#	1,6±0,4#	0,5 (0; 2)§
Стресс+фенибут	8,1±0,0#	0,2±0,0#	1,4±0,2#	1 (1, 1) §
Стресс+пирацетам	7,8±0,0#	0,2±0,0#	1,3±0,5#	1 (1, 2) §

Примечания: \* -относительно интактных животных контрольной группы по *t*-критерию Стьюдента;

^ - относительно интактных животных контрольной группы по критерию Крускала-Уоллиса и пост-хок теста Данна;  $p < 0,05$

# относительно стрессированных животных контрольной группы по критерию Ньюмена-Кейлса;

§- относительно стрессированных животных контрольной группы по критерию Крускала-Уоллиса и пост-хок теста Данна;  $p < 0,05$

У интактных животных контрольной группы и получавших соединения РГПУ-207, фенибут и пирацетам срАД за 24 часа наблюдения практически не изменялось, в то время как у стрессированных животных группы контроля показатель возрастал на 16,3% ( $p < 0,05$ ) (Табл. 13). При введении стрессированным крысам соединения РГПУ-207 прирост срАД был меньше в 4 ( $p < 0,05$ ), фенибута и пирацетама - в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым у самцов контрольной группы, подвергшихся стрессорному воздействию (Табл.14).

При введении интактным самцам соединения РГПУ-207 в условиях проведения преднагрузки прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда (+dP/dt, -dP/dt) был в среднем в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) выше, по сравнению с показателями группы позитивного контроля. У интактных животных, получавших пирацетам и фенибут, наблюдалось менее выраженное увеличение

исследуемых параметров. На фоне стресса прирост  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС на 10 секунде после проведения нагрузки объемом был на 62% ( $p < 0,05$ ), 44% ( $p < 0,05$ ), 44% ( $p \leq 0,05$ ) и 67% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно ниже относительно показателей крыс интактной группы. После введения соединения РГПУ-207 на фоне стресса выявлено увеличение прироста скорости сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и ЧСС на 79% ( $p < 0,05$ ), 61% ( $p < 0,05$ ), 70% ( $p < 0,05$ ) и 79% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с животными группы негативного контроля. У стрессированных крыс, получавших фенибут, также повышался прирост показателей  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС на 58% ( $p < 0,05$ ), 55% ( $p < 0,05$ ), 59% ( $p < 0,05$ ) и 70% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно значений животных группы негативного контроля, но в меньшей степени, чем у самцов, которым вводили соединение РГПУ-207. На фоне пираретама у стрессированных самцов повышался лишь прирост скорости сокращения и расслабления миокарда (на 63% ( $p < 0,05$ ) и 57% ( $p < 0,05$ ) соответственно) по сравнению показателями животных контрольной группы, увеличение ЧСС и ЛЖД было недостоверно (Табл.15).

У интактных животных, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пираретам, на 10 секунде стимуляции адренорецепторов сердца достоверных изменений прироста  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС по сравнению с интактными самцами контрольной группы не выявлено. В группе негативного контроля прирост исследуемых показателей был более, чем в два раза ниже (на 46% ( $p < 0,05$ ), 68% ( $p < 0,05$ ), 43% ( $p < 0,05$ ) и 60% ( $p < 0,05$ ) соответственно) по сравнению с показателями интактных животных контрольной группы. Введение соединения РГПУ-207 в условиях стресса приводило к увеличению прироста  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС на 48% ( $p < 0,05$ ), 68% ( $p < 0,05$ ), 47% ( $p < 0,05$ ) и 64% ( $p < 0,05$ ) У стрессированных крыс, получавших фенибут, прирост  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС также был выше, чем у животных негативного контроля на 47% ( $p < 0,05$ ), 68% ( $p < 0,05$ ), 52% ( $p < 0,05$ ) и 56% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно. Пираретам способствовал увеличению прироста  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД и ЧСС по сравнению со стрессированными самцами

контрольной группы на 38% ( $p < 0,05$ ), 51% ( $p < 0,05$ ), 36% ( $p < 0,05$ ) и 37% ( $p < 0,05$ ), что было в среднем в 1,3 и 1,4 раза ниже, чем у животных, получавших соединения РГПУ-207 и фенибута. (Табл.16).

В условиях постнагрузки у интактных крыс, получавших соединение РГПУ-207 и референтные препараты, прирост исследуемых показателей на 5 секунде был незначительно выше в сравнении с приростом интактных самцов контрольной группы. У стрессированных животных при окклюзии восходящей части дуги аорты прирост  $+dP/dt$ ,  $-dPp/dt$ , ЛЖД, ЧСС и МИФС снизился в два раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым крыс группы позитивного контроля. При проведении изометрической нагрузки у стрессированных самцов, получавших соединение РГПУ-207, прирост исследуемых показателей был в два раза больше ( $p < 0,05$ ) такового стрессированных крыс контрольной группы. На фоне введения препаратов сравнения у крыс, подвергшихся стрессу, при окклюзии восходящей части дуги аорты прирост  $+dP/dt$ ,  $-dPp/dt$ , ЛЖД, ЧСС и МИФС был в среднем в 2 раза ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с показателями стрессированных животных контрольной группы (Табл.17,18).



Таблица 15. Влияние аналогов ГАМК на показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом ( $M \pm m$ ).

Группы животных	+dP/dt		-dP/dt		ЛЖД		ЧСС	
	Исходно, мм рт.ст./с	Через 10 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст./с	Через 10 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст.	Через 10 с, мм рт.ст.	Исходно, уд/мин	Через 10 с, уд/мин
Позитивный контроль (интактные)	5451,3±263,6	6917,6±464,0 (27,0±6,3)	-2837,6±175,3	-4043,2±283,6 (42,272±4,3)	87,0±4,7	106,6±5,0 (23,1±3,4)	235,1±21,8	317,3±24,0 (36,5±5,2)
Интактная группа +РГПУ-207	6099,8±923,5	9467,3±1377,8 (55,8±6,6 <sup>^</sup> )	-4625,5±823,6	7698,0±1380,6 (65,6±5,6 <sup>^</sup> )	94,9±7,1	141,7±10,9 (49,5±6,2 <sup>^</sup> )	261,9±25,4	419,6±45,7 (60,1±7,2 <sup>^</sup> )
Интактная группа +фенибут	5166,5±648,7	7039,8±711,1 (38,9±5,4)	-3168,2±483,9	-4756,2±752,8 (49,9±5,4)	97,4±5,8	121,5±5,3 (26,2±5,7)	231,9±16,2	323,2±26,6 (39,3±6,8)
Интактная группа +пирацетам	6415,4±523,7	8469,4±825,9 (32,4±6,7)	-4102,8±500,1	-5936,7±794,6 (44,6±5,8)	98,8±7,0	121,0±9,2 (22,8±5,2)	260,0±25,2	339,7±31,1 (33,4±7,2)
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	7794,7±805,7	8557,9±820,8 (10,3±1,9 <sup>*</sup> )	-5618,8±583,6	-6938,9±707,0 (23,8±2,1 <sup>*</sup> )	106,9±7,4	120,3±7,3 (13,0±2,2 <sup>*</sup> )	309,2±15,9	343,9±13,4 (12,1±3,7 <sup>*</sup> )
Стресс+РГПУ-207	5049,4±636,8	7555,0±973,3 (49,4±4,4 <sup>#</sup> )	-3576,0±477,7	-5596,1±608,1 (61,2±11,7 <sup>#</sup> )	85,5±5,1	123,0±9,0 (43,7±6,3 <sup>#</sup> )	245,9±10,6	383,3±14,9 (57,8±9,2 <sup>#</sup> )
Стресс+фенибут	6142,1±503,7	7688,2±723,8 (24,3±2,7 <sup>#</sup> )	-3696,6±364,5	-5543,3±480,8 (53,0±10,0 <sup>#</sup> )	98,0±5,6	128,9±7,3 (32,1±4,6 <sup>#</sup> )	235,5±16,2	329,8±26,4 (40,3±5,5 <sup>#</sup> )
Стресс+пирацетам	6004,2±675,7	7628,7±826,2 (27,9±2,5 <sup>#</sup> )	-4265,1±575,4	-6420,1±770,9 (55,6±9,4 <sup>#</sup> )	91,7±5,3	115,1±8,0 (25,2±4,6)	264,4±20,1	333,6±19,3 (27,7±5,0)

Примечания: в скобках указан % прироста по отношению к исходным данным

\* -относительно интактных животных контрольной группы по t-критерию Стьюдента;

<sup>^</sup> - по критерию Ньюмена-Кейлса;  $p < 0,05$ ;

<sup>#</sup> относительно стрессированных животных контрольной группы по критерию Ньюмена-Кейлса;  $p < 0,05$

Таблица 16. Влияние аналогов ГАМК на показатели кардиодинамики в условиях стимуляции адренорецепторов сердца ( $M \pm m$ ).

Группы животных	+dP/dt		-dP/dt		ЛЖД		ЧСС	
	Исходно, мм рт.ст./с	Через 10 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст./с	Через 10 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст.	Через 10 с, мм рт.ст.	Исходно, уд/мин	Через 10 с, уд/мин
Позитивный контроль (интактные)	5606,3±421,7	11245,0±710,5 (105,5±14,1)	-3793,1±254,7	-9907,2±785,7 (159,6±4,7)	95,3±5,3	155,0±8,5 (64,3±9,8)	254,8±22,4	508,4±29,2 (104,3±11,4)
Интактная группа +РГПУ-207	4824,8±804,9	9742,3±1363,6 (110,5±9,4)	-3004,9±445,2	-7989,2±1269,3 (163,5±5,7)	88,7±3,3	147,6±6,9 (66,1±2,5)	202,9±18,7	433,2±38,6 (114,3±5,1)
Интактная группа +фенибут	4794,2±541,0	10030,0±1360,2 (106,0±9,4)	-3324,5±264,0	-8713,8±870,6 (159,5±9,2)	93,8±6,3	162,4±7,0 (75,5±6,3)	229,7±10,0	466,4±16,1 (105,5±11,2)
Интактная группа +пирацетам	5784,2±580,9	11289,2±1101,5 (96,6±5,3)	-3553,3±384,3	-7766,7±711,4 (122,5±7,4)	93,7±7,0	151,0±12,4 (63,6±13,5)	234,5±11,7	422,7±24,2 (79,9±3,6)
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	7730,0±805,7	11834,7±820,8 (57,5±9,4*)	-5888,7±634,4	-8765,7±825,2 (51,5±8,5*)	111,3±5,4	152,4±8,8 (36,9±4,6*)	317,7±21,0	447,5±30,4 (42,3±7,8*)
Стресс+РГПУ-207	5233,0±893,4	10713,9±1574,5 (110,7±12,6#)	-3178,7±289,7	-8092,7±637,4 (129,8±15,0#)	96,4±6,3	161,8±8,5 (69,1±4,4#)	238,1±10,9	511,5±22,6 (116,6±11,0#)
Стресс+фенибут	4781,2±503,7	10002,8±723,8 (109,3±10,7#)	-3488,1±205,3	-9138,4±635,2 (161,6±9,8#)	80,5±2,8	142,0±5,1 (77,2±7,0#)	282,7±20,7	557,7±51,1 (97,0±10,1)
Стресс+пирацетам	5962,5±798,2	11304,5±1361,8 (92,9±9,6#)	-4465,5±546,0	-8944,6±931,5 (105,0±9,9#)	96,2±5,2	151,5±9,1 (58,0±6,3#)	274,0±16,5	456,7±28,2 (67,0±5,1#)

Примечания: в скобках указан % прироста по отношению к исходным данным

\* -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;  $p < 0,05$

На 30 секунде изометрической нагрузки у интактных животных, получавших циклические аналоги ГАМК, прирост всех показателей сохранялся в большей степени, чем у интактных самцов контрольной группы (Табл. 16,17). У стрессированных крыс контрольной группы прирост  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЛЖД, ЧСС и МИФС на 30 секунде был на 69% ( $p<0,05$ ), 84% ( $p<0,05$ ), 93% ( $p<0,05$ ), 79% ( $p<0,05$ ) и 87% ( $p<0,05$ ) соответственно ниже, чем у животных группы позитивного контроля. При введении соединения РГПУ-207 и референтных препаратов на фоне острого стрессорного воздействия прирост  $+dP/dt$  был больше чем у стрессированных животных контрольной группы в среднем на 85% ( $p<0,05$ ),  $-dP/dt$  - на 84% ( $p<0,05$ ), ЛЖД – на 94% ( $p<0,05$ ), ЧСС – на 79% ( $p<0,05$ ) и МИФС – на 89% ( $p<0,05$ ).

Таким образом, соединение РГПУ- 207 и, в меньшей степени, фенибут и пираретам ограничивают стрессорное воздействие: изменение относительной массы тимуса и надпочечников, поражение СОЖ было менее выраженным по отношению к показателям животных группы негативного контроля. Исследуемое соединение обладает выраженным кардиопротекторным эффектом, увеличивает прирост показателей  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЧСС, ЛЖД и МИФС при проведении нагрузочных проб. Кардиопротекторное действие наблюдается у фенибута и пираретама, которые также способствуют увеличению прироста всех исследуемых показателей.

Таблица 17. Влияние аналогов ГАМК на скорости расслабления и сокращения миокарда, ЛЖД в условиях изометрической нагрузки (M ±m).

Группы животных	+dP/dt			-dP/dt			ЛЖД		
	Исходно, мм рт.ст./с	Через 5 с, мм рт.ст./с	Через 30 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст./с	Через 5 с, мм рт.ст./с	Через 30 с, мм рт.ст./с	Исходно, мм рт.ст.	Через 5 с, мм рт.ст.	Через 30 с, мм рт.ст./с
Позитивный контроль (интактные)	4839,3±511,8	9129,4±1133,1 (87,6±18,1)	5854,7±558,5 (19,5±2,0)	-2779,8±420,5	-5782,5±705,3 (119,6±19,71)	-4144,1±576,5 (52,4±6,1)	92,6±5,5	175,0±10,5 (92,7±14,6)	134,1±6,1 (47,3±8,9)
Интактная группа +РГПУ-207	4937,5±705,1	8994,3±1195,1 (88,4±14,2)	6712,3±1101,8 (35,1±9,3 <sup>^</sup> )	-2974,8±608,6	-6725,3±1141,0 (122,2±10,5)	-4746,1±902,5 (55,2±13,6)	89,5±7,7	169,5±14,2 (93,2±11,0)	136,3±11,9 (55,4±9,6)
Интактная группа +фенибут	3576,3±309,0	7294,5±899,2 (87,9±7,7)	5880,4±734,3 (53,8±11,6)	-2576,6±145,7	-6013,2±546,3 (132,0±12,5)	-4138,1±322,7 (61,5±11,0)	88,1±6,7	176,5±11,9 (102,6±8,7)	132,4±12,7 (51,6±10,9)
Интактная группа +пирацетам	4538,4±422,0	8645,9±886,8 (90,7±7,8)	6271,6±662,0 (38,9±8,7)	-3186,2±327,1	-6383,8±647,9 (102,43±14,64)	-4630,0±395,1 (47,2±7,0)	93,9±5,9	187,6±10,4 (101,7±9,2)	142,4±2,9 (55,4±9,3)
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	6148,7±10,0	9112,5±21,4 (41,1±11,1*)	7015,4±19,8 (6,1±3,3*)	-4470,7±409,3	-6621,3±343,0 (53,8±11,5*)	-4745,9±299,3 (8,2±4,5*)	119,8±5,3	175,3±17,2 (47,3±14,0*)	122,2±5,5 (3,2±5,7*)
Стресс+РГПУ-207	5054,1±524,3	9120,1±928,8 (86,1±9,5#)	6704,4±775,3 (35,3±6,1#)	-3246,0±311,3	-6857,2±749,6 (122,9±10,3#)	-4661,5±538,6 (50,2±3,4#)	98,4±7,6	187,9±14,9 (92,0±9,6#)	153,2±14,3 (54,9±5,1#)
Стресс+фенибут	4642,4±402,4	9286,5±962,5 (86,2±6,9#)	7540,0±723,8 (51,7±4,9#)	-3815,8±472,9	-8910,9±899,3 (133,9±5,6#)	-6025,7±513,5 (60,6±8,3#)	96,8±3,2	196,0±6,5 (103,3±7,0#)	149,9±6,4 (55,5±6,9#)
Стресс+пирацетам	4991,7±690,0	9659,6±1131,8 (99,3±10,1#)	6697,5±755,9 (38,4±6,4#)	-3354,3±452,3	-6428,5±709,4 (96,5±8,9#)	-4726,6±564,4 (45,7±12,1#)	95,9±5,7	192,4±10,2 (102,8±10,6#)	146,9±7,5 (54,1±5,2#)

Примечания: в скобках указан % прироста по отношению к исходным данным;

\* -относительно интактных животных контрольной группы по t-критерию Стьюдента;

<sup>^</sup> - по критерию Ньюмена-Кейлса; p<0,05;

# относительно стрессированных животных контрольной группы по критерию Ньюмена-Кейлса; p<0,05

Таблица 18. Влияние аналогов ГАМК на показатели кардиодинамики (ЧСС, МИФС) в условиях изометрической нагрузки ( $M \pm m$ ).

Группы животных	ЧСС			МИФС		
	Исходно, уд/мин	Через 5 с, уд/мин	Через 30 с, уд/мин	Исходно, мм рт.ст./ мг*мин	Через 5 с, мм рт.ст./ мг*мин	Через 30 с, мм рт.ст./ мг*мин
Позитивный контроль (интактные)	277,1±22,6	473,8±24,9 (75,5±8,7)	378,2±32,1 (36,4±4,1)	47,2±5,0	154,4±14,1 (238,7±31,1)	94,4±10,0 (102,4±16,7)
Интактная группа +РГПУ-207	265,8±18,0	462,3±21,8 (75,9±6,1)	392,8±26,3 (48,0±3,3)	47,5±6,7	154,1±17,1 (240,6±24,6)	107,4±15,7 (129,0±12,4)
Интактная группа +фенибут	291,6±11,8	515,9±28,0 (76,8±5,2)	411,0±33,6 (40,0±7,6)	49,4±3,3	175,2±12,4 (258,2±18,2)	106,1±15,6 (114,3±24,0)
Интактная группа +пирацетам	277,6±17,5	460,3±23,4 (67,9±8,2)	370,5±20,5 (34,5±4,7)	48,5±4,5	161,5±14,7 (241,4±26,3)	98,4±6,6 (111,4±19,3)
Негативный контроль (стресс+физ. р-р)	349,9±24,4	470,3±31,4 (38,3±13,0*)	371,6±23,2 (7,6±5,3*)	84,8±10,0	165,4±21,4 (114,5±39,7*)	90,2±8,1 (12,9±9,6*)
Стресс+РГПУ-207	285,1±16,4	491,6±19,5 (74,2±6,8#)	416,0±14,7 (47,7±6,1)	59,9±6,7	198,4±20,4 (235,1±22,1#)	136,5±14,0 (129,9±13,2)
Стресс+фенибут	343,5±16,2	599,7±41,4 (75,4±10,9#)	447,7±26,7 (31,5±8,7)	69,7±6,3	243,8±21,2 (255,2±23,9#)	139,6±12,8 (107,3±20,0)
Стресс+пирацетам	284,5±25,8	458,4±32,1 (63,8±7,0#)	374,1±29,9 (32,5±3,5#)	57,9±8,5	185,8±19,6 (234,4±26,341#)	115,7±13,6 (104,6±9,6#)

Примечания: в скобках указан % прироста по отношению к исходным данным

\* -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;  $p < 0,05$

## 4. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ-207

### 4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГИПОКСАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ-207

Известно, что гипоксия тканей, возникающая при различных сосудистых заболеваниях вследствие нарушения циркуляции крови, сама может участвовать в ремоделировании тканей и усилении сердечно-сосудистых нарушений (Abe H. et al., 2017). Поэтому было исследовано антигипоксантажное действие изучаемого соединения в дозе 9,4 мг/кг. Все группы включали в себя по 7 крыс.

У животных контрольной группы биоэлектрическая активность сердца сохранялась  $448,3 \pm 34,4$  с с момента пережатия трахеи. При введении соединения РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг исследуемый показатель увеличился на 31% ( $p < 0,05$ ) и равнялся  $651,2 \pm 67,6$  с. Верапамил в дозе 1,6 мг/кг также способствовал более длительной биоэлектрической сердечной активности, время которой достигло  $676,1 \pm 93,5$  с, что было на 34% больше чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). На фоне введения мексидола в дозе 40 мг/кг и ивабрадина в дозе 21 мг/кг выявлена тенденция к возрастанию исследуемого показателя на 19% и 16% до  $551,3 \pm 104,9$  и  $553,3 \pm 171,0$  с соответственно (Рисунок 9).

Таким образом, исследуемое соединение РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг оказывает антигипоксантажное действие, способствуя удлинению биоэлектрической активности сердца. По эффективности исследуемое соединение было сопоставимо с верапамилом в дозе 1,6 мг/кг. Мексидол в (40 мг/кг) и ивабрадин (21 мг/кг) не оказали выраженного влияния на исследуемый показатель.

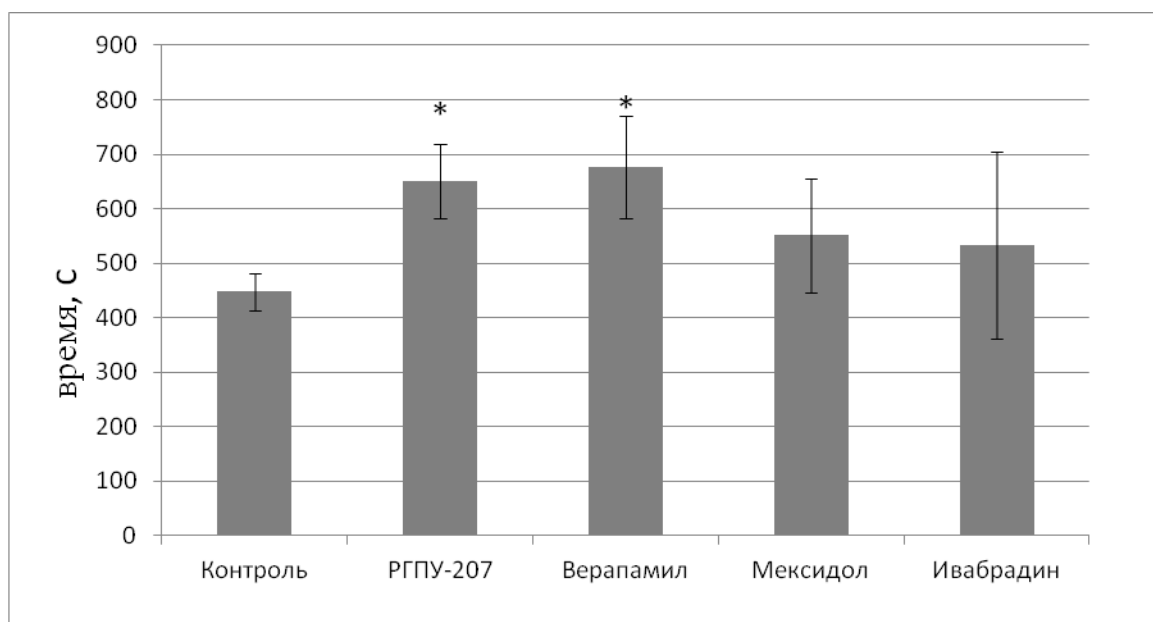


Рисунок 9. Влияние соединения РГПУ-207 на продолжительность биоэлектрической активности сердца

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

#### 4.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ-207 НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ 30-МИНУТНОЙ ОККЛЮЗИИ И РЕПЕРФУЗИИ НВЛКА

В условиях ишемии в процессах повреждения миокарда большую роль играют реакции ПОЛ (Голиков А. П. и др., 2005, Пристром А. М. и др., 2012, Ferrari R., 2005). Вследствие их активизации повреждается клеточная мембрана, меняется ее проницаемость, происходит накопление внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , активация протеолитических ферментов и возникает альтерация кардиомиоцитов (Bacon S. L. et al., 2004, Geng B. et al., 2004). Известно, что рацетамы ограничивают процессы ПОЛ и активируют ферменты антиоксидантной системы (Карнаух Э. В., 42-44, 2011). В этой связи исследовали влияние соединения РГПУ-207 на оксидантно/антиоксидантную систему клеток сердца.

Концентрация первичных продуктов ПОЛ - ДК в контрольной группе с ОНВЛКА была на 30% выше, чем у ЛО животных ( $1,89 \pm 0,56$  против  $1,32 \pm 0,24$  D233/г белка). У крыс, которым вводили соединение РГПУ-207,

верапамил, мексидол и ивабрадин, показатель составил  $1,09 \pm 0,24$ ,  $1,34 \pm 0,32$ ,  $1,67 \pm 0,43$ ,  $1,66 \pm 0,41$  D233/г белка соответственно, что было на 42% ( $p \leq 0,05$ ), 29%, 12%, и 12% соответственно ниже по сравнению с группой негативного контроля. Содержание ДК в опытной группе, получавшей соединение РГПУ-207, было на 34% ниже ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с показателем животных, которым вводили мексидол и ивабрадин (Рис.10а).

В группе негативного контроля концентрация вторичных продуктов ПОЛ - кетодиенов – составила  $0,25 \pm 0,07$  D278/г белка, что было на 23% больше, чем у ЛО животных ( $0,19 \pm 0,03$  D278/г белка). У крыс, получавших соединение РГПУ-207 и верапамил, уровень дикетонов был на 44 % ( $p \leq 0,05$ ) и 23% соответственно ниже, чем у группы негативного контроля (значения равнялись  $0,14 \pm 0,05$  и  $0,20 \pm 0,03$  D233/г белка). Ивабрадин и мексидол не влияли на образование вторичных продуктов ПОЛ - уровень кетодиенов практически не отличался от такового у животных контрольной группы с ОНВЛКА ( $0,26 \pm 0,09$  и  $0,28 \pm 0,08$  D278/г белка). У крыс, которым вводили соединение РГПУ-207, уровень кетодиенов был на 45% и 50% ниже ( $p \leq 0,05$ ) чем, у животных, получавших ивабрадин и мексидол соответственно (Рис.10б).

Выявлено, что у крыс группы негативного контроля концентрация малонового диальдегида (МДА) ( $6,86 \pm 0,60$  мМ/мг белка) была достоверно на 14% ( $p \leq 0,05$ ) выше, чем в группе ЛО животных ( $5,93 \pm 0,31$  мМ/мг белка). При введении соединения РГПУ-207 уровень МДА снизился на 18% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой крыс с ОНВЛКА и достиг значения  $5,63 \pm 0,69$  мМ/мг белка. У животных, получавших верапамил, мексидол и ивабрадин, количество МДА практически не отличалось от такового в группе негативного контроля ( $6,44 \pm 0,84$ ,  $6,43 \pm 0,93$  и  $6,77 \pm 0,80$  против  $6,86 \pm 0,60$  мМ/мг белка) При этом у животных, которым вводили соединение РГПУ-207, концентрация МДА была на 17% ниже, чем у крыс, получавших ивабрадин ( $p \leq 0,05$ ) (Рис. 10в).



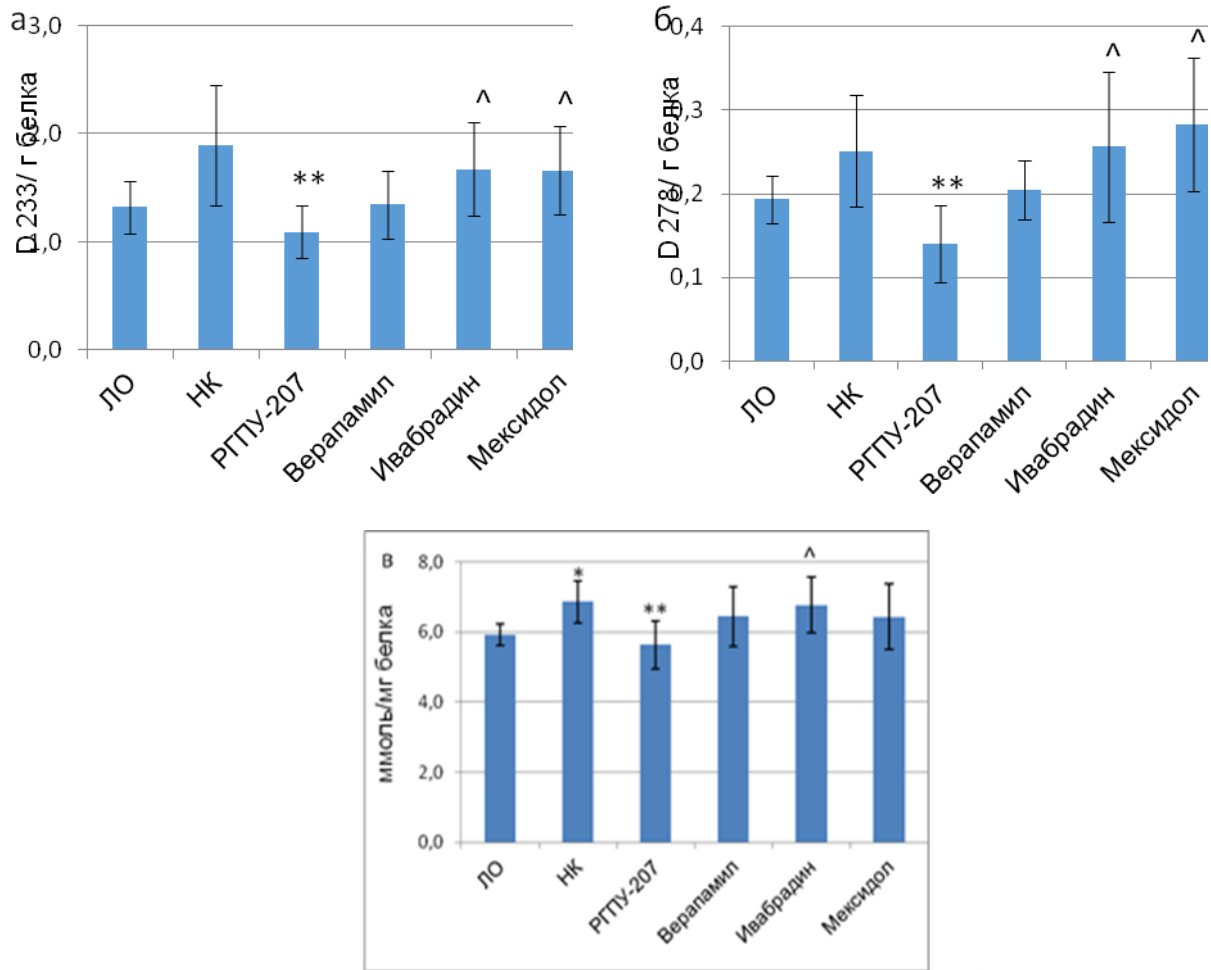


Рисунок 10. Содержание продуктов ПОЛ в гомогенате сердца крыс после 30-минутной окклюзии и 30-минутной реперфузии.

Примечания: а - концентрация диеновых конъюгатов, б - концентрация кетодиенов, в - концентрация малонового диальдегида

ЛО – ложнооперированные животные.

НК - негативный контроль

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

Активность СОД у животных контрольной группы с ОНВЛКА ( $13,9 \pm 3,4$  у.е./г белка) была на 30% ниже по сравнению с группой позитивного контроля ( $20,0 \pm 4,6$  у.е./г белка). У самцов, получавших соединение РГПУ-207 и препарат сравнения верапамил, активность СОД была равна соответственно  $19,4 \pm 3,1$  и  $17,1 \pm 5,2$  у.е./г белка, что было на 28% ( $p \leq 0,05$ ) и 19% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно выше по сравнению с группой

негативного контроля. У крыс, которым вводили ивабрадин и мексидол, активность фермента не отличалась от таковой у крыс контрольной группы ( $14,7 \pm 3,6$  и  $16,0 \pm 5,5$  у.е./г белка). При введении соединения РГПУ-207 активность СОД была на 24% больше ( $p \leq 0,05$ ), чем при введении ивабрадина (Рис.11а).

Отмечено снижение активности ГП в контрольной группе с ОНВЛКА на 27% по сравнению с группой ложнооперированных животных ( $p \leq 0,05$ ) ( $36,8 \pm 6,5$  против  $50,4 \pm 3,3$  мМ GSH/мин/мг белка). У самцов, получавших соединение РГПУ-207 и верапамил, наблюдалось увеличение активности ГП на 34% ( $55,4 \pm 8,0$  мМ GSH/мин/мг белка) ( $p \leq 0,05$ ) и 46% ( $68,2 \pm 10,2$  мМ GSH/мин/мг белка) ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по сравнению группой негативного контроля. После введения ивабрадина и мексидола активность ГП не менялась в сравнении с группой негативного контроля (соответственно  $40,8 \pm 8,9$  и  $45,1 \pm 8,2$  мМ GSH/мин/мг белка). У животных, получавших соединение РГПУ-207, активность ГП была на 26% больше, чем в группе, которой вводили ивабрадин ( $p \leq 0,05$ ) (Рис.11б).

Активность каталазы у животных контрольной группы с ОНВЛКА ( $1,35 \pm 0,38$  у.е./г белка/мин) была на 22% ниже по сравнению с группой позитивного контроля ( $1,74 \pm 0,64$  у.е./г белка/мин) ( $p \leq 0,05$ ). На фоне введения соединения РГПУ-207 и верапамила, активность каталазы возрастала до  $1,96 \pm 0,53$  и  $1,70 \pm 0,23$  у.е./г белка/мин соответственно, что было больше на 31% ( $p \leq 0,05$ ) и 21% соответственно, чем у группы негативного контроля. У животных, получавших ивабрадин и мексидол, активность фермента практически не изменялась ( $1,31 \pm 0,30$  и  $1,28 \pm 0,32$  у.е./г белка/мин). Соединение РГПУ-207 способствовало повышению активности каталазы в сравнении с ивабрадином и мексидолом на 33% и 34% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно (Рис.11в).

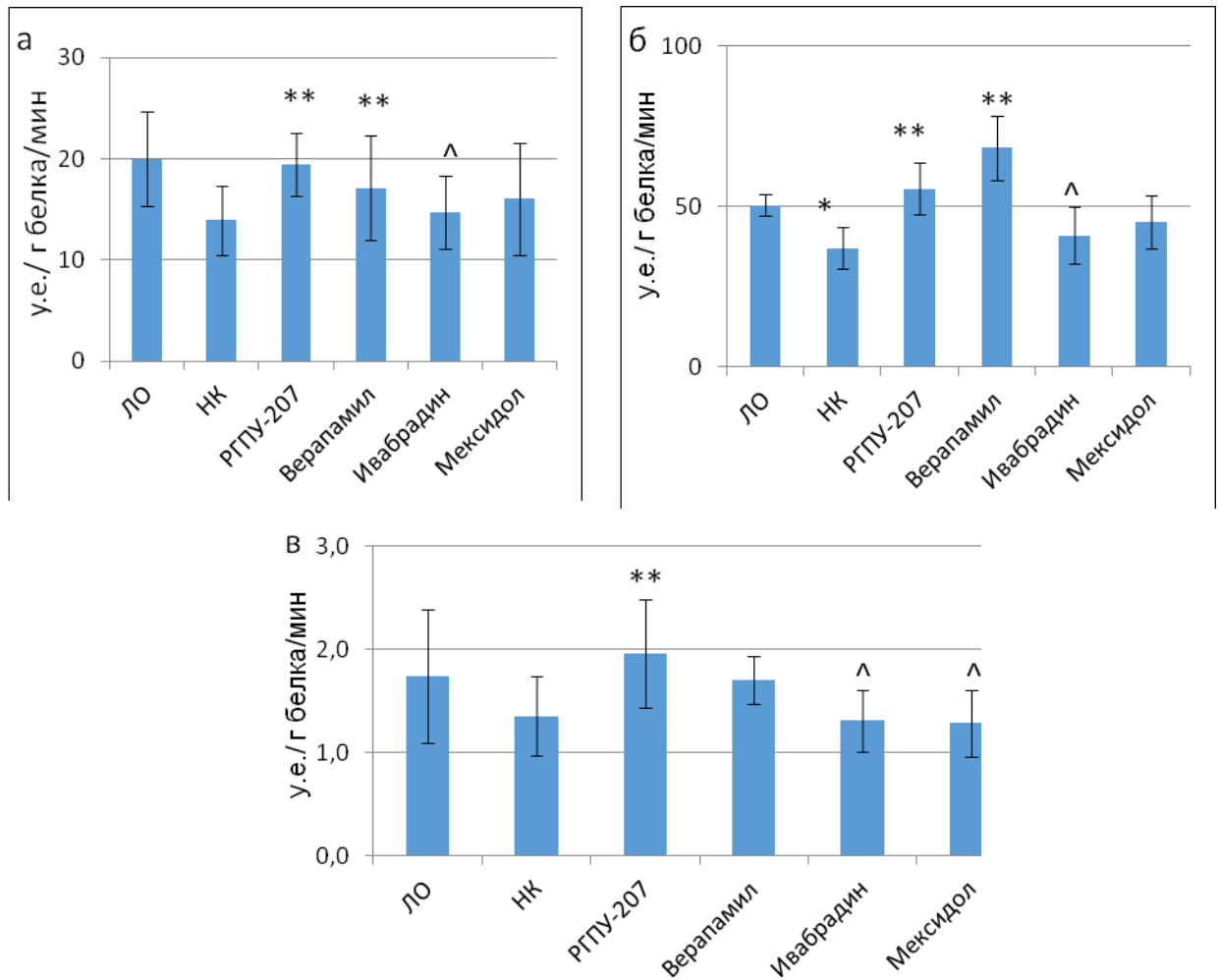


Рисунок 11. Активность ферментов АОС в гомогенате сердца крыс после 30-минутной окклюзии и 30-минутной реперфузии.

Примечания: а – активность супероксиддисмутазы, б – глутатионпероксидазы, в – каталазы

ЛО – ложнооперированные животные.

НК – негативный контроль.

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

В результате проведенного исследования выявлено, что 30-минутная ОНВЛКА с последующей 30-минутной реперфузией активизирует процессы ПОЛ, о чем свидетельствует повышенное образование их первичных и вторичных продуктов - конъюгированных диенов, кетодиенов и МДА, а также снижение активности ферментов АОС (СОД, каталазы и ГП) в

гомогенате сердца у крыс с ОНВЛКА по сравнению с ложнооперированными животными.

Соединение РГПУ-207 ограничивает процессы ПОЛ, на что указывает снижение концентрации ДК, кетодиенов и МДА и способствует повышению активности антиоксидантных ферментов СОД, каталазы и ГП в ткани сердца по сравнению с показателями группы негативного контроля.

#### 4.3. ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ -207 НА РАЗВИТИЕ ПРОЦЕССОВ ПОЛ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Существуют стресс-реализующие системы, участвующие в формировании стресс-реакций, и стресс-лимитирующие системы, ограничивающие чрезмерное развитие стресс-реакций и предотвращающие связанные с этим патологические изменения в клетке (накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, активация протеаз и фосфолипаз и процессов ПОЛ, развитие митопоптоза, апоптоза или некроза) и организме в целом (снижение инотропной функции миокарда эрозивно-язвенные поражения слизистой ЖКТ) (Меерсон Ф.З., 1984). Одной из главнейших стресс-лимитирующих систем является ГАМК-ергическая система (Пшенникова М.Г., 2000). Поэтому можно считать актуальным поиск среди рацетамов новых соединений, ограничивающих стресс-реакции и связанные с ней процессы ПОЛ в кардиомиоцитах.

В митохондриях мозга интактных крыс, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам, уровень ДК был незначительно ниже по сравнению с группой позитивного контроля соответственно на 17%, 14% и 9% и составляли соответственно  $2,36 \pm 0,51$ ,  $2,48 \pm 0,79$ ,  $2,63 \pm 0,84$  D233/мг белка. В группе негативного контроля содержание ДК, являющихся первичными продуктами ПОЛ, было равно  $4,41 \pm 1,08$  D233/мг белка, что было на 53% больше, чем у интактных животных контрольной группы ( $2,88 \pm 1,08$  D233/мг белка). Введение соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама снижало концентрацию ДК до значений  $3,50 \pm 0,47$ ,  $3,06 \pm 0,53$ ,  $3,03 \pm 0,37$

D233/мг белка соответственно, что было на 21% ( $p<0,05$ ), 31% ( $p<0,05$ ) и 31% ( $p<0,05$ ) меньше чем в группе контрольных стрессированных крыс (рис. 12).

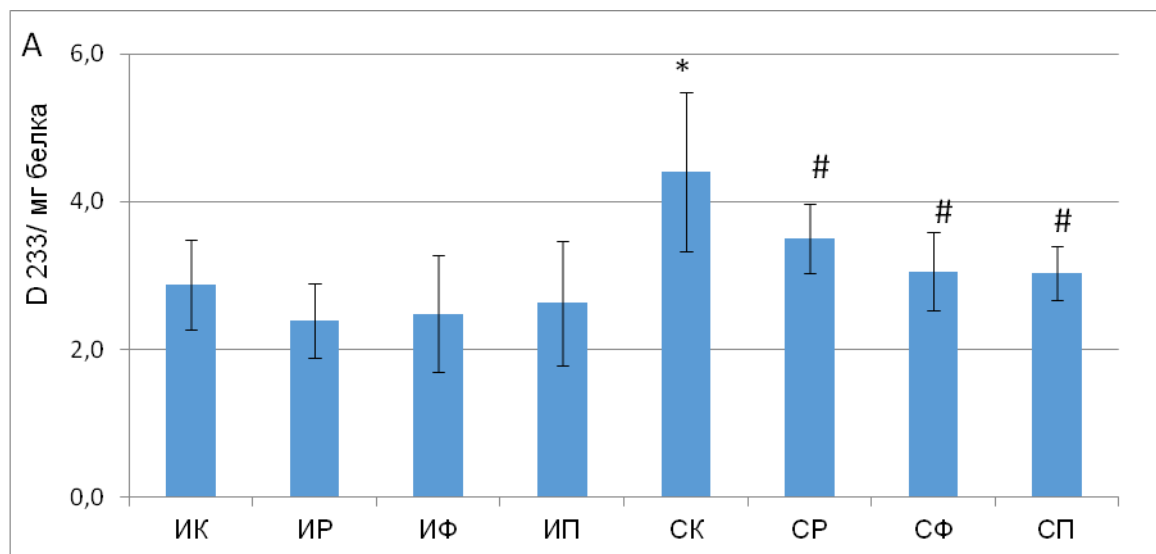


Рисунок 12. Содержание первичных продуктов ПОЛ (ДК) в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p<0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p<0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

Содержание дикетонов в гомогенате из мозга интактных крыс при введении соединения РГПУ-207 и препаратов сравнения фенибута и пирацетама практически не изменилось. Показатель составлял  $0,39\pm 0,04$ ,  $0,47\pm 0,06$  и  $0,41\pm 0,11$  D278/мг белка соответственно, а в контрольной интактной группе –  $0,45\pm 0,06$  D278/мг белка. На фоне стресса отмечено повышение уровня дикетонов до  $0,61\pm 0,18$  D278/мг белка, что больше на 36% по отношению к интактным животным ( $p<0,05$ ). Введение соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама на фоне стресса предотвращает увеличение показателя. Значения были равны соответственно  $0,45\pm 0,02$ ,  $0,36\pm 0,08$  и  $0,41\pm 0,09$ , что было меньше чем в группе негативного контроля на 27% ( $p<0,05$ ), 40% ( $p<0,05$ ) и 32% ( $p<0,05$ ) соответственно (рис. 13).

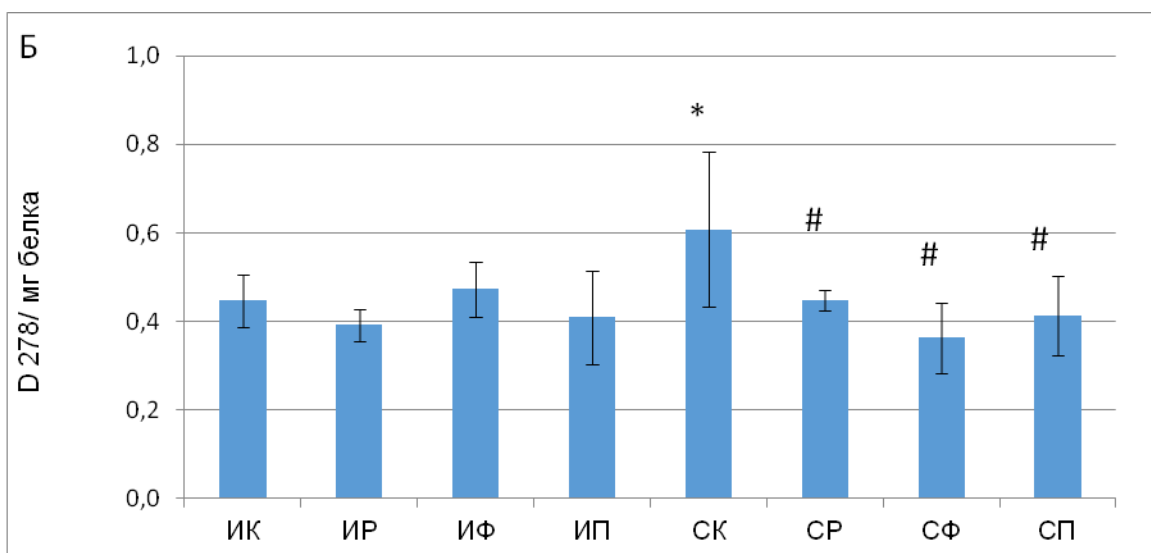


Рисунок 13 Содержание кетодиенов в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

Введение интактным животным фенибута и рацетамов (соединения РГПУ-207 и пирацетама) приводило к незначительному изменению содержания МДА в митохондриях мозга. Значения составляли соответственно  $11,73 \pm 2,04$ ,  $12,46 \pm 2,01$ ,  $15,46 \pm 4,98$  мМ/мг белка, что меньше на 10%, 4% и больше на 19% соответственно по сравнению с контрольной интактной группой ( $13,03 \pm 0,88$  мМ/мг белка). У стрессированных крыс показатель был выше на 40% ( $p < 0,05$ ), чем у интактных и составил  $18,20 \pm 3,24$  мМ/мг белка. При введении соединения РГПУ-207 на фоне стресса уровень МДА стал ниже на 40% ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе негативного контроля и практически сравнялся со значениями группы позитивного контроля ( $12,63 \pm 3,24$  мМ/мг белка). Эталонные препараты фенибут и пирацетам также вызвали уменьшение содержания МДА на 38% ( $p < 0,05$ ) и 33% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с группой негативного

контроля, достигая  $11,2 \pm 3,56$  и  $12,17 \pm 4,70$  мМ/мг белка соответственно (Рис. 14).

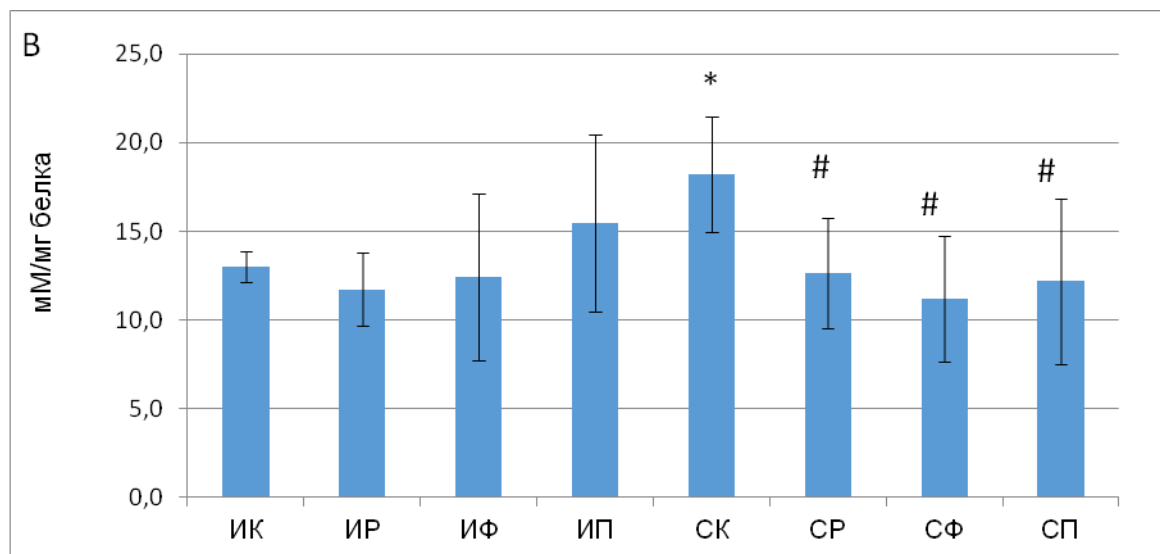


Рисунок 14. Содержание МДА в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

Активность СОД в митохондриях мозга интактных животных, получавших соединение РГПУ-207, препараты фенибут и пирацетам практически не отличалась от таковой в контрольной группе интактных крыс и была равна  $36,22 \pm 4,14$ ,  $30,22 \pm 3,39$  и  $37,80 \pm 8,82$  у.е./мг белка соответственно против  $33,33 \pm 3,23$  у.е./мг белка у интактных животных, которым вводили физ. р-р. У стрессированных крыс контрольной группы активность СОД была на 30% ( $p < 0,05$ ) ниже ( $23,18 \pm 3,86$  у.е./мг белка) по сравнению с группой позитивного контроля. При введении соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама отмечалось выраженное повышение показателя до уровня интактных животных и равнялась соответственно  $33,80 \pm 3,46$ ,  $42,43 \pm 5,57$ ,  $38,60 \pm 4,29$  у.е./мг белка, что было больше, чем у крыс группы негативного контроля на 46% ( $p < 0,05$ ), 83% ( $p < 0,05$ ) и 66% ( $p < 0,05$ ) соответственно (Рис. 15).

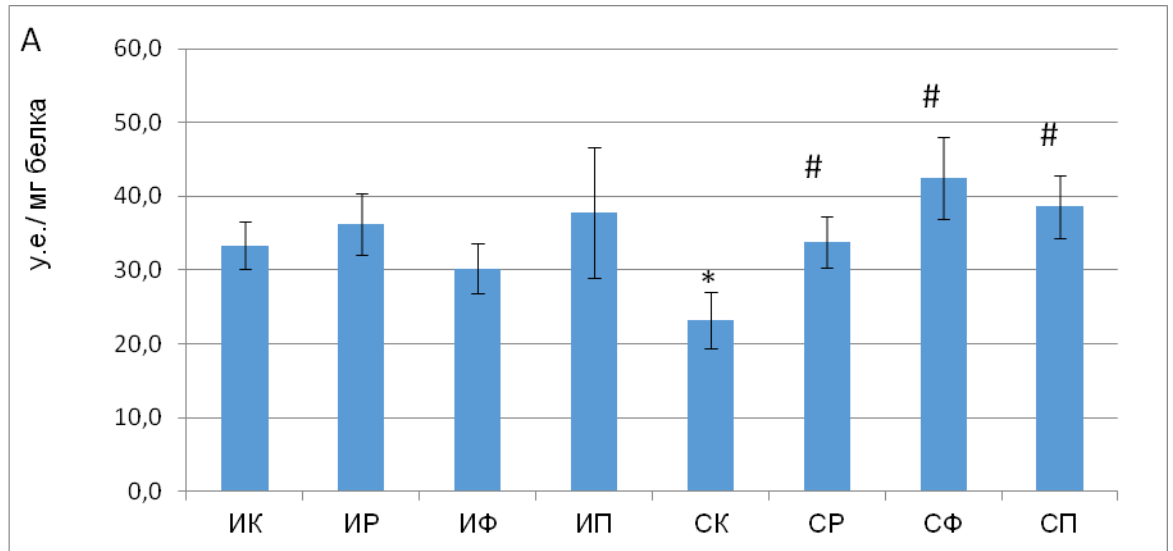


Рисунок 15. Активность СОД в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.*

Введение интактным животным исследуемого соединения и эталонных препаратов практически не влияло на активность ГП в митохондриях мозга, показатель составил  $47,72 \pm 2,69$ ,  $53,74 \pm 7,87$  и  $55,96 \pm 11,02$  мМ GSH/мин/мг белка, тогда как в группе позитивного контроля активность была  $50,01 \pm 5,45$  мМ GSH/мин/мг белка. На фоне острого стрессорного воздействия у крыс исследуемый показатель снизился на 19% ( $p < 0,05$ ) и был равен  $40,76 \pm 4,84$  мМ GSH/мин/мг белка. У стрессированных животных, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам, активность ГП была выше соответственно на 17% ( $p < 0,05$ ), 28% ( $p < 0,05$ ) и 36% ( $p < 0,05$ ) по отношению к таковой в группе негативного контроля и составила  $47,73 \pm 3,14$ ,  $52,36 \pm 4,17$  и  $55,24 \pm 7,26$  мМ GSH/мин/мг белка соответственно (Рис. 16).



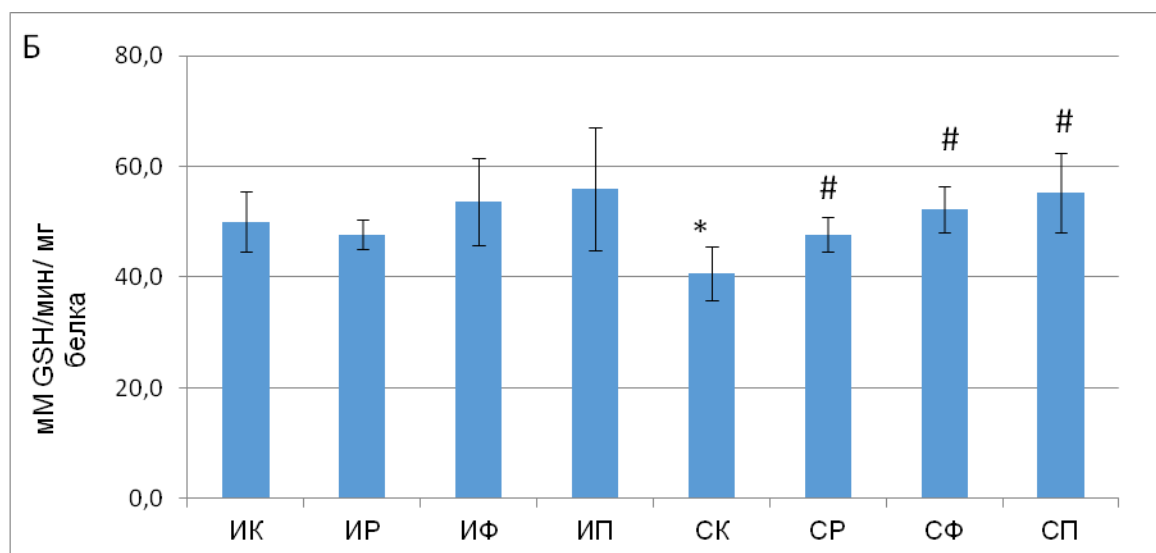


Рисунок 16. Активность ГП в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.*

На фоне введения интактным животным соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама активность каталазы в митохондриях мозга практически не менялась по отношению к значениям в контрольной группе. Показатели в опытных группах составляли соответственно  $17,50 \pm 4,05$ ,  $18,09 \pm 3,45$  и  $17,07 \pm 2,77$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка, в контрольной группе –  $17,17 \pm 2,00$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка. После стрессирования в митохондриях клеток головного мозга крыс контрольной группы активность каталазы была на 14% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем у интактных животных и равнялась  $14,77 \pm 1,54$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка. Введение стрессированным животным соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама способствовало повышению исследуемый показатель соответственно на 16% ( $p < 0,05$ ), 16% ( $p < 0,05$ ) и 23% ( $p < 0,05$ ) по отношению к значениям в группе негативного контроля, что составило соответственно  $17,07 \pm 1,58$ ,  $17,21 \pm 1,00$  и  $18,20 \pm 2,46$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка (рис. 17).

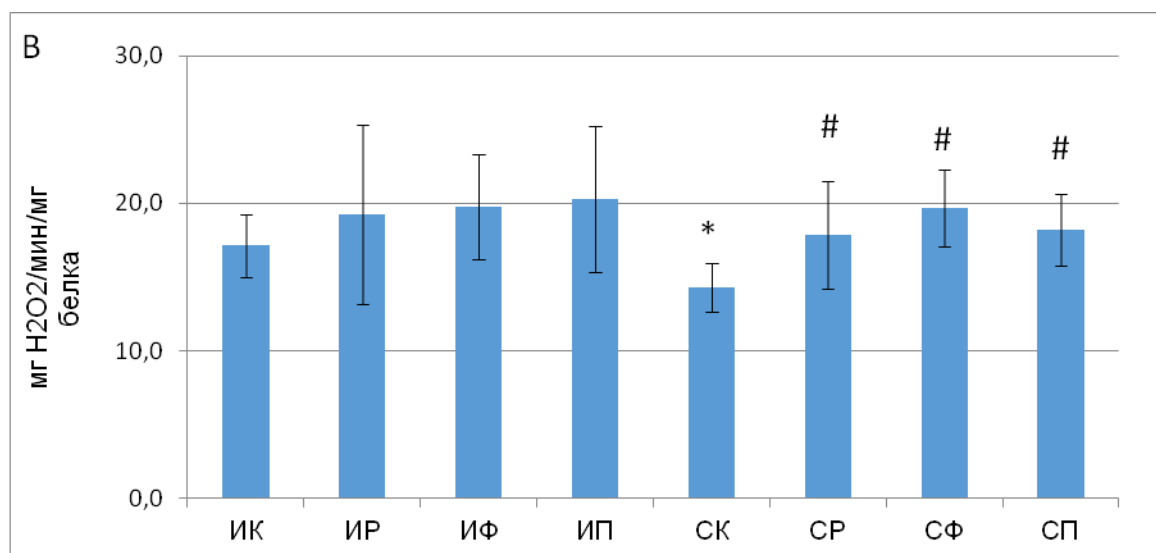


Рисунок 17. Активность каталазы в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных крыс.

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.*

Введение соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама привело к незначительному изменению уровня ДК в митохондриях сердца интактных животных по отношению к значениям крыс позитивного контроля. Значения показателя были равны соответственно  $2,45 \pm 0,33$ ,  $2,45 \pm 0,31$  и  $2,07 \pm 0,69$  D233/мг белка против  $2,10 \pm 0,29$  D233/мг белка у интактных животных контрольной группы. На фоне стресса у крыс группы негативного контроля уровень ДК вырос на 95% до  $4,09 \pm 0,34$  D233/мг белка в сравнении с показателями самцов группы позитивного контроля ( $p < 0,05$ ). У стрессированных животных, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам, снизился соответственно на 32% ( $p < 0,05$ ), 41% ( $p < 0,05$ ) и 42% ( $p < 0,05$ ) по отношению к показателям стрессированных крыс контрольной группой соответственно, достигая соответственно значений  $2,78 \pm 0,54$ ,  $2,39 \pm 1,04$  и  $2,38 \pm 0,65$  D233/мг белка (Рис. 18).

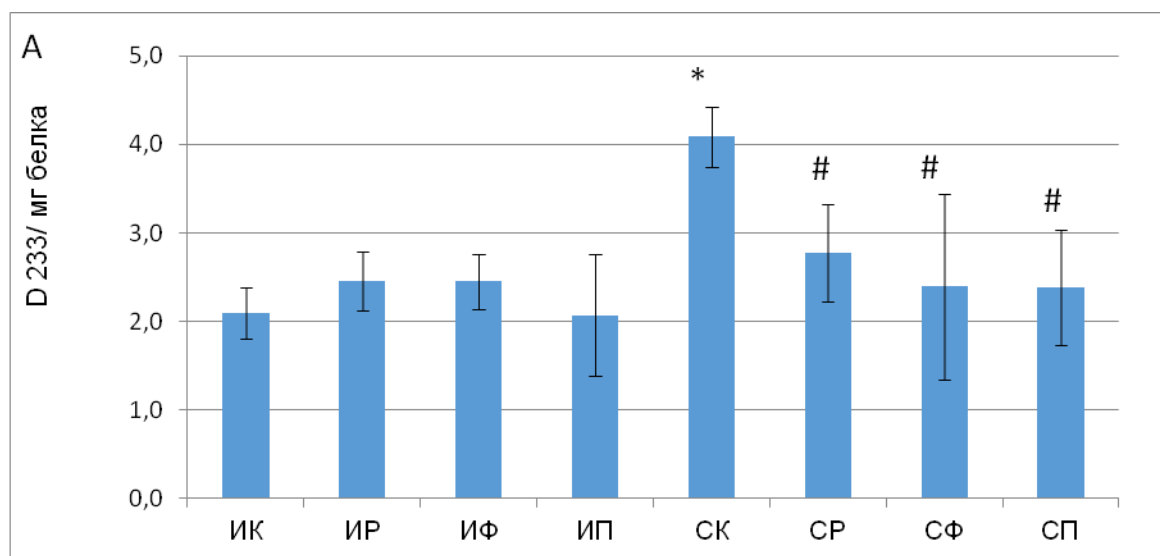


Рисунок 18. Содержание ДК в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.*

В митохондриях сердца интактных крыс на фоне введения соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама была выявлена тенденция к повышению уровня кетодиенов соответственно на 23%, 73% и 39% по отношению к животным группы позитивного контроля, достигая соответственно  $0,30 \pm 0,13$ ,  $0,42 \pm 0,15$  и  $0,34 \pm 0,17$  D278/мг белка. На фоне стресса у крыс контрольной группы содержание кетодиенов повысилось до  $0,39 \pm 0,06$  D278/мг белка, что соответствовало 62% ( $p < 0,05$ ). При введении стрессированным самцам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама значения показателя снизилось соответственно до  $0,31 \pm 0,01$ ,  $0,25 \pm 0,06$  и  $0,21 \pm 0,06$  D278/мг белка, что по отношению к показателю крыс группы негативного контроля было меньше соответственно на 46% ( $p < 0,05$ ), 38% ( $p < 0,05$ ) и 46% ( $p < 0,05$ ) (рис. 19).

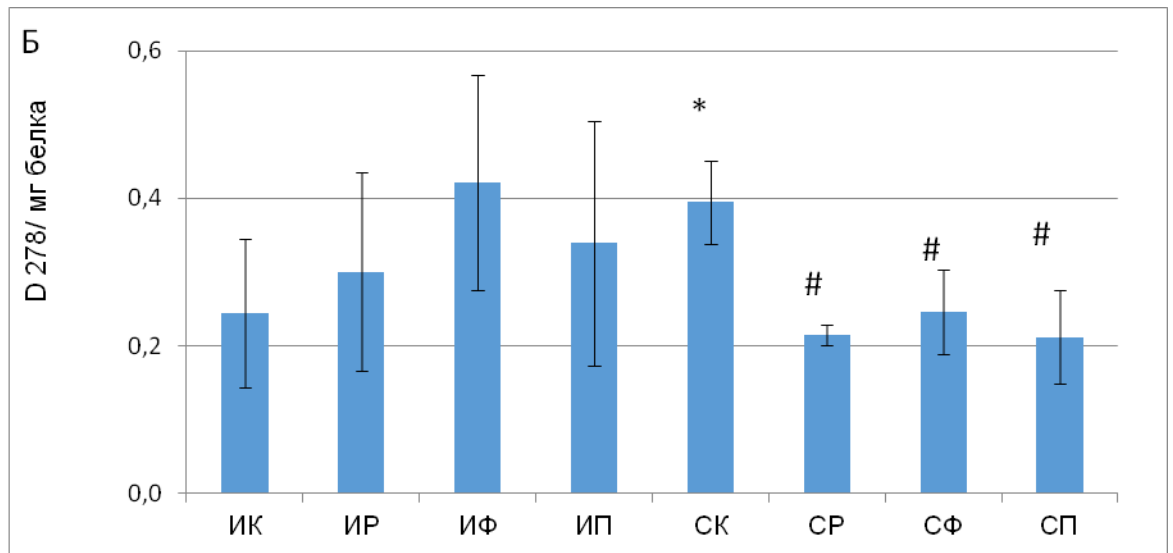


Рисунок 19. Содержание кетодиенов в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

На фоне введения животным интактным животным соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама содержание МДА в митохондриях клеток сердца повысилось соответственно на 32%, 14% и 4% по отношению к значению показателя в контрольной группе. Уровень МДА в опытных группах был равен  $7,43 \pm 1,28$ ,  $6,40 \pm 1,38$  и  $5,87 \pm 2,45$  мМ/мг белка, тогда как в группе позитивного контроля -  $5,64 \pm 1,10$  мМ/мг белка. При стрессировании содержание МДА в митохондриях миокарда крыс возросло на 40% по сравнению с контрольной группой интактных животных ( $p < 0,05$ ) и достигло  $7,88 \pm 1,16$  мМ/мг белка. При введении стрессированным самцам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама уровень МДА снизился по отношению к группе негативного контроля соответственно на 31% ( $p < 0,05$ ), 29% ( $p < 0,05$ ) и 24% ( $p < 0,05$ ) и был равен  $5,45 \pm 1,45$ ,  $5,58 \pm 0,86$  и  $6,02 \pm 0,74$  мМ/мг белка (Рис. 20).

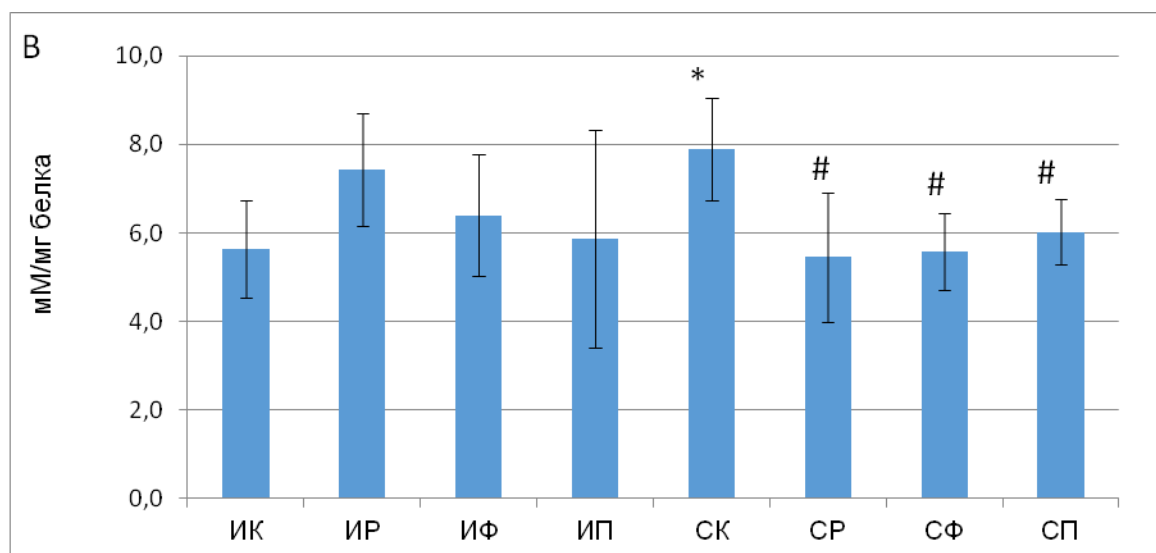


Рисунок 20. Содержание кетодиенов в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

Активность СОД в митохондриях кардиомиоцитов интактных крыс практически не изменялась после введения РГПУ-207, фенибута и пирацетама по сравнению с таковой у крыс группы позитивного контроля и была равна соответственно  $57,88 \pm 7,89$ ,  $49,62 \pm 5,36$  и  $57,27 \pm 12,11$  у.е./мг белка против  $57,35 \pm 4,99$  у.е./мг белка у интактных животных контрольной группы. На фоне стресса в митохондриях клеток миокарда крыс контрольной группы исследуемый показатель был ниже на 12% по сравнению с таковым в группе позитивного контроля ( $p < 0,05$ ) и соответствовал  $50,25 \pm 3,05$  у.е./мг белка. Введение стрессированным самцам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама ограничивало снижение активности СОД в митохондриях клеток сердца. Показатель в опытных группах равнялся соответственно  $57,75 \pm 5,10$ ,  $59,33 \pm 3,62$  и  $60,83 \pm 4,02$  у.е./мг белка, что было больше, чем в группе негативного контроля соответственно на 15% ( $p < 0,05$ ), 18% ( $p < 0,05$ ) и 21% ( $p < 0,05$ ) (Рис. 21).

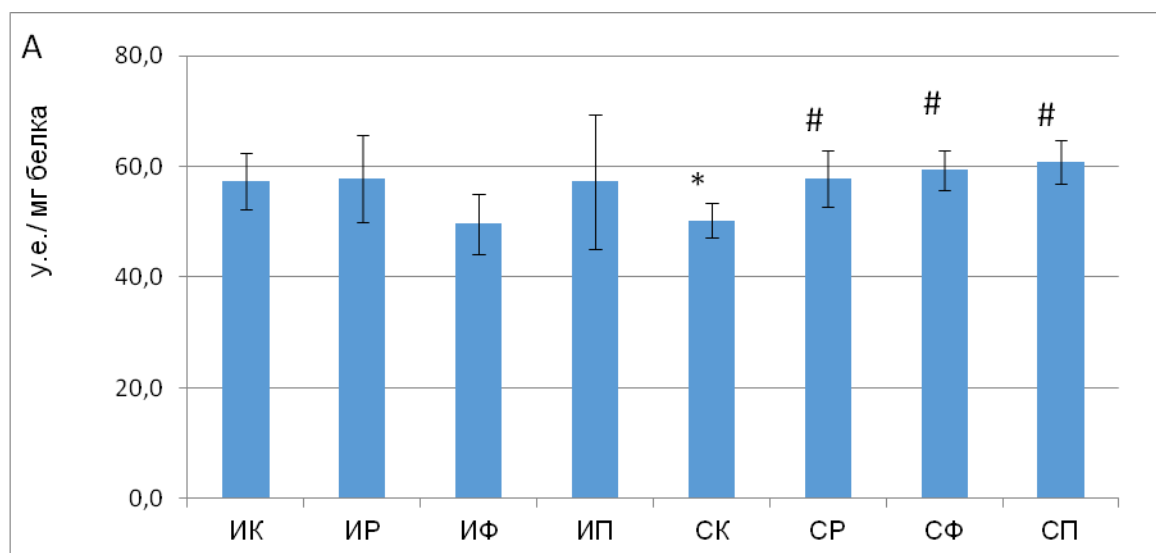


Рисунок 21. Активность СОД в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

У интактных животных активность ГП в митохондриях кардиомиоцитов незначительно менялась после введения соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама по отношению к таковой в группе позитивного контроля. Значения в опытных группах составили соответственно  $45,27 \pm 2,96$ ,  $54,48 \pm 7,89$  и  $58,67 \pm 10,70$  мМ GSH/мин/мг белка, тогда как в контрольной группе интактных животных показатель был равен  $49,57 \pm 6,27$  мМ GSH/мин/мг белка. Под влиянием острого стресса в митохондриях миокарда крыс контрольной группы активность ГП была на 32% ниже по сравнению с показателями животных группы позитивного контроля ( $p < 0,05$ ) и составила  $33,71 \pm 5,33$  мМ GSH/мин/мг белка. На фоне введения стрессированным крысам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама показатель был равен соответственно  $45,97 \pm 5,54$ ,  $62,32 \pm 11,95$  и  $61,40 \pm 8,12$  мМ GSH/мин/мг белка, что превышало значения группы негативного контроля на 36% ( $p < 0,05$ ), 85% ( $p < 0,05$ ) и 82% ( $p < 0,05$ ) (рис. 22).

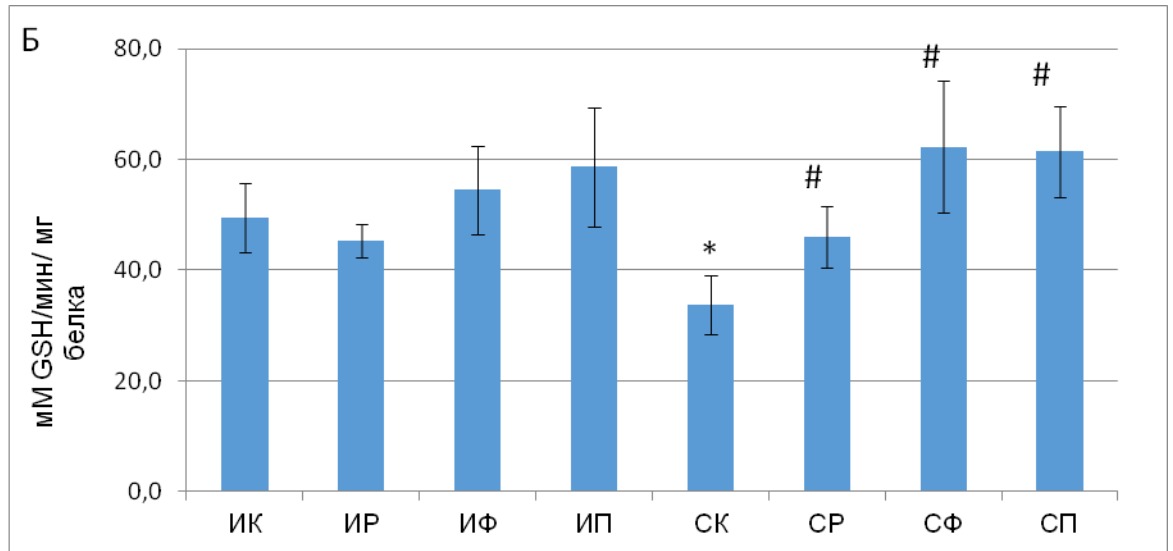


Рисунок 22. Активность ГП в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.

Выявлена тенденция к возрастанию активности каталазы в митохондриях клеток сердца интактных животных, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам. Показатель был равен соответственно  $19,26 \pm 6,10$ ,  $19,77 \pm 3,57$  и  $20,30 \pm 4,98$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка против  $17,14 \pm 2,15$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка в контрольной группе, что было больше соответственно на 12%, 15% и 18%. На фоне острого стресса активность каталазы в митохондриях кардиомиоцитов крыс контрольной группы снизилась по отношению к таковой у интактных крыс на 17% ( $p < 0,05$ ) и равнялась  $14,30 \pm 1,67$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка. Введение стрессированным самцам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама ограничивало уменьшение активности каталазы в митохондриях клеток сердца. Показатель составил соответственно  $17,86 \pm 43,64$ ,  $19,71 \pm 2,62$  и  $18,20 \pm 2,46$  мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка, что было больше чем в группе негативного контроля соответственно на 25% ( $p < 0,05$ ), 38% ( $p < 0,05$ ) и 27% ( $p < 0,05$ ) (Рис. 23).

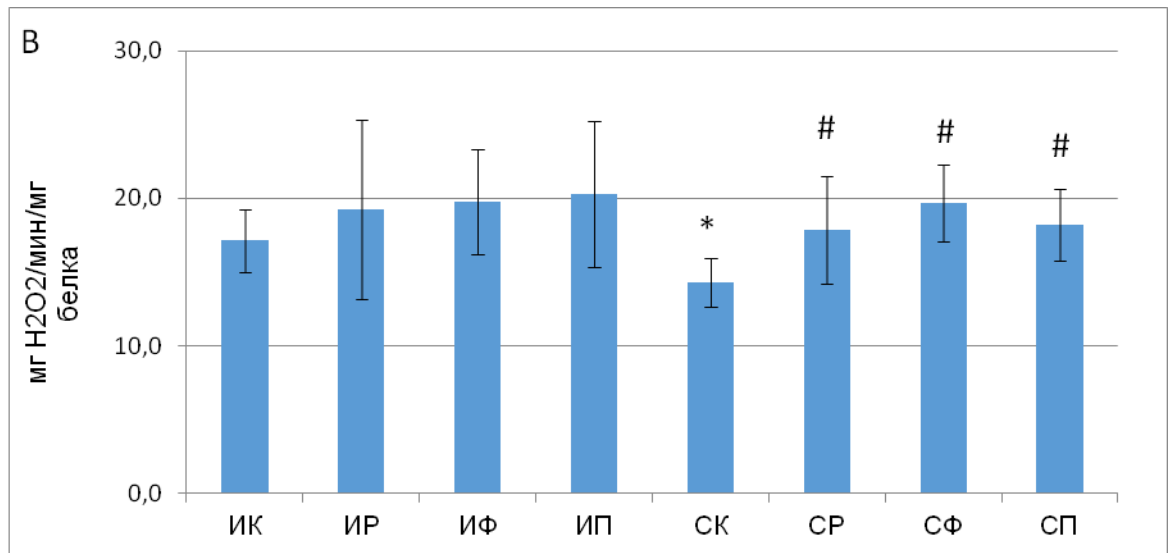


Рисунок 23. Активность каталазы в митохондриях клеток сердца интактных и стрессированных крыс.

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*-  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно ИК; # -  $p < 0,05$  изменения достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса относительно СК.*

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружено, что острый стресс приводит к интенсификации процессов ПОЛ в митохондриях клеток мозга и сердца, что отражается в накоплении первичных и вторичных продуктов липопероксидации (ДК, кетодиенов и МДА), снижении активности ферментов, участвующих в инактивации АФК (каталазы, СОД, ГП). Соединение РГПУ-207 и эталонные препараты фенибут и пирацетам при введении стрессированным животным снижали интенсивность процессов ПОЛ и усиливали антиоксидантную защиту.

#### 4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА СОЕДИНЕНИЯ РГПУ -207 НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА И МОЗГА ПРИ СТРЕССЕ

Реализация стресс-реакции происходит путем внутриклеточных изменений, связанных с повреждением мембраны клетки и целлюлярных органелл, угнетения активности комплексов дыхательной цепи. В



митохондриальной мембране формируется mPTP (mitochondrial permeability transition pore) (McCommis KS et al., 2012), открытие которой приводит к набуханию матрикса, разрыву внешней митохондриальной мембраны (Kinnally KW et al., 2007) и развитию митоптоза и апоптоза. В этой связи было изучено влияние соединения РГПУ-207 на функциональную активность митохондрий в условиях стресса.

Выявлено, что введение интактным животным исследуемого соединения РГПУ-207 и препаратов сравнения фенибута и пирацетама не вызывало изменений нестимулированной скорости дыхания V4 митохондрий клеток мозга по отношению к таковому у крыс контрольной группы. При работе СДГ показатель был равен соответственно  $7,8 \pm 1,4$ ,  $11,4 \pm 1,9$  и  $11,7 \pm 1,9$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка, NDH –  $39,7 \pm 4,5$ ,  $37,2 \pm 6,6$  и  $18,2 \pm 0,9$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка, при их совместном функционировании –  $19,7 \pm 2,7$ ,  $16,0 \pm 1,3$  и  $20,5 \pm 1,8$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка, у группы позитивного контроля значения составляли соответственно  $10,4 \pm 0,2$ ,  $25,4 \pm 3,2$  и  $13,3 \pm 0,4$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. В условиях стресса в митохондриях клеток мозга скорость V4 при работе I комплекса дыхательной цепи увеличилась на 58% ( $p < 0,05$ ), II комплекса - в 2 раза ( $p < 0,05$ ), при совместном функционировании I и II комплексов – на 77% ( $p < 0,05$ ). У стрессированных самцов, получавших новое производное ГАМК, малатзависимая скорость поглощения кислорода V4 в митохондриях мозга снизилась на 42% ( $p < 0,05$ ), при введении фенибута и пирацетама – на 40% ( $p < 0,05$ ) и 37% ( $p < 0,05$ ) соответственно. В условиях добавления в полярографическую ячейку сукцината также обнаружено замедление нестимулированной скорости дыхания V4 митохондрий клеток мозга стрессированных крыс, получавших фенибут и пирацетам. Значения были равны соответственно  $16,7 \pm 1,0$  и  $12,2 \pm 2,2$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка, что было соответственно на 60% ( $p < 0,05$ ) и 40% ( $p < 0,05$ ) меньше чем у животных группы негативного контроля. При введении РГПУ-207 наблюдалась лишь тенденция к снижению скорости дыхания на 18%. V4 в условиях суммарной активности NDH и СДГ митохондрий мозга стрессированных крыс на фоне

введения соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама незначительно менялась по отношению к показателям животных группы негативного контроля. Значения были равны соответственно  $24,2 \pm 1,7$ ,  $17,3 \pm 2,8$  и  $22,1 \pm 4,2$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка (Рис. 24).

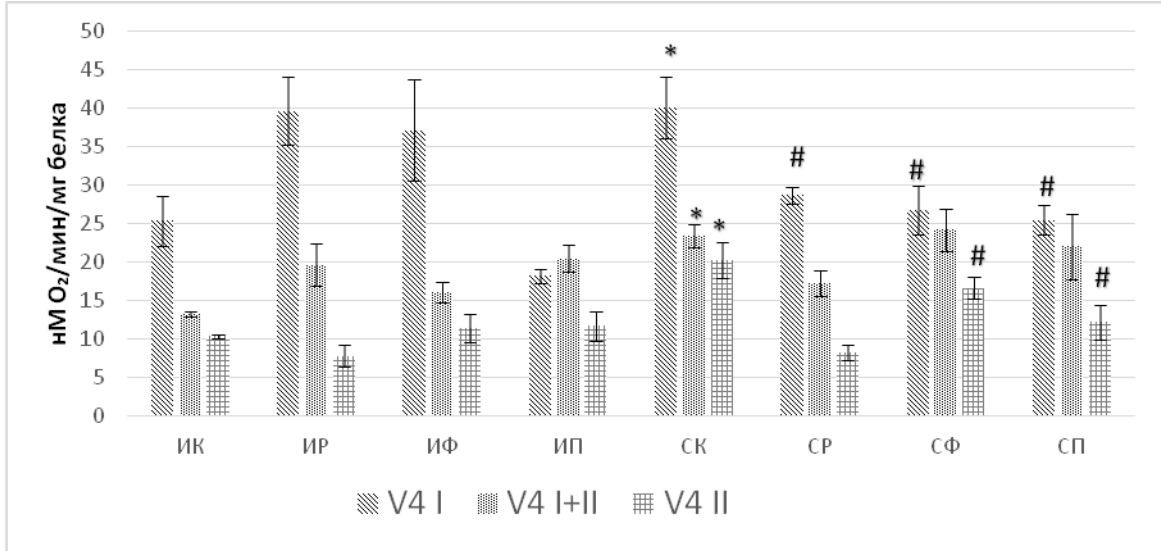


Рисунок 24. Влияние аналогов ГАМК на скорость V4 (нМ  $O_2$ /мин/мг белка) митохондрий клеток головного мозга самцов

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*- изменения достоверны относительно животных ИК группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В условиях стимуляции дыхания добавлением АДФ скорость поглощения кислорода V3 в митохондриях клеток мозга при введении интактным животным соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама менялась незначительно по отношению к таковому у крыс контрольной группы. При работе I комплекса значения составили соответственно  $139,8 \pm 15,5$ ,  $137,6 \pm 11,1$  и  $110,5 \pm 11,5$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка (против  $104,6 \pm 7,1$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка в группе позитивного контроля), при работе II комплекса –  $36,7 \pm 5,7$ ,  $36,4 \pm 5,7$  и  $55,9 \pm 8,4$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка (тогда как в

контрольной группе интактных крыс показатель был  $104,6 \pm 7,1$  нМ  $O_2$ /мин/мг (белка), при совместном функционировании обоих комплексов –  $123,9 \pm 15,6$ ,  $118,7 \pm 15,1$  и  $107,5 \pm 7,8$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка ( $86,7 \pm 13,1$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка в группе позитивного контроля). На фоне острого стресса скорость поглощения кислорода V3 в митохондриях клеток мозга самцов контрольной группы недостоверно повышалась по отношению к показателям интактных животных. При функционировании NDH показатель V3 увеличился на 6%, СДГ – на 48%, при их совместной работе – увеличился на 7% по сравнению со значениями группы позитивного контроля. Показатели были соответственно равны  $110,5 \pm 11,5$ ,  $61,8 \pm 8,1$  и  $92,6 \pm 7,0$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка. Введение на фоне стресса соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама вызвало незначительные изменения стимулированной скорости поглощения кислорода митохондриями клеток мозга животных по отношению к показателям в группе негативного контроля. У стрессированных крыс, получавших соединение РГПУ-207, V3 при работе I, II комплексов и их совместном функционировании составила соответственно  $108,6 \pm 2,7$ ,  $58,1 \pm 1,2$  и  $96,5 \pm 4,4$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка. При введении фенибута – соответственно  $112,9 \pm 12,4$ ,  $31,4 \pm 6,2$  и  $91,5 \pm 8,7$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка, при введении пирацетама – соответственно  $102,7 \pm 11,9$ ,  $48,8 \pm 7,9$  и  $102,8 \pm 6,1$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка (Рис. 25).

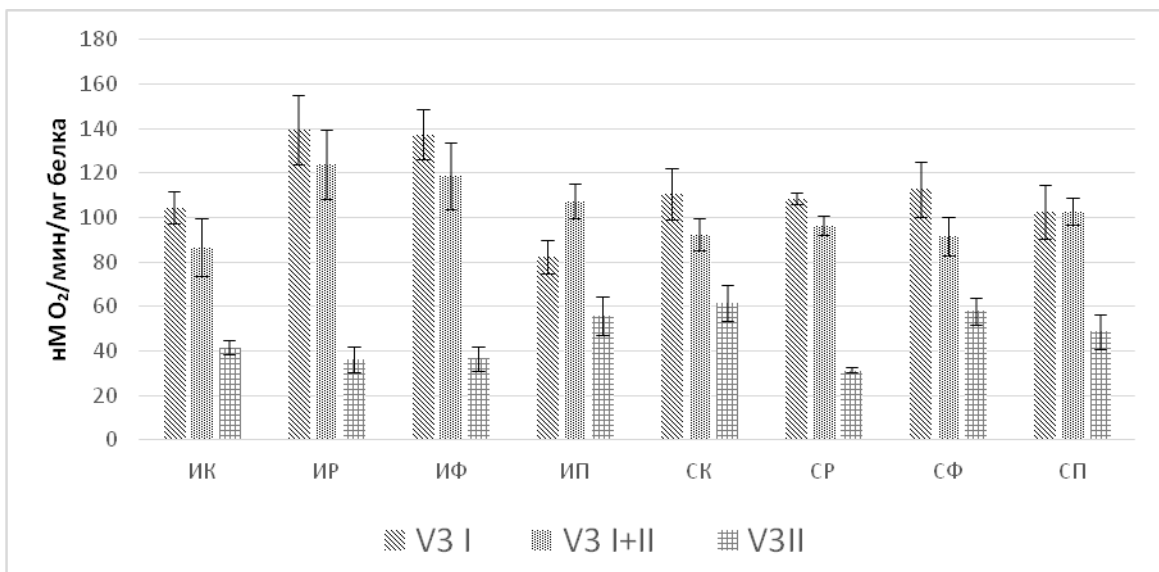


Рисунок 25. Влияние аналогов ГАМК на скорость V3 (нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка) митохондрий клеток головного мозга самцов

*Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;*

*\*- - изменения достоверны относительно животных ИК группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );*

*# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).*

В митохондриях кардиомиоцитов интактных животных контрольной группы показатель V4 при функционировании I комплекса был равен  $31,2 \pm 1,3$ , II комплекса –  $13,3 \pm 0,9$ , при их совместном функционировании –  $18,2 \pm 2,1$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. У интактных животных, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам, обнаружено недостоверное изменение скорости поглощения кислорода V4 митохондриями клеток сердца по отношению к таковым у животных группы позитивного контроля. При работе NDH значение показателя составило на фоне введения РГПУ-207  $26,5 \pm 0,7$ , при введении фенибута –  $27,4 \pm 2,1$ , на фоне пирацетама –  $27,2 \pm 1,1$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. Сукцинатзависимая нестимулированная скорость потребления кислорода была равна соответственно  $11,0 \pm 1,9$ ,  $14,7 \pm 0,9$  и  $21,5 \pm 4,3$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. При совместной работе I и II комплексов показатели составили соответственно  $15,7 \pm 0,5$ ,  $22,5 \pm 2,2$  и  $18,0 \pm 1,1$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. Показано, что острый стресс приводит к стимуляции скорости потребления V3 митохондрий клеток сердца по отношению к показателям интактных животных. Так сукцинатзависимая скорость увеличилась по сравнению с группой позитивного контроля на 40 % ( $p < 0,05$ ) до  $18,6 \pm 1,8$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка и наблюдалась тенденция к его активации в условиях функционирования I+II комплексов на 77% до  $32,3 \pm 11,0$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. Достоверного влияния рацетамов на скорость дыхания V4

митохондрий кардиомиоцитов крыс, подвергшихся стрессу, не обнаружено (рис. 26).

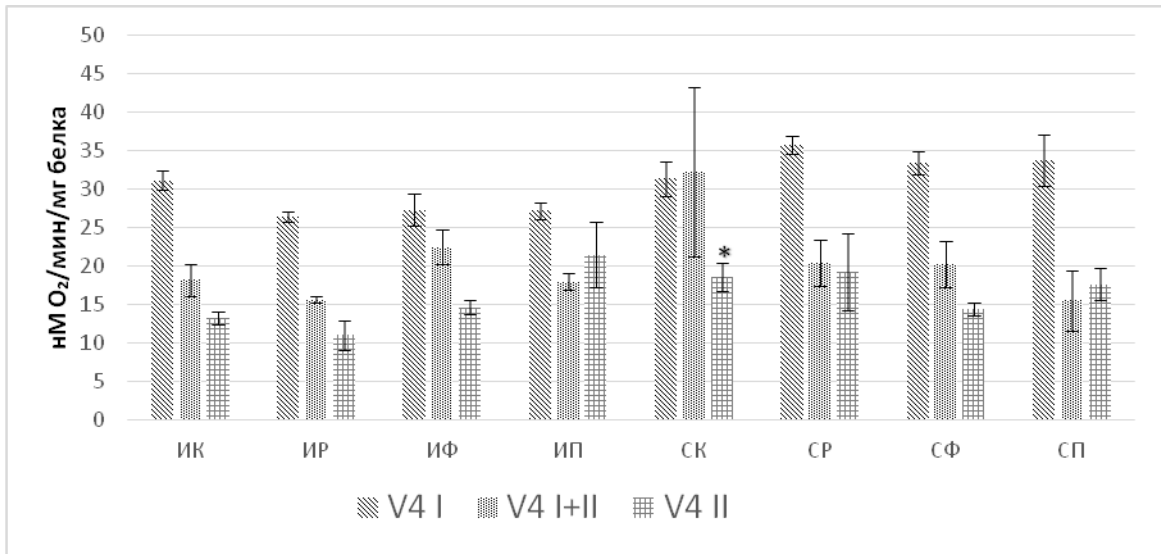


Рисунок 26. Влияние аналогов ГАМК на скорость V4 (нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка) митохондрий кардиомиоцитов самцов

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*- изменения достоверны относительно животных ИК группы (*t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Скорость V3 митохондрий клеток сердца интактных крыс при работе I комплекса была равна  $106,2 \pm 4,8$ , II комплекса –  $42,7 \pm 2,5$ , при их совместном функционировании –  $94,7 \pm 5,4$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. В условиях введения рацетамов интактным самцам показатель практически не изменился. На фоне введения РГПУ-207 при активности NDH V3 митохондрий кардиомиоцитов был равен  $119,1 \pm 1,3$ , при функционировании СДГ –  $48,4 \pm 10,3$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка, при их совместной работе –  $87,1 \pm 5,5$  нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка. У стрессированных животных контрольной группы скорость V3 при работе I

комплекса снижалась на 25% по отношению к показателям животных группы позитивного контроля ( $p < 0,05$ ) до  $79,6 \pm 5,2$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка, I и II комплексов - на 42% ( $p < 0,05$ ) до  $54,9 \pm 9,0$  нМ  $O_2$ /мин/мг белка. При функционировании только СДГ была выявлена лишь тенденция к уменьшению показателя. Соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам способствовали ускорению малатзависимой V3 в митохондриях сердца стрессированных крыс на 72% ( $p < 0,05$ ), 62% ( $p < 0,05$ ) и 74% ( $p < 0,05$ ) соответственно по отношению к значениям животных группы негативного контроля. Исследуемое соединение и пирацетам не влияли на скорость V3 при окислении сукцината и смеси малата и сукцината, тогда как фенибут повышал V3 при работе I+II комплексов на 55% по отношению к показателям стрессированных животных контрольной группы ( $p < 0,05$ ) (Рис. 27).

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 ( $V3/V4$ ).

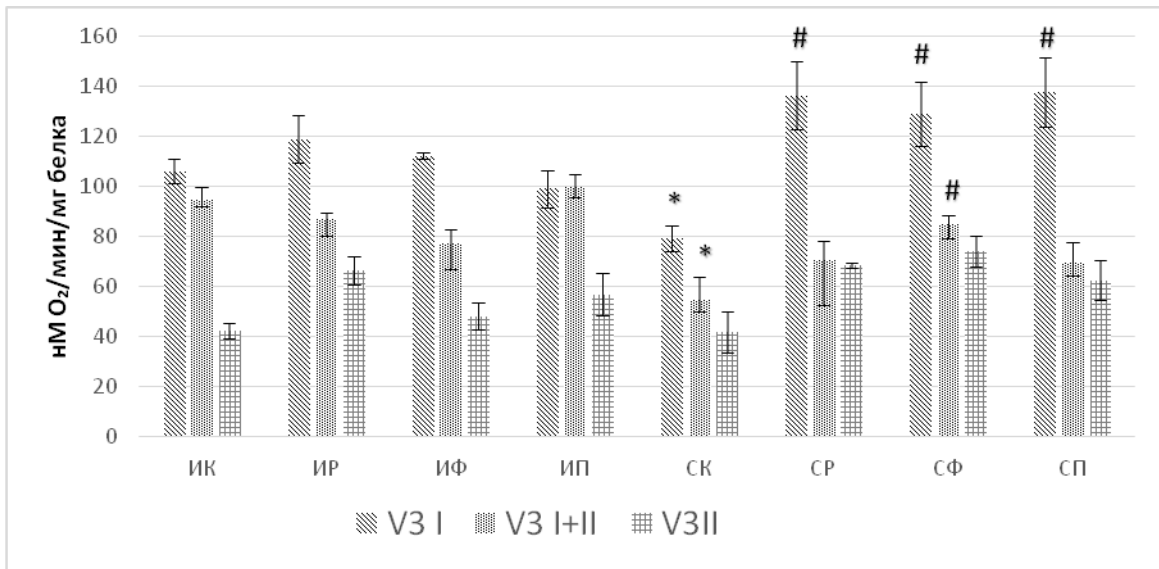


Рисунок 27. Влияние аналогов ГАМК на скорость V3 (нМ  $O_2$ /мин/мг белка) митохондрий кардиомиоцитов самцов

Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы,

получавшие пирацетам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пирацетам;

\*- - изменения достоверны относительно животных ИК группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

ДКЧ в митохондриях клеток мозга интактных крыс контрольной группы при работе NDH составил  $4,27 \pm 0,27$ , СДГ –  $4,01 \pm 0,26$ , при их совместном функционировании –  $4,46 \pm 0,2$ . На фоне введения интактным крысам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама исследуемый показатель изменялся недостоверно. При малатзависимом поглощении кислорода в митохондриях клеток мозга крыс, получавших соединение РГПУ-207, коэффициент  $V3/V4$  составил  $3,71 \pm 0,51$ , при введении фенибута –  $4,26 \pm 0,53$ , пирацетама –  $4,47 \pm 0,19$ . В условиях работы СДГ исследуемый параметр на фоне введения соединения РГПУ-207 составлял  $4,64 \pm 0,47$ , на фоне фенибута –  $4,82 \pm 0,04$ , пирацетама –  $4,82 \pm 0,05$ . При совместной активности СДГ и NDH соотношение  $V3/V4$  у крыс, получавших соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам, было равно соответственно  $7,70 \pm 2,05$ ,  $6,63 \pm 1,77$  и  $5,61 \pm 0,79$ . На фоне острого стресса ДКЧ в митохондриях клеток мозга интактных животных при работе I комплекса был на 32% ниже по отношению к таковому у крыс группы позитивного контроля и составил  $2,86 \pm 0,32$  ( $p < 0,05$ ), II комплекса – на 25% ( $3,02 \pm 0,12$ ) ( $p < 0,05$ ), при их совместном функционировании - на 26% ( $3,28 \pm 0,20$ ). Введение рацетамов и фенибута предотвращало падение ДКЧ. У стрессированных крыс, получавших соединение РГПУ-207, коэффициент  $V3/V4$  в условиях активности NDH, СДГ и NDH+СДГ был соответственно на 42% ( $p < 0,05$ ), 37% ( $p < 0,05$ ) и 41% выше по отношению к значению группы негативного контроля и составил соответственно  $4,07 \pm 0,11$ ,  $3,71 \pm 0,02$  и  $3,65 \pm 0,09$ . Введение стрессированным крысам фенибута при работе I, II и I+II комплексов вызывало повышение ДКЧ по сравнению с таковым у стрессированных крыс контрольной группы соответственно на 40% ( $p < 0,05$ ),

24% ( $p<0,05$ ) и 11% что равнялось соответственно  $4,02 \pm 0,29$ ,  $3,76 \pm 0,12$  и  $3,65 \pm 0,09$ . На фоне введения пираретама при функционировании NDH, СДГ и NDH+СДГ коэффициент V3/V4 был выше по сравнению с показателем стрессированных животных контрольной группы соответственно на 37% ( $p<0,05$ ), 20% ( $p<0,05$ ) и 29% и составлял соответственно  $3,92 \pm 0,64$ ,  $3,64 \pm 0,05$  и  $4,23 \pm 0,05$  (рис.28).

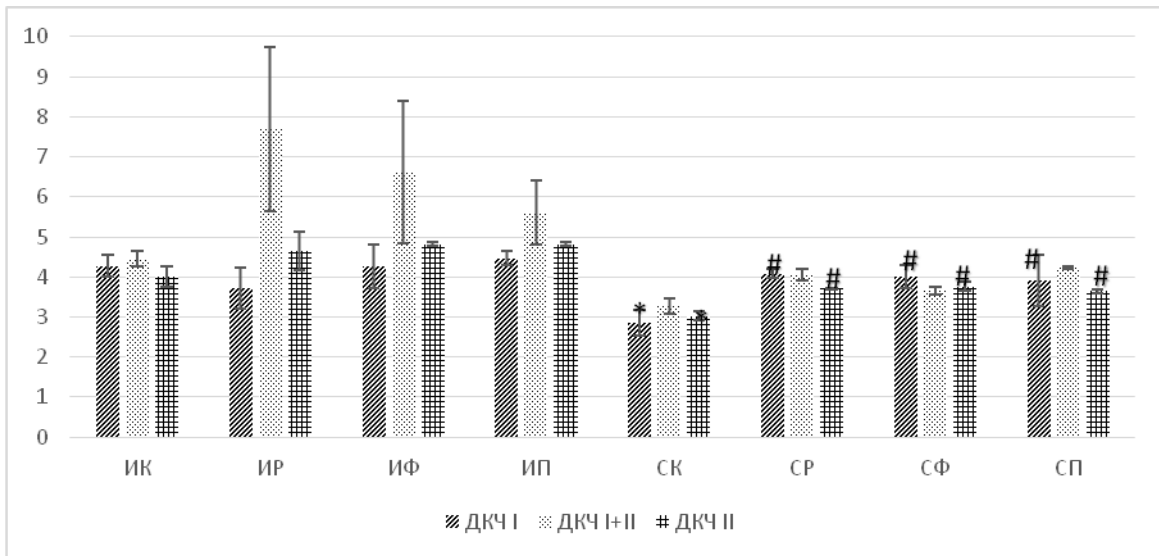


Рис. 28. Изменение коэффициента дыхательного контроля по Чансу ( $V3/V4$ ) в митохондриях клеток головного мозга крыс.

*Примечания:* ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пираретам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пираретам;

\* - изменения достоверны относительно животных интактной группы ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ );

# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p<0,05$ ).

Коэффициент  $V3/V4$  в митохондриях клеток сердца в группе интактных животных контрольной группы при работе NDH составил  $3,44 \pm 0,22$ , СДГ -  $3,26 \pm 0,17$ , при их совместном функционировании –  $4,93 \pm 0,17$ . В условиях малатзависимого окисления при введении интактным крысам соединения РГПУ-207, фенибута и пираретама ДКЧ был выше соответственно на 31%, 20% и 8% по отношению к животным группы



позитивного контроля и был равен соответственно  $4,51 \pm 0,10$ ,  $4,15 \pm 0,33$  и  $3,72 \pm 0,39$ . На фоне окисления сукцината у интактных самцов, получавших новый циклический аналог ГАМК, фенибут и пирацетам, исследуемый показатель был выше соответственно на 31%, 32% и 20% и равнялся  $4,27 \pm 0,29$ ,  $4,31 \pm 0,25$  и  $3,92 \pm 0,30$ . При совместной работе NDH и СДГ в митохондриях кардиомиоцитов интактных крыс, которым вводили соединение РГПУ-207 и пирацетам коэффициент V3/V4 увеличился соответственно на 14% и 15%. У животных, получавших фенибут показатель уменьшился на 24% по отношению к таковому животных контрольной группы. Значения соответственно составили  $5,61 \pm 0,45$ ,  $5,68 \pm 0,46$  и  $3,75 \pm 0,61$ . У животных группы негативного контроля произошло снижение ДКЧ при функционировании I, II и I+II комплексов соответственно на 25% ( $p < 0,05$ ), 26% ( $p < 0,05$ ) и 40% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с крысами позитивного контроля и был равен соответственно  $2,57 \pm 0,17$ ,  $2,40 \pm 0,35$  и  $2,96 \pm 0,65$ . В условиях работы NDH митохондрий кардиомиоцитов при введении стрессированным самцам соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама коэффициент V3/V4 был выше соответственно на 46% ( $p < 0,05$ ), 50% ( $p < 0,05$ ) и 61% ( $p < 0,05$ ) по сравнению к показателю животным негативного контроля и достиг значений соответственно  $3,76 \pm 0,28$ ,  $3,87 \pm 0,33$  и  $4,13 \pm 0,31$ . При функционировании СДГ митохондрий стрессированных животных, получавших новый циклический аналог ГАМК, фенибут и пирацетам, ДКЧ возрос по отношению к показателям контрольной группы стрессированных животных соответственно на 67% ( $p < 0,05$ ), 104% ( $p < 0,05$ ) и 52% ( $p < 0,05$ ) до значений  $4,02 \pm 0,25$ ,  $4,90 \pm 0,58$  и  $3,66 \pm 0,19$ . В условиях совместной работы СДГ и NDH на фоне введения исследуемых веществ стрессированным крысам отмечена лишь тенденция к возрастаю ДКЧ. (рис. 29).

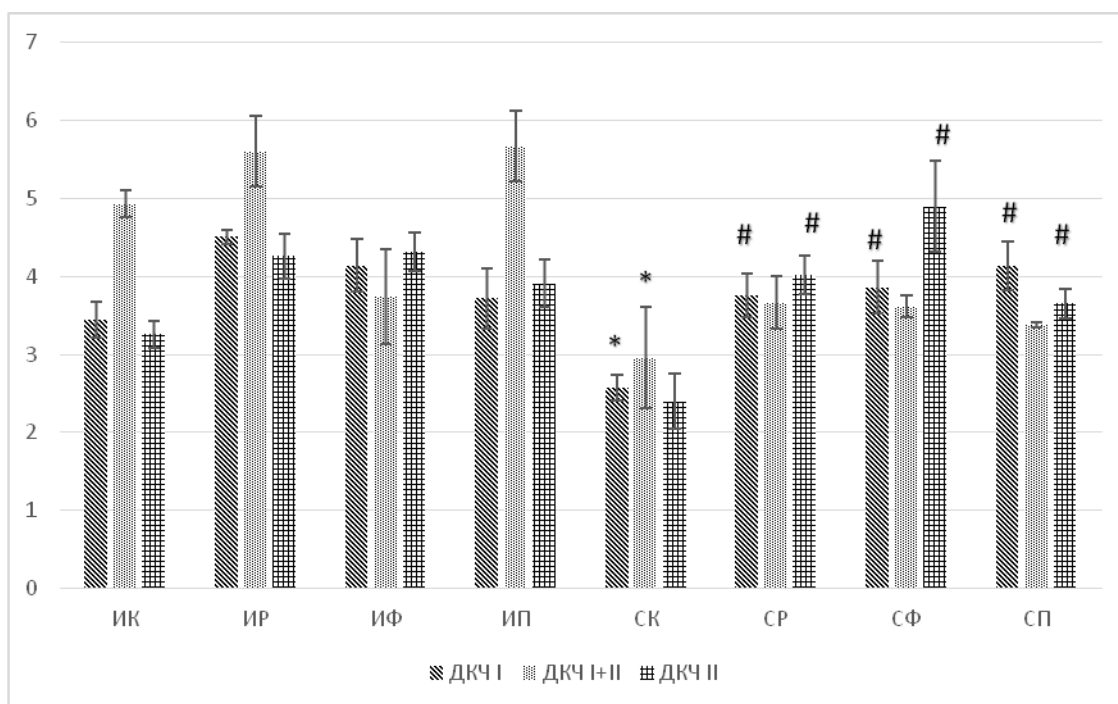


Рис. 29. Изменение коэффициента дыхательного контроля по Чансу ( $V_3/V_4$ ) в митохондриях кардиомиоцитов крыс.

Примечания: ИК – контрольная группа интактных самцов (позитивный контроль); ИР - интактные самцы, получавшие РГПУ-207; ИФ - интактные самцы, получавшие пираретам; СК – контрольная группа стрессированных самцов (негативный контроль); СР - стрессированные самцы, получавшие РГПУ-207; СФ - стрессированные самцы, получавшие пираретам;

\* - изменения достоверны относительно животных интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно группы СК (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, рацетамы и фенибут не влияют на функциональную активность митохондрий клеток сердца и мозга интактных животных. В условиях острого стресса выявлено возрастание скорости  $V_4$  в митохондриях клеток мозга при отдельной и совместной работе I и II комплексов дыхательной цепи. В митохондриях кардиомиоцитов показатель возрос лишь при работе II комплекса. Стимулированная скорость  $V_3$  понижалась при функционировании NDH и совместной работе NDH и СДГ митохондрий кардиомиоцитов стрессированных самцов. Достоверных изменений  $V_3$  митохондрий клеток мозга животных на фоне стресса не выявлено. Введение стрессированным крысам производных ГАМК

нивелирует изменение скоростей поглощения кислорода митохондриями по отношению к показателям животных группы негативного контроля. Малатзависимая скорость V4 в митохондриях клеток мозга стрессированных самцов снижалась на фоне введения соединения РГПУ-207 и эталонных препаратов, сукцинатзависимая V4 уменьшалась только после введения фенибута и пирацетама. Достоверного влияния рацетамов на V4 митохондрий клеток сердца крыс, подвергшихся стрессу, не обнаружено. Соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам также способствовали ускорению малатзависимой V3 в митохондриях кардиомиоцитов стрессированных крыс. При работе I+II комплексов отмечено повышение V3 только на фоне введения фенибута. Достоверного влияния циклических аналогов ГАМК на V3 в митохондриях клеток мозга не выявлено.

На фоне стресса снижается сопряжение окисления и фосфорилирования, о чем говорит снижение ДКЧ в митохондриях клеток сердца и мозга животных группы негативного контроля по отношению к значениям в группе позитивного контроля. В митохондриях клеток мозга коэффициент V3/V4 снижался у стрессированных крыс при отдельном функционировании I и II комплексов дыхательной цепи, тогда как в митохондриях кардиомиоцитов отмечено снижение и при работе I, II и I+II комплексов. Введение стрессированным животным производных ГАМК предотвращало снижение ДКЧ в митохондриях клеток мозга в условиях функционирования I и II комплексов и в митохондриях клеток сердца при работе СДГ и NDH.

#### 4.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ -207 НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Известно, что в патогенезе стрессорного повреждения сердца большую роль играет нарушение микроциркуляции (Крыжановский, Г, 2011). Рацетамамы снижают агрегацию тромбоцитов (Жилюк и др., 2013). Поэтому было изучено влияние нового циклического аналога ГАМК и препаратов сравнения на систему гемостаза на фоне стресса.

В группе позитивного контроля результаты равнялись: ПВ -  $23,9 \pm 3,4$  с, АЧТВ -  $18,8 \pm 2,1$  с, ФГ -  $4,0 \pm 0,6$  г/л, степень агрегации  $27,6 \pm 2,5\%$ , скорость агрегации  $23,1 \pm 2,0$  %/мин. У интактных животных, получавших циклические аналоги ГАМК, исследуемые показатели гемостаза недостоверно изменялись по отношению к контрольной группе. При введении соединения РГПУ-207 ПВ, АЧТВ, ФГ, степень и скорость агрегации составили соответственно  $17,0 \pm 4,2$  с,  $18,4 \pm 2,8$  с,  $4,6 \pm 0,9$  г/л,  $23,6 \pm 4,35\%$  и  $20,6 \pm 8,2$  %/мин, на фоне введения фенибута – соответственно  $17,7 \pm 3,2$  с,  $18,1 \pm 3,3$  с,  $3,8 \pm 0,7$  г/л,  $26,2 \pm 7,3$  % и  $21,8 \pm 7,1$  %/мин, при введении пираретама -  $18,6 \pm 5,1$  с,  $17,7 \pm 4,2$  с,  $3,8 \pm 0,3$  г/л,  $23,6 \pm 6,2$  %,  $19,6 \pm 6,9$  %/мин. Степень агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, в плазме стрессированных контрольной группы крыс была больше на 24% ( $p < 0,05$ ) ( $33,8 \pm 4,08\%$ ) и образование агрегатов ускорилось на 22% ( $p < 0,05$ ) ( $28,7 \pm 2,9$  %/мин) по сравнению с таковыми интактных животных. На фоне введения животным опытных групп соединения РГПУ-207, фенибута и пираретама агрегация стала менее выраженной, ее степень была ниже по отношению к значениям крыс группы негативного контроля соответственно на 21% ( $p < 0,05$ ), 21% ( $p < 0,05$ ) и 23% ( $p < 0,05$ ) и равнялась соответственно  $25,0 \pm 4,7$ ,  $27,6 \pm 4,6$ ,  $26,2 \pm 4,7$  %. Скорость агрегации была на 26% ( $p < 0,05$ ), 18% ( $p < 0,05$ ) и 22% ( $p < 0,05$ ) ниже и составила  $22,7 \pm 3,8$ ,  $22,6 \pm 6,9$  и  $22,1 \pm 4,0$  %/с. Показатели внешнего и внутреннего пути коагуляции – ПВ и АЧТВ – у самцов, подвергшихся стрессу, были на 27% ( $p < 0,05$ ) и 21% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с показателями опытных животных контрольной группы, значения составили соответственно  $17,5 \pm 2,2$  с и  $14,9 \pm 3,6$  с. У стрессированных самцов, получавших новый циклический аналог ГАМК, ПВ и АЧТВ составляли соответственно  $14,8 \pm 2,3$  с и  $14,1 \pm 3,6$  с. У животных, получавших препараты сравнения фенибут и пираретам, показатели внешнего пути коагуляции были равны соответственно  $18,0 \pm 1,2$  с и  $17,3 \pm 2,5$  с, показатель внутреннего пути -  $13,8 \pm 2,8$  с и  $13,5 \pm 1,7$  с.

Концентрация фибриногена в условиях острого стресса была на 23% ( $p < 0,05$ ) выше по отношению к значениям животных интактной группы и равнялась  $4,9 \pm 0,5$  г/л. При введении соединения РГПУ-207, фенибута и пирацетама стрессированным самцам концентрация ФГ была соответственно на 15% ( $p < 0,05$ ), 15% ( $p < 0,05$ ) и 13% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в группе негативного контроля и составила  $4,2 \pm 0,5$ ,  $4,2 \pm 0,3$  и  $4,3 \pm 0,2$  г/л (табл 19).

Таблица 19. Влияние производных ГАМК на показатели плазменно-коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза интактных и стрессированных животных ( $M \pm \sigma$ ),

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

Примечания: \* - изменения достоверны относительно животных интактной группы (*t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самцов (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Изучение антиагрегантного действия производных ГАМК *in vitro* было проведено на тромбоцитах плазмы интактных кроликов (6 проб с каждым веществом). В плазме, содержащим физ. р-р, степень и скорость агрегации составляли соответственно  $22,4 \pm 2,25$  % и  $26,5 \pm 2,11$  %/мин. На фоне добавления нового циклического аналога ГАМК исследуемые параметры составляли  $22,7 \pm 3,46$ % и  $22,3 \pm 2,86$  %/мин. При введении в раствор фенибута и пирацетама степень агрегации составила соответственно  $21,7 \pm 2,06$  и  $22,4 \pm 2,67$  %, скорость -  $24,0 \pm 3,23$  и  $24,4 \pm 2,60$  %/мин (Табл. 20).

Таким образом, соединение РГПУ-207, фенибут и пирацетам не влияют на агрегацию тромбоцитов *in vitro*.

Таблица 20. Влияние циклических производных ГАМК на агрегацию тромбоцитов *in vitro* ( $M \pm \sigma$ )

Соединение	Степень агрегации тромбоцитов, %	Скорость агрегации тромбоцитов, %/мин
Физраствор	22,4 $\pm$ 2,25	26,5 $\pm$ 2,11
РГПУ-207	22,7 $\pm$ 3,46	22,3 $\pm$ 2,86
фенибут	21,7 $\pm$ 2,06	24,0 $\pm$ 3,23
пирацетам	22,4 $\pm$ 2,67	24,4 $\pm$ 2,60

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

Болезни системы кровообращения (БСК) в 48% случаев явились причиной смертности населения РФ в 2016 году (<https://www.fedstat.ru/indicator/31619>). Среди БСК ИБС служит главной причиной инвалидизации и преждевременной смерти (25% смертности среди БСК в 2016 году).

Большую роль в развитии ИБС играют патологические изменения в миокарде, запускающие каскад внутриклеточных реакций, приводящих к гибели клетки (Hall AR et al., 2016). 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 внутриклеточные компоненты и мембрану клеток (Piper, H. M., 2004). Кроме того, при выраженных сдвигах в структуре и биохимических процессах в митохондриях формируется неспецифический канал «Mitochondrial Permeability Transition Pore, mPTP», через который в матрикс проникают низкомолекулярные соединения (McCommis, 2012). Это в свою очередь ведет к митоптозу, а затем и к апоптозу клетки.

Известно также, что ишемические звенья патогенеза играют большую роль в стрессорном повреждении сердца. Так тахикардия и гипертензия, развивающиеся при гипердреналинемии, усиливает нагрузку на сердце и увеличивает потребность миокарда в кислороде. На фоне вазоконстрикции и активации тромбоцитов, возникших 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).

Потенциально эффективными кардиопротекторными соединениями можно назвать вещества из группы рацетамов, являющихся циклическими аналогами ГАМК. В многочисленных исследованиях описаны их противоишемические (Цорин И. Б., 1986), противогипоксические (Solanki P, 2011), стресспротекторные (Карнаух Э.В., 2003, 2012, 2013), антиаритмические (Карнаух Э.В., 2012) эффекты.

В связи с этим был проведен поиск соединений с противоишемической активностью среди 12 рацетамов, синтезированных на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И.Герцена (г. Санкт-Петербург, Россия) под руководством проф. Берестовицкой В.М. Ишемия миокарда была моделирована путем окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии продолжительностью 30 минут с последующей 30-минутной реперфузией. Вещества вводили внутривенно за 10 минут до окклюзии. Функциональное состояние очага ишемии (ФСОИ) оценивали по размеру площади под кривой интервала ST. Было обнаружено, что максимальной антиангинальной активностью обладали соединения, в состав которых входил фенилацетилгидразидный радикал в 1-м положении пирролидинового цикла. Среди них самым эффективным оказалось соединение РГПУ-207 (фенилгидразид(4-фенил-2-пирролидон-1-ил)-уксусной кислоты). Площадь под кривой интервала ST у крыс, получавших его, была в 2 раза меньше чем у животных контрольной группы, что было сопоставимо с эффектом препарата сравнения верапамила.

Можно предположить, что противоишемическая активность соединения РГПУ-207 обусловлена его влиянием на метаболизм кардиомиоцитов. Согласно литературным данным производные ГАМК могут активировать аденилатциклазу, генерирующую цАМФ, а он способен мобилизовать субстраты для синтеза АТФ, снижение концентрации которого наблюдается в кардиомиоцитах при ИБС. Кроме того, известно, что



производные ГАМК могут модифицировать биохимические реакции ГАМК-шунта, способствуя регенерации АТФ при недостатке кислорода, созданию резервного фонда НАД<sup>+</sup> для окисления лактата в пируват, снижению лактоацидоза, что создает благоприятные условия для функционирования ферментных систем и улучшения метаболизма клеток.

Показано, что в условиях ишемии миокарда уровень внеклеточного норадреналина повышается более чем на 2 порядка. При реперфузии норадреналин в таком количестве может окисляться с образованием АФК (Гишинский М.А. и др., 2008). Известно, что производные ГАМК обладают симпатингибирующей активностью, что может способствовать ограничению повышения уровня катехоламинов и АФК, защите мембран клеток и клеточных органелл от повреждающего действия последних. Показано, что производные ГАМК снижают агрегацию тромбоцитов и адгезию эритроцитов, а также вязкость крови, что может способствовать улучшению кровотока и кровоснабжения ишемизированных клеток сердца.

При изучении зависимости «доза-эффект» соединения РГПУ-207 выявлено, что максимальный противоишемический эффект оно оказывает в дозе 9,4 мг/кг и не уступает референсным препаратам, вводимым в максимальных дозах. Увеличение дозы до 18,7 и 37,5 мг/кг не приводило к усилению действия, поэтому для дальнейших исследований была выбрана доза 9,4 мг/кг.

Одним из свойств антиангинальных препаратов является уменьшением размера зоны некротизированного миокарда.

На модели двойного окрашивания синим Эванса и ТТС ишемизированного миокарда выявлено, что у животных, получавших новый аналог ГАМК и препараты сравнения ивабрадин, мексидол и верапамил, размер зоны некроза был меньше по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Полученные результаты согласуются с данными литературы, где описано протекторное влияние пирацетама на структуру миокарда (Кресюн В.И., 1990, Цорин И.Б., 1997), что отражается на ЭКГ в

виде сниженной элевации сегмента ST (Цорин И. Б., 1986), менее выраженном изменении ЧСС и амплитуды зубца T (Карнаух Э.В., 2011). Возможно, антиангинальное действие соединения РГПУ-207 связано с его антигипоксическим эффектом. Показано, что пираретам повышает устойчивость миокарда (Кресюн В.И., 1990) и головного мозга (Ганцгорн Е.В. и др., 2012) к гипоксии. Леветирацетам снижает гибель нейронов при уменьшении содержания кислорода в культуральной среде (Sendrowski K, 2011), а также лимитирует гипоксического-ишемическое повреждение головного мозга новорожденных крыс (Griesmaier E, 2014). Фенотропил на модели гиперкапнической и гемической гипоксии проявляет антигипоксическое действие (Багметов М. Н., 2006). Оксирететам оказывает нейропротекторное действие на нейроны крыс при их инкубации в гипоксической среде.

Одной из важнейших характеристик работы сердца является его электрическая стабильность. Аритмогенез сопровождает многие патологические состояния, такие как стрессорное воздействие, ишемическая болезнь сердца, гипертиреоз и другие.

При кратковременной 10-минутной ишемии миокарда с последующей реперфузией отмечено развитие тяжелых нарушений ритма сердца у 100% животных с их дальнейшей гибелью. Считается, что аритмии, возникающие в ранний период окклюзии миокарда, связаны с механизмом «re-entry» вокруг очага ишемии из-за его отличающихся электрофизиологических свойств по отношению к здоровой зоне (Tse G., 2016). Соединение РГПУ-207 снижало выраженность аритмий во всех трех исследуемых дозах. Его механизм действия может быть связан как с влиянием на ионную проводимость мембраны, так и с антиангинальным эффектом, ограничением зоны некроза, которая является причиной возникновения «re-entry».

Соединение РГПУ-207 во всех исследуемых дозах снижало тяжесть возникающих реперфузионных аритмий после 30-минутной ишемии, при введении в дозе 9,4 мг/кг предотвращало их гибель, в дозах 18,7 и 37,5 мг/кг

уменьшало количество случаев гибели животных по сравнению с контрольной группой.

На аконитиновой модели нарушений ритма сердца выявлена выраженная антиаритмическая активность нового циклического аналога ГАМК во всех трех исследуемых дозах. По эффективности соединения незначительно уступает референсным препаратам новокаинамиду, этмозину и лидокаину. Кроме того, при введении соединения РГПУ-207 наблюдалось снижение летальности среди животных опытной группы. Аконитин стимулирует натриевую проницаемость мембран кардиомиоцитов, вызывая их деполяризацию. Существуют данные, что леветирацетам (входящий в группу рацетамов) может блокировать натриевые каналы кардиомиоцитов (Chua-Tuan J.L. et al., 2015). Можно предположить, что соединение РГПУ-207 также блокирует проводимость натрия через плазмолемму клеток сердца.

В условиях НРС, вызванных хлоридом кальция, антиаритмический эффект соединения РГПУ-207 был выявлен при введении в дозах 9,4 и 37,5 мг/кг, что выражалось в повышении выживаемости животных. Аналогичный результат наблюдали у крыс, получавших препараты сравнения верапамил и лидокаин. Механизм антиаритмического эффекта соединения РГПУ-207 в условиях избыточного уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$  может быть объяснен влиянием на работу как кальциевых так и натриевых каналов сарколеммы. По литературным данным леветирацетам ингибирует высоковольтные кальциевые токи в пирамидальных нейронах гиппокампа (Nimmrich V. et. al., 2012).

Изучение влияния соединения на трансмембранные ионные токи показало, что оно незначительно увеличивает 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.

Подавление ионных токов может быть связано с развитием инактивации каналов, с прямым блокированием ионных каналов и снижением их проводимости, или с уменьшением времени открытого состояния одиночных каналов, что в итоге также снижает ионную проводимость. Снижение ионных токов возможно также по причине уменьшения частоты открывания ионных каналов. Из литературы известно, что молекулярный механизм подавления токов веществами, как правило, связан с тем, что снижается количество функционирующих каналов вследствие связывания их молекул со структурами ионных каналов, вероятно, с сегментами S5–S6 в устье канала (Ahern Ch.A. et al., 2008, Decher N. et al., 2004, Muroi Y. et al., 2008).

Подавление всех ионных токов при действии мембраноактивных веществ примерно в равной степени и в равных концентрациях можно называть неспецифическим (неизбирательным) их влиянием на ионные каналы. Многие соединения подавляют кальциевые, натриевые и калиевые ионные токи, но вместе с тем часто выявляются и индивидуальные черты их действия (Вислобоков А.И. и др, 2010). Например, анксиолитик афобазол, обладающий еще и противоаритмическими свойствами (Вислобоков А.И. и др, 2010, Воронина Т.А., 2007), способен блокировать ионные каналы. В принципе для каждого соединения обнаруживаются некоторые особенности их мембранотропного действия, которое, вероятно, определяется структурой молекул этих соединений и их взаимодействием со структурами мембраны (связь “структура – действие”). Об этом свидетельствует и представленный спектр мембранотропной активности соединения РГПУ-207, в частности, активация калиевых токов при действии соединения в малых концентрациях (1 мкМ) и преимущественное подавление им калиевых ионных токов в концентрациях 100–1000 мкМ, что можно расценивать, как проявление специфичности действия данного соединения на ионные каналы.

Учитывая, что моллюски были интактные, можно предположить, что ионотропное действие соединения РГПУ-207 не связано с их действием на

жидкостность мембраны. Вероятно, влияние соединения на ионные токи, проходящие через мембрану, вносит существенный вклад в его антиаритмическое действие.

Известно, что одним из ведущих факторов повреждающего действия на кардиомиоциты является стресс. При этом гиперактивация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы ведет к повышению уровня катехоламинов, сужению сосудов, гипоксии, снижению микроциркуляции, интенсификации процессов ПОЛ с последующим разрушением клеточных мембран и нарушением синтеза АТФ (Меерсон Ф.З., 1984; Пшенникова М.Г., 2000). Следствием вышеназванных событий являются дегенеративные изменения в кардиомиоцитах и уменьшение функциональных резервов сердца (Меерсон Ф.З. и др., 1980). В этой связи представлялось целесообразным изучение влияния соединения РГПУ-207 на инотропные резервы миокарда при стрессорном воздействии.

После 24-часового стрессорного воздействия у животных контрольной группы развивались инволюция тимуса, гиперплазия надпочечников и эрозивно-язвенное поражение СОЖ (стрессорная триада) и увеличилось срАД, что связано с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Вследствие гиперглюкокортикоидемии возникают эрозивно-язвенным поражения слизистой оболочки желудка и инволюция тимуса. Повышение срАД возникает как результат гиперкатехолемии (Меерсон Ф.З., 1984). На фоне стрессорного воздействия происходит истощение функциональных резервов сердца, на что указывает снижение в два раза прироста показателей  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , ЧСС, ЛЖД и МИФС при нагрузках по сравнению со значениями интактных крыс. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях (Тюренков И.Н., 2014). Соединени РГПУ-207 и препараты сравнения способствуют увеличению прироста скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД, ЧСС и МИФС при проведении функциональных проб у стрессированных животных по сравнению с контрольной группой. Вероятно, это связано со

стресспротекторным действием соединения. Известно, что ГАМК-ергическая система является тормозной, стресс-лимитирующей, ограничивает стресс-реакции на центральном и периферическом уровнях. Нейроны, синтезирующие ГАМК, обнаружены в структурах мозга, играющих ведущую роль в развитии стресса - в дорсомедиальном, паравентрикулярном, перифорникальном ядрах гипоталамуса, а также в амигдаллярном комплексе (Cullinan W., 2000; Herman J.P et al., 2001; Miklos I.H. et al., 2002; Shekhar A. et al., 1995). В работе Bailey T.W. et al., (2003), показано, что инъекции агониста ГАМК<sub>A</sub> – рецепторов мусцимола в дорсомедиальные ядра гипоталамуса, медиальную амигдаллярную, ростральную и каудальную области вентральной зоны латерального септума, а также в бледный шов способствуют снижению индуцированной стрессом тахикардии и подъема АД (Morin S.M. et al., 2001; Samuels B.C. et al., 2002; Kubo T. et al., 2004; Horiuchi J. et al., 2002; Herman J.P. et al., 2004; De-Matteo R. et al., 2006). Наоборот, введение бикикулина и 6-ОН-саклофена — антагонистов ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub>- рецепторов в перифорникальное и паравентрикулярное ядра гипоталамуса вызывает повышение АД и ЧСС (Bailey T.W. et al., 2001). Вероятно, стресс-лимитирующее действие ГАМК реализуется за счет ингибирования секреции «гормонов и медиаторов стресса» - кортикотропин-рилизинг-фактора, АКТГ, вазопрессина и катехоламинов (Carrasco G.A. et al., 2003; Strohle A, 2003; Chadda R. et al., 2004; Kovacs K.J. et al., 2004; Verkuyl J.M. et al., 2005; Reddy D.S., 2006).

Стресс-протекторное действие ГАМК также может быть обусловлено ограничением развития окислительного стресса, которое показано в ряде работ (Zhang H.Y. et al., 2002; Шустанова Т.А. 2004,). В ряде работ Меерсона Ф.З. и соавт. (1981, 1984).

Выявлено повышение времени биоэлектрической активности сердца в условиях нормобарической гипоксии при введении соединения РГПУ-207 в дозе 9,4 мг/кг и верапамила в дозе 1,6 мг/кг, что говорит об их антигипоксантах действии. Исследуемое соединение, являясь циклическим

аналогом ГАМК, возможно, относится к антигипоксантам прямого действия, улучшая метаболизм ишемизированных клеток (Новиков В. Е. и др., 2008).

Известно, что в ишемическом и стрессорном поражении сердца большую роль играют процессы ПОЛ, приводящие к повреждению мембраны клеток 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. Образующие гидроксиперекиси липидов, нарушая структуру бислойной мембраны, уменьшают ее текучесть, вызывают инактивацию мембранно-связанных белков (Ademowo OS. et al., 2017).

В условиях 30-минутной ишемии миокарда с последующей реперфузией наблюдается активизация процессов ПОЛ в кардиомиоцитах, о чем говорит повышенное образование КД, 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 клетках сердца и мозга. Схожие процессы при различных моделях иммобилизационного стресса описаны другими авторами в плазме крови (Zaidi SK. et al., 2017), мозге, печени и почках (Samarghandian S. et al., 2017). 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. Аналогичные результаты были получены во множестве экспериментов с использованием ГАМК и ее производных на разных моделях: в условиях ишемии (Перфилова В. Н. и др., 2005), накопления  $\beta$ -амилоида и возрастных изменений (Stockburger C. et al, 2013), окислительного стресса при обработке культуры астроцитов липополисахаридами (Gupta S. et al, 2014), алкогольной интоксикации в слизистой желудка крыс и в культуре человеческих эпителиоцитов желудка GES-1 (Xie M. et al., 2017). Ограничение развития

процессов ПОЛ и увеличение активности антиоксидантных ферментов может быть связано со стресс-протективным действием соединения. Показано, что нарушение баланса про- и антиоксидантных систем находится в прямой зависимости от содержания стресс-лимитирующих медиаторов в гипоталамусе (Николаев В.И., 1995). Возможно, снижение уровня продуктов ПОЛ под влиянием пирасетама и соединения РГПУ-207 связано с повышением текучести поврежденных митохондриальных мембран (Stockburger C. et al, 2013), что способствует улучшению функционирования комплексов дыхательной цепи митохондрий (Gupta S. e al, 2014), снижению утечки из нее электронов и образования АФК. В этой связи емкость ферментов АОС сохраняется.

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 ( $V_4$ ) при работе I и II комплексов дыхательной цепи, что может указывать на увеличении проницаемости мембраны митохондрий, вероятно из-за активации процессов ПОЛ. Схожие результаты были получены Chanana P. (2016). Вследствие повышения проницаемости протоны переходят через внутреннюю мембрану, что сопровождается снижением мембранного потенциала (создаваемого при отсутствии АДФ и при наличии кислорода и субстратов) и стимулированием работы дыхательной цепи. Наблюдаемое разобщение окисления и фосфорилирования подтверждается снижением значения ДКЧ в митохондриях клеток мозга стрессированных животных при добавлении субстратов NDH. После добавления субстрата СДГ сопряжение повышалось, так как инактивация NAD-зависимого пути продукции АТФ обычно приводит к стимуляции сукцинатзависимой энергопродукции (Орлов, Ю.П. и др., 2014). После добавления ротенона передача электронов



на цитохромоксидазу от I комплекса ингибируется, однако поврежденные NDH вероятно продолжают использовать кислород для образования АФК и поэтому коэффициент сопряжения дыхания и фосфорилирования снова уменьшается.

В проведенном нами исследовании показано, что в митохондриях клеток сердца стрессированных крыс происходит замедление стимулированной скорости поглощения кислорода  $V_3$  в условиях работы I и I+II комплексов с понижением значения ДКЧ. Так как при изолированном функционировании II комплекса подобных изменений не выявлено, можно предположить выраженное ингибирование активности NDH. Эта теория согласуется с литературными данными: многие исследователи определили NDH в качестве основного места повреждения дыхательной цепи (Yang M. et al., 2014, Baniene R. et al., 2016, Gorenkova N. et al., 2013). При этом, как правило, скорость окисления сукцината не изменялась, что означает снижение активности только I комплекса без ингибирования II комплекса. В описанной инактивации NDH видимо большую роль играет образование АФК (Murphy MP, 2016) с последующим развитием ПОЛ, о чем свидетельствует повышение уровня продуктов ПОЛ и снижение активности ферментов антиоксидантной системы в митохондриях клеток сердца и мозга.

Результаты проведенного эксперимента показали, что аналоги ГАМК обладают выраженным протективным действием на митохондрии, о чем свидетельствует повышение скорости  $V_3$  митохондрий клеток сердца и снижение скорости  $V_4$  митохондрий клеток мозга у опытных крыс, увеличение сопряжения окисления и фосфорилирования и ДКЧ митохондрий клеток мозга и сердца. Согласно литературным данным, пирацетам сохраняет мембранный потенциал митохондрий (Stockburger C. et al, 2013, Gupta S. e al, 2014), индуцирует синтез АТФ (Stockburger C. et al, 2013), повышает активность комплексов дыхательной цепи (Gupta S. e al, 2014). Подобное защитное действие рацетамов связывают с улучшением текучести нейрональных и митохондриальных мембран путем связывания с полярными

головками фосфолипидов (Leuner K., et al., 2010), особенно при их повреждении АФК.

Отсутствие влияния рацетамов на функциональную активность митохондрий интактных животных (также описанное в работе Singh N. (2016)) может быть связано с тем, что молекулы рацетама, взаимодействуя с фосфолипидами мембраны, недостаточно сильно изменяют жидкостные свойства неповрежденной мембраны.

Известно, что стресс сопровождается инициацией тромбообразования как за счет стимуляции тромбоцитарного звена, так и за счет активации плазменных факторов свертывания (von Känel R., 2015). Играет свою роль и повышение гематокрита крови, с концентрированием молекул гемостаза большого размера, что способствует более активному контакту их друг с другом и с эндотелием сосудов. Согласно полученным результатам, острый стресс приводит к активации внешнего и внутреннего пути коагуляции, а также агрегации тромбоцитов. Увеличение уровня фибриногена в плазме стрессированных крыс свидетельствует о протромбогенном действии (является фактором свертывания I) и о развитие стресс-реакции (является белком острой фазы) (Lazzarino A.I., 2015). Исследуемое соединение РГПУ-207 и препараты сравнения снижали концентрацию фибриногена в плазме на фоне стресса. По данным литературы у пациентов, принимавших пирарцетам, наблюдалось снижение уровня фибриногена на 30-40% (Mogiau M. et al., 1993). Показано, что в условиях стресса наблюдается активация агрегации тромбоцитов, приводящая к усилению ишемии тканей (Садикова, 2016). У стрессированных животных, получавших новый аналог ГАМК и препараты сравнения, степень и скорость агрегации были ниже, чем у стрессированных животных контрольной группы. При добавлении соединений *in vitro* к тромбоцитам интактных кроликов влияния соединения РГПУ-207 и препаратов сравнения на агрегацию не выявлено (Singh N. et al., 2016).

Таким образом, соединение РГПУ-207 обладает противоишемическим, антигипоксическим, антиаритмическим, стресслимитирующим и

антиагрегантным эффектами, а также ограничивает процессы ПОЛ, повышает активность антиоксидантных ферментов, восстанавливает работу митохондрий и влияет на функционирование ионных каналов.

## 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-болевогой стресс, соединение РГПУ-207 оказывает кардипротекторное 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 гиперкапнической гипоксии. У животных, получавших соединение РГПУ-207 и подвергшихся 24-часовому иммобилизационно-болевогому 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АКТГ - адренотропный гормон
- АОС – антиоксидантная система
- АФК - активные формы кислорода
- АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
- БСК – болезни системы кровообращения
- ВАХ – вольт-амперная характеристика
- В/бр - внутрибрюшинно
- ГАМК - гамма-аминомасляная кислота
- ГОМК - гамма-оксимасляная кислота
- ГП – глутатионпероксидаза
- ДК – диеновые конъюгаты
- ДКЧ – дыхательный контроль по Чансу
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- ЛЖД - левожелудочковое давление
- МДА - малоновый диальдегид
- МИФС - максимальная интенсивность функционирования структур
- НРС – нарушения ритма сердца
- ОНВЛКА – окклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии
- ПВ – протромбиновое время
- ПОЛ - перекисное окисление липидов
- СДГ - сукцинатдегидрогеназа
- СОД — супероксиддисмутаза
- СРО – свободно-радикальное окисление
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ССС – сердечно-сосудистая система



СТГ – соматотропный гормон

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТТГ – тиреотропный гормон

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФГ - фибриноген

Физ. р-р – физиологический раствор

ФСОИ – функциональное состояние очага ишемии

ЦПЭ – цепь переноса электрона

ЦНС - центральная нервная система

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭИМ – экспериментальный инфаркт миокарда

NDH – NADH дегидрогеназа

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, В.П. Влияние ГАМК и пирацетама на АТФ-азную активность митохондрий мозга и печени в условиях экспериментальной гипокинезии / В.П. Акопян, О.П. Соцкий, Л.В. Едигарова, А.А. Василян, К.Р. Маилян, Д.С. Шафразян // Вопросы медицинской химии. - 1998 - N 3. - С. 262-266.
2. Алисиевич, С.В. Стресс-индуцированная дисфункция тромбоцитов у крыс с фолатзависимой гипергомоцистеинемией / С.В. Алисиевич, А.Г. Дубичев, А.А. Левина, Г.А. Назарова, Н.Н. Золотов, В.В. Кржечковская, Н.Н. Павлова, Е.П. Романова, И.А. Рудько, К.А. Черкасова, А.А. Кубатиев // Общая реаниматология. – 2006. - Т. II, №5 — 6. – С. 61-65.
3. Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лабораторное дело. 1988. - № 11. – С. 41-43.
4. Багметов, М. Н. Церебропротекторное действие композиций фенибута и фенотропила и их солей в условиях экспериментальной ишемии головного мозга: дисс. ... канд. мед. Наук / Багметов Мирослав Николаевич. - Волгоград, 2006. – 201 с.
5. Ватутин, Н. Т. Реперфузионное повреждение миокарда / Н.Т. Ватутин, Н.В. Калинин, Е.В. Ещенко, И.Н. Кравченко // Кардіохірургія та інтервенційна кардіологія. - 2013. - № 1. - С. 15-22.
6. Виноградов, В.А. Влияние нейропептидов на экспериментальную дуоденальную язву у крыс / В.А. Виноградов, В.М. Полонский // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1983. – №1. – С. 3-7.
7. Вислобоков, А.И. / Фармакологическая модуляция ионных каналов мембраны нейронов // А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, К.Н. Мельников. СПб.: Издательство СПбГМУ, 2006. - 288 с.

8. Вислобоков, А.И. Мембранотропное действие фармакологических средств / А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, П.А. Галенко-Ярошевский, П.Д. Шабанов. Санкт-Петербург – Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. - 528 с.
9. Воронина, Т. А. Ноотропные препараты: достижения и новые проблемы / Т.А. Воронина , С.Б. Середенин // Экспер. и клин. фармакол. - 1998. - № 4. - С. 3-9.
10. Воронина, Т.А. Ноотропные и нейропротективные средства / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Эксп. и клин. фарм. - 2007. -Т. 70 (4). – С. 44–58.
11. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов, Е.Я. Позин, Р.А. Маркосян // Лаб дело. – 1989. №10. – С. 15-18.
12. Ганцгорн, Е.В. Церебропротекторные эффекты пирацетама и его комбинации с мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс / Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.Е. Матухно, О.М. Куделина, Н.Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2012. - № 1. - С. 60–66.
13. Гишинский, М.А. Ишемия и ишемическая устойчивость миокарда: роль симпатической системы / М.А. Гишинский, С.Е. Науменко // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – Т. 2 (26). – С. 93-102.
14. Голиков, А.П. Новые возможности лечения и профилактики гипертонических кризов у больных с сочетанием гипертонической болезни и ишемической болезни сердца / А.П. Голиков, М.М. Лукьянов, В.Ю. Полумисков, П.П. Голиков, Б.В. Давыдов, Д.В. Руднев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2005. - №.3. - С. 10-16.
15. Гурова, Н.А. Кардиопротекторные свойства зонипорида на модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс / Н.А. Гурова, А.А. Спасов, А.С. Тимофеева, А.А. Желтова, В.Ю. Федорчук //

- Экспериментальная и клиническая фармакология. -2013. – Т 76. №8. - С. 17-19.
16. Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца  
Клинические рекомендации. - Москва, 2013
17. Епишина, В.В. Сравнительное изучение психотропной активности гетероциклических производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот: дис. ... канд. мед. Наук / Епишина Виктория Владимировна. - Волгоград, 2006. – 212 с.
18. Жамгарян, Л.Г. Оценка действия пирарцетама на состояние процессов фосфорилирования АДФ и аккумуляции кальция в митохондриях сердца в условиях гипокинезии / Л.Г. Жамгарян // Медицинская наука Армении. - 2007. - №1. - С. 54-58.
19. Жилюк, В.И. Изучение механизмов антиагрегантного действия производных пирролидона у крыс с хронической гипергликемией / В.И. Жилюк, А.Э. Левых, В.И. Мамчур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156 (12). – С. 763-766
20. Здравоохранение в России. 2015: Стат. сб./ Росстат. - М., 2015
21. Капелько, В.И. Регуляторная роль кислородных радикалов в миокардиальных клетках / Капелько В.И // Рос. физиологич. журн. им. Сеченова. - 2004. - Т. 90. № 6. - С. 681-692.
22. Карнаух, Э.В. Кардиопротекторное действие пирарцетама в условиях потенцированной эмоциональным стрессом модельной кальциевой аритмии / Э.В. Карнаух // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2012. - №1 (54). – С. 80-84
23. Карнаух, Э.В. Антистрессовое кардиопротекторное действие пирарцетама при эмоциональном стрессе по критерию ограничения стресс-индуцированной ферментемии и протеолиза / Э.В. Карнаух // Экспериментальна і клінічна медицина. - 2013. - Т. 58. № 1. - С. 43-46.

- 24.Карнаух, Э.В. Кардиопротекторное влияние пирарцетама на баланс тканевых катехоламинов в миокарде при эмоциональном стрессе / Э.В. Карнаух // Медицина сьогодні і завтра. - 2013. - № 1 (58). - С. 56-58.
- 25.Карнаух, Э.В. Пирарцетам: морфофункціональна антистрессова кардиопротекція по даним електронної мікроскопії/ Э.В. Карнаух // Медицина сьогодні і завтра. - 2011. – Т.25, № 3. - С. 28-32.
- 26.Карнаух, Э.В. Противоішемическое кардиопротекторное действие пирарцетама в условиях потенцированной эмоциональным стрессом модельной ишемии миокарда по даним електрокардіографії / Э.В. Карнаух // Медицина сьогодні і завтра. - 2011. – № 4(53). - С. 42-44.
- 27.Кароли, Н.А. Внезапная сердечная смерть у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / Н.А. Кароли, А.П. Ребров // Кардиология. – 2017. –Vol. 57(2). - P. 83-90.
- 28.Ковалев, Г.В. Найденов Влияние транквилизаторов на функциональное состояние миокарда при его стрессорном повреждении / Г.В. Ковалев, К.Г. Гурбанов, И.Н. Тюренков, // Фармакология и токсикология. - 1983. - Т. 46, № 3. - С. 41-44.
- 29.Колесникова, Т. А. Использование пирарцетама для профилактики и лечения внутриутробной гипоксии плода у рожениц с гестационным пиелонефритом / Т.А. Колесникова, М.В. Белуга, И.А. Ославский, А.Л. Гурин и др. // Журнал Гродненского медицинского университета. - 2006. - № 2 (14). - С. 73-75.
- 30.Королюк, М.А. Методы определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. Дело. – 1988. № 1. – С. 16-19.
- 31.Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. - № 2. – С. 88-91.

32. Костюк, П.Г. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки / П.Г. Костюк, О.А. Крышталь. М.: Наука, 1981. – 208 с.
33. Кресюн, В.И. Влияние литонита и пирацетама на течение экспериментального инфаркта миокарда / В.И. Кресюн, В.С. Кравченко, Л.Л. Кадырова // Фармакология и токсикология. - 1990. - Т. 53. № 2. - С. 29-31.
34. Кресюн, В.И. Влияние пирацетама и метионина на течение экспериментального инфаркта миокарда / В.И. Кресюн, Л.С. Кравченко, Л.Л. Кадырова // Патологич. физиол. и эксперим. терапия. - 1993. - № 3. - С. 14-16.
35. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. М.: Медицина, 1988. – 256 с.
36. Меерсон, Ф.З. Активация перекисного окисления липидов и очаговые контрактурные повреждения в сердечной мышце при эмоционально-болевым стрессе / Ф.З. Меерсон, В.В. Малышев, В.Е. Каган // Архив патологии. – 1980.- №2. – С.9-12.
37. Меерсон, Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. – 272 с.
38. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по доклиническому исследований лекарственных средств. Часть первая. М., Гриф и К, 2012г.- 944 с.
39. Моин, В.М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. - № 12. – С. 12-16.
40. Новиков, В.Е. Аминотиоловые антигипоксанты при травматическом отеке головного мозг / В.Е. Новиков, Н.С. Понамарева, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6(3). - С. 3-56.

41. Орлов, Ю.П. Роль сукцинатов при критических состояниях / Ю.П. Орлов, Н.В. Говорова // *Общ. Реаниматол.* - 2014. – Vol. 6. – P. 65-78.
42. Пелипецкая, Е.Ю. Желудочковые аритмии при инфаркте миокарда (распространенность, прогноз, лечение) / Е.Ю. Пелипецкая, В.А. Шульман, С.Е. Головенкин // *Сибирское медицинское обозрение.* 2012. – 76 (4). – С. 56-62.
43. Перуцкий, Д.Н. Основные концепции постинфарктного ремоделирования миокарда левого желудочка / Д.Н. Перуцкий, Т.И. Макеева, С.Л. Константинов // *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация.* - 2011. - № 10 (105). Выпуск 14. – С. 51-58.
44. Перфилова, В.Н. Влияние цитрокарда на функциональные резервы сердца в условиях хронического стрессорного воздействия / В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, С.А. Лебедева [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* - 2007. - № 7. - С. 24-28.
45. Перфилова, В.Н. Изучение мембранопротекторного действия структурных аналогов ГАМК / В.Н. Перфилова, С.А. Лебедева, Х. Диб // «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» 4-я Международная конференция, д/о «Подмосковье». - 2006. - С. 59
46. Перфилова, В.Н. Кардиопротективное действие феруловой кислоты при стрессорном повреждении сердца / В.Н. Перфилова, А.В. Дьяков, И.Н. Тюренков // *Экспериментальная и клин фармакология.* – 2005. – Т.68 №5. - С.19-22
47. Перфилова, В.Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК: дисс. ... д-ра биол. наук / Перфилова Валентина Николаевна. - Волгоград, 2009. - 348 с.
48. Пристром, А.М. Оксидативный стресс и сердечно-сосудистые заболевания. Часть II // А.М. Пристром, М. Бенхамед // *Лечебное дело.* – 2012. - № 2. – С. 19-23.

49. Пшенникова, М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М.Г. Пшенникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2000. - № 2. - С. 24-31.
50. Садикова, Н.В. Коррекция производными глутаминовой кислоты стрессорных повреждений сердца: автореф. дисс. ... канд. мед. Наук / Садикова Наталья Владимировна - Волгоград, 2016. – 26 с.
51. Селье, Г. Стресс без дистресса. - М: Прогресс, 1979. – С. 123.
52. Стальная, И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии 1977: 66-68.
53. Сыренский, А.В. Влияние изменения метаболического и антиоксидантного статуса миокарда на выраженность его ишемического и реперфузионного повреждения / А.В. Сыренский, М.М. Галагудза, Е.И. Егорова и др. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – Т.10(94). – С. 1171-1180.
54. Сычев, Д.А. Пирацетам и пирацетамоподобные препараты: взгляд клинического фармаколога / Д.А. Сычев, К.В. Герасимова, В.А. Отделенов // Неврология. Психиатрия. - 2011. - № 15. - С. 957-962.
55. Теряева, Н. Б. Стресс: метаболические основы адаптации и патология сердечно-сосудистой системы / Н. Б. Теряева // Креативная кардиология. – 2008. - № 1. С. 24-30.
56. Тюренков, И. Н. Изменение ино- и хронотропных резервов сердца стрессированных животных в условиях блокады различных NO-синтаз / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова, Н. В. Садикова // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 2014. - N 1. - С. 46-50.
57. Тюренков, И.Н. Кардио- и церебропротекторное действие новых структурных аналогов ГАМК / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.Е. Бородкина, О.Ю. Гречко, В.В. Ковтун // Вестник Волгоградского



- государственного медицинского университета. – 2000. – Т.56 (6). – С. 52-56.
- 58.Тюренков, И.Н. Сравнительная характеристика нейропротекторного действия фенотропила и пирацетама в условиях ишемии головного мозга у лабораторных животных / И.Н. Тюренков, М.Н. Багметов, В.В. Епишина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. - Т. 70, № 2. – С. 24-29.г
- 59.Тюренков, И.Н. Фенибут и его цитрат в предупреждении психоневрологических нарушений, вызванных хроническим стрессом - лишением парадоксальной фазы сна / И.Н. Тюренков, В.В. Багметова, Л.Е. Бородкина, В.М. Берестовицкая, О. С Васильева /// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. - Т. 75, № 6. – С. 8-13.
- 60.Ушкалова, В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Г.Д., Деева ЗМ. Контроль перекисного окисления липидов. Изд-во Новосибирского университета 1993: 182 с.
- 61.Фоменко, С.Е. Нарушение обменных процессов в печени крыс под действием стресса / С.Е. Фоменко, Н.Ф. Кушнерова, В.Г. Спрыгин, Т.В. Момот // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. - № 2. - С. 67-70.
- 62.Цорин, И.Б. Действие препаратов с антигипоксическими свойствами на ишемическое повреждение миокарда // И.Б. Цорин, Г.Г. Чичканов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. - 1986. - Т.102. №11. - С. 585-587.
- 63.Цорин, И.Б. Фармакологическая защита ишемизированного миокарда: антагонисты кальция, специфические брадикардические средства, антигипоксанты: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. / Цорин Иоосиф Борисович. – Москва, 1997. - 49 с.
- 64.Шабалина, И.А. Модуляция стрессорной вазоконстрикции при сочетании активации  $\mu$  и  $\delta$ -опиатных рецепторов агонистами с различной степенью стабильности: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Шабалина Ирина Александровна. – Архангельск, 2012. – 117с.

- 65.Шустанова, Т.А. Свободнорадикальный механизм развития холодового стресса у крыс /Т.А. Шустанова, Т.И. Бондаренко, Н.П. Милютин //Рос. физиологич. журн. им. Сеченова.– 2004.- Т.90, №1. – С.73-82.
- 66.Abe, H. The Roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases / H. Abe, H. Semba, N. Takeda // J Atheroscler Thromb. – 2017. – Vol. 28. – P. [Epub ahead of print].
- 67.Ademowo, O.S. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? / O.S. Ademowo, H.K.I. Dias, D.G.A. Burton, H.R. Griffiths // Biogerontology. – 2017. – Vol. 24. - P. [Epub ahead of print].
- 68.Ahern, Ch.A. Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels / Ch.A. Ahern, A.L. Eastwood, D.A. Dougherty, R. Horn // *Circulation Research*. – 2008. – Vol. 102. - 86–94.
- 69.Akhnokh, M.K. Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits mitochondrial damage and preserves function following ischemic injury / M.K. Akhnokh, F.H. Yang, V. Samokhvalov, K.L. Jamieson [et al] // *Front Pharmacol*. – 2016. – Vol.7(7). – P. 133.
- 70.Antzelevitch, C. Basic mechanisms of reentrant arrhythmias / C. Antzelevitch // *Curr Opin Cardiol*. – 2001. - 16(1). P. 1-7.
71. Arieli, Y. Gender modulation of Ca<sup>2+</sup> uptake in cardiac mitochondria // Y. Arieli, H. Gursahani, M. Eaton, L.A. Hernandez, S. Schaefer// *J. Mol. Cell. Cardiol*. - 2004. – Vol. 37. – P. 507–513.
- 72.Bacon, S.L. Changes in plasma volume associated with mental stress ischemia in patients with coronary artery disease / S.L. Bacon, A. Sherwood, A.L. Hinderliter et al. // *Int. J. Psychophysiol*. - 2006. - Vol. 61. - P. 143–148.
- 73.Bailey, T.W. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats /T.W. Bailey, J.A. Dimicco//*Am.J. Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol*.– 2001. Vol.280, №1– P.8-15

74. Baniene, R. Short ischemia induces rat kidney mitochondria dysfunction / R. Baniene, D. Trumbeckas, M. Kincius, N. Pauziene [et al] // *J Bioenerg Biomembr.* – 2016. – Vol.48(1). - P. 77-85.
75. Bauer, G. siRNA-based Analysis of the Abrogation of the Protective Function of Membrane-associated Catalase of Tumor Cells / G. Bauer // *Anticancer Res.* – 2017. – Vol.37(2). - P. 567-581.
76. Baumeister, P. Altered Calcium Handling and Ventricular Arrhythmias in Acute Ischemia / P. Baumeister, T.A. Quinn // *Clin Med Insights Cardiol.* – 2016. – 14(10). – P. 61-69.
77. Becker, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology / L.B. Becker // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 61. – P. 461–470.
78. Bi, Z. Diapause-associated protein3 functions as Cu/Zn superoxide dismutase in the Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*) / Z. Bi, X. Yang, W. Yu, J. Shu, Y. Zhang // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(3). - P. e90435.
79. Borutaite, V. Kinetic analysis of changes in activity of heart mitochondrial oxidative phosphorylation system induced by ischemia / V. Borutaite, R. Morkuniene, A. Budriunaite, D. Krasauskaite [et al/] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1996. – Vol. 28. – P. 2195–2201.
80. Bosetti, F. Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early-post ischemic reperfusion of rat heart / F. Bosetti, A. Baracca, G. Lenaz, G. Solaini // *FEBS Lett.* – 2004. - Vol. 563. – P. 161–164.
81. Brand ,M.D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M.D. Brand, D.G. Nicholls // *Biochemical Journal.* - 2011. – Vol. 435. – P. 297-312.
82. Bravo-Martínez, J. A novel CaV2.2 channel inhibition by piracetam in peripheral and central neurons / J. Bravo-Martínez, I. Arenas, O. Vivas, S. Rebolledo-Antúnez [et al] // *Exp Biol Med.* – 2012. – Vol. 237(10). - P. 1209-18.
83. Cairns, C. B. Postischaemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischaemia and

- reperfusion injury / C.B. Cairns, A.A. Ferroggiaro, J.M. Walther, A.H.Harken, A. Banerjee // *Circulation*. - 1997. – Vol.96 (II). – P. 260–265.
- 84.Campos, J.C. Mitochondrial Quality Control in Cardiac Diseases / J.C. Campos, L.H. Bozi, L.R. Bechara, V.M. Lima, J.C. Ferreira // *Front Physiol*. – 2016. – Vol. 21(7). – P. 479.
- 85.Carmeliet, E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias / E. Carmeliet // *Physiol Rev*. – 1999. - 79(3). P. 917-1017.
- 86.Carrasco, G.A. Neuroendocrine pharmacology of stress/ G.A.Carrasco, L.D.Van de Kar // *Eur. J.Pharmacol*. - 2003. .-Vol.463, №.28. – P.235-272.
- 87.Chadda, R. Sex differences in effects of mild chronic stress on seizure risk and GABAA receptors in rats / R.Chadda, L.L. Devaud // *Pharmacol.Biochem.Behav.*– 2004. –Vol.78, №.3. – P. 495-504.
- 88.Chanana, P. GABA-BZD receptor modulating mechanism of panax quinquefolius against 72-h sleep deprivation induced anxiety like behavior: possible roles of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation / P. Chanana, A. Kumar // *Front Neurosci*. – 2016. – Vol.7(10). – P. 84.
89. Cheema, Y. Mitochondriocentric pathway to cardiomyocyte necrosis in aldosteronism: cardioprotective responses to carvedilol and nebivolol / Y. Cheema, J.N. Sherrod, W. Zhao, T. Zhao [et al.] // *J.Cardiovasc Pharmacol*. – 2011. - Vol.58(1). – P. 80-6.
- 90.Chen, J. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart / J. Chen, G.I. Henderson, G.L. Freeman // *J. Mol. Cell. Cardiol*. - 2001. – Vol.33. – P. 1919–1927.
- 91.Chouchani, E.T. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury / E.T. Chouchani, V.R. Pell, A.M. James, L.M. Work [et al.] // *Cell Metab*. - 2016. – Vol.23. – P. 254–263.
- 92.Chua-Tuan, L.J. Cardiac sodium channel blockade after an intentional ingestion of lacosamide, cyclobenzaprine, and levetiracetam: Case report / L.J.

- Chua-Tuan, D. Cao, J.L. Iwanicki, C.O. Hoyte // *Clinical Toxicology*. – 2015. Vol. 53(6). – P. 565-8.
93. Costa, R.A.P. Protective effects of L-carnitine and piracetam against mitochondrial permeability transition and PC3 cell necrosis induced by simvastatin / R.A.P. Costa, M.P. Fernandes, N.C. de Souza-Pinto, A.E. Vercesi // *European Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 701. – P. 82–86.
94. Crompton, M. The role of Ca<sup>2+</sup> in the function and dysfunction of heart mitochondria. In *Calcium and the Heart*. Lange, G. A. ed. al.: NY. Raven Press, 1990. - P167–198.
95. Cullinan, W. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study / W. Cullinan // *Comp. Neurol E.J.* – 2000. - Vol. 419, №10. – P. 344-351
96. Dambrova, M. Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut / M. Dambrova, L. Zvejniece, E. Liepinsh, H. Cirule [et al] // *Eur J Pharmacol.* – 2008. - Vol. 583(1). – P. 128-34.
97. de la Roche, J. Lactate is a potent inhibitor of the capsaicin receptor TRPV1 / J. de la Roche, I. Walther, W. Leonow, A. Hage [et al] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 9. – P. 36740.
98. Decher, N. Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K<sup>+</sup> channels / N. Decher, B. Pirard, F. Bundis, S. Peukert, K.H. Baringhaus [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2004. – Vol. 279 (1). – P. 394–400.
99. De-Matteo, R. Angiotensin II in dorsomedial hypothalamus modulates cardiovascular arousal caused by stress but not feeding in rabbits / R. De-Matteo, G.A. Head, D.N. Mayorov // *Am.J.Physiol.Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. - Vol. 290, №1. – P. 257-264.
100. Elliott, A.C. Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts / A.C. Elliott, G.L. Smith, D.A. Eisner, D.G. Allen // *J Physiol.* – 1992. – Vol. 454. – P. 467-490.

101. Eltahawy, N.A. Gamma amino butyric acid attenuates brain oxidative damage associated with insulin alteration in streptozotocin-treated rats / N.A. Eltahawy, H.N. Saada, A.S. Hammad // *Indian J Clin Biochem.* – 2017. – Vol. 32(2). – P. 207-213.
102. Ferrari, R. Angiotensin-converting enzyme inhibition in cardiovascular disease: evidence with perindopril / R. Ferrari // *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* — 2005. -Vol.3, №1.-P. 15-29.
103. Ferrari, R. The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischemic reperfusion / R. Ferrari, F. Di Lisa, R. Raddino, O. Visioli // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1982. – Vol.14. – P. 737–740.
104. Fink, G. Selye's general adaptation syndrome: stress-induced gastroduodenal ulceration and inflammatory bowel disease / G. Fink // *J Endocrinol.* – 2017. --- Vol. 232 (3). – P. F1-F5.
105. Fontes, M.A.P. Asymmetric sympathetic output: The dorsomedial hypothalamus as a potential link between emotional stress and cardiac arrhythmias / M.A.P. Fontes, M.L. Filho, N.L.S. Machado, C.A. de Paula [et al] *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* – 2017. Vol. 17. – P. pii: S1566-0702(16)30228-4.
106. Foskett, J.K. The mitochondrial Ca(2+) uniporter complex / J.K. Foskett, B. Philipson // *J Mol Cell Cardiol.* – 2015. – Vol.78. – P. 3-8.
107. Frangogiannis, N.G. Pathophysiology of Myocardial Infarction / N.G. Frangogiannis // *Comprehensive Physiology.* – 2015. - Vol. 5(4). - P. 1841-75.
108. Gadicherla, A.K. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine / A.K. Gadicherla, D.F. Stowe, W.E. Antholine, M. Yang, A.K. Camara // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – Vol. 1817(3). – P. 419-29.
109. Geng, B. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol / B. Geng, L. Chang, C. Pan, Y. Qi [et al] // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. - Vol. 318. – P. 756–763.

110. Gibbs, J.E. Levetiracetam: antiepileptic properties and protective effects on mitochondrial dysfunction in experimental status epilepticus / J.E. Gibbs, M.C. Walker, H.R. Cock // *Epilepsia*. – 2006. – Vol. 47(3). – P. 469-78.
111. Gnaiger, E. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia / E. Gnaiger, G. Mendez, S.C. Hand // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2000. – Vol. 97. - P. 11080–11085.
112. Gnaiger, E. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c / E. Gnaiger, A.V. Kuznetsov // *Biochem. Soc. Trans.* - 2002. – Vol. 30. – P. 252–258.
113. Gogvadze, V. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. / V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky // *Semin. Cancer Biol.* - 2009. - Vol.19, №1 - P. 57–66.
114. Gorenkova, N. Conformational change of mitochondrial complex I increases ROS sensitivity during ischemia / N. Gorenkova, E. Robinson, D.J. Grieve, A. Galkin // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. - Vol. 19(13). - P. 1459-68.
115. Graff, S. Long-term risk of atrial fibrillation after the death of a partner / S. Graff, M. Fenger-Grøn, B. Christensen, H.S. Pedersen, J. Christensen, J. Li, M. Vestergaard // *Open Heart*. – 2016. – Vol. 3(1). – P. 1-6.
116. Gregg, R.E. New ST-segment elevation myocardial infarction criteria for left bundle branch block based on QRS area / R.E. Gregg, E.D. Helfenbein, S. Babaeizadeh // *Journal of Electrocardiology*. -2013. - V. 46 - P.528–534.
117. Griesmaier, E. Levetiracetam increases neonatal hypoxic-ischemic brain injury under normothermic, but not hypothermic conditions / E. Griesmaier, K. Stock, K. Medek, R.I. Stanika [et al.] *Brain Res.* – 2014.- Vol. 1556 (27). – P. 10-8.
118. Gupta, G. The metabolic enhancer piracetam attenuates mitochondrion-specific endonuclease G translocation and oxidative DNA fragmentation / G. Gupta, K.V. Dinesh, B. Joyshree, R.K. Sivarama [et al] // *Free Radic Biol Med.* - 2014. – Vol. 73. - 278-90.

119. Hall, A.R. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction / A.R. Hall, N. Burke, R.K. Dongworth, S.B. Kalkhoran [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 26(7). – P. - e2238.
120. Halliwell, B. Gutteridge J.M.C. Free radicals. In *Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK, 1989.
121. Hammadah, M. Vascular, hemodynamic and hormonal response to mental stress and risk of mental stress induced myocardial ischemia circulation / M. Hammadah, A. Alkhoder, N. Isakadze [et al.] // *Circulation.* – 2016. –Vol.134. - P. A11582.
122. Herman, J.P. Differential regulation of forebrain glutamic acid decarboxylase mRNA expression by aging and stress / J.P. Herman, B.R. Larson // *Brain.Res.* – 2001. - Vol.912, №1.– P.60-66.
123. Herman, J.P. Differential regulation of forebrain glutamic acid decarboxylase mRNA expression by aging and stress / J.P. Herman, B.R. Larson // *Brain.Res.* – 2001. - Vol.912, №1.– P.60-66.
124. Hoffman, B.F. Mechanisms for cardiac arrhythmias / Hoffman B.F., Dangman KH. // *Experientia.* – 1987. - Vol. 43(10). - P. 1049-56.
125. Hokonohara, T. Effects of oxiracetam on the decrease in population spikes in hypoxic and low glucose media / T. Hokonohara, Y. Shimoda, N. Hori // *Folia Pharmacologica Japonica.* - 1992. - Vol. 99. - №. 3. - P. 123 – 133.
126. Horiuchi, J. Evidence for tonic disinhibition of RVLM sympathoexcitatory neurons from the caudal pressor area / J. Horiuchi, R.A. Dampney // *Auton.Neurosci.*–2002. - Vol.99, №2– P.102-10.
127. Imahashi, K. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury / K. Imahashi, H. Kusuoka, K. Hashimoto, J. Yoshioka, [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 84. – P. 1401–1406.
128. Iwai, T. Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart / T. Iwai, K. Tanonaka, R. Inoue, S. Kasahara [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2002. - Vol. 34. – P. 725–738



129. Iwai, T. Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts / T. Iwai, K. Tanonaka, R. Inoue, S .Kasahara [et al.] // *Cardiovas. Res.* - 2002. – Vol.55 – P. 141–149.
130. Jennings, R.B. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury / Jennings R.B. // *Circ Res.* -2013. – Vol.113. - C. 428-438.
131. Jiang, W. Platelet aggregation and mental stress induced myocardial ischemia: Results from the Responses of Myocardial Ischemia to Escitalopram Treatment (REMIT) study / W. Jiang, S. Boyle, T. Ortel, Z. Samad [et al.] // *Am. Heart J.* - 2015. - Vol. 169(4). - P. 496-507.
132. Kang, P.M. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature / P.M. Kang, S. Izumo // *Circ. Res.* - 2000. – Vol. 86. - P. 1107–1113.
133. Kang-Park, M. Interaction of CRF and kappa opioid systems on GABAergic neurotransmission in the mouse central amygdale / M. Kang-Park, B.L. Kieffer, A.J. Roberts, G.R. Siggins, S.D. Moore // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2015. – Vol. 355 (2). P. 206-211.
134. Kentish, J.C. The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle / J.C. Kentish // *J Physiol.* – 1986. – Vol. 370. - P. 585-604.
135. Kinnally, K. W. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. / K. W. Kinnally, B. Antonsson // *Apoptosis.* – 2007. - Vol.12, №5. - P. 857–868.
136. Kovacs, K.J. GABAergic mechanisms constraining the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis /K.J. Kovacs, I.H. Miklos, B. Bali// *Ann.N.Y.Acad.Sci.*– 2004. - Vol. 1018, №6–P.466-476.
137. Kubo T. Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats/ T. Kubo, H. Okatani, Y. Nishigori // *Neurosci. Lett.* – 2004. .- Vol.354, №1–P.84-86.

138. Kunz, W. S. Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle / W.S. Kunz, A. Kudin, S. Vielhaber, C.E. Elger [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 27741–27745.
139. Lanza, I.R. Mitochondrial Metabolic Function Assessed In Vivo and In Vitro / I.R. Lanza, K.N. Sreekumaran // *Methods Enzymol.* – 2009. - Vol. 457. – P. 349-372.
140. Lazzarino, A.I. The association between fibrinogen reactivity to mental stress and high-sensitivity cardiac troponin T in healthy adults / A.I. Lazzarino, M. Hamer, D. Gaze, P. Collinson [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* – 2015. – Vol. 59. – P. 37–48.
141. Leducq, N. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion / N. Leducq, F. Bono, T. Sulpice // *Pharmacol. Exp. Ther.* - 2003. - Vol. 306. № 3. - P. 828 -837.
142. Lesnefsky, E.J. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin / E.J. Lesnefsky, Q. Chen, T.J. Slabe, M.S. Stoll [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2004. – Vol.1. –P. 258–267.
143. Lesnefsky, E.J. Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria / E.J. Lesnefsky, B. Tandler, J. Ye, T.J. Slabe [et al.] // *Am. J. Physiol.* - 1997. – Vol. 273. – P. 1544–1554.
144. Leuner, K. Improved mitochondrial function in brain aging and Alzheimer disease - the new mechanism of action of the old metabolic enhancer piracetam / K. Leuner, C. Kurz, G. Guidetti, J.M. Orgogozo, W.E. Müller // *Front Neurosci.* – 2010. - Vol. 7 (4). - P. pii: 44.
145. Levraut, J. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation // J. Levraut, H. Iwase, Z.H. Shao, T.L.

- Vanden Hoek, P.T. Schumacker // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. - Vol. 284. – P. 549–558.
146. Lindsay, D.P. Differential effects of buffer pH on Ca<sup>2+</sup>-induced ROS emission with inhibited mitochondrial complexes I and III / D.P. Lindsay, K.S.A. Camara, D. F. Stowe, R. Lubbe, M. Aldakkak. // *Front Physiol.* – 2015. – Vol.10 (6). – P. 58.
147. Lussier, A.L. Altered GABAergic and glutamatergic activity within the rat hippocampus and amygdala in rats subjected to repeated corticosterone administration but not restraint stress / A.L. Lussier, R. Romay-Tallón, H.J. Caruncho, L.E. Kalynchuk // *Neuroscience.* – 2013. - Vol. 231. - P. 38-48.
148. Mathupala, S. P. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. / S.P. Mathupala, Y.H. Ko, P.L. Pedersen // *Oncogene.* - 2006. - Vol.25, №34. - P. 4777–4786.
149. Matsuhisa, F. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice / F. Matsuhisa, N. Kitamura, E. Satoh // *Stress.* – 2014. - Vol.17, №2. – C.186-92.
150. McCommis, K.S. The role of VDAC in cell death: friend or foe? / K.S. McCommis, C.P. Baines // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2012. – Vol. 1818. - P. 1444–1450.
151. Murphy, M. P. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage / M. P. Murphy // *Biochemical Society Transactions.* – 2016. – Vol. 44. – P. 1219–1226.
152. Miklos, I.H. GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy / I.H. Miklos, K.J. Kovacs // *Neuroscience.* – 2002. – Vol.113, №3.–P.581-592.
153. Moriau, M. Treatment of the Raynaud's phenomenon with piracetam / M. Moriau, E. Lavenne-Pardonge, L. Crasborn, R von Frenckell, C. Col-Debeys // *Arzneimittelforschung.* – 1993. Vol. 43(5). – P. 526-35.

154. Morin, S.M. Injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus / S.M. Morin, E.H. Stotz-Potter, J.A. DiMicco // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2001. – Vol.280, №5.–P.1276-1284.
155. Mráček, T. ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase / T. Mráček, E. Holzerová, Z. Drahot, N. Kovářová [et al.] // *J. Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol.1837(1). P. - 98-111.
156. Muller, W. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain / W. Muller, S. Koch, K.Scheuer, A. Rostock, R. Bartsch // *Biochem. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 53. - P. 135–140.
157. Murphy, M. P. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage / M. P. Murphy // *Biochemical Society Transactions.* – 2016. – Vol.44. - P. 1219–1226.
158. Nie, Z. Presynaptic CRF1 receptors mediate the ethanol enhancement of GABAergic transmission in the mouse central amygdala / Z. Nie, E.P. Zorilla, S.G. Madamba, K.C. Rice, M. Roberto, G.R. Siggins // *Sci World J.* – 2009. – Vol. 18(9). P. 68-85.
159. Nimmrich, V. P/Q-type calcium channel modulators / V. Nimmrich, G. Gross // *Br J Pharmacol.* – 2012. - 167(4). – P. 741–759.
160. Onwugbufor, M. Myocardial cytochrome oxidase activity increases with age and hypoxemia in patients with congenital heart disease / M. Onwugbufor, R.J. Levy, D. Zurakowski, R.A. Jonas, P. Sinha // *Perfusion.* – 2016. – Vol. 1. - P. pii: 0267659116681435.
161. Paradies, G. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischaemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin // G. Paradies, G. Pedrosillo, M. Pistolese, N. Di Venosa [et al] // *Circ. Res.* - 2004. – Vol. 94. – P. 53–59.
162. Paradies, G. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage / G. Paradies, G.

- Pedrosillo, M. Pistolese, F.M. Ruggiero // *Gene*. - 2002. Vol. 286. – P. 135–141.
163. Piper, H.M. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection / H.M. Piper, Y. Abdallah, C. Schaefer // *Cardiovasc. Res.* - 2004. – Vol. 61.- P. 365–371.
164. Pouleur, H. Diastolic dysfunction and myocardial energetics / H. Pouleur // *Eur Heart J.* – 1990. – Vol.11. – P. 30-34.
165. Qiao, Z. Salvianolic acid alleviating myocardium injury in ischemia reperfusion rats / Z. Qiao, Y. Xu // *Afr J Tradit Complement Altern Med.* – 2016. – Vol. 13(4). – P. 157–161.
166. Quinlan, C.L. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates / C.L. Quinlan, I.V. Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, A.L. Orr, M.D. Brand // *Redox Biol.* – 2013. – Vol.23(1). – P. 304-12.
167. Reddy, D.S. Physiological role of adrenal deoxycorticosterone-derived neuroactive steroids in stress-sensitive conditions /D.S. Reddy// *Neuroscience*. 2006. – Vol.138, №3.–P.911-920.
168. Ristow, M. Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS) / M. Ristow, K. Schmeisser // *Dose Response*. – 2014. – Vol. 12(2). – P. 288-341.
169. Rodrigo, G.C. Dinitrophenol pretreatment of rat ventricular myocytes protects against damage by metabolic inhibition and reperfusion / G.C. Rodrigo, C.L. Lawrence, N.B. Standen // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – Vol. 34. – P. 555–569.
170. Romanov, R.A. Molecular diversity of corticotropin-releasing hormone mRNA-containing neurons in the hypothalamus / R. A. Romanov, A. Alpar, T. Hökfelt, T. Harkany // *J. Endocrinol.* - 2017; 232(3). – P. R161-R172.
171. Samarghandian, S. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney / S. Samarghandian, M.

- Azimi-Nezhad, T. Farkhondeh, F. Samini // *Biomed Pharmacother.* – 2017. Vol. 87. – P. 223-229.
172. Samuels, B.C. Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe / B.C. Samuels, D.V. Zaretsky, J.A. DiMicco // *J.Physiol.* – 2002. – Vol.538, №3.–P.941-946.
173. Sapa, J. Antiarrhythmic and antioxidant activity of novel pyrrolidin-2-one derivatives with adrenolytic properties / J. Sapa, A. Nowaczyk, K. Kulig // *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* - 2011. – Vol. 383 (1). – P. 13-25.
174. Schmidt, M.R. Remote ischemic conditioning for patients with STEMI / M.R. Schmidt, M.E. Rasmussen, H.E. Bøtker // *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* – 2017. – Vol. 22(4). - P. 302-309.
175. Scolletta, S. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure / S. Scolletta, B. Biagioli // *Biomed Pharmacother.* – 2010. – Vol.64(3). – P. 203-7.
176. Sendrowski, K. Levetiracetam protects hippocampal neurons in culture against hypoxia-induced injury / K. Sendrowski, L. Boćkowski, W. Sobaniec, E. Hendo [et al] // *Folia Histochem Cytobiol.* – 2011. – Vol.49(1). - P. 148-52.
177. Shekhar, A. Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test / A. Shekhar, J.S. Katner // *Pharmacol.Biochem.Behav.* – 1995. - Vol. 50, №2. - P. 253 – 258.
178. Singh, N. In Vitro Effects of Cognitives and Nootropics on Mitochondrial Respiration and Monoamine Oxidase Activity / N. Singh, J. Hroudová, Z. Fišar // *Mol Neurobiol.* – 2016. Vol. 23. – P. [Epub ahead of print].
179. Smith, D. R. Stimulation of mitochondrial oxygen consumption in isolated cardiomyocytes after hypoxia-reoxygenation / D. R. Smith, D. Stone and V. M. Darley-Usmar // *Free Radical Res.* – 1996. - Vol. 24. - P. 159–166.
180. Solaini, G. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion // G. Solaini, D.A. Harris / *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 390. – P. 377–394.

181. Solanki, P. Preventive effect of piracetam and vinpocetine on hypoxia-reoxygenation induced injury in primary hippocampal culture / P. Solanki, D. Prasad, S. Muthuraju, A.K. Sharma [et al] // *Food Chem Toxicol.* – 2011. – Vol. 49(4). – P. 917-22.
182. Solaro, R.J. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats / R.J. Solaro, J.A. Lee, J.C. Kentish, D.G. Allen // *Circ Res.* – 1988. – Vol. 63. - P. 779-787.
183. Steenbergen, C. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart / C. Steenbergen, G. Deleeuw, T. Rich, J.R. Williamson // *Circ Res.* – 1977. – Vol. 41. - P. 849-858.
184. Steenbergen, C. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity / C. Steenbergen, M.L. Hill, R.B. Jennings // *Circ Res.* – 1985. – Vol. 57. - P. 864-875.
185. Stephens, M.A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones / M.A. Stephens, P.B. Mahon, M.E. McCaul, G.S. Wand // *Psychoneuroendocrinology.* – 2016. – Vol. 66. – P. 47-55.
186. Stockburger, C. A mitochondrial role of SV2a protein in aging and alzheimer's disease: studies with levetiracetam / C. Stockburger, D. Miano, M. Baeumlisberger, T. Pallas // *J Alzheimers Dis.* – 2016. – Vol. 50(1). - P. 201-15.
187. Stockburger, C. Improvement of mitochondrial function and dynamics by the metabolic enhancer piracetam / C. Stockburger, C. Kurz, K.A. Koch, S.H. Eckert [et al.] // *Biochem Soc Trans.* – 2013. – Vol. 41(5). - P. 1331-4.
188. Stockmans, F. Inhibitory effect of piracetam on platelet-rich thrombus formation in an animal model / F. Stockmans, W. Deberdt, A. Nyström, E. Nyström [et al.] // *Thromb Haemost.* – 1998. – Vol. 79(1). P. - 222-7

189. Strohle, A. The neuroendocrinology of stress and the pathophysiology and therapy of depression and anxiety /A.Strohle// *Nervenarzt.*– 2003. – Vol.74, №3.–P.279-291.
190. Sutherland, S.P. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia / S.P. Sutherland, S.P. Cook, E.W. McCleskey // *Prog Brain Res.* – 2000. – Vol. 129. – P. 21-38.
191. Suzuki, K. Heat-shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemiareperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction / K. Suzuki, B. Murtuza, I.A. Sammut, N. Latif [et al] // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P.270–276.
192. Trueblood, N. A. Niacin protects the isolated heart from ischemia-reperfusion injury / N. A. Trueblood, R. Ramasamy, L. F. Wang, S. Scafer // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 764–771.
193. Tse, G. Mechanisms of cardiac arrhythmias / G. Tse // *J Arrhythm.* – 2016. Vol. 32(2). - P. 75–81.
194. Tse, G. Y<sup>4</sup>Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis // G. Tse, B.P. Yan, Y.W. Chan, X.Y. Tian // *Huang. Front Physiol.* – 2016. – Vol. 3 (7). - P. 313.
195. Van Borren, M.M.G.J. NHE-1 and NBC during pseudo-ischemia/reperfusion in rabbit ventricular myocytes / M.M.G.J. Van Borren, A. Baartscheer, R. Wilders, J.H. Ravesloot // *J. Mol.Cell. Cardiol.* - 2004. – Vol. 37. – P. 567–577.
196. Varadarajan, S. G. Changes in [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, compartmental [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts / S.G. Varadarajan, J. An, E. Novalija, S.C. Smart, D. F. Stowe // *Am. J. Physiol.* - 2001. – Vol. 280. – P. 280–293.



197. Verkuyl, J. GABAergic transmission in the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and stress / J. Verkuyl, H. Karst // *Eur. J. Neurosci.* - 2005. - Vol. 21. - P. 113-121.
198. von Känel, R. Acute mental stress and hemostasis: When physiology becomes vascular harm / R. von Känel // *Thromb Res.* - 2015. - Vol. 135 Suppl 1. - P. 52-5.
199. Winnicka, K. Piracetam - an old drug with novel properties? / K. Winnicka, M. Tomasiak, A. Bielawska // *Acta Pol. Pharm.* - 2005. - Vol. 62 (5). - P. 405-409.
200. Xie, M. Gastroprotective effect of gamma-aminobutyric acid against ethanol-induced gastric mucosal injury / M. Xie, H. Chen, S. Nie, W. Tong [et al.] // *Chem Biol Interact.* - 2017. Vol. 272. - P. 125-134.
201. Yamamoto, S. Protective effect of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor, SM-20550, on impaired mitochondrial respiratory function and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload in ischemic/reperfused rat hearts / S. Yamamoto, K. Matsui, N. Ohashi // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 2002. - Vol. 39. - P. 569-575.
202. Yang, M. Reversible blockade of complex I or inhibition of PKC $\beta$  reduces activation and mitochondria translocation of p66Shc to preserve cardiac function after ischemia / M. Yang, D.F. Stowe, K.B. Udoh, J.S. Heisner, A.K. Camara // *PLoS One.* - 2014. -Vol. 9(12). - P. e113534.
203. Yu, L. Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: role of AMPK-PGC-1 $\alpha$ -SIRT3 signaling / L. Yu, B. Gong, W. Duan, C. Fan [et al.] // *Sci Rep.* - 2017. - Vol. 25(7). - P. 41337.
204. Zaidi, S.K. Garlic extract attenuates immobilization stress-induced alterations in plasma antioxidant/oxidant parameters and hepatic function in rats / S.K. Zaidi, S.A. Ansari, S. Tabrez, M.N. Hoda [et al] // *Chin J Integr Med.* - 2017. - Vol.15. - P. [Epub ahead of print].

205. Ziegelstein, R.C. Acute emotional stress and cardiac arrhythmias / R.C. Ziegelstein // JAMA. – 2007. – Vol.298(3). – P. 324-9.
206. <https://www.fedstat.ru/indicator/31619>.