

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Мамлеев Андрей Викторович

Эндотелиопротекторные свойства 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина при экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Воронков Андрей Владиславович

Пятигорск – 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Взаимосвязь ЭД и активности протеинкиназы С на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов .....	12
1.1.1 Взаимосвязь тонуса сосудов мозга и активности ПКС на фоне НППГ .....	18
1.1.2 Взаимосвязь процессов тромбообразования и активности ПКС при ЭД, вызванной НППГ .....	21
1.1.3. Взаимосвязь воспалительных процессов и активности ПКС при ЭД, вызванной НППГ .....	23
1.1.4 Взаимосвязь пролиферативных процессов и активности ПКС при ЭД, вызванной НППГ .....	24
1.1.5 Взаимосвязь изоферментов ПКС в повреждении тканей головного мозга .....	27
1.2 Способы фармакологической коррекции ЭД, вызванной НППГ .....	28
1.3 Клинические аспекты использования экспериментальных препаратов, обладающих ингибирующим влиянием на активность ПКС.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1 Моделирование эндотелиальной дисфункции .....	36
2.2 Изучение сосудистой реакции у животных с НППГ при введении эндотелиоспецифичных анализаторов .....	37
2.3 Скрининговые методики.....	38
2.4 Изучение эндотелиопротекторных свойств соединения-лидера.....	40
2.5 Методы статистической обработки результатов эксперимента.....	44
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ВАЗОДИЛАТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ НА ФОНЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭНДОТЕЛИОСПЕЦИФИЧНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ.....	45
ГЛАВА 4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ 2- СТИРИЛПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИН-4(1Н)-ОНА.....	50
4.1 Фармакологический скрининг новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1Н)-	

она с наиболее выраженным влиянием на вазодилатирующую функцию эндотелия в условиях экспериментально вызванной НППГ .....	50
4.2 Фармакологический скрининг новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она по влиянию на антиагрегационную функцию в условиях экспериментально вызванной НППГ .....	52
4.4 Заключение.....	54
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА PMS4OH НА ВАЗОДИЛАТИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ .....	56
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА, PMS4OH, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНЫМ ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА, НА АНТИТРОМБОТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ .....	65
6.1. Оценка влияния соединения-лидера PMS4OH на скорость образования тромба при воздействии на поверхность сонной артерии 50% раствором хлорида железа (III), при экспериментальной НППГ .....	65
6.2. Оценка влияния соединения-лидера PMS4OH на агрегационную активность тромбоцитов при введении различных индукторов агрегации, на фоне экспериментальной НППГ .....	67
6.3. Оценка влияния соединения PMS4OH на активность фактора фон Виллебранда, при экспериментально вызванной НППГ .....	70
6.4 Оценка влияния соединения PMS4OH на процессы вторичного коагуляционного гемостаза при экспериментально вызванной НППГ .....	71
6.5 Оценка влияния соединения PMS4OH на активность противосвертывающей системы путем измерения уровня антитромбина III при экспериментально вызванной НППГ .....	73
6.6 Заключение.....	74
ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ PMS4OH НА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ,	

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУЮ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТКАНИ МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ .....	76
7.1. Оценка влияния соединения PMS-4ОН на уровень лейкоцитов в условиях ЭД, вызванной экспериментальной НППГ .....	76
7.2 Оценка влияния соединения-лидера PMS4ОН на уровень С-реактивного белка при экспериментальной НППГ .....	77
7.3 Изучение влияния соединения PMS4ОН на структуры тканей головного мозга крыс на фоне экспериментально вызванной НППГ .....	78
7.4 Заключение.....	87
ГЛАВА 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ PMS4ОН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НППГ .....	89
8.1 Прогноз биологической активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она с помощью программ молекулярной динамики .....	89
8.2 Проведение ИГХ-анализа срезов головного мозга крыс для выявления иммунопозитивных клеток к ПКС и eNOS на фоне экспериментальной терапии PMS4ОН при ЭД, взванной НППГ .....	92
8.3 Проведение ИФА различных маркеров с целью определения потенциальных механизмов действия PMS4ОН при ЭД, вызванной НППГ .....	99
8. 4 Заключение.....	103
ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	104
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	119
Список сокращений.....	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	122

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность**

По данным всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания являются доминирующей патологией в большинстве стран мира и основной причиной преждевременной смертности, инвалидизации и снижения качества жизни населения. На сегодняшний день установлено, что практически все сердечно-сосудистые, эндокринные, аутоиммунные и др. заболевания сопряжены с эндотелиальной дисфункцией (ЭД) [1,2,3,4], которая является неблагоприятным ранним патофизиологическим признаком и независимым предиктором развития сердечно-сосудистых осложнений. Таким образом, эндотелий можно рассматривать как индивидуальную мишень для фармакологического воздействия.

В регуляции функций характерных для эндотелиальных клеток участвует, в основном, эндогенный оксид азота (NO), вырабатываемый эндотелиальной системой синтеза оксида азота – NO-синтазой (eNOS), активность которой зависит от уровня эстрогеновых половых гормонов [5,6,7,8].

Важно отметить, что угасание или прекращение деятельности половых желез у женщин и снижение гормонов приводит не только к уменьшению синтеза оксида азота, но и к росту уровня липопротеинов низкой плотности, свободно-перекисному окислению, инсулинорезистентности, увеличению свертываемости крови и все это может являться самостоятельными пусковыми механизмами развития ЭД и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [9].

Исходя из вышесказанного, изучение влияния недостаточности эстрогеновых половых гормонов (НПГ) и механизм их взаимодействия с сосудистым эндотелием представляет актуальную задачу современной науки, позволяющей оценить не только физиологические и патофизиологические особенности эндотелия, но и определить направление поиска соединений для фармакологической коррекции ЭД и ассоциированных с ней ССЗ, в том числе не связанных с недостаточностью половых гормонов.

Изучая вопрос поиска веществ для нормализации нарушенных функций эндотелия, интересно отметить большую роль протеинкиназы С (ПКС) в регуляции активности eNOS [8,10,11,12]. Осуществляя перенос фосфатной группы от нуклеозид-трифосфата на остатки таких аминокислот, как серин, треонин и тирозин протеинкиназы являются частью путей передачи внутриклеточной информации, а изменение активности протеинкиназ нарушает эти процессы, которые ассоциированы с развитием большого числа болезней, включающих и ССЗ [11]. Таким образом, воздействие на этот тип ферментов может представлять большой научно-практический интерес.

Исследуемые вещества, представляющие собой 2-стирилзамещенные производные 4-оксопиримидина, синтезированные на кафедре органической химии ПМФИ филиала ВолгГМУ, по результатам прогноза с помощью программ молекулярной динамики, показали различную тропность к активным центрам ПКС. Кроме того, предварительные прогнозы и исследование родственных соединений показали различные виды активности 4-оксопиримидинов, в том числе, мембраностабилизирующей, противовоспалительной и т.д. Исходя из вышеизложенного, изучение эндотелиопротекторных свойств исследуемых производных пиримидина, обладающих влиянием на активность ПКС, на фоне экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов представляет собой актуальную проблему как общебиологического и фармакологического характера с одной стороны, так и компьютерного программирования с другой.

### **Степень разработанности проблемы**

Коррекция ЭД, которая является важным патофизиологическим звеном и неблагоприятным фактором множества эндокринных, аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваний, является важным, перспективным и новым фармакологическим направлением[1,2,3,4]. Особенно актуально это для постовариэктомических и климактерических состояний, которые характеризуются недостаточностью половых гормонов, приводящей к значительному системному ухудшению работы эндотелия, являющегося по современным представлениям не просто барьерным слоем клеток, а самой крупной паракринной железой в

организме[5,6,7,8]. Также рост ЛПНП, усиление СПОЛ, инсулинорезистентности и тромбообразования в условиях НПГ могут дополнительно ухудшать функции эндотелия и прогноз сопутствующих ССЗ [9].

Но, несмотря на актуальную вышеуказанную роль эндотелия, класса препаратов с основным, доказанным эндотелиопротекторным действием нет. Вместе с тем длительный прием эстрогенов в качестве заместительной терапии может приводить к провоспалительным, протромбогенным, гипертензивным эффектам и доброкачественным изменениям в гормонозависимых органах, что нивелирует их эндотелиопротекторный эффект и значительно ограничивает применение [9].

Таким образом, поиск новых соединений, обладающих специфическим эндотелиопротекторным действием, позволяющим скорректировать нарушенные функции эндотелия при НПГ и сопутствующих ССЗ, представляет собой актуальное фармакологическое направление современной медицинской науке.

Одной из потенциальных терапевтических мишеней при ЭД, вызванной НПГ, может быть протеинкиназа С, значительное повышение которой наблюдается при развитии большего количества ССЗ, в том числе, ассоциированных с НПГ, а препаратов, с доказанным влиянием на активность ПКС в настоящее время нет[8,10,11,12].

### **Цель:**

Изучение эндотелиопротекторных свойств среди соединений 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина, и выявление возможных механизмов их реализации, связанных, в том числе, с влиянием на активность ПКС в условиях ЭД, вызванной НПГ.

### **Задачи:**

1) Провести оценку вазодилатирующей функции эндотелия и изменений АД в норме и патологии при введении эндотелиоспецифичных анализаторов, на фоне экспериментальной НПГ;

2) Провести скрининг с помощью программ молекулярного конструирования и фармакологический скрининг среди исследуемых соединений

для выявления соединения-лидера, обладающего наиболее выраженными эндотелиотропными свойствами и ингибирующим влиянием на активность ПКС;

3) Изучить влияние соединения-лидера на вазодилатирующую и антитромботическую функции сосудистого эндотелия в разные периоды развития ЭД, на фоне экспериментальной НПГ;

4) Изучить влияние соединения-лидера на противовоспалительную, антипролиферативную функции эндотелия и на морфологическое состояние клеток эндотелия и головного мозга крысы при экспериментально вызванной НПГ;

5) Провести изучение потенциального механизма эндотелиопротекторного действия соединения-лидера, в том числе связанного с изменением активности ПКС при экспериментально вызванной НПГ

#### **Новизна исследования:**

Впервые показаны различные варианты изменения вазодилатирующей функции эндотелия при введении эндотелиоспецифичных анализаторов в связи с разной направленностью сосудистого ответа на введенные анализаторы: ацетилхолина, L-NAME и АХ на фоне действия L-NAME.

Впервые выявлены эндотелиотропные свойства среди 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина с использованием комплексных скрининговых методик, включающих методы молекулярной динамики и фармакологические подходы по влиянию на вазодилатирующую и антиагрегационную функции эндотелия, по результатам которых было выбрано соединение-лидер PMS4ОН.

Впервые изучено позитивное влияние 2-стирилзамещенного производного 4-оксопиримидина PMS4ОН на вазодилатирующую (выраженную в улучшении реакции на ацетилхолин, L-аргинин, L-NAME), антитромботическую (выраженную в увеличении времени тромбообразования, снижении агрегационных и коагуляционных показателей), противовоспалительную и антипролиферативную функции эндотелия, на структурное состояние ЭК и клеток головного мозга крысы (выраженные в снижении уровня С-реактивного белка, матриксной металлопротеиназы-1 и морфологически выявленных нарушений) при экспериментальной НПГ;

Впервые изучены потенциальные механизмы реализации эндотелиопротекторного действия 2-стирилзамещенного производного 4-оксопиримидина PMS4OH (который приводил к увеличению уровня eNOS и уменьшению количества ADMA), в том числе включающих изучение активности ПКС (приводящего к снижению уровня ПКС, подтвержденного ИГХ и ИФА методами), на фоне экспериментальной НПГ.

#### **Научно-практическая ценность работы:**

Полученные данные об эндотелиопротекторных свойствах 2-стирилзамещенного производного 4-оксопиримидина соединения-лидера PMS4OH, выраженных в улучшении реакции сосудов на введение специфических анализаторов, уменьшении тромбогенного потенциала и нормализации воспалительно-пролиферативных и морфологических изменений эндотелиоцитов и тканей мозга, что позволяет рекомендовать для углубленного изучения с целью получения на их основе средств с целью коррекции нарушенных функций эндотелия, улучшения мозгового кровообращения, улучшения тромбогенного потенциала больным, с развитой НПГ (постовариэктомические и климактерические состояния) и сопутствующими ССЗ.

Полученные данные о возможных механизмах действия исследуемых веществ, включающих изменения активности ПКС, eNOS и уровня ADMA позволяют расширить представления о патофизиологии развития ЭД и выявить инновационные стратегические подходы для лечения ССЗ, в том числе ассоциированных с НПГ.

Методики для проведения молекулярного прогноза, подтвержденные фармакологически можно использовать для дальнейшего поиска веществ, обладающих более выраженными эндотелиопротекторными свойствами и расширить возможности целенаправленного синтеза более фармакологически активных соединений.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1) НПГ может приводить к различным вариантам изменения вазодилатирующей функции при введении эндотелиоспецифических анализаторов;

2) Среди 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина веществом с наиболее выраженным эндотелиотропным действием и ингибирующим влиянием на активность ПКС обладает соединение PMS4OH;

3) Соединение PMS4OH обладает выраженными эндотелипротекторными свойствами, которые проявляются в улучшении вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия в разные периоды развития ЭД, вызванные НПГ;

4) Соединение PMS4OH обладает выраженными эндотелипротекторными свойствами, которые проявляются в улучшении противовоспалительной, антипролиферативной функции эндотелия и нормализации морфологического состояния клеток эндотелия и головного мозга крыс;

5) Одним из возможных звеньев механизма реализации эндотелиопротекторного эффекта PMS4OH при экспериментальной НПГ может быть снижение активности ПКС.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на 72 научно-практической конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Пятигорск, 2014), на 73 научно-практической конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2015), на конференции «Человек и лекарство» (Москва, 2016), на научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству» (Пятигорск, 2017).

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 5 из них в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

### **Объем и структура**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 6 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка используемой литературы, включающего 182 источников, из них 39 отечественных и 143 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, содержит таблиц –19, рисунков –19.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

**Взаимосвязь ЭД и активности протеинкиназы С на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов и способы фармакологической коррекции нарушенных функций эндотелия.**

Согласно современным данным основа ССЗ и других заболеваний лежит в нарушении свойств и функций эндотелия [1,2,3,4], который участвует во множестве физиологических и патологических процессов [4,7,8,13,14].

В настоящее время под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное выполнение всех эндотелийзависимых функций [7,14,15,16] и разные механизмы [6,7,10,14,17], приводящие к смещению функции эндотелиоцитов в сторону вазоконстрикции, повышения свертывания крови, воспаления и пролиферации [9,10,14,18,19].

Универсальным модулятором основных функций эндотелия является оксид азота, биологическая активность которого [20,21] зависит от места его образования и от ферментов его синтезирующих [22,23]. На сегодняшний день выделяют конститутивные изоформы, которые постоянно продуцируют относительно небольшое количество оксида азота, их активность зависит от уровня кальция в клетке. В зависимости от тканей, в которых находятся конститутивные изоформы NO-синтаз, выделяют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS, которая отвечает за специфическую эндотелиопротекторную функцию) и нейрональную NOS (nNOS - нейроны коры больших полушарий (2%), в глутаматергических зернистых клетках, ГАМК-ергических корзинчатых клетках мозжечка, полосатом теле) [24]. Третья изоформа называется индуцибельной (iNOS), которая широко распространена в макрофагах, астроцитах и др. микроглиальных клетках, ее активность не зависит от уровня кальция в цитоплазме. Как только активируется индуцибельная синтаза, образуется большое количество оксида азота, который может обладать повреждающим действием [25]. Роль nNOS не совсем однозначна, но установлено, что активация nNOS также нежелательна, так как приводит к образованию

пероксинитрита и индукции глутаматопосредованной эксайтотоксичности, причем введение эстрогенов может уменьшить такого рода изменения [26,27,28,29,30,31,32].

Основные функции эндотелия связывают именно с активностью eNOS и синтезируемым ею оксидом азота. Функционирование eNOS заключается в синтезе оксида азота путем превращения субстрата L-аргинина в L- цитруллин. При этом происходит перенос электронов с редуктазного домена от НАДФН, ФАД, ФМН, затем при присоединении кальция и активации кальмодулина на оксигеназный домен, включающий в себя гем, сайт для L-аргинина и тетрагидробиоптерин. Также для протекания реакции необходимы ионы цинка. В результате гем может связывать кислород O<sub>2</sub> и участвовать в катализе реакции синтеза NO из L-аргинина [11]. Нарушение функционирования системы eNOS лежит в основе ЭД при ССЗ, в связи с чем, регулирование активности этого фермента может быть перспективной точкой приложения фармакологических средств [10,11].

Регулирование активности eNOS может проходить в нескольких направлениях: экспрессия гена синтазы, расположение фермента в цитозоле (взаимодействие с кавеолами, миристилирование и пальмитирование [33]), влияние на рецепторный механизм активации синтазы (рецепторы для АХ, брадикинина, серотонина, гистамина, эстрогеновых стероидных гормонов, простаглицина и т. д.[10,34]), конкурирование за субстратный центр фермента (L-NAME, ADMA, и т. д. [35,36]), фосфорилирование и дефосфорилирование аминокислот eNOS с помощью протеинкиназ (c-Src, PI3K (или Erk-киназа MAPK-семейства), PKB (или Akt-киназа), PKA, PKC), влияние на кальциевые и калиевые ионные каналы и т.д. [10,37].

### ***1.1 Взаимосвязь ЭД и активности протеинкиназы С на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов***

Впервые положительные эффекты эстрогенов на ССС были выявлены в связи с низкой заболеваемостью ИБС женщинами, по сравнению с мужчинами в доклимактерическом периоде и выравнивание частоты заболевания у обоих полов в постклимактерическом [38].

Обнаружено, что эстрогены могут оказывать как быстрые эффекты на эндотелий негеномным механизмом через мембранные рецепторы, так и

отсроченные геномные эффекты посредством взаимодействия с ядерными рецепторами [39]. Негеномный механизм реализуется через эстрогеновые рецепторы ER $\alpha$  и ER $\beta$ , находящиеся в мембране эндотелиальных клеток [40]. Причем, наиболее важную роль в эндотелиальных клетках (ЭК) играет изоформа рецептора ER $\alpha$  – ER46, которая обуславливает быструю активацию eNOS и выброс NO эстрогенами [41]. На сегодняшний день обнаружены также мембранные эстрогеновые рецепторы неклассической структуры – GPR30, которые также могут участвовать в регуляции функций эндотелия [42].

Также доказано, что эстрогеновые гормоны способствуют более стабильному конформационному расположению мультифункционального комплекса в мембранах кавеол эндотелия [5,43]. Этот комплекс включает в себя: рецептор ER46, белок кавеолин-1, G-белок, eNOS и такие киназные системы, как Src, PI3K, Akt и Erk/MAPK. При этом белок CSrc подвергается миристилированию, ER-46 – пальмитилированию и связыванию с кавеолином-1. Следует сказать, что для быстрого выброса NO eNOS–системой необходима последовательная активация следующих киназных систем: c-Src, PI3K (или Erk-киназа MAPK-семейства), Akt [5].

Учитывая, что eNOS система состоит из ферментов и структур, которые выполняют перенос электронов с редуктазного домена eNOS (включающего НАДФН+, ФАД, ФМН, кальмодулин) на оксигеназный домен (который включает тетрагидроптерин (H4B) и гем, имеющий сайт для связывания L -аргинина) [10,44] интересным становится тот факт, что эстрогены стимулируют образование NO, но при этом ингибируют активность НАДФН-оксидазы, тем самым ограничивая производство супероксидного радикала и пероксинитрита eNOS-системой [45].

Кроме прямого влияния на функционирование eNOS-системы, эстрогены могут оказывать следующие эффекты, положительно влияющие на эндотелиальные функции (ЭФ):

1. Уменьшают количество ангиотензиновых рецепторов, блокируют кальциевые каналы [46];

2. Уменьшают количество метилированных аминокислот, таких как ADMA (асимметрический диметиларгинин), которые конкурируют с L-аргиномом за субстратный центр eNOS-системы и уменьшают выработку NO [9,47]. Возможно, эстрогены стимулируют активность DDAH (диметиларгининаминогидролаза), которая может расщеплять ADMA [48];

3. Улучшают митохондриальную функцию, уменьшают продукцию свободных радикалов и тем самым могут выполнять антигипоксикантную и антиоксидантную функции в условиях НППГ [49];

4. Стимулируют образование ЦОГ-2, вследствие чего повышаются уровни простаглицина и простаглицина E2 в ЭК [50];

5. Усиливают эндотелийзависимую вазодилатацию посредством увеличения выработки эндотелиального гиперполяризирующего фактора (ЭГПФ) преимущественно в сосудах репродуктивных органов [51].

Но, несмотря на выше перечисленные эффекты, использование эстрогенов при ЭД, вызванной овариоэктомией или наступлением климактерического периода, а также ЭД ассоциированной с другими ССЗ, может вызывать провоспалительное, протромботическое и гипертензивное действие, что может нивелировать их положительные эффекты. Кроме того, они могут вызывать доброкачественные изменения в эстрогензависимых органах (матка, молочные железы и т.д.), что также ограничивает их применение [9]. Таким образом, актуально продолжать поиск веществ, обладающих эндотелиопротекторными свойствами, а эстрогены и/или недостаточность их эффектов можно использовать в качестве модели ЭД, в которой, как показано выше, различными путями могут нарушаться функции ЭК.

Перспективным направлением в поиске терапевтических мишеней для коррекции ЭД и ассоциированных с ней ССЗ стало влияние на ПКС и семейство ее изоферментов [12,52,53], которые могут регулировать активность eNOS и путем фосфорилирования аминокислоты треонина Thr-495 и дефосфорилирования аминокислоты серина Ser-1177 приводить к снижению выработки оксида азота eNOS системой [10,11]. Кроме того, ПКС может фосфорилировать другие белки, регулирующие функции эндотелия (ацетилхолинэстеразу, брадикиновые рецепторы

и т.д.). Также установлено, что активация протеинкиназы С снижает активность САТ-1 – белка системы переноса катионных аминокислот в клетку, в том числе L-аргинина [10,35,36]. Открыта ПКС была в 1982 году. Её важная роль установлена при таких заболеваниях как раковые, СД, ИБС, сердечная недостаточность, аутоиммунные, псориаз, болезнь Паркинсона и Альцгеймера и т.д., но препаратов, избирательно влияющих на активность этого фермента, в клинической практике пока нет [12].

Для определения механизма действия и классификации изоферментов ПКС, ее взаимосвязи с ЭД, целесообразно рассмотреть структурные элементы фермента. Как и во многих других протеинкиназах (ПК), ПКС имеет регуляторный и каталитический терминалы, или домены. ПКС состоит из четырех постоянных (консервативных) доменов (С1-С4) и 5 переменных (вариабельных) доменов (v1-v5). Наибольшее различие между ПКС наблюдается в структуре их конститивных доменов[54,55].

Регуляторный участок ПКС состоит из аутоингибирующего домена (псевдосубстрата) и двух мембраносвязывающих доменов (С1 и С2). Домен С1 связывается с диацилглицеролом. Домен С2 содержит множество аминокислот с кислотными боковыми цепями, координационно связывающими  $Ca^{2+}$ . Подобный набор аминокислот отсутствует у новых ПКС. Каталитический участок состоит из двух доменов (С3 и С4). Домен С3 связывает АТФ, а домен С4 ответственен за связывания с белковым субстратом [56]. Разделяет каталитический и регуляторный домены область V3, которая представляет собой шарнирный полипептид. При активации РКС домен С2 освобождает каталитический домен V5, после чего активный центр фермента становится доступным для субстрата. Учитывая вышеописанные механизмы активации и ингибирования РКС, домен V5 является перспективной мишенью для действия модуляторов активности протеинкиназы-С [10,44].

Классифицируют изоферменты ПКС, в зависимости от структурных особенностей последних. Классификация различных ПКС, в соответствии с их регуляторным доменом, следующая [54,57]:

- 1) Обычные (типичные) ПКС: С1 домен имеющий кальций-зависимый сайт

связывания с ДАГ (или форболовым эфиром), и С2-область – акцептирует кальций и фосфолипиды:  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  и  $\gamma$

2) Новые ПКС: чувствительны к ДАГ, но С2 сайт не восприимчив к кальцию:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  и  $\theta$

3) Атипичные ПКС – нечувствительны к ионам кальция и ДАГ, но активируются при связывании с фосфатидилсерином, церамидами и форболовым эфиром:  $\xi$ ,  $\iota$  и  $\lambda$ .

Молекулы, которые представляют собой агонисты рецепторов, связанных с G-белками, приводят к активации разных биологических элементов, в том числе и к активации фосфолипазы С. Этот фермент расщепляет структурный компонент мембраны – фосфатидил-4,5-дифосфат с образованием следующих компонентов: диацилглицерол (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3, IP3). ИФ3 мобилизует кальций из ретикулума. Кальций приводит к взаимодействию ПКС с фосфолипидами, что способствует перемещению фермента к мембране, где он связывается с ДАГ для полной активации. Также ПКС может быть связана с мембранам органоидов внутри клетки, взаимодействуя с анионными фосфолипидами – фосфатидилсерином и фосфатидилхолином без предварительной активации. Высокие уровни кальция могут привести к активации фосфолипазы С без внешнего специфического сигнала [54].

Важно отметить, что все структурные области фермента могут быть мишенью для терапевтического модулирования. Исследование и поиск активных соединений изначально были ориентированы на каталитический (идентичен у многих изоформ ПКС, а также ПК, например, киназа легких цепей миозина [54]) и с1 домен, связывающий ДАГ и форболовый эфир. Но наиболее низкой гомологичностью между изоферментами обладает С2-домен и промежуточный V-домен [53].

После, того как произвели клонирование изоферментов ПКС [12], было установлено, что они экспрессируются во всех тканях и на разных этапах развития. В то же время при патологических состояниях они приобретают уникальные и противоположные свойства [58,59]. Эндотелиальные клетки сосудов содержат

различные изоформы ПКС:  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  и практически не содержат  $\gamma$  [13]. Но очень важно отметить, что экспрессия изоферментов ПКС в сосудах у мужчин и женщин различна, и, вероятно, это связано с эффектами эстрогеновых стероидных гормонов [60].

Интересно отметить, что в исследовании [60] введение активатора ПКС – форболового эфира приводило к повышению активности этого фермента в большей степени у крыс самцов, по сравнению с самками. Также введение ингибиторов ПКС (стауроспорина и кальфостина С) приводило к уменьшению активности этого фермента, что опять же было более выражено у самцов. Кроме того, оказалось, что у самцов уровни ПКС- $\alpha$  и ПКС- $\delta$  выше, чем у самок, и ответ на введение форболового эфира был более выражен также у самцов. ПКС- $\xi$  более выражена у самок, и в большей степени участвует в процессах пролиферации, нежели в регуляции сосудистого тонуса.

Важным является тот факт, что активность ПКС у интактных крыс-самцов и кастрированных была практически одинакова, в то время как у самок, подвергшихся овариэктомии, активность ПКС значительно выше, по сравнению с интактными самками. Кроме того, введение эстрогенов самкам с НПГ привело к уменьшению активности ПКС, а половых гормонов самцам - значительных изменений не вызывало. Также половые различия в активности ПКС могут усиливаться при ЭД (спонтанная гипертензия) и/или извращаться (ЭД при беременности, ЭД, вызванная гипергликемией [6]). Исходя из этого, можно сказать, что активность ПКС может зависеть как от уровня эстрогенов, так и от рецепторов для эстрогенов, которых в сосудах самок гораздо больше [60].

Резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что эстрогены – важный фактор регуляции функций эндотелия и их недостаток может привести к ЭД, скорректировать которую возможно путем модулирования активности ПКС. Необходимо отметить, что эстрогены не только могут вызывать ЭД, но и прямо влиять на активность ПКС. Таким образом, большой научный интерес представляет изучение взаимосвязи основных функций эндотелия с активностью ПКС на фоне экспериментально вызванной НПГ.

### ***1.1.1 Взаимосвязь тонуса сосудов мозга и активности ПКС на фоне НПГ***

Как уже говорилось выше, уменьшение эстрогеновых влияний *in vitro* и *in vivo* может привести к серьезным нарушениям в работе ССС и ЭД [7,61,62], в том числе к повышенному риску возникновения мозгового инсульта. Введение эстрогенов крысам после овариоэктомии приводило к улучшению мозгового кровотока, как при фокальной ишемии, так и при глобальной путем повышения экспрессии eNOS и синтеза оксида азота эндотелием церебральных сосудов [8].

Влияние эстрогенов на тонус сосудов изучали путем введения ацетилхолина (повышающего образование оксида азота ЭК рецепторным механизмом), который отражал т.н. эндотелийзависимую вазодилатацию мозговых сосудов (ЭЗВД), и введения нитропрусида натрия (донатора оксида азота), показывающего эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД). Интересно отметить, что введение натрия нитропрусида интактным животным и животным с НПГ, которым проводили фармакотерапию эстрогенами, значимых изменений в сосудистом ответе не наблюдалось. Кроме того, применение папаверина этим группам также к достоверным изменениям в вазодилатации не привело, и это указывает на то, что эстрогены и НПГ практически не влияют на эндотелий-независимый миогенный ответ сосудов мозга [8].

АХ-индуцированная вазодилатация была более выражена у интактных животных и крыс с НПГ, которым вводили эстрогены (17- $\beta$ -эстрадиол), что приводило к увеличению оксида азота и цГМФ в мозговых артериях. К тому же, Pelligrino и др. [63] показали значительно сниженный ответ пиальных артерий на введение АХ, опосредованный оксидом азота. Некоторые исследования указывают, что в АХ-вызванной дилатации мозговых сосудов принимает участие не только оксид азота, но и эндотелиальный гиперполяризирующий фактор (ЭГПФ), а простациклин и другие простагландины выраженного вклада в расширение сосудов мозга не приносят. Более выраженный вклад оксида азота в ответ сосудов на АХ подчеркивают исследования с применением конкурентного ингибитора eNOS – L-NAME. Его введение снижает реакцию на АХ, причем это ярче проявляется у

животных с НПП, а использование L-аргинина уменьшало влияние L-NAME на АХ-индуцированную релаксацию мозговых сосудов [7,8].

В синтезе оксида азота может участвовать не только eNOS, но и iNOS, токсичность которого обусловлена продукцией дисульфидов цистеина и глутатиона [64], формированием нитрозотиолов, или нитрозилированием белков [65], образованием свободнорадикальных продуктов: в комбинации с супероксидными радикалами NO образует токсический пероксинитрит, способствующий повреждению клеточных мембран, липидов, белка, ДНК и в целом клеток и ведущий к нейродегенеративным повреждениям [23] и может вызывать апоптоз [66,67]. Использование специфического ингибитора iNOS – аугментина показало, что у крыс, подвергшихся овариэктомии большую роль в синтезе оксида азота играет индуцибельная синтаза, нежели эндотелиальная, увеличиваются уровни супероксидного радикала и уменьшается количество NO за счет образования пероксинитрита. Введение эстрогенов этим животным приводило к повышению активности eNOS, увеличению концентрации оксида азота, уменьшению экспрессии iNOS и свободных радикалов. Причем в здоровой сосудистой ткани iNOS тяжело обнаружить [7,68].

О значительном влиянии оксидативного стресса в повреждении эндотелия и роли ПКС говорят многие исследования [17,69], в том числе выполненные на модели эндотелиальной дисфункции, вызванной активатором ПКС – форболовым эфиром (ФМА, или англ. PMA – 4-форбол-12-миристан-13-ацетат). Активные формы кислорода (АФК), в частности супероксидный радикал, активирует ПКС различными механизмами (прямое воздействие на регуляторные домены, активация фосфолипаз, фосфорилирование ПКС по остаткам тирозина). Кроме того, повышенная активность ПКС может приводить к увеличению образования свободных радикалов, формируя тем самым «порочный круг активации ПКС» [17].

Рассмотрев активность ПКС в ЭК при ЭД, вызванной НПП, необходимо отметить ее исключительную роль в гладкомышечных клетках (ГМК) сосудов головного мозга. В миоцитах гладких мышц основная роль ПКС состоит в повышении чувствительности микрофиламентов к ионам кальция, что приводит к

вазоконстрикции [70]. Кроме того, ПКС фосфорилирует потенциал-зависимые кальциевые каналы, ингибируют калиевые, связывает многие другие внутриклеточные сигнальные пути включающие киназу легких цепей миозина, систему оксида азота, систему внутриклеточного кальциевого депо, тирозинкиназу и ее субстраты, такие как митогенактивируемая протеинкиназа (МАПК) и т. д. Таким образом ПКС имеет мультифакторный спектр влияния на многие процессы, в том числе приводящие к церебральному вазоспазму [71,72].

Спазм сосудов может быть вызван дисбалансом между факторами релаксации (простациклин и др. эйкозаноиды, оксид азота) и констрикции (эндотелин (действует через ПКС, а ПКС регулирует выработку эндотелина)) [54,72,73,74]. Оксид азота – основной фактор релаксации - увеличивает цГМФ в цитозоле, который приводит к расслаблению сосудов и противостоит сократительным агентам, в том числе эндотелину [75]. Системы оксида азота – цГМФ и ПКС имеют место быть в патогенезе церебрального вазоспазма, и считается, что система оксид азота – цГМФ выполняет отрицательную обратную связь, т. е. уменьшает вазоконстрикцию, вызванную сократительными факторами, в том числе, вызванную активностью ПКС. Исследования показали, что если развился спазм сосудов головного мозга, то донаторы оксида азота не в состоянии возратить тонус сосудов в физиологическое состояние. Вазоспазм, вызванный с помощью активатора ПКС – форболового эфира не регулировался цАМФ, при этом донаторы оксида азота не приводили к активации NO-гуанилатциклаза-цГМФ-ПКГ, тогда как аналог цГМФ приводил к ослаблению тонуса сосудов [54].

Исходя из литературных данных, представленных выше, ЭД, вызванная НПГ, путем уменьшения образования оксида азота, повышения уровней пероксинитрита и супероксидного радикала, повышения активности ПКС приводит к снижению, в основном, ЭЗВД. Но интересным является тот факт, что по некоторым данным [76] недостаточность эстрогеновых эффектов снижает кардиопротективный эффект при ишемическом прекондиционировании путем снижения активности ПКС-ε.

Таким образом поиск веществ, обладающих ингибирующим влиянием на ПКС ( $\alpha$  и  $\delta$ , экспрессия которых на фоне НПГ в сосудах мозга выше) является

терапевтически более перспективным, причем активность ПКС эпсилон, возможно, имеет смысл повышать при ЭД, вызванной в том числе и НПГ.

### ***1.1.2 Взаимосвязь процессов тромбообразования и активности ПКС при ЭД, вызванной НПГ***

ЭД сопряжена с повышением тромбогенного потенциала, связанного с увеличением выделения эндотелием проагрегантов и прокоагулянтов (ТхА2, фактора Виллебранда [14]). Влияние эстрогенов на процесс тромбообразования у крыс с ЭД, вызванной НПГ, неоднозначно.

Согласно литературным данным, эстрогены, влияя как на функцию ЭК так и тромбоцитов, повышают образование оксида азота, простациклина, уменьшают выработку эндотелина-1, стимулируют процессы фибринолиза, что приводит к снижению тромбообразования в артериях и венах [7,77]. Наряду с этим у овариэктомизированных крыс введение эстрогенов может приводить к повышению риска тромбоза и, следовательно, к серьезным осложнениям ССЗ, что может быть связано с повышением синтеза ТхА2, факторов свертывания II, IX, X, XII, XIII, уменьшением антикоагуляционных факторов – протеина С, антитромбина [78,79]. В целом, НПГ приводит к повышению тромбогенного потенциала [80], и его снижение с помощью эстрогенов может привести к опасным последствиям, поэтому целесообразно рассмотреть другие возможные механизмы нормализации тромботической функции эндотелия в условиях ЭД.

Как было указано выше, ПКС путем прямого или косвенного влияния на eNOS, посредством увлечения свободно-радикального окисления и выделения эндотелина может приводить к ЭД, и тем самым ухудшать антитромботическую функцию ЭК. Кроме того исследования показывают, что процессы фосфорилирования ПКС в тромбоцитах играют двойную роль в тромбообразовании [80,81].

Установлено, что в тромбоцитах человека и мыши изоформы ПКС увеличивают агрегационные свойства тромбоцитов (секреция гранул и интегрин  $\alpha\text{IIb } \beta 3$ ) [80] и уменьшают коагуляционные (уменьшение активности сигнального пути GP VI – кальций-зависимое выделение фосфатидилсерина и активация тромбина) [80,81].

Большой интерес представляют собой результаты исследований, выполненные [80] по изучению более детальной роли изоферментов ПКС в тромбообразовании. Важно отметить, что типичные изоформы ПКС  $\alpha$  и ПКС  $\beta$  оказывают положительное влияние на образование тромба. Отсутствие этих изоформ приводит к заметному подавлению секреции гранул, образования агрегатов, кальциевой сигнализации и уровня фосфатидилсерина. В противоположность этому отсутствие новых изоформ ПКС- $\theta$  и - $\delta$  способствует усилению коллаген-индуцированного тромбообразования, хотя ингибирование ПКС- $\delta$  не приводило к повышению секреции гранул, образования агрегатов, кальциевой сигнализации и уровня фосфатидилсерина. Следовательно, можно сказать, что обычные ПКС- $\alpha$  и - $\beta$  содействуют, а новые ПКС уменьшают процесс образования тромба с помощью различных механизмов.

ПКС- $\alpha$  и - $\beta$ , как типичные изоферменты, в соответствии с [81] усиливают GPVI-опосредованные процессы агрегации (секреция электроноплотных и  $\alpha$  гранул, экспрессия интегрин  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3) и очень незначительно GPVI-опосредованные процессы коагуляции. Вероятно, ПКС- $\alpha$  преимущественно влияет на секрецию гранул и на стимулирование GPVI-сигнального пути, а ПКС- $\beta$  – на фосфорилирование интегрин  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 [80,81].

Из атипичных ПКС в тромбоцитах больше всех выражена ПКС  $\theta$ , по сравнению с ПКС- $\delta$  и  $\epsilon$  [82,83]. ПКС- $\theta$  уменьшает в физиологических условиях GPVI-индуцированную секрецию гранул и агрегацию тромбоцитов. Мало того, ПКС- $\theta$  уменьшает кальций – зависимое выделение ФС и прокоагуляционную активность, которая также запускается гликопротеином GPVI. Механизм действия этой изоформы не совсем ясен, но есть данные о возможном фосфорилировании фосфолипазы C и уменьшении кальция путем его усиленного выведения с помощью кальциевой-АТФазы [80].

В итоге стимулирующая роль ПКС на процесс тромбообразования является преобладающей [80]. Таким образом, учитывая преобладающую роль ПКС- $\alpha$  и - $\beta$  в процессах агрегации и коагуляции, ингибирование активности этих типичных изоферментов можно использовать для коррекции ЭД, вызванной в том числе и НПГ. Кроме того, согласно [12] абсолютное выключение этой протеинкиназы

(нокаут) не приводит к кровотечениям, что является преимуществом перед др. ЛП, действующими на свертываемость крови.

### ***1.1.3. Взаимосвязь воспалительных процессов и активности ПКС при ЭД, вызванной НПГ***

Изменение функционирования ЭК – центральное звено процессов воспаления. ЭД, вызванная НПГ, может приводить к усилению воспалительных процессов, выраженных в увеличении концентрации СРБ, уменьшении экспрессии eNOS, увеличении уровня провоспалительных цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , повышении экспрессии iNOS и продуцируемых ею АФК, а введение эстрогенов уменьшало выраженность этих изменений [7,77,84,85,86]. Также большую роль играют эстрогеновые рецепторы, которые могут регулировать сигнальные пути Toll-подобных рецепторов, уменьшать экспрессию молекул адгезии, индуцированную цитокинами. Кроме того, противовоспалительные эффекты эстрогенов, как отмечено, менее выражены у старых животных [77].

Следует указать на то, что введение эстрогенов также может усиливать воспалительные процессы, к тому же эта дилемма усложняется большим разнообразием условий проведения экспериментов: маркеры, оценивающие воспалительные процессы, стимулы, вызывающие повреждение, продолжительность, метаболитов эстрогенов и т. д. В некоторых исследованиях эстрогены способствуют лейкоцитарной инфильтрации сосудистой стенки, экспрессии молекул адгезии, повышению уровня металлопротеаз. Кроме того, эстрогены могут влиять на иммунные и воспалительные процессы через систему гипоталамус-гипофиз-надпочечники [77].

Таким образом, коррекция ЭД, и в том числе вызванная НПГ, эстрогеновыми препаратами может привести к провоспалительным эффектам, поэтому актуально рассмотреть регуляцию этой функции другими путями. Роль ПКС в воспалительных процессах, в частности в экспрессии молекул адгезии и пролиферации до конца не ясна [77].

Результаты некоторых исследований привели к пониманию того, что ПКС может быть посредником в экспрессии молекул адгезии – VCAM, ICAM и E-

селектина при воздействии на ЭК пупочной вены ФНО и ИЛ-1. В ЭК экспрессия антигенных молекул занимает центральную роль в воспалительных реакциях. Цитокины, такие как фактор некроза опухолей (ФНО), ИЛ-1 стимулируют комплекс мероприятий, запускающий экспрессию молекул клеточной адгезии лейкоцитов, в том числе Е-селектина, молекул клеточной адгезии сосудистых клеток – VCAM-1, и молекул межклеточной адгезии – ICAM-1. Эти молекулы способствуют присоединению, проникновению через эндотелиальный барьер лейкоцитов, направляя тем самым их в очаг воспаления. С другой стороны, активация ЭК может происходить не только цитокинами, но и ангиогенными стимулами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF) или взаимодействие с межклеточным матриксом, опосредованное интегрином [7,77,87].

Важно подчеркнуть роль отдельных изоферментов ПКС в воспалении. Провоспалительный цитокин интерлейкин ИЛ-1 $\beta$  играет большую роль в повышении проницаемости ГЭБ и способствует его отеку посредством повышения активности ПКС- $\theta$ . Некоторые исследования показали, что ФНО- $\alpha$  может вызвать ЭД и даже апоптоз ЭК посредством повышения активности ПКС- $\beta$  (2) и ПКС- $\zeta$ , которые в свою очередь приводят к активации и продукции АФК. Также ПКС-активированная НАДФН-оксидаза и пути сигнализации NF- $\kappa$ B/TLR-4 играют большую роль в миграции ЭК [88,89,90,91].

Много противоречивых данных о влиянии ПКС на процессы воспаления [7,77,87,88,89,90,91], но учитывая вышесказанное, ингибируя активность ПКС, можно нормализовать противовоспалительную функцию эндотелия в условиях НПГ.

#### ***1.1.4 Взаимосвязь пролиферативных процессов и активности ПКС при ЭД, вызванной НПГ***

Эндотелиоциты играют ключевую роль в процессах ангиогенеза, включающих деградацию базальной мембраны старых и поврежденных сосудов, пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, формирование межклеточного матрикса вокруг сосудов. Эти процессы необходимы для заживления ран, восстановления кровоснабжения после ишемии [77]. Большое участие принимают

эстрогены в этих процессах, активируя плазминоген и металлопротеазы, повышая экспрессию молекул адгезии и интегринов, факторов роста эндотелия и фибробластов, повышая уровни оксида азота. Интересно отметить, что эстрогены, посредством воздействия на эстрогеновые рецепторы и активации eNOS, увеличивает пролиферацию ЭК не только в месте повреждения сосуда, но и костном мозге [92]. С другой стороны, оксид азота системы eNOS, стимулированной эстрогенами, модулирует и ограничивает пролиферативную активность в интиме/медии сосудов [77].

Таким образом, НПГ может приводить к ЭД, выраженной как в снижении процессов ангиогенеза, приводящего к дестабилизации сосудов головного мозга, повышению микропроницаемости, что опасно при внутричерепных кровоизлияниях, отеках мозга, так и к гиперплазии интимы/медии сосудов, что актуально при ЭД, ассоциированной с атеросклерозом. Исследования ученых [93,94] связывают нарушение функциональной целостности и повышения проницаемости сосудов со снижением выработки ЭК PDGF-BB в условиях НПГ. Необходимо сказать, что у овариоэктомизированных крыс увеличиваются уровни ангиопоэтина-1- $\alpha$  и активируется сигнализационный путь Ang-1/Tie-2, с последующей активацией гипоксией-индуцированного фактора ГИФ-1 $\alpha$ , приводящего к экспрессии сигнального пути PDGF/VEGF/PI3K, что предотвращало дальнейшую регрессию структуры сосудов у овариоэктамизированных (ОВЭ) животных, таким образом, формируя адаптацию ЭК к НПГ [92]. Вместе с тем установлено, что НПГ приводит к уменьшению деления клеток эндотелия и ЭК-предшественников в костном мозге, посредством снижения eNOS-активности [92].

Таким образом, ЭД, вызванная НПГ, приводит к дисбалансу в пролиферативных процессах, и возможность их регуляции, в том числе с помощью ПКС, представляет собой актуальную проблему. Ангиогенез прежде всего зависит от эндотелиальных клеток, которые мигрируют в направлении ангиогенного стимула, что происходит при повреждении сосуда и/или растворении элементов базальной мембраны. В процессах ангиогенеза большую роль отводят VEGF и основному фактору роста фибробластов (bFGF), которые индуцируют

пролиферативные процессы посредством активации ПКС [53].

Результаты исследований [53] приводят к следующему - характерной особенностью для эндотелиальных клеток является зависимость от факторов роста для пролиферации и ингибирование ПКС подавляет VEGF-индуцированный ангиогенез, но повышает VEGF-индуцируемую NO-зависимую проницаемость сосудов.

Влияние VEGF на сосудистую проницаемость может быть обусловлено как NO, так и частичным синтезом простаглицина. Исследования показали, что ингибирование ПКС приводит к увеличению продукции оксида азота и индукции eNOS. Эти эффекты связаны, в большей степени, с процессами фосфорилирования eNOS с помощью ПКС, чем с индукцией транскрипции, так как увеличения фермента при ингибировании ПКС не наблюдалось. Фосфорилирование eNOS с помощью ПКС приводит к снижению активности на 77% [53].

Дефосфорилирование аминокислоты Thr495 способствует ассоциации eNOS с ее активатором – кальмодулином [95]. ПКС осуществляет фосфорилирование, в том числе и остатка Thr 495, что и приводит к снижению активности eNOS [11].

Исследования [96] указывают на повышение проницаемости эндотелиальной стенки при активации ПКС, что противоречит вышесказанному. Такое противоречие может быть связано с действием многих факторов, в том числе с различными эффектами изоферментов ПКС, функции которых имеют существенные отличия: ПКС- $\beta$ -2 приводит к митогенному эффекту VEGF, аденовирусная избыточная экспрессия ПКС- $\alpha$  может как повышать миграцию эндотелиальных клеток [97], так и снижать активность ПКС- $\delta$  [98].

Подводя итоги о сложном и неоднозначном влиянии ПКС на течение ЭД, вызванной НППГ, можно сказать, что они требуют дальнейшего изучения. Ингибируя активность ПКС можно уменьшить выраженность пролиферативных процессов, что целесообразно при ЭД, сопряженной с атеросклерозом и СД, но также может привести к снижению процессов восстановления структур сосудов, что не всегда желательно.

### ***1.1.5 Взаимосвязь изоферментов ПКС в повреждении тканей головного мозга***

Как, указывалось выше, ЭД, вызванная НПГ, может осложняться нарушениями мозгового кровообращения, поэтому целесообразно рассмотреть при этом роль ПКС:

1) Аденозин-опосредованная регуляция активности ПКС, в частности ПКС-ε в ишемическом прекондиционировании. Активация ПКС-ε оказывает защитный эффект до длительной ишемии (имитируя короткий ишемический период – прекондиционирование), во время реперфузии и последующий этап после реперфузии (посткондиционирование). Свой эффект оказывает ПКС-ε за счет активации митохондриальной альдегиддегидрогеназы 2, которая обезвреживает продукты свободно-перекисного окисления липидов (СПОЛ) [99]. ПКС активирует ERK и MAPK – киназные пути, участвующие в антиапоптотических сигнальных процессах и способствующие выживанию клеток [100]. Исходя из этого активность ПКС, скорее всего, выгодно повышать.

2) Роль нейронной ПКС-γ в глутамат-индуцированной эксайтотоксичности. ПКС γ участвует в положительной обратной связи в усилении NMDAR-активности, увеличении внутриклеточного кальция и митохондриальной дисфункции [101].

Другие изоэнзимы ПКС также могут быть вовлечены в клеточный ответ при ишемии. Например, ингибирование ПКС-ζ уменьшает повреждение клеток, при NMDA-индуцированном повреждении нейронов [102].

3) Роль ПКС-δ в запоздалых процессах апоптоза во время реперфузии [103,104]. Низкое содержание АТФ, периинфарктное повышение глутамата и возникновение волны деполяризации повышают АФК, такие как гидроксильные радикалы, синглетный кислород, супероксид. ПКС активируется АФК и другими участниками процессов апоптоза, включая активацию каспазы. В сердце также снижает активность пируватдегидрогеназы. Торможение ПКС-δ снижает митохондриальную дисфункцию, высвобождение апоптогенных белков Bcl-2, увеличивает восстановление клеточного ацидоза [12,105].

Роль ПКС-δ в реперфузионном апоптозе делает эту ПКС важной

терапевтической мишенью, для увеличения временного окна у пациентов, перенесших инсульт [12]

Подводя итоги по пункту настоящей главы, ингибирование ПКС, лучше путем избирательного влияния на изоферменты, может привести к улучшению работы эндотелия, выраженной в повышении вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной и антипролиферативной функции эндотелия. Кроме того, блокада активности ПКС может нормализовать свободно-радикальный фон, процессы некроза и апоптоза ЭК и нервных клеток, уменьшить глутамат-индуцированное повреждение нейронов. Также необходима осторожность регуляции ПКС процессов воспаления и пролиферации, взаимосвязь которых до конца не выявлена.

## ***1.2 Способы фармакологической коррекции ЭД, вызванной НПГ***

Несмотря на то, что ЭД сопряжена со многими заболеваниями, истинных препаратов, обладающих эндотелиопротекторными свойствами в клинической практике в настоящее время нет. Для коррекции нарушенных функций эндотелия используются препараты, применяемые, в основном, в кардиологической и эндокринологической практике, влияние которых на эндотелий скорее вспомогательное, а не основное:

1. Эстрогеновые препараты, и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов: ралоксифен, тамоксифен. Эти препараты повышают активность eNOS-синтазы, выработку оксида азота, обладают антиоксидантными свойствами, но при их применении может повышаться риск венозного тромбообразования, пролиферация эстроген-зависимых органов, провоспалительных и гипертензивных эффектов, нарушения гормонального фона, что сильно ограничивает их применение [7,9,77].

2. Милдронат – препарат с кардиопротективным, нейропротективным и антигипоксическим действием, связан с торможением окисления жирных кислот в митохондриях, может приводить к увеличению образования оксида азота. Эндотелиопротекторный эффект, возможно, связан с усилением ацетилхолиновой

сигнализации и/или стимуляцией eNOS с помощью  $\gamma$ -бутирофина, количество которого увеличивает милдронат [106].

3. иАПФ – группа антигипертензивных ЛП, уменьшая уровни ангиотензина II (индуктор оксидантного стресса) и повышая количество брадикинина, увеличивают производство вазодилатирующих факторов – NO, простациклина, тем самым улучшая ЭФ. Также уменьшает пролиферацию клеток в бляшке атеросклеротической, обладают антиоксидантными и антикоагулянтными свойствами [14,107].

4. Тиазидные и тиазидоподобные диуретики – помимо регуляции водно-солевого обмена и снижения АД, повышают активность eNOS, биодоступность оксида азота и обладают антиоксидантными свойствами [14,108].

5. Статины и фибраты – препараты, нормализующие липидный фон, благодаря взаимодействию с рецепторами PRAP, в том числе и в ЭК (такой же механизм у глитазонов), уменьшают продукцию свободных радикалов и провоспалительных цитокинов, улучшают ЭФ. Статины увеличивают экспрессию eNOS, уменьшают уровни ФНО, ИЛ-1, продлевают время жизни мРНК, необходимой для синтеза eNOS, стимулируют сигнальный путь PI3K/Akt/eNOS/NO и уменьшают уровни АФК [14,109].

6.  $\beta$ -блокаторы – вызывают снижение влияния симпатической вегетативной системы, уменьшение образования свободных радикалов, повышение активности синтазы оксида азота. Выраженными эндотелиотропными свойствами обладает небиволол, повышающие экспрессию eNOS [14,110].

7. Блокаторы кальциевых каналов – уменьшают содержания кальция в клетках ССС, что приводит к вазодилатации, снижению СПОЛ, уменьшению атерогенеза, улучшению реологических показателей крови [76,111].

8. Блокаторы АТ-1 рецепторов – за счет активации АТ-2 и блокады АТ-1 рецепторов эта группа препаратов обладает вазодилатирующими свойствами, повышает образование оксида азота, уменьшает пролиферацию органов мишеней, обладает антиатеросклеротическими и антиоксидантными свойствами, регулирует агрегацию тромбоцитов [107,111,112].

9. Сулодексид – гепариноид, обладающий гипополипидемическим действием, снижающий агрегационные и коагуляционные показатели, повышает фибринолиз, модулирует функции ЭК, обладает противовоспалительными свойствами [113].

Несмотря на то, что есть широкий ассортимент лекарственных средств обладающих неосновным (плеотропным) влиянием на функционирование эндотелия, в настоящее время препаратов с доказанным основным эндотелиопротекторным действием нет. Таким образом, поиск препаратов с избирательными основными эндотелиопротекторными свойствами, с возможно новыми механизмами действия, разрешенных к использованию в клинической практике для лечения ССЗ и ЭД, представляет собой важную актуальную задачу.

### ***1.3 Клинические аспекты использования экспериментальных препаратов, обладающих ингибирующим влиянием на активность ПКС***

Важным является тот факт, что увеличение активации изоферментов ПКС наблюдалось при следующих нарушениях: опухолевый рост [114], сахарный диабет 2 типа, ишемическая болезнь сердца, острые и хронические заболевания сердца [12,115], сердечная недостаточность, болезни почек [116], ряд дерматологических заболеваний, включая псориаз [117], при аутоиммунных заболеваниях [118,119] и в ряде неврологических заболеваний, в том числе инсульта [105], болезни Паркинсона [120], слабоумие, болезнь Альцгеймера, болевой синдром и даже в психиатрических заболеваниях, в том числе биполярное расстройство [12]. В этих заболеваниях отмечено высокое содержание определенных ПКС и/или аномальное увеличение активности. Но в настоящее время нет препаратов, ингибирующих активность ПКС, применяемых в клинической практике.

Использование препаратов в клинических исследованиях обусловлены многими обстоятельствами: 1) изменение активности ПКС при многих патологических состояниях: сердечная недостаточность, биполярное расстройство, сахарный диабет [121]; 2) ПКС играют роль в клеточной пролиферации, ангиогенезе, что является определяющим в опухолевом росте [122]; 3) Исследования на животных доказывают эффективную роль при многих патологиях [123,124]; 4)

многие фармакологические агенты моделируют активность ПКС прямо или опосредовано [125].

Основные результаты клинических исследований приведены в таблице 1 [12].

Исходя из данных таблицы, чаще всего результаты клинических исследований были разочаровывающими из-за недостаточного терапевтического эффекта и/или непредвиденных побочных реакций. Только рубокситаурин из всего большинства ингибиторов ПКС вызвал достаточный терапевтический сигнал, чтобы FDA утвердило использование этого препарата при непролиферативной ретинопатии.

Можно выделить ряд научных проблем, которые ограничивают применение ингибиторов ПКС в клинической практике [12]:

1. Недостаточные знания патофизиологии многих заболеваний и роли определенных изоферментов ПКС в этих процессах;
2. Неадекватность доклинических исследований;
3. Отсутствие селективности по влиянию на изоферменты ПКС. Даже наиболее избирательные ингибиторы вызывают снижение активности других изоферментов, что приводит к нежелательным системным эффектам [126]. Кроме того, один изофермент регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей;
4. Недостаточная концентрация препарата у биомишени;
5. Отсутствие биомаркеров, которые отражали адекватность дозирования препаратов, в результате чего клинические испытания – единственный на сегодняшний день метод для определения оптимальной дозы;
6. Отсутствие данных о неудачных клинических испытаниях.

В результате обзора литературы можно сказать, что поиск соединений, которые могут улучшать функции эндотелия при НПГ и сопутствующих ССЗ, обладающих ингибирующим влиянием на активность ПКС, представляет собой актуальную научно-практическую проблему современной медицины. К сожалению, в настоящее время таких препаратов, как с доказанным механизмом действия и разрешенным к использованию в клинической практике нет с одной стороны, так и препаратов с основным доказанным эндотелиопротекторным действием с другой, что стимулирует дальнейшее изучение этого вопроса

Основные результаты клинического применения потенциальных ингибиторов активности ПКС при различных патологиях

Патология	ЛС	Предполагаемый МД	Результат лечения	Комментарии компании
Хроническая сердечная недостаточность	Флосквинан [12]	Неизбирательная ↓ ПКС	Увеличение случаев госпитализации и смертности раннее прекращение исследования	Изъят из клинического применения
Коронарное шунтирование	Наркозные ЛП [127]	↑ ПКС-ε	Снижение уровня тропонина, необходимость инотропной поддержки и длительной госпитализации (> 7 дней)	Севофлюран и десфлюран по сравнению с пропофолом в исследованиях умеренного размера.
	Аденозин [128]	↑ ПКС-ε	Снижение смертности, необходимость в сосудосуживающей терапии	Требуется подтверждение в более крупном исследовании
	Акадезин [129]	↑ ПКС-ε ↑ АМРК	Не наблюдается снижения смертности	Снижение смертности в небольшой группе пациентов
Биполярное расстройство	Тамоксифен [130,131]	Неселективное ↓ ПКС (при высокой дозе – модулятор эстрогеновых рецепторов)	Несколько небольших исследований показывают значительное преимущество при остром маниакальном психозе	Высокие дозы тамоксифена (80 мг/сут) повышает риск развития тромбоэмболии, инсульта и рака матки
Онкология	Бриостатин [132]	Неселективное ↑ ПКС	Минимальная эффективность	Вызывает серьезные миалгии у 50% пациентов.
	Апринокарсен [12]	↓ ПКС α	Низкая эффективность	разработка прекращена
	Энзастаурин [133]	↓ ПКС β	Низкая эффективность	Текущие исследования влияния

				на рост злокачественных опухолей головного мозга
	Тамоксифен [12]	Неселективное ↓ ПКС (при высокой дозе – модулятор эстрогеновых рецепторов)	Низкая эффективность лечения злокачественных глиом и гормонального рака простаты	Высокие дозы тамоксифена (80 мг/сут) повышает риск развития тромбоэмболии, инсульта и рака матки
	Мидостаурин [134]	Неселективное ↓ ПКС ↓ FMS типа тирозинкиназы 3	Отсутствие эффекта при лечении меланомы.	Проводятся исследования при лейкозе
	ОКН-01 [12]	Неселективное ↓ ПКС ↓ Chk1	Нет эффектов при лечении рака почек и яичников	Изучается в сочетании с топотеканом для лечения рака яичников
Диабетическая ретинопатия	Рубоксистаурин [135,136]	↓ ПКС-β	Снижение потери зрения в крупных исследованиях	На рассмотрении FDA для применения у пациентов с диабетической ретинопатии
Диабетическая невропатия	Рубоксистаурин [12]	↓ ПКС-β	Мягкое снижение симптомов	Небольшие исследования. Требуется подтверждение в более крупном исследовании
Пересадка органов	Сотрастаурин [137,138]	Неселективное ↓ ПКС	Заметное увеличение отторжения	Отторжение происходило при использовании в комбинации с микофенолатом

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводилось на 529 крысах-самках линии Wistar, массой 230-300 г., которые были разведены и выращены в виварии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет.

В процессе проведения эксперимента всех животных содержали стандартных условиях вивария (естественный режим смены света, температура, относительная влажность, стандартная диета лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92), еженедельная смена подстилки и клеток, фиксированное время кормления и подачи питья) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. Кроме этого руководствовались правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики») и Приказу МЗ РФ от 23 августа 2010 г. N 708 н «Правила лабораторной практики».

В процессе экспериментального исследования проводили изучение эндотелиопротекторных свойств 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина, синтезированных на кафедре органической химии ПМФИ филиала ВолГМУ под руководством профессора И.П. Кодониди, за что ему и всей кафедре выражаем искреннюю признательность. Следующие производные с условными обозначениями: PMS4OH, QTF, PMSB, PMS5MeSl, PMS34DiMeO и AzoTF вводились внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг, которая показала эффективность этой химической группы во многих других исследованиях [139-143].

Все экспериментальное исследование условно разделялось на 4 исследовательских блока (этапа):

1-й блок исследований включал воспроизведение НПГ, как модели ЭД, путем удаления матки с придатками и изучение изменений СК и АД при введении эндотелиоспецифичных анализаторов.

2-й блок исследований включал скрининг исследуемых производных с

использованием программ молекулярной динамики и фармакологических методов и выявлением с помощью них соединения-лидера [44,144].

3-й блок проведенных опытов направлен на изучение эндотелиопротекторных свойств соединения лидера, включающий оценку влияния на вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную функции и структурно-морфологическое состояние эндотелия [145,146].

4-й блок – направлен на выяснение потенциальных механизмов эндотелиопротекторного действия соединения-лидера с помощью ИГХ- и ИФА-методов анализа [146].

На всех этапах экспериментов эндотелиопротекторное действие изучаемых соединений и препаратов сравнения проводили на модели ЭД, вызванной НПГ. Также полученные результаты сравнивали со значениями группы негативного контроля (группа НПГ без фармакотерапии) и группы позитивного контроля (ложнооперированная (ЛО) группа) (таблица 2 – дизайн исследования).

## Дизайн эксперимента

Группа	1 день эксперимента Проведение оперативного вмешательства	7 день эксперимента Экспериментальная терапия	28 день эксперимента Комплексная морфофункциональная оценка терапии
ЛО-группа	Наркоз (хлоралгидрат, 350 мг/кг), операция, извлечение матки с придатками, но без их удаления, наложение швов	Введение раствора воды очищенной с твином с 7 по 28 день эксперимента внутривнутрибрюшинно	<b>ОЦЕНКА:</b>  <i>Вазодилатирующей</i> <i>Антитромботической</i> <i>Противо</i> <i>воспалительной</i> <i>Анти</i> <i>пролиферативной</i> <i>функций эндотелия</i>  <i>Морфометрия</i> <i>головного мозга</i>  <i>ИГХ и ИФА анализ</i>
Группа негативного контроля (НПГ)	Наркоз (хлоралгидрат, 350 мг/кг), операция, экстирпация матки с придатками, наложение швов	Введение раствора воды очищенной с твином с 7 по 28 день эксперимента внутривнутрибрюшинно	
Группа, которой вводили исследуемые производные пириимидина		Введение производных в виде суспензии в дозе 50 мг/кг с 7 по 28 день внутривнутрибрюшинно	
Группа животных, которым вводили препарат сравнения - сулодексид		Введение препарата Вессел Дуэ Ф (сулодексид) в дозе 30 ЕВЛ/кг с 7 по 28 день внутривнутрибрюшинно	

### 2.1 Моделирование эндотелиальной дисфункции

Модель ЭД, вызванную НПГ, воспроизводили путем удаления матки и яичников у крыс-самок под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг, Acros Organics, серия: A035219) [144,146]. Перед оперативным вмешательством выстригалась шерсть на брюхе животного, а после – накладывали швы. Все манипуляции

проводили в специально оборудованной лаборатории с соблюдением правил асептики. Период, по истечению которого проводилась оценка эндотелиопротекторных свойств у овариэктомизированных животных, составлял 28 дней. Для уменьшения факторов, влияющих на течение эксперимента, группе негативного контроля вводили твин с дистиллированной водой внутривентриально на 7 день после начала эксперимента в течение 21 дня.

Все исследуемые соединения, являющиеся 2-стирилзамещенными производными 4-оксопиримидина, вводили животным с НПП на 7 день после экстирпации матки по 28 день внутривентриально в виде суспензии (вода очищенная и твин 80 – на 100 мл воды 0,5 мл твина 80) в дозе 50 мг/кг, в объеме 1мл на 100 г массы животного. Вещества вводили в утреннее время на протяжении 21 дня.

Помимо исследуемых веществ, группе сравнения (сулодексид-группа) вводили препарат с выраженными эндотелиопротекторными свойствами - сулодексид – комбинация гепариноида с дерматан сульфатом (Вессел Дуэ Ф, Alfa Wasserman, Италия, серия: 14520), в дозе 30 ЛЕ (ЕВЛ) (единицы высвобождения липопротеинлипазы) [146,147]. Также вводили на 7 день после удаления матки с яичниками в течение 3-х недель внутривентриально.

В группе положительного контроля, которая представлена ЛО-животными, проводили все те же операции, что и группе негативного, но без удаления яичников с маткой.

## ***2.2 Изучение сосудистой реакции у животных с НПП при введении эндотелиоспецифичных анализаторов***

Проведение 1 этапа исследований – изучение на модели ЭД, вызванной НПП, изменений СК и АД при введении эндотелиоспецифичных анализаторов.

Для начала проводилась оценка полноты удаления яичников, путем определения фаз ежедневно с течением недели полового цикла у ЛО-крыс и крыс с моделью НПП с помощью характерных морфологических признаков по влагалищным мазкам согласно методике Я. Д. Киршенблата и установлено отсутствие этих фаз, что может говорить о полноте экстирпации [148].

Эксперимент проводился на 30 крысах-самках, рандомизированных по массе

(230-270 гр.) и возрасту (половозрелые – 4 месяца). Животные были разделены на 2 группы: ложнооперированные самки (n = 10) и самки с моделью недостаточности половых гормонов (НПГ). В процессе эксперимента животных с НПГ, для демонстрации различных вариантов ответа на введенные анализаторы, разделили на три группы по направленности сосудистого ответа: НПГ№1 (n=8), НПГ№2 (n=6) и НПГ№3 (n=6).

По истечении 28 суток с момента операции проводили оценку *вазодилатационной функции* эндотелия сосудов измерением скорости церебрального кровотока в теменной области головного мозга крыс при введении эндотелиоспецифичных анализаторов. Для этого осуществляли вскрытие черепной коробки с помощью бормашины, периодически охлаждая поверхность с помощью 0,9% раствора натрия хлорида. Регистрацию кровотока осуществляли с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25МГц и компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.7. (Санкт – Петербург, Россия). Для оценки функционального состояния эндотелия сосудистого русла осуществлялось стимулирование выброса эндогенного оксида азота с помощью анализатора - ацетилхолина (АХ (Sigma-aldrich, США, серия: A11040712)), в дозе 0,1 мг/кг. Также дополнительно использовали блокатор eNOS – нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME («Sigma-Aldrich», США, серия:1413116)) в дозе 10 мг/кг [144,149], вводимые внутривенно. Артериальное давление измеряли в бедренной артерии прямым методом. Введение анализаторов осуществлялось после возврата АД в исходное состояние.

### **2.3 Скрининговые методики**

Второй блок исследований включал скрининг и выявление соединения-лидера. В этом этапе проводили физико-математические расчеты степени тропности исследуемых веществ к ПКС, который был выполнен на кафедре неорганической, физической и коллоидной химии совместно с к.ф.н. А.А. Глушко, за что выражаем ему благодарность. Кроме того, в этот блок входили методики по влиянию исследуемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия и

антиагрегационную.

Выявление активности у прогнозируемых соединений основано на их тропности к активным центрам ПКС, выявленной с помощью программ молекулярного моделирования системы лиганд-фермент в динамике. В качестве макромолекулы-мишени была использована модель фермента протеинкиназы-C-η полученная методом рентгеноструктурного анализа. Моделирование молекулярной динамики осуществлялось в области сайта связывания АТФ в субъединице С3. Трехмерные модели молекул лигандов были построены с помощью программы HyperChem 8.0. Оптимизация геометрии молекул лигандов осуществлялась с использованием метода *ab initio* (UHF/3-21G\*). Далее заряды рассчитывались методом *ab initio* DFT (B3LYP/6-31G(d,p)). Моделирование 196 нс времени системы «лиганд-фермент» в водном окружении осуществлялось при температуре 300К в программе Биоэврика.

Фармакологический скрининг по влиянию на вазодилатирующую функцию эндотелия проводился на 95 крысах-самках, рандомизированных по массе (230-270 гр.) и возрасту (половозрелые – 4 месяца): 1 группа -ложнооперированные самки (n=12), 2 группа - самки с моделью НПГ(n=12). Препарат сравнения вводили 3 группе животных (n=10). Исследуемые вещества PMS4OH (n=10), QTF(n=10), PMSB(n=10), PMS5MeSl(n=10), PMS34DiMeO(n=10) и AzoTF(n=11) вводили 4, 5,6,7,8,9 группам животных. Через 4 недели от начала эксперимента измеряли скорость церебрального кровотока (СК) в теменной области головного мозга крыс доплерографическим методом при использовании анализатора АХ.

Фармакологический скрининг по влиянию на антиагрегационную функцию проведен на 108 крысах – самках, разделенных на 9 равных экспериментальных групп (так же, как и в предыдущем эксперименте) по 12 особей в каждой. По истечении 28-ти дневного периода у крыс производили забор венозной крови (из подъязычной вены в пробирку со стабилизатором цитратом натрия, предварительно им обработанную в соотношении 1:10) для определения показателей, характеризующих антитромбогенный потенциал: регистрировали процесс агрегации тромбоцитов (степень, скорость и показатель агрегации). Процесс агрегации

тромбоцитов регистрировали с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия), методом определения относительного среднего размера агрегатов. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (НПО «РЕНАМ», набор «АГРЕНАМ», серия:1115) в конечной концентрации 5 мкМ [150].

## ***2.4 Изучение эндотелиопротекторных свойств соединения-лидера***

3-й блок проведенных опытов направлен на изучение эндотелиопротекторных свойств соединения лидера и включал:

изучение влияния на вазодилатирующую функцию эндотелия соединения лидера в разные периоды развития ЭД (в 1й, 14й и 28й дни эксперимента), вызванной НПГ [144,151];

изучение влияния на антитромботическую функцию эндотелия соединения лидера в условиях НПГ [145,152,153];

изучение влияния на противовоспалительную функцию эндотелия соединения лидера в условиях НПГ [146];

Исследование по влиянию на вазодилатирующую функцию, проведено на 92 крысах–самках предварительно рандомизированных по возрасту и массе (250-300 грамм, половозрелые – 4 месяца), и разделенные на 4 экспериментальные группы:

1 группа представлена ложнооперированными крысами (ЛО-группа, n=20); 2 группа – группа животных с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов (НПГ-группа, n=24); 3-ей группе вводили препарат сравнения сулодексид (n=24); 4 группе – соединение-лидер PMS4ОН (n=24).

В каждой группе животных проводили оценку вазодилатационной функции эндотелия сосудов путем измерения скорости церебрального кровотока (СК) в теменной области головного мозга крыс доплерографическим методом при введении эндотелиоспецифичных анализаторов. Для оценки функционального состояния эндотелия сосудистого русла осуществлялось стимулирование выброса эндогенного оксида азота с помощью анализатора (модификатора) - ацетилхолина (АХ (Sigma-aldrich, США, серия: A11040712)), в дозе 0,1 мг/кг. Также

дополнительно использовали блокатор eNOS – нитро- L -аргинин метиловый эфир (L-NAME («Acros organics», США, серия:1413116)) в дозе 10 мг/кг, L-аргинина (Panreac, серия: 143464.1208, 300 мг/кг) [144,147,149,151,154], вводимые внутривенно. Измерение кровотока в каждой экспериментальной группе проводили три раза под хлоралгидратным наркозом: 1-ое измерение – на первый день эксперимента, 2-ое измерение приходилось на середину эксперимента (14 день), 3-ье, последнее измерение проводили на 28 день. Для измерения СК осуществляли вскрытие черепной коробки с помощью бормашины, периодически охлаждая поверхность с помощью 0,9% раствора натрия хлорида. После эксперимента проводили репозицию части теменной кости черепа с ушиванием краев раны. Животных содержали вне вивария в индивидуальных лабораторных условиях в клетках попарно с ежедневной антисептической обработкой операционного шва.

Изучение влияния на антиромботическую функцию эндотелия проводилось по нескольким направлениям: анализ скорости образования тромба, анализ агрегационных показателей, активности фактора фон Виллебранда (FW), показателей коагуляционного гемостаза, антитромбина-III.

Влияние производных пиримидина на скорость образования тромба проводили в последний день эксперимента (использовали 24 самки, разделенных на 4 группы по 6 животных) на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) на поверхность правой сонной артерии [152,153]. После хлоралгидратного наркоза изолировали сонную артерию, накладывали ватный диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (0,025 мл). Затем регистрировали время, в течение которого происходила полная остановка кровотока, детектируемая доплерографическим методом.

Анализ агрегационной активности тромбоцитов производили во всех группах животных (4 группы по 6 крыс) на 28 день эксперимента, после забора венозной крови, отделения плазмы, инкубации и добавления агрегантов методом определения относительного среднего размера агрегатов [151] с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия). В качестве индукторов агрегации использовали: динатриевую

соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ, НПО «Ренам», набор «АГРЕНАМ», серия:1115) в конечной концентрации 5 мкМ, коллаген (НПО «Ренам», набор «АГРЕНАМ», серия:1115) в конечной концентрации 1 мг/мл и ристомицин (НПО «Ренам», набор «АГРЕНАМ», серия:1115) в конечной концентрации 15 мг/мл. Процесс агрегации регистрировали в течение пяти минут и регистрировали степень и скорость агрегации тромбоцитов.

Активность FW определяли в плазме крови также в последний день эксперимента агглютинационным методом (основанным на способности связывать тромбоциты с ристомицином), в котором использовали 24 самки, разделенных на 4 группы (по 6 животных). К разведенной имидазоловым буфером (1:5) плазме (50 мкл) добавляли 50 мкл Виллебранд – реагента (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия:6515) и регистрировали время от момента добавления Виллебранд - реагента до начала появления агглютинации и по калибровочному графику определяли активность FW в %.

Определение коагуляционных показателей проводили в плазме, бедной тромбоцитами в эксперименте с использованием 24 крыс-самок (4 группы по 6 животных), путем определения времени образования кровяного сгустка на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701». С помощью наборов для определения протромбинового времени, тромбин-тест, фибриноген – тест, активированного частичного тромбопластинового времени (производство НПО РЕНАМ, Россия) [155] определяли АЧТВ (серия:1913) (добавляли к плазме водного раствора эллаговой кислоты (активатор внутреннего пути свертывания) в комплексе с соевыми фосфолипидами и хлоридом кальция), ТВ (серия: 3915) (добавляли к плазме раствор тромбина, что характеризует скорость образование фибрина), ПВ (серия: 2911) (добавляли тканевой тромбластин в плазму крови (характеризует внешний путь коагуляции)), уровень фибриногена (серия: 3815) (методом Клаусса с использованием калибровочного графика).

Активность антитромбина III определяли в плазме крови совместно с показателями коагуляции спектрофотометрическим методом, при добавлении в нее 100 мкл рабочего раствора тромбина, 100 мкл рабочего раствора хромогенного

субстрата, 1 мл 50% раствора уксусной кислоты. По калибровочному графику определяли активность АТ – III в исследуемом образце (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия: 0316).

Оценку влияния на противовоспалительную функцию эндотелия соединения лидера в условиях НПГ проводили путем определения С-реактивного белка СРБ и уровня лейкоцитов.

Содержание СРБ в сыворотке крови определяли методом латекс – агглютинации с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+» (серия: 079) (по 9 животных в 4х группах).

Количество лейкоцитов и тромбоцитов в крови определяли с использованием системы ветеринарного автоматического гематологического анализа ВС 2800vet (Mindray).

4-й этап направлен на выяснение потенциальных механизмов эндотелиопротекторного действия соединения-лидера с помощью ИГХ- и ИФА - методов анализа.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа на 28 день эксперимента в плазме крови и гомогенате головного мозга животных (24 крысы-самки, по 6 животных в группе) определяли концентрацию изоферментов синтазы оксида азота (nNOS, серия: L161103374; eNOS, серия: L161108684; iNOS, серия: L161243261, гомогенат мозга), ассиметричного диметиларгинина (ADMA, серия: L161103361, плазма), тромбоксана А2 (ТХА2, серия: L170329064, плазма), матриксной металлопротеиназы-1 (MMP–1, серия: L170426080, плазма), протеинкиназы С  $\alpha$  (ПКС, серия: L116780139, гомогенат), гормонов эстрадиола (серия: L180415011, плазма) и ФСГ (серия: L182530154, плазма). В работе использовали видоспецифичные наборы реактивов производства компании *Cloud Clone Corp.* (США). Ход анализа строго соответствовал прилагаемой производителем инструкции к набору реактивов. Считывание результатов производили на микропланшетном ридере Tecan Infinite F50 (Австрия).

Для гистологического исследования под эфирным наркозом производили забор головного мозга крыс (4 группы по 6 животных). Материал фиксировали в течение

48 часов в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4). После фиксации материал проводили по общепринятой гистологической методике. Использовали микроскоп DM 300 фирмы Leica с компьютерной морфометрической программой LAS.

Для выявления степени функционирования эндотелия мозга в условиях НПГ (4 группы по 6 животных) оценивали оптическую плотность и использовали моноклональные антитела к eNOS (серия: ab76198), а для оценки влияния исследуемого соединения на ПКС – антитела к этому виду ферментов (фирмы «Abcam», специфичных к нескольким изоферментам ПКС- $\alpha$ , ПКС- $\beta$ 2, ПКС- $\zeta$  и ПКС- $\iota$ , серия: ab181558). С последующей температурной демаскировкой. Для достоверности использовали негативные и позитивные контроли антигенов, негативные контроли антител. ИГХ-анализ проводился строго согласно инструкции к антителам. Иммуногистохимическое исследование проводилось совместно с кафедрой морфологии ПМФИ – филиала ВолгГМУ во главе с С.А. Калашниковой и с кафедрой биологии ВолгГМУ во главе со Снигур Г.Л., за что выражаем искреннюю признательность.

## ***2.5 Методы статистической обработки результатов эксперимента***

Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро - Уилка. В случае подчинения данных законам нормального распределения для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. В противном случае дальнейшую статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни [156].

### **ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ВАЗОДИЛАТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ НА ФОНЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭНДОТЕЛИОСПЕЦИФИЧНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ**

Функциональную активность эндотелия на фоне НПГ при введении веществ, первично действующих на эндотелий сосудов – АХ и L-NAME, можно оценить путем измерения скорости мозгового кровотока в комплексе с измерением АД, так как эти показатели находятся в непосредственной зависимости от тонуса сосудов [157].

До начала эксперимента было проведено изучение слизистой влагалища, по методу Я. Д. Киршенבלата – наличия чешуек, слизи, типа клеток, проводилось в течение недели. В ЛО - группе самок наблюдались все фазы эстрального цикла, особенно эструс, диэструс, причем, продолжительность цикла была в пределах 7 дней. В группе самок подвергшихся овариоэктомии отчётливо фазы полового цикла не выделялись, и наблюдалась картина, характерна для диэструса, что может свидетельствовать о полноте экстерпации яичников и матки и развитии НПГ [148].

При измерении линейной средней систолической скорости кровотока (СК) в ЛО-группе (n=10) крыс были получены следующие результаты (таблица 3). При введении АХ у данной группы животных наблюдалось увеличение СК на  $29,5 \pm 1,2\%$ , тогда как внутривенное введение L-NAME привело к снижению кровотока на  $21,5 \pm 2,21\%$ , а повторное введение АХ (после введения L-NAME) приводило к менее выраженному приросту кровотока на  $10,7 \pm 1,33\%$  по сравнению с исходными данными ЛО-крыс. Важно отметить, что показатели СК согласуются с достоверными изменениями АД: при введении АХ давление снижается на  $49,6 \pm 3,2\%$ , введение L-NAME приводит к его повышению на  $6,8 \pm 0,61\%$ , а вторичное введение АХ к менее выраженному падению АД – на  $40,2 \pm 2,81\%$ , по сравнению с исходной СК.

Показатели СК и АД у ЛО крыс и животных с НПГ при введении анализаторов

	Исх. СК / Исх. Р	СК <sub>ах</sub> / Р <sub>ах</sub>	СК <sub>ах</sub> % / Р <sub>ах</sub> %	СК l-n / Pl- n	СКl-n % / Pl-n %	СК <sub>ах</sub> +l-n / Р <sub>ах</sub> +l-n	СК <sub>ах</sub> +l-n % / Р <sub>ах</sub> +l-n %
ЛО	5,54±0,37 97,3±2,10	7,2±0,51* 49±3,30*	29,5±1,20 -49,6±3,20	4,39±0,36** 103,9±2,01* *	-21,5±2,21 6,8±0,61	6,2±0,41* 58,3±3,01*	10,7±1,33 ΔΔ -40,2±2,81 Δ
НПГ №1	2,99±0,14### 103±2,10	3,55±0,16* * 70,3±1,31*	18,9±0,61# -31,7±1,41#	2,8±0,14 110,8±1,31* *	-6,2±0,61# 7,8±2,11	3,1±0,14 76,9±1,90*	3,5±0,60 #, ΔΔΔ -25,3±1,21 ##, Δ
НПГ №2	3,37±0,31### 99,8±2,81	4,03±0,37 75,0±4,01 ***	20,0±1,01# -24,6±3,01###	2,8±0,25 106,5±3,01	-16,6±1,11 <sup>α</sup> 6,7±1,51	2,43±0,24** 72,3±4,11 ***	-27,8±1,77 #, α, ΔΔΔ -27,6±3,31 ###
НПГ №3	4,35±0,15### 98,3±2,10	5,3±0,18 *** 62,0±2,32 *	22,0±1,21## -36,6±3,81 ###, ββ	4,9±0,21** 89,1±3,31**	12,5±1,15 #, α, β -9,6±1,81 #, α, β	4,7±0,18 56,8±1,12* *	7,8±1,21 αα, ΔΔΔ, β -42,1±2,30 α, ββ

Примечание. Исх. СК – исходная скорость кровотока, см/с; исх. Р – исходное АД, мм. рт. ст.; СК<sub>ах</sub> – скорость кровотока при введении АХ, см/с; Р<sub>ах</sub> – АД при введении АХ, мм рт.ст; СК<sub>ах</sub>% - отношение СК<sub>ах</sub> к исх. СК в %; Р<sub>ах</sub> – отношение Р<sub>ах</sub> к исх. Р в %; СК l-n – скорость кровотока при введении L-NAME; Pl-n – АД при введении L-NAME; СКl-n % - отношение СКl-n к исх. СК в %; Pl-n % - отношение Pl-n к исх. Р в %; СК<sub>ах</sub>+l-n – скорость кровотока при введении АХ на фоне действия L-NAME; Р<sub>ах</sub>+l-n – АД при введении АХ на фоне действия L-NAME; СК<sub>ах</sub>+l-n % - отношение СК<sub>ах</sub>+l-n к исх. СК в %; Р<sub>ах</sub>+l-n % - отношение Р<sub>ах</sub>+l-n к исх. Р.

\* - P≤0,001; \*\* - P≤0,05, \*\*\*- P≤0,01 - достоверно по отношению к исходным значениям СК и АД; Δ - P≤0,05; ΔΔ - P≤0,01; ΔΔΔ- P≤0,001 - достоверно по отношению к носительным показателям, полученным при первом введении АХ;

# - P≤0,001; ## - P≤0,01; ### - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям ЛО-группы крыс; α - P≤0,001; αα - P≤0,02 - достоверно по отношению к аналогичным показателям группы крыс НПГ№1; β - P≤0,001; ββ - P≤0,05 – достоверно по отношению к аналогичным показателям группы крыс НПГ№2

Таким образом, введение АХ ЛО крысам приводило к однонаправленному повышению СК. Блокада eNOS-системы с помощью L-NAME, приводила к снижению кровотока, а введение АХ, на фоне блокады L-NAME приводило к увеличению СК, но в значительно меньшей степени, чем до введения L-NAME, что, очевидно, связано с прямой блокадой на уровне ферментных систем, и согласуется с литературными данными [144]. Кроме того, СК согласуются с колебаниями АД – чем выраженнее падение АД, тем выше СК (при введении АХ), обратный эффект наблюдается при введении L-NAME. Менее выраженное падение АД при введении АХ после блокады eNOS с помощью L-NAME также может говорить о снижении вазодилатирующего эффекта АХ [154]. Эти результаты подтвердили, что СК и АД находятся в прямой зависимости от степени вазодилатации.

Всех животных с НПГ по направленности показателей СК и АД при введении анализаторов можно разделить на 3 группы: НПГ№1, НПГ№2 и НПГ№3

В группе крыс НПГ №1 (n=8) наблюдалось достоверное снижение исходной СК, по отношению с ЛО – группой. Введение АХ приводило к увеличению СК на  $19,2 \pm 0,61$  %, введение L-NAME и повторное введение АХ достоверных изменений не вызывало по сравнению с исходными показателями, в сравнении с ЛО-группой, говорит о менее выраженном ответе и ухудшении работы эндотелия. Показателям СК соответствуют следующие достоверные изменения АД: при введении АХ АД снижалось на  $31,7 \pm 1,41$  %, введение L-NAME приводило к увеличению АД на  $7,8 \pm 2,11$  %, а вторичное введение АХ – к менее выраженному падению АД на  $25,3 \pm 1,21$  %. Такая направленность сосудистого ответа схожа с ЛО-группой, но достоверно менее выражена, относительно ЛО-группы, в изменении показателей СК и АД при введении АХ, СК при введении L-NAME, СК и АД при повторном введении АХ, что согласуется с другими проведенными исследованиями [144].

В группе крыс НПГ №2 (n=6) исходная СК была ниже, чем у ЛО-группы. В ответ на введение АХ и L-NAME достоверных различий в абсолютных показателях СК не наблюдалось (при достоверном снижении АД при введении АХ), причем, повторное введение АХ (с достоверным снижением АД) приводило к падению кровотока ниже исходного уровня на  $27,8 \pm 1,77$  %, относительно исходной скорости

(такая реакция достоверно отличалась от ЛО-группы, группы НПГ №1 и от значений, полученных при первом введении АХ). Интересно отметить, что цифры АД достоверно не отличались от показателей группы крыс НПГ №1 (таблица 3). Изменение ответа на АХ (как СК, так и АД) при первом его введении, по сравнению с ЛО-группой указывает на ухудшение вазодилатирующей функции эндотелия. Но эту группу отличает от животных НПГ №1 более выраженное снижение СК при введении L-NAME (недостоверно отличается от ЛО-группы). Интересно отметить, что при повторном введении АХ наблюдается снижение кровотока ниже исходного уровня, причем при значениях АД, не отличающихся от группы НПГ №1. Показатели СК, ниже исходных показателей, при введении АХ могут отражать тяжелые нарушения в работе эндотелиальной системы [144], которые, возможно, приводят к напряжению работы систем, обеспечивающим адекватное кровоснабжение головного мозга, в которых эндотелиальный механизм играет значительную роль [158].

В группе крыс НПГ №3 (n=6) исходная СК была ниже, чем ЛО-группы, но выше, чем у предыдущих двух групп с НПГ. Введение АХ приводило к увеличению кровотока на  $22,0 \pm 1,21\%$ , а введение L-NAME приводило также к увеличению СК на  $12,5 \pm 1,15\%$ , введение после L-NAME АХ не вызывало достоверных изменений, по сравнению с исходными данными. При этом, АД при введении АХ уменьшалось на  $36,6 \pm 3,81\%$ , при введении L-NAME понижалось на  $9,6 \pm 1,81\%$ , а при повторном введении АХ – снижалось на  $42,0 \pm 2,30\%$ . Также, как и в предыдущих группах с патологией, в этой - давление выше (но ниже чем у НПГ №2), а кровотоки ниже, чем у ЛО-группы при введении АХ, что может указывать на ЭД. Но при введении L-NAME наблюдается обратная реакция, в отличие от других групп – СК достоверно увеличивается, а АД снижается. Также интересно отметить, что введение АХ после блокады с помощью L-NAME приводит у этой группы к увеличению СК и снижению АД, достоверно не отличающихся с таковыми у ЛО-группы и отличающиеся от групп НПГ №1 и НПГ №2

Возможно, такая парадоксальная реакция на введение L-NAME, и на АХ, вводимый после L-NAME, связана с тем, что L-NAME может уменьшать

разобщение работы eNOS-системы (проявляющееся в увеличении синтеза свободных радикалов), вызванное НППГ, что, в свою очередь, может приводить к увеличению СК и снижению АД [159,160,161,162].

### **Заключение**

1. Модель ЭД, вызванная экстирпацией матки с придатками, может приводить к НППГ, выраженной в нарушении эстрального цикла, по сравнению с ЛО – группой.

2. Изучение вазодилатирующей функции эндотелия на ЛО-животных с помощью эндотелиотропных анализаторов показало, что при повышении АД СК снижалась, а при понижении – СК повышалась.

3. По направленности динамики СК и АД у животных с НППГ можно выделить следующие виды их изменений на введенные анализаторы:

А) Направленность сосудистых реакций аналогична зафиксированной в ЛО-группе, но достоверно менее выражена, что проявляется в более высоких показателях АД и низких СК, при введении эндотелиоспецифичных анализаторов.

Б) Недостаточность половых гормонов может приводить к показателям СК, которые ниже исходного уровня при введении АХ после блокады L-NAME, что при соответствующих цифрах АД может говорить о напряжении работы систем, поддерживающих адекватное кровоснабжение головного мозга.

В) Недостаточность половых гормонов может приводить к показателям СК превышающим исходный уровень кровотока при введении L-NAME, что согласуется со снижением АД. С последующим улучшением вазодилатирующей функции, выраженной в увеличении СК и снижении АД при введении АХ после L-NAME, что не отличалось от динамики в ЛО-группе.

## ГЛАВА 4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА

### 4.1 Фармакологический скрининг новых 2-стирилпроизводных пириимидин-4(1H)-она с наиболее выраженным влиянием на вазодилатирующую функцию эндотелия в условиях экспериментально вызванной НПГ

Для оценки результатов молекулярного конструирования было проведено изучение влияния производных пириимидина на вазодилатирующую функцию эндотелия путем измерения исходной СК мозгового кровотока, а также скорости, стимулированной введением АХ – эндотелиоспецифичного анализатора (таблица 4).

Таблица 4

Изменение скорости кровотока при введении АХ различным группам животных

Группа	Исх. Кровоток, см/с	АХ, см/с	% изменения
1. ЛО-группа	4,18±0,17	6,1±0,23	46,77±4,74
2. НПГ-группа	2,61±0,08	3,29±0,11	26,11±0,77*
3. Сулодексид-группа	4,14±0,24	5,70±0,34	37,6±2,5###
4. PMS4OH-группа	4,19±0,19	5,88±0,24	40,83±2,9##
5. PMSB-группа	4,22±0,2	5,60±0,25	33,05±2,91#
6. QTF-группа	4,50±0,27	6,01±0,38	33,72±3,06#
7. AzoTF-группа	4,13±0,22	7,40±0,31	30,0±2,6
8. PMS5MESI-группа	3,14±0,28	3,95±0,34	25,66±1,25
9. PMS34DiMeo-группа	2,95±0,29	3,69±0,35	25,58±1,25

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к ЛО–группе животных;

# -  $P \leq 0,05$ , ## -  $P \leq 0,001$ , ### -  $P \leq 0,01$  достоверно по отношению к НПГ-группе крыс;

В группе ЛО животных исходная линейная средняя систолическая скорость кровотока составляла 4,18±0,17 см/с. Введение специфичного стимулятора выброса вазодилатирующих веществ эндотелием (основным из которых является оксид азота) АХ, приводило к увеличению СК до 6,1±0,23 см/с, что превышает исходные

показатели на  $46,77 \pm 4,74\%$ . Такой ответ на введение АХ характерен для интактных животных и согласуется с литературными данными [144, 147, 151, 154].

В группе у животных с НПГ исходная СК составляла  $2,61 \pm 0,08$  см/с, а введение АХ приводило к увеличению кровотока до  $3,29 \pm 0,11$  см/с, т.е. на  $26,11 \pm 0,77\%$ , что в 1,79 раза достоверно ниже такового прироста у ЛО-группы. Таким образом у животных с НПГ недостаток эстрогенов может приводить к нарушению вазодилатирующей функции эндотелия [5], выраженной в снижении СК в ответ на введение АХ [144,151,154], что, вероятнее всего, связано с уменьшенным выбросом эндотелием сосудорасширяющих веществ (в том числе и оксида азота) [7].

В группе животным с НПГ, которым вводили препарат сравнения – сулодексид, исходная СК была  $4,14 \pm 0,24$  см/с, а кровоток, стимулированный введением АХ, составлял  $5,7 \pm 0,34$  см/с, т.е. на  $37,6 \pm 2,5\%$  превышающий исходные показатели. Прирост кровотока в ответ на введение АХ у животных, которым вводили сулодексид достоверно выше в 1,44 раза, чем у негативного контроля (группа НПГ), что может говорить о эндотелиопротекторной активности препарата, выраженной в улучшении эндотелиозависимой вазодилатации при стимулировании выброса сосудорасширяющих веществ с помощью АХ [113,144,147].

Животным с НПГ, которым проводили фармакотерапию веществом PMS4OH, введение АХ привело к приросту кровотока на  $40,83 \pm 2,9\%$ , что достоверно превышает этот показатель у группы НПГ в 1,56 раз, и он выше, чем у животных, которым вводили сулодексид.

Животным с НПГ, которым применяли PMSB, при введении АХ кровоток увеличивался на  $33,05 \pm 2,91\%$ , что в 1,3 раза достоверно выше, чем у крыс негативного контроля. Использование QTF также превышало прирост СК в ответ на введение АХ в 1,3 раза при сравнении с НПГ-группой.

Применение вещества AZOTF у крыс с НПГ приводило к увеличению СК, вызванной АХ, на  $30 \pm 2,6\%$ , но этот показатель достоверно не отличался от НПГ-группы.

В PMS5MESI- и PMS34DiMeo-группе, прирост кровотока в ответ на введение АХ достоверно не отличался от группы негативного контроля, что может говорить об отсутствии или наличии слабой эндотелиопротекторной активности данных соединений.

Таким образом, можно сказать, что в ряду 2-стирилпроизводных пириимидин-4(1H)-она способность повышать АХ-индуцированную скорость кровотока и, следовательно ЭЗВД, наиболее выражена у соединения PMS4OH.

#### **4.2 Фармакологический скрининг новых 2-стирилпроизводных пириимидин-4(1H)-она по влиянию на антиагрегационную функцию в условиях экспериментально вызванной НПГ**

Дальнейший поиск наиболее активных соединений, обладающих эндотелиопротекторной активностью среди производных пириимидина, проводился путем изучения влияния исследуемых веществ (см. таблицу 5) на показатели агрегации тромбоцитов (степень, скорость и показатель агрегации) при добавлении проагреганта – АДФ.

Таблица 5

Изменение показателей процесса агрегации тромбоцитов при НПГ на фоне введения сулодексида, и исследуемых соединений (50 мг/кг).

Группа	Степень агрегации, усл. ед.	Скорость агрегации, усл. ед.	Показатель агрегации, усл. ед.
1. ЛО-группа	1,53±0,05	1,27±0,27	1,05±0,08
2. НПГ-группа	3,24±0,39*	5,8±1,09*	1,16±0,09
3. Сулодексид-группа	2,02±0,18 <sup>#</sup>	1,41±0,18 <sup>Δ</sup>	1,03±0,09
4. PMS4OH-группа	1,5±0,15 <sup>Δ</sup>	1,13±0,21 <sup>Δ</sup>	0,96±0,13
5. PMSB-группа	3,06±0,63 <sup>#</sup>	2,92±0,28 <sup>#</sup>	1,4±0,61
6. QTF-группа	2,51±0,37 <sup>#</sup>	2,53±0,47 <sup>#</sup>	1,22±0,19
7. AzoTF-группа	1,87±0,1 <sup>α, #</sup>	1,96±0,42 <sup>δ</sup>	0,99±0,07
8. PMS5MESI-группа	3,24±1,11 <sup>*, α</sup>	5,54±3,21 <sup>*</sup>	1,13±0,2
9. PMS34DiMeo-группа	3,37±1,02 <sup>*</sup>	6,06±2,24 <sup>*</sup>	1,14±0,26

Примечание: \* - достоверно, относительно Л/О группы(P<0,01); α - достоверно, относительно Л/О группы(P<0,05); # - достоверно, относительно НПГ группы(P<0,05); Δ - достоверно, относительно НПГ группы (P<0,01); δ - достоверно, относительно НПГ группы(P<0,02).

Анализируя данные, полученные при оценке АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов можно сделать вывод, что недостаточность половых гормонов способствует повышению степени агрегации тромбоцитов в 2,1 раза ( $P < 0,01$ ), относительно группы ложнооперированных животных. Также у крыс группы негативного контроля, по сравнению с ЛО-группой животных отмечено увеличение скорости агрегации в 4,57 ( $P < 0,01$ ) раза. Следует также сказать, что показатель агрегации тромбоцитов, который показывает значения среднего размера агрегата в заданное время после добавления индуктора, во всех экспериментальных группах крыс значимо не отличался, что говорит о снижении интенсивности агрегационных процессов после действия индуктора. Полученные результаты, вероятно, можно объяснить тем, что эстрогены играют важную роль в регуляции функциональной активности сосудистого эндотелия (влияние на eNOS-систему) [7,77] и при недостаточности половых гормонов, вероятно, происходит сдвиг в сторону повышения агрегации, что сопоставимо с полученными результатами других авторов [152,153].

Курсовое введение сулодексида в значительной мере способствовало снижению агрегационного потенциала. Так степень агрегации тромбоцитов по сравнению с группой крыс негативного контроля уменьшилась на 60,1% (в 1,6 раза), с  $3,24 \pm 0,387$  до  $2,02 \pm 0,185$  усл. ед. Однако данный показатель все же значительно превосходил аналогичное значение группы ЛО-крыс – на 32,6 % ( $P < 0,05$ ). Скорость агрегации при введении сулодексида изменялась аналогично степени агрегации. Данный показатель снизился относительно группы животных с НПГ в 4,1 раза и статистически значимо не отличался от показателей ЛО-крыс. В совокупности, полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями и подтверждают наличие у сулодексида эндотелиопротекторной активности [113,147].

Применение исследуемых соединений оказало следующее влияние на показатели агрегации тромбоцитов. Так при применении соединения QTF степень агрегации тромбоцитов относительно ЛО-группы животных увеличилась на 64,7% ( $P < 0,05$ ), а скорость агрегации на 99,2% ( $P < 0,05$ ). Одновременно данные показатели

уменьшились по сравнению с группой крыс негативного контроля в 1,4 раза и в 2,3 раза соответственно.

На фоне введения соединения AZOtF степень агрегации тромбоцитов увеличилась относительно группы ложнооперированных животных на 22,8% ( $P < 0,05$ ), в то же время по сравнению с крысами группы негативного контроля данный показатель значительно уменьшился - в 1,72 раза. Скорость агрегации по сравнению с животными НПГ снижалась в 3,0 раза.

28-ти дневное внутрибрюшинное введение соединения PMS4OH оказало выраженный эффект показателя агрегации тромбоцитов. Степень и скорость агрегации тромбоцитов, относительно группы крыс негативного контроля, уменьшились в 2,16 ( $P < 0,01$ ) и 5,13 ( $P < 0,01$ ) раза соответственно. При этом данные показатели практически не отличались от таковых группы ЛО животных.

Введение вещества PMSB животным привело к достоверному снижению только скорости агрегации тромбоцитов в 1,98 раза ( $P < 0,05$ ) по отношению к крысам с НПГ.

При изучении показателей агрегации тромбоцитов в группах животных, которым вводили PMS5MeSl и PMS34DiMeo, достоверных изменений степени, скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с группой животных с НПГ не наблюдалась.

Подводя итоги влияния исследуемых соединений на показатели агрегации тромбоцитов, можно отметить, что лидером по снижению агрегационных показателей является вещество PMS4OH.

#### **4.4 Заключение**

1. Проведенные исследования по изучению влияния экспериментальных веществ на функции эндотелия показали, что ЭД, вызванная НПГ приводит к нарушению вазодилатирующей функции эндотелия, выраженной в снижении АХ-индуцированной СК в 1,79 раза по сравнению с ЛО-группой; и антиагрегационной, выраженной в повышении степени агрегации 2,1 раза, а скорости – в 4,57 раза, по сравнению с ЛО-группой.

2. Введение препарата сравнения – сулодексида приводило к улучшению вазодилатирующей функции эндотелия, выраженной в увеличении АХ-модифицированной СК в 1,44 раза, по сравнению с НПГ-группой; и улучшало антиагрегационную функцию, выраженную в снижении степени агрегации в 1,6 раза, а скорости – в 4,1 раза, по сравнению с НПГ-группой.

3. Лидером по влиянию на вазодилатирующую и антиагрегационную функции эндотелия является вещество PMS4OH, которое увеличивало АХ-стимулированную СК в 1,56 раз, а степень и скорость агрегации снижал в 2,16 и в 5,13 раз соответственно, по сравнению с НПГ-группой

## **ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА PMS4OH НА ВАЗОДИЛАТИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ**

Эксперименты по изучению вазодилатирующей функции эндотелия при НПГ проведенные ранее позволили нам предполагать разные варианты сосудистого ответа на введение эндотелиоспецифичных анализаторов: АХ, L-аргинина, L-NAME. Исходя из этого при оценки влияния соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия для избежания ошибочных результатов, были проведены исследования по влиянию соединения-лидера PMS4OH на вазодилатирующую функцию эндотелия, модифицированную введением эндотелиоспецифичных анализаторов, в разные периоды развития экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов: 1 период измерения – до овариоэктомии, 2 период – 14 день развития эксперимента, 3 период – на 28 день.

В ЛО-группе животных при первом измерении (таблица 6а) СК получены достоверные результаты, относительно исходной СК ( $5,04 \pm 0,38$  см/с): увеличение на  $41,2 \pm 3,8$  % при введении АХ, практически не измененным кровотоком оставался при введении L-аргинина (недостоверное различие), внутривенное введение L-NAME приводило к снижению СК на  $23,7 \pm 1,62\%$ , а при повторном введении АХ (на фоне блокады L-NAME) наблюдался менее выраженный прирост кровотока – на  $25,3 \pm 2,25\%$ . Такой ответ эндотелия на введение эндотелиоспецифичных анализаторов-модификатор характерен для интактных животных и согласуется с литературными данными [144,154].

Интересно отметить, что динамика изменения вазодилатирующей функции эндотелия при втором и третьем измерениях в ЛО-группе животных существенно не отличалась и имела ту же выраженность и направленность, что и в первом измерении. Наблюдалось увеличение ответа на введение L-аргинина, и снижение эффекта от введения L-NAME, во 2-ом и 3-ем измерениях относительно первого,

что может быть связано с различными факторами (хирургическое воздействие, трепанация и репозиция части костей черепа крысы, влияние наркоза, индивидуальные особенности животных и т.д.).

Значения скорости кровотока в ЛО-группе животных при введении эндотелиоспецифичных анализаторов

Измерение/СК	Исх. СК, см/с	СКах, см/с	СКах, %	СКЛ-Арг, см/с	СКЛ-арг, %	СКl-n, см/с	СКl-n, %	СКl-n+ax, см/с	СКl-n+ax, %
1-измерение	5,04±0,38	7,04±0,50*	41,2±3,8	4,88±0,36	-3,29±1,87	3,86±0,31**	-23,7±1,62	6,29 ±0,46**	25,3±2,25 <sup>β</sup>
2-измерение	4,84±0,28	7,12±0,46*	47,6±5,2	4,89±0,28	1,30±1,0 <sup>##</sup>	4,01±0,24**	-17,1±1,1 <sup>#</sup>	6,15±0,32**	29,01±4,9 <sup>β</sup>
3-измерение	5,00±0,34	7,35±0,50*	49,5±5,9	5,07±0,36	1,2±0,7 <sup>##</sup>	4,15±0,30	-17,2±1,1 <sup>#</sup>	6,31±0,37**	29,0 ±4,4 <sup>β</sup>

Примечание: Исх. СК – исходная скорость кровотока, см/с; СКах – скорость кровотока при введении АХ, см/с; СК l-arg - скорость кровотока при введении L-Аргинина, см/с; СК l-n – скорость кровотока при введении L-NAME, см/с; СКах+l-n – скорость кровотока при введении АХ на фоне действия L-NAME, см/с; 1,2,3 изм. – первое, второе и третье измерения, соответственно. \* - P≤0,01; \*\* - P≤0,05 - достоверно по отношению к исходным показателям скорости кровотока; # - P≤0,01; ## - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям ЛО-группы крыс, полученным при 1-ом измерении. <sup>β</sup> - P≤0,05 – достоверно по относительным показателям СК, полученным при первом введении АХ;

Значения скорости кровотока в животных с НПГ при введении эндотелиоспецифичных анализаторов

Измерение/СК	Исх. СК, см/с	СКах, см/с	СКах, %	СКЛ-Арг, см/с	СКЛ-арг, %	СКl-n, см/с	СКl-n, %	СКl-n+ax, см/с	СКl-n+ax, %
1-измерение	4,47±0,27	6,21±0,41*	39,6±4,1	4,47±0,27	0,26±1,4	3,69±0,25**	-18,1±1,4	5,46±0,36**	22,4±3,4 <sup>β</sup>
2-измерение	4,83±0,41	6,17±0,49	28,6±2,5 <sup>##,α</sup>	4,87±0,54	0,3±5,3	4,06±0,4	-15,7±3,0	5,00±0,52	3,5±3,9 <sup>β,##,α</sup>
3-измерение	3,50±0,32 ##, α, ΔΔ	3,77±0,33 #, α, Δ	9,1±1,4 #, α, Δ	4,36±0,40	23,9±3,3 #, α, Δ	3,84±0,3	13,3±4,9 #, α, Δ	3,92±0,40 ##, αα	9,5±6,0 <sup>α</sup>

Примечание: # - P≤0,01; ## - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы крыс, полученным при 1-ом измерении; Δ - P≤0,02; ΔΔ - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы крыс, полученным при 2-ом измерении; α - P≤0,02; αα - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям ЛО-группы крыс, полученным в тот же период измерений. \* - P≤0,01; \*\* - P≤0,05 - достоверно по отношению к исходным показателям скорости кровотока; <sup>β</sup> - P≤0,05 – достоверно по относительным показателям СК, полученным при первом введении АХ;

Таблица бв

Значения скорости кровотока в группе животных, получавших сулодексид, при введении эндотелиоспецифичных анализаторов

Измерение/СК	Исх. СК, см/с	СКах, см/с	СКах, %	СКL-Арг, см/с	СКL-арг, %	СКI-n, см/с	СКI-n, %	СКI-n+ах, см/с	СКI-n+ах, %
1-измерение	4,39±0,31	6,15±0,41*	41,4±3,2	4,41±0,30	1,4±1,4	3,54±0,25**	-19,4±1,5	5,35±0,40**	22,7±4,2 <sup>β</sup>
2-измерение	4,08±0,28	5,13±0,30**	27,7±4,0 <sup>##</sup>	4,47±0,27	10,8±3,4 <sup>##</sup>	3,94±0,29	-2,9±4,1 #, αα	4,39±0,29	9,7±4,8 <sup>##,β</sup>
3-измерение	4,74±0,3 <sup>α</sup>	6,15±0,35**	32,1±3,9 <sup>α</sup>	4,85±0,35	1,9±3,4 <sup>α</sup>	4,36±0,3	-8,3±2,04 α, #	5,62±0,30	21,8±4,7

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$ ; \*\* -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к исходным показателям скорости кровотока; # -  $P \leq 0,01$ ; ## -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям группы, получавшей сулодексид, полученным при 1-ом измерении; α -  $P \leq 0,01$ ; αα -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы крыс, полученным в тот же период измерений; β -  $P \leq 0,05$  - достоверно по относительным показателям СК, полученным при первом введении АХ;

Таблица бг

Значения скорости кровотока в группе животных, получавших PMS4OH, при введении эндотелиоспецифичных анализаторов

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$ ; \*\* -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к исходным показателям скорости кровотока; # -  $P \leq 0,01$ ; ## -  $P \leq 0,05$  - достоверно по

Измерение/СК	Исх. СК, см/с	СКах, см/с	СКах, %	СКL-Арг, см/с	СКL-арг, %	СКI-n, см/с	СКI-n, %	СКI-n+ах, см/с	СКI-n+ах, %
1-измерение	4,74±0,27	6,83±0,38*	45,9±3,9	4,63±0,28	-2,2±1,0	4,02±0,27**	-18,4±1,3	5,84±0,32**	24,7±3,6 <sup>δ</sup>
2-измерение	4,22±0,35	6,32±0,65*	46,0±4,6 <sup>α,β</sup>	4,73±0,42	11,1±4,0 <sup>#</sup>	3,92±0,35	-8,20±2,3 #, αα	5,10±0,48	19,1±3,8 <sup>δ,α</sup>
3-измерение	3,86±0,37	5,78±0,66**	46,0±3,9 α, ββ	4,23±0,44	7,6±4,4 <sup>##,αα</sup>	3,53±0,36	-9,7±2,0 <sup>#,α</sup>	4,61±0,50	17,3±4,3 <sup>δ</sup>

отношению к аналогичным показателям PMS-группы крыс, полученным при 1-ом измерении; α -  $P \leq 0,01$ ; αα -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы крыс, полученным в тот же период измерений; β -  $P \leq 0,01$ ; ββ -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям сулодексид-группы крыс, полученным в тот же период измерений; δ -  $P \leq 0,01$  - достоверно по относительным показателям СК, полученным при первом введении АХ;

Во второй группе животных с НПГ при первом измерении (таблица 6б) введение анализаторов приводило к изменениям СК той же выраженности и направленности, что и показатели кровотока ЛО-группы в тот же период измерения. Из этого следует вывод, что сосудистый ответ обеих групп животных на начальном этапе эксперимента был на одном уровне.

Вторая серия измерений СК в НПГ-группе крыс привела к следующим изменениям, относительного 1ого измерения - достоверно снижался ответ на введение АХ (с  $39,6 \pm 4,1\%$  до  $28,6 \pm 2,5\%$ , на 11%) и на введение АХ, введенного после блокады eNOS (после введения L-NAME) (с  $22,4 \pm 3,4\%$  до  $3,5 \pm 3,9\%$ , на 18,9%). Такая динамика изменений СК 2го периода измерений указывает на ухудшение работы эндотелия в условиях НПГ.

Последнее измерение кровотока в данной группе животных приводило к еще более выраженным достоверным изменениям относительно первого: ответ на введение АХ еще сильнее снижался, в среднем, (с  $39,6 \pm 4,1\%$  до  $9,1 \pm 1,4\%$ ) на 30,5%; ответная реакция на L-аргинин увеличилась (с  $0,26 \pm 1,4\%$  до  $23,9 \pm 3,3\%$ ) на 23,6 %; при введении L-NAME наблюдалась инверсия СК – отрицательные показатели, характерные для интактных крыс сменились в условиях НПГ положительными, и увеличились, в среднем, ( $-18,1 \pm 1,4\%$  до  $13,3 \pm 4,9\%$ ) на 31,4 %; повторное последующее введение АХ привело к снижению сосудистой реакции (с  $22,4 \pm 3,4\%$  до  $9,5 \pm 6,0\%$ ) на 12,5%. Кроме того, сосудистая реакция на введенные анализаторы (кроме L-NAME и АХ, введенный после L-NAME) в последнем периоде измерений также достоверно отличалась от показателей второго измерения, что говорит о поэтапном развитии ЭД. Важно отметить, что наряду с изменениями модифицированной СК снижается и исходный кровоток, что может быть связано со снижением базального выброса оксида азота и др. сосудорасширяющих веществ.

Данные результаты могут свидетельствовать о развитии и дальнейшем усугублении эндотелиальной дисфункции, вызванной НПГ, выраженной в изменении сосудистого ответа при введении анализаторов и снижении базальной СК и не противоречат предыдущим исследованиям [144,147,151,154]. Эти изменения могут быть связаны с недостаточностью эффектов эстрогеновых половых

гормонов, которая приводит к нарушению функций эндотелия, работы eNOS-системы, накоплению метилированных производных аминокислот, снижению выброса вазодилатирующих веществ, главным из которых является оксид азота и др [5,9]. Как видно из показателей СК, при ЭД снижается реакция на АХ, увеличивается ответ на введение L-аргинина (что описывает феномен т.н. «L-аргининового парадокса» [9,146]), в меньшей степени снижается кровоток на введение L-NAME, кроме того последний может увеличиваться. Возможно, такая реакция на введение L-NAME, связана с тем, что L-NAME может уменьшать синтез eNOS-системой свободных радикалов, вызванный НПГ, что, в свою очередь, может приводить к увеличению СК [159,160], что и подтвердили данные с разными вариантами сосудистой реакции при введении анализаторов при НПГ.

При первом измерении в группе крыс с НПГ, которым вводили препарат сравнения (таблица бв), привел к значениям показателей СК, практически не отличающимся от таковых у ЛО-группы животных.

Второе измерение кровотока в сулодексид-группе животных при введении анализаторов привело к значениям, которые достоверно ниже полученных при первом: ответ на введение АХ снижался (с  $41,4 \pm 3,2\%$  до  $27,7 \pm 4,0\%$ ) на 13,7%; реакция кровотока на L-аргинин повышалась (с  $1,4 \pm 1,4\%$  до  $10,8 \pm 3,4\%$ ) на 9,4%; ответ на введение L-NAME становился менее выраженным (с  $-19,4 \pm 1,5\%$  до  $-2,9 \pm 4,1\%$ ) на 16,5%; ответ на повторное введение АХ после L-NAME снижался (с  $22,7 \pm 4,2\%$  до  $9,7 \pm 4,8\%$ ) на 13%. Такая динамика изменения СК характерна для развития ЭД, и практически не отличалась от показателей НПГ-группы второго измерения, кроме реакции на L-NAME, которая была менее выражена, чем у группы с НПГ, что может говорить об ухудшении вазодилатирующей функции, если сравнивать с динамикой ЛО-группы.

Последнее измерение СК в группе, которым вводили сулодексид, приводит к достоверному улучшению вазодилатирующей функции эндотелия, если сравнивать со значениями, полученными в третьем измерении СК у НПГ-группы крыс: исходная СК увеличивалась и достоверно не отличалась от показателей ЛО-группы; повышалась реакция при введении АХ (с  $9,1 \pm 1,4\%$  до  $32,1 \pm 3,9\%$ ) на 23%; снижался

прирост, вызванный «L-аргининовым парадоксом» (с  $23,9 \pm 3,3\%$  до  $1,9 \pm 3,4\%$ ) на 22%; ответ на введение L-NAME становился отрицательным, т.к. снижался (с  $13,3 \pm 4,9\%$  до  $-8,3 \pm 2,04\%$ ) на 21,6%. Необходимо отметить, что сосудистый ответ, полученный при 3ем измерении на введение АХ, L-аргинина, АХ на фоне L-NAME достоверно не отличался от 1го измерения, когда показатели второго – отличались. Таким образом, эндотелиотропный эффект, по совокупности данных динамики СК в текущей группе и в группе с НПГ, у препарата сравнения [113,147] можно наблюдать в последнем измерении, который выражен в улучшении как исходной СК, так и модифицированной с помощью анализаторов.

В группе крыс с НПГ, которым вводили исследуемое вещество PMS4OH, при первом измерении значения СК были схожи с ЛО-группой (таблица 6г).

Изучение СК во втором периоде в PMS-группе крыс, привело к тому, что при сравнении с первым измерением происходит ухудшение вазодилатирующей функции, связанной с реакцией на введение L-аргинина – кровотока увеличивается (с  $2,2 \pm 1,0\%$  до  $11,1 \pm 4,0\%$ ) на 8,9% и связанной с ответом на введение L-NAME – уменьшение снижения СК (с  $-18,4 \pm 1,3\%$  до  $-8,2 \pm 2,3\%$ ) на 10,2%. Необходимо подчеркнуть, что реакция на АХ и на АХ, введенный после L-NAME достоверно не отличалась от значений первого измерения. Показатели кровотока улучшаются, по сравнению со вторым измерением в НПГ-группе: ответ на введение АХ повышается (с  $28,6 \pm 2,71\%$  до  $46,0 \pm 4,6\%$ ) на 17,4% (превосходит сулодексид по этому показателю), а также ответ на последующее применение АХ увеличивается (с  $3,5 \pm 3,9\%$  до  $19,1 \pm 3,8\%$ ) на 15,6%. Таким образом, по совокупности данных динамики изменения СК в данной группе и в группе негативного контроля можно сказать, что введение PMS4OH крысам с НПГ приводит к улучшению сосудистой реакции в ответ на введение АХ во втором периоде измерений.

В последнем измерении СК у животных PMS-группы наблюдается достоверное улучшение вазодилатирующей функции эндотелия, по отношению к третьему измерению кровотока в НПГ группе, выраженное: в увеличении прироста кровотока при введении АХ (с  $9,1 \pm 1,4\%$  до  $46,0 \pm 3,9\%$ ) на 36,9% (достоверно превышает сулодексид по этому показателю); в снижении ответа на введение Л-

аргинина (с  $23,9 \pm 3,3\%$  до  $7,6 \pm 4,4\%$ ) на  $16,3\%$ ; в увеличении отрицательной реакции на введение L-NAME (с  $13,3 \pm 4,9$  до  $-9,7 \pm 2,0\%$ ) на  $23\%$ . Также, важно подчеркнуть, реакция на АХ и АХ, введенный на фоне L-NAME, полученные в 3ем измерении не имели достоверных отличий от 1го, 2го измерений, и ЛО группы. Но реакция на L-аргинин и на L-NAME в этом периоде измерений отличались от первого и не отличались от 2го периода, что говорит менее выраженном влиянии PMS4OH на и механизмы, приводящие к изменению этих показателей.

Необходимо указать, что эффект, наблюдаемый у группы животных, которым вводили исследуемое вещество, выраженный в улучшении функции эндотелия при введении АХ, наблюдается во втором (на 14 день развития после овариоэктомии) и третьем периоде измерений (на 28 день), относительно НПГ-группы. Исследуемое вещество превосходит препарат сравнения по способности повышать кровоток при введении АХ.

Возможно, различные эффекты на вазодилатирующую функцию эндотелия исследуемого соединения и препарата сравнения связаны с тем, что они могут реализоваться через разные фармакодинамические механизмы [10,11,44,113,139-143].

### **Заключение**

1. Вазодилатирующая способность, выраженная в показателях исходной и модифицированной скорости кровотока всех групп животных на начальном этапе эксперимента находилась, на одном уровне.

2. Недостаточность половых гормонов способствует развитию и поэтапному усугублению эндотелиальной дисфункции, выраженной в последнем измерении (на 28 день) вплоть до: снижения реакции при введении АХ на  $30,5\%$ , увеличению кровотока при введении L-аргинина на  $23,6\%$ , снижению реакции при введении L-NAME на  $31,4\%$ , снижению ответа при повторном введении АХ на  $12,5\%$ , относительно первого измерения (в первый день эксперимента).

3. Терапевтическое введение сулодексида привело к улучшению сосудистой реакции в последнем измерении на 28 день, где СК на введение АХ, L-аргинина и АХ, введенного на фоне L-NAME, достоверно не отличалась от

показаний в 1-й день эксперимента (на 14 день наблюдались достоверные отличия). Также сулодексид, улучшал вазодилатирующую функцию эндотелия при НПГ, выраженную в: повышении исходной скорости кровотока, увеличению ответа на введение АХ на 23%, снижению кровотока при введении L-аргинина на 22%, усилению реакции при введении L-NAME на 21,6%.

4. Терапевтическое введение PMS4OH приводило к показателям СК, стимулированного АХ и АХ на фоне действия L-NAME, на 14й и 28й дни измерений, достоверно не отличавшимся от показаний 1-го измерения. Также PMS4OH улучшал вазодилатирующую функцию эндотелия при НПГ, выраженную в: увеличении ответа на введение АХ на 36,9%, снижению кровотока при введении L-аргинина на 16,3%, увеличению реакции при введении L-NAME на 23%.

5. Эффект улучшения функции эндотелия PMS4OH наблюдался на 14 и 28 дни измерений, тогда как эффект препарата сравнения отмечен только в третьем периоде измерений.

6. Исследуемое вещество превосходит препарат сравнения по способности повышать кровотоки при введении АХ, но уступает по изменению СК при введении L-аргинина.

## **ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА, PMS4OH, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНЫМ ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА, НА АНТИТРОМБОТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ**

Сосудистые эндотелиальные факторы, такие как тромборезистивный отрицательный заряд ЭК, выделение антиагрегантов – простаглицлина и оксида азота, белок на мембране ЭК - тромбомодулин, секреция тканевого активатора плазминогена и т.д. [79], регулируют процессы образования тромба, которые условно разделяют на первичный, вторичный гемостаз и фибринолиз. ЭД, вызванная НПГ, запускает как первичные реакции образования тромба: вазоспазм, изменение заряда ЭК, выделение субэндотелиального коллагена, фактора фон Виллебранда, активацию тромбоцитов и их агрегацию; так и вторичные: последовательный каскад активации факторов свертывания крови с образованием фибринового тромба.

Таким образом, для выявления эндотелиопротекторной активности соединения-лидера, являющегося 2-стирилпроизводным пиримидин-4(1H)-она – PMS-4OH, необходимо оценить его влияние на процессы образования тромба при ЭД, вызванной НПГ.

### ***6.1. Оценка влияния соединения-лидера PMS4OH на скорость образования тромба при воздействии на поверхность сонной артерии 50% раствором хлорида железа (III), при экспериментальной НПГ***

Аппликация на адвентицию сонной артерии железа хлорида приводит к тромбозу, скорость образования которого можно использовать для оценки влияния веществ [152,153] (таблица 7).

Значения СК и времени до полной остановки кровотока в правой сонной артерии при нанесении железа хлорида при НПГ.

Показатель/ группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS-4ОН
Исх. СК, см/с	4,62±0,27	2,99±0,12*	3,71±0,16 <sup>#</sup>	4,19±0,25 <sup>#</sup>
Время, до полной окклюзии, мин	23,1±0,53	13,7±0,68*	18,3±0,63 <sup>##,*</sup>	18±0,53 <sup>##,*</sup>

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к скорости кровотока НПГ-группы; ## -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению ко времени до полной окклюзии артерии НПГ-группы;

У животных с НПГ исходная скорость кровотока была достоверно ниже, чем у крыс ЛО-группы в 1,55 раза. А время образование тромба у овариэктомизированных животных в 1,67 раза меньше времени полной окклюзии сонной артерии самок ЛО-группы. Характер снижения скорости кровотока при аппликации железа хлорида у всех групп животных был одинаков. Данная динамика не противоречит аналогичным исследованием при воспроизведении данной модели тромбоза [152,153].

У животных с НПГ, которым вводили препарат сравнения – сулодексид, наблюдалось увеличение СК, относительно НПГ-группы, в 1,24 раза, тогда как время до полной остановки кровотока в 1,34 раза было выше, что подтверждает антитромботические свойства сулодексида [113].

Введение соединения-лидера PMS-4ОН приводило к увеличению исходной СК и времени образования тромба в 1,4 и в 1,31 раза соответственно, по сравнению с НПГ-группой.

Таким образом, можно сказать, что исследуемое стирилпроизводное пириимидина PMS-4ОН и препарат сравнения сулодексид одинаково увеличивают

время образования тромба при аппликации железа хлорида на поверхность в 1,31 и в 1,34 раза (по сравнению с негативным контролем), но при этом оно достоверно меньше чем у ЛО-группы.

## **6.2. Оценка влияния соединения-лидера PMS4OH на агрегационную активность тромбоцитов при введении различных индукторов агрегации, на фоне экспериментальной НПГ**

До оценки влияния соединений на показатели агрегации тромбоцитов, проводился анализ их количества с помощью гематологического анализатора. Как видно из таблицы 8, уровень тромбоцитов всех групп достоверно не отличался между собой, что говорит о том, что НПГ не оказывает заметного влияния на процесс образования тромбоцитов, сводя к минимуму воздействие количества тромбоцитов на процессы агрегации.

Таблица 8

Количество тромбоцитов (PLT) в крови экспериментальных животных.

Группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS-4OH
PLT*10 <sup>9</sup> /л	464,18±25,04	448,6±26,23	462,18±34,2	463,92±21,75

При изучении влияния исследуемого соединения на процессы первичного сосудисто-тромбоцитарного гемостаза проводили анализ показателей агрегации тромбоцитов – степени, скорости агрегации тромбоцитов при введении таких проагрегантов, как АДФ, коллаген и ристомицин (см. таблица 9, 10, 11).

Таблица 9

Показатели агрегации тромбоцитов на модели АДФ-индуцированной агрегации при введении сулодексида и исследуемого соединения на фоне НПГ.

Группа	Степень агрегации, усл. ед.	Скорость агрегации, усл.ед.
1. ЛО-группа	1,53±0,05	1,27±0,27
2. НПГ-группа	3,24±0,39*	5,8±1,09*
3. Сулодексид	2,02±0,18 <sup>#,**</sup>	1,41±0,18 <sup>Δ</sup>
4. PMS4OH	1,5±0,15 <sup>Δ</sup>	1,13±0,21 <sup>Δ</sup>

Примечание: \* - достоверно, относительно ЛО группы(P<0,01); \*\* - достоверно, относительно ЛО группы(P<0,05); # - достоверно, относительно НПГ группы(P<0,05); Δ - достоверно, относительно НПГ группы(P<0,01);

Таблица 10

Показатели агрегации тромбоцитов на модели коллаген-индуцированной агрегации при введении сулодексида и исследуемого соединения на фоне НПГ

Группа	Степень агрегации, усл. ед.	Скорость агрегации, усл.ед.
1. ЛО-группа	1,3±0,06	1,11±0,12
2. НПГ-группа	3,06±0,23*	4,38±0,47*
3. Сулодексид	2,11±0,28 <sup>#,**</sup>	3,08±0,31 <sup>#,*</sup>
4. PMS4OH	1,89±0,09 <sup>Δ,*</sup>	3,01±0,37 <sup>#,*</sup>

Примечание: \* - P≤0,01, \*\* - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # - P≤0,05 - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы; Δ P≤0,02 - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы;

Показатели агрегации тромбоцитов на модели ристомицин-индуцированной агрегации при введении сулодексида и исследуемого соединения на фоне НПГ

Группа	Степень агрегации, усл. ед.	Скорость агрегации, усл.ед.
1. ЛО-группа	1,57±0,79	1,41±0,1
2. НПГ-группа	3,01±0,4*	3,1±0,37*
3. Сулодексид	1,97±0,1 <sup>#,*</sup>	2,08±0,23 <sup>#,*</sup>
4. PMS4OH	1,88±0,14 <sup>#,*</sup>	1,92±0,15 <sup>#,*</sup>

Примечание:\* -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы;

У животных, которым воспроизводилась модель ЭД с помощью экстирпации матки с придатками, наблюдались значимые изменения в степени и скорости агрегации тромбоцитов. Так, при добавлении к плазме индуктора АДФ степень агрегации увеличивалась в 2,12 раза, скорость агрегации в 4,57 раз, при сравнении с ЛО-группой. Также достоверно увеличивалась степень и скорость агрегации на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов в 2,35 и 3,94 раза, и при ристомицин-индуцированной агрегации в 1,92 и 2,2 раза соответственно, при сравнении с показателями агрегации ЛО-группы. Таким образом, недостаточность эстрогеновых гормонов приводит к выраженному повышению агрегации, что согласуется с литературными данными, причем выраженность изменений скорости агрегации при введении АДФ и коллагена больше, по сравнению с ристомицином [152,153].

Курсовое введение животным с патологией препарата сравнения сулодексида позволило снизить показатели агрегации тромбоцитов, что подтверждается другими исследованиями [113]. При этом АДФ-индуцированные показатели – степень агрегации и скорость уменьшались в 1,6 и в 4,11 раза, по сравнению с НПГ-крысами. Наряду с этими данными степень и скорость агрегации при индукции

коллагеном уменьшались в 1,45 и 1,42 раза соответственно, а на фоне ристомидинового модели агрегации эти показатели были меньше в 1,52 и 1,49 раза, чем у группы негативного контроля.

Экспериментальное введение исследуемого пиримидин-производного PMS4OH крысам с НПГ приводило к достоверному снижению агрегации тромбоцитов на различных моделях. Степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов была меньше в 2,16 раза, скорость в 5,13 раза, чем у животных с патологией без фармакотерапии. На модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов степень и скорость агрегации у животных этой группы уменьшалась в 1,62 и в 1,45 раз соответственно, вместе с тем в ристомидиновой модели агрегации наблюдалось снижение степени и скорости агрегации в 1,6 раза, при сравнении с показателями самок с НПГ.

Необходимо отметить, что при введении PMS4OH степень агрегации тромбоцитов при индукции АДФ не отличалась от ЛО-группы, в отличие от животных, которым вводили сулодексид, что может говорить о более высокой активности PMS4OH.

В результате проведенного эксперимента установлено, что модель ЭД, вызванная НПГ приводит к повышению агрегации тромбоцитов, выраженной в однонаправленных изменениях показателей агрегации на фоне индукции различными проагрегантами, причем введение сулодексида и PMS4OH позволяло снизить агрегационную активность, при относительно одинаковом количестве тромбоцитов в группах.

### ***6.3. Оценка влияния соединения PMS4OH на активность фактора фон Виллебранда, при экспериментально вызванной НПГ***

Для подтверждения влияния соединений на функцию эндотелия в процессах гемостаза проведено определение активности фактора фон Виллебранда – одного из специфических маркеров ЭД [163], способствующего адгезии тромбоцитов к субэндотелиальному коллагену с их последующей активацией (таблица 12).

Активность фактора фон Виллебранда (FW) при введении препарата сравнения сулодексида и PMS4OH животным с экспериментальной НПГ.

Группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS4OH
FW, %	98,39±4,8	142,23±7,34*	121,29±4,35 <sup>#,**</sup>	110,68±5,8 <sup>##</sup>

Примечание: \* -  $P \leq 0,001$ , \*\* -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям ЛО-группы; # -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы; ## -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы;

У животных с моделируемой патологией, не подвергавшихся фармакотерапии, наблюдалось значительное достоверное превышение FW в 1,45 раза, по сравнению с ЛО-группой, что может говорить о выраженной ЭД при НПГ и объяснить усиление процессов агрегации, и не противоречит другим исследованиям уровня FW при ЭД [145,152,153]

Активность FW в сулодексид-группе крыс была достоверно ниже, чем у животных с НПГ в 1,17 раза (при этом достоверно выше, чем в ЛО-группе), а введение PMS4OH уменьшало этот показатель в 1,29 раз, что достоверно не имело достоверных отличий от ЛО-группы.

Таким образом, НПГ может приводить к ЭД, выраженной в увеличении активности FW в плазме крови и введение сулодексида и PMS4OH приводили к достоверному снижению, причем исследуемое вещество в сравнении с препаратом сравнения проявляло более выраженную активность.

#### **6.4 Оценка влияния соединения PMS4OH на процессы вторичного коагуляционного гемостаза при экспериментально вызванной НПГ**

Вторичный гемостаз (коагуляционный, плазменный) представляет собой процесс последовательной активации факторов свертывания плазмы крови, который завершается образованием нерастворимого фибрина. Этот процесс упрощенно можно разделить на 3 этапа: активация протромбиназного ферментного комплекса (Ха-Va-Са), которой может протекать внутренним (контактным) и внешним

(прокоагулянтным) механизмами; образованием тромбина из протромбина; образованием фибрина из фибриногена.

Поэтому, для оценки влияния исследуемого соединения на процессы гемостаза определяли АЧТВ (характеризует внутренний механизм активации протромбиназы – факторы XII, XI, VIII), ПВ (характеризует внешний путь свертывания – факторы V, VII, X), ТВ (характеризует стадию образования фибрина) [153] и количество фибриногена, который также является маркером ЭД, в плазме крови животных с экспериментальной НПГ (таблица 13).

Таблица 13

Показатели коагуляционного гемостаза: АЧТВ, ПВ, ТВ, количество фибриногена при введении препарата сравнения сулодексида и PMS4ОН животным с экспериментальной НПГ.

Группы / Показатели	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS4ОН
АЧТВ, сек	18,67±0,9	10±0,9*	20,3±1,2 <sup>#</sup>	13,8±0,6 <sup>###,β,***</sup>
ПВ, сек	22,7±1,23	12,7±0,61*	25,7±1,43 <sup>#</sup>	17,3±1,1 <sup>α,β,***</sup>
ТВ, сек	24,5±1,6	15,3±0,8 <sup>**</sup>	21,2±1,5 <sup>###</sup>	18,5±1,0 <sup>α,***</sup>
Фибриноген, г/л	2,33±0,23	3,89±0,33*	2,8±0,31 <sup>###</sup>	2,57±0,14 <sup>###</sup>

Примечание: \* -  $P \leq 0,001$ , \*\* -  $P \leq 0,02$ , \*\*\* -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # -  $P \leq 0,001$ , ## -  $P \leq 0,01$ , ### -  $P \leq 0,02$ , α -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы; β -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям группы, которым вводили сулодексид;

У животных с моделью ЭД, вызванной НПГ, наблюдались достоверные изменения показателей гемостаза относительно ЛО-группы. Так АЧТВ НПГ-группы было в 1,9 раза меньше, чем у ЛО-группы, что может говорить о повышении активности внутренней системы активации протромбина. Также ПВ в группе негативного контроля в 1,79 раза было меньше такового у ЛО-крыс, что также говорит о смещении процессов свертывания в сторону гиперкоагуляции. Анализ ТВ в данной экспериментальной группы показал его снижение в 1,6 раза при сравнении с ЛО-группой, что указывает на усиление процессов образования фибрина и снижения активности противосвертывающей системы. Количество фибриногена у овариоэктомизированных животных было в 1,67 раза достоверно выше показателей

ЛО-группы, свидетельствуя об ухудшении системы свертывания в сторону тромбообразования и возможном ухудшении функционирования ЭК. Таким образом НПГ приводит нарушению коагуляционного гемостаза в сторону гиперкоагуляции, что характерно для ЭД и не противоречит другим данным [153].

Фармакотерапия животных с НПГ с помощью препарата сулодексида приводило к достоверному снижению активности системы плазменного гемостаза, по сравнению с НПГ группой, выраженного в увеличении АЧТВ в 2,03 раза, ПВ – в 2,02 раза, ТВ – в 1,39 раза, и в снижении количества фибриногена в 1,39 раза, причем отличий от ЛО-группы не наблюдалось. Таким образом, препарат сравнения обладает выраженными антикоагулянтными свойствами при НПГ, что также соответствует исследованиям других авторов [113].

Курсовое введение PMS4OH животным с НПГ снижало активность процессов гиперкоагуляции, наблюдаемых в группе негативного контроля, что подтверждалось увеличением АЧТВ в 1,38 раза, ПВ - в 1,36 раза, ТВ – в 1,21 раза (временные показатели достоверно были ниже, чем у ЛО-группы), а количество фибриногена уменьшается в 1,51 раза. Следовательно, исследуемое вещество обладает антикоагулянтными свойствами у крыс с патологией, но активность его меньше, чем у сулодексида (достоверно по показателям АЧТВ и ТВ).

Таким образом, НПГ смещает работу системы вторичного гемостаза в сторону гиперкоагуляции, а введение препарата сравнения и 2-стирилпроизводного пиримидина PMS4OH позволяло нивелировать вызванные патологией отклонения, однако при этом активность сулодексида была выше, что может быть связано с различием в их механизмах действия.

### ***6.5 Оценка влияния соединения PMS4OH на активность противосвертывающей системы путем измерения уровня антитромбина III при экспериментально вызванной НПГ***

В группе животных с НПГ количество АТ III (антитромбина III) (таблица 14) достоверно ниже в 1,65 раза группы контроля, что может говорить о напряжении работы противосвертывающей системы. Введение сулодексида увеличивало этот

показатель, по сравнению с НПГ-группой, в 1,45 раз (не отличало от ЛО-группы), а применение экспериментального вещества – в 1,3 раза (но достоверно меньше, чем в ЛО-группе). Тем самым необходимо отметить, что смоделированная патология приводит к уменьшению активности противосвертывающей системы, а исследуемое соединение и сулодексид повышали ее, причем сулодексид оказался активнее PMS4OH по данному параметру.

Таблица 14

Уровень АТ III (антитромбина III) при введении препарата сравнения сулодексида и PMS4OH животным с экспериментальной НПГ.

Группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS4OH
Количество АТIII, %	103,3±4,03	62,65±5,36*	90,58±4,9 <sup>#</sup>	81,17±4,17 <sup>##,**</sup>

Примечание: \* -  $P \leq 0,001$ , \*\* -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # -  $P \leq 0,001$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы; ## -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы;

## 6.6 Заключение

Проанализировав данные, полученные при изучении влияния исследуемого соединения на систему тромбообразования на фоне НПГ, можно выделить:

1. Модель ЭД, вызванная НПГ, приводит к увеличению тромбогенного потенциала, при сравнении с ЛО-группой, что выражается: в уменьшении времени до полной остановки кровотока в 1,67 раза при аппликации железа хлорида на поверхность сонной артерии; в усилении активности сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, что проявляется в увеличении степени и скорости агрегации при индуцировании АДФ – в 2,12 и в 4,57 раза, коллагена – в 2,35 и в 3,94 раза, ристомидина – в 1,92 и 2,2 раза соответственно, при одинаковом количестве тромбоцитов в группах; в повышении FW в 1,45 раза; в усилении активности плазменной системы гемостаза, которая подтверждается уменьшением АЧТВ в 1,9 раз, ПВ - в 1,79 раза, ТВ - в 1,6 и увеличением количества фибриногена в 1,67 раз; снижением активности противосвертывающей системы, что проявляется снижением АТ в 1,65 раз;

2. Препарат сравнения сулодексид позволил уменьшить нарушения тромботического потенциала, при сравнении с НПГ-группой, что проявлялось: увеличением времени до полной остановки кровотока в 1,34 раза при аппликации железа хлорида на поверхность сонной артерии; в усилении активности сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, что проявляется в снижении степени и скорости агрегации при индуцировании АДФ – в 1,6 и в 4,11 раза, коллагена – в 1,45 и в 1,42 раза, ристомицина – в 1,52 и 1,49 раза соответственно, при одинаковом количестве тромбоцитов в группах; в снижении FW в 1,17 раза; ослаблением активности плазменной системы гемостаза, которая подтверждается увеличением АЧТВ в 2,03 раз, ПВ - в 2,02 раза, ТВ - в 1,39 и снижением количества фибриногена в 1,39 раз; повышением активности противосвертывающей системы, что проявляется снижением АТ в 1,45 раз;

3. Исследуемое вещество PMS4ОН ограничивало нарушения тромботического потенциала, при сравнении с НПГ-группой, что выражалось: увеличением времени до полной остановки кровотока в 1,31 раза при аппликации железа хлорида на поверхность сонной артерии; в усилении активности сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, что проявляется в снижении степени и скорости агрегации при индуцировании АДФ – в 2,16 и в 5,13 раза, коллагена – в 1,62 и в 1,45 раза, ристомицина – в 1,6 и 1,6 раза соответственно, при одинаковом количестве тромбоцитов в группах; в снижении FW в 1,29 раза; ослаблением активности плазменной системы гемостаза, которая подтверждается увеличением АЧТВ в 1,38 раз, ПВ - в 1,36 раза, ТВ - в 1,21 и снижением количества фибриногена в 1,51 раз; повышением противосвертывающей активности путем проявления снижения АТ в 1,3 раз;

4. Эффективность исследуемого вещества превышает таковую у препарата сравнения сулодексида по влиянию на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (не отличалась от ЛО-группы по степени агрегации при индукции АДФ и по активности фактора фон Виллебранда), но ниже его по воздействию на коагуляционный гемостаз (АЧТВ и ТВ), что, может быть обусловлено различными механизмами действия

веществ.

## ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ PMS4OH НА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ, АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУЮ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТКАНИ МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Известно, что эндотелий сосудов играет важную роль в воспалительных процессах путем регуляции активности про- и противовоспалительных факторов. При ЭД, в том числе вызванной НПГ, баланс смещается в сторону провоспалительных агентов, что может выражаться в снижении продукции оксида азота, увеличении провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , повышении экспрессии молекул адгезии, увеличении числа лейкоцитов, изменении уровня С-реактивного белка [164,165], увеличении активности ядерных факторов транскрипции NF- $\kappa$ B [3,166].

Исходя из вышесказанного, для того чтобы определить эндотелиопротекторную активность PMS-4OH необходимо оценить их влияние на процессы воспаления, на фоне экспериментально вызванной НПГ.

### **7.1. Оценка влияния соединения PMS-4OH на уровень лейкоцитов в условиях ЭД, вызванной экспериментальной НПГ**

Таблица 15

Количество лейкоцитов (WBC) в крови экспериментальных животных.

Группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS-4OH
WBC*10 <sup>9</sup> /л	7,14±0,41	10,5±0,74*	9,32±1,19	8,57±0,85

Примечание:\* -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы;

Анализ уровня лейкоцитов в экспериментальных группах животных (таблица 15) с помощью гематологического анализатора показал, что в группе животных с НПГ количество лейкоцитов в 1,47 раза выше, чем у ЛО-группы, что является отклонением от нормы и указывает на развитие воспалительных процессов в организме животного [167]. Введение препарата сравнения сулодексида к изменению уровня лейкоцитов практически не привело, а введение PMS-4OH

немного снижало их количество, но с недостаточной степенью достоверности ( $P \leq 0,1$ ), по сравнению с НПГ-группой.

## 7.2 Оценка влияния соединения-лидера PMS4OH на уровень С-реактивного белка при экспериментальной НПГ

Оценить влияние исследуемого соединения на течение воспалительных процессов при НПГ можно с помощью определения методом латекс-агглютинации С-реактивного белка в сыворотке крови, который является маркером воспаления и дисфункции эндотелия [3] и ассоциируется с рядом ССЗ [165]. Также СРБ, как белок острой фазы воспаления, может повышать экспрессию хемоаттрактантов и молекул адгезии [164].

Таблица 16

Концентрация СРБ в сыворотке крови экспериментальных групп животных при введении препарата сравнения и исследуемого вещества на фоне НПГ

Группа	ЛО-группа	НПГ-группа	Сулодексид	PMS-4OH
Концентрация СРБ, мкг/л	5,54±0,81	20,5±1,1*	13,27±0,74 <sup>#,*</sup>	15,14±1,13 <sup>##,*</sup>

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям с ЛО-группы; # -  $P \leq 0,01$  - достоверно по отношению к показателю уровня СРБ НПГ-группы; ## -  $P \leq 0,02$  - достоверно по отношению к показателю уровня СРБ НПГ-группы.

В группе негативного контроля (таблица 16) наблюдалось значительное увеличение уровня СРБ: в 3,7 раза больше, чем у ЛО-группы, что может говорить о развитии воспалительных процессов, и может коррелировать с ухудшением функций эндотелия других исследований [165].

Введение препарата сравнения группе овариоэктомизированных крыс приводило к снижению концентрации СРБ в 1,54 раза, при сравнении с НПГ-группой. Также применение исследуемого вещества PMS-4OH способствовало снижению уровня СРБ в 1,35 раза, по сравнению с группой негативного контроля. Но при этом значения СРБ были выше, чем у ЛО-группы

Таким образом, можно отметить, что НПГ приводит к развитию воспалительных процессов, что выражается в увеличении уровня СРБ, и введение

препарата сравнения и исследуемой субстанции приводило к достоверному его снижению.

### ***7.3 Изучение влияния соединения PMS4OH на структуры тканей головного мозга крыс на фоне экспериментально вызванной НПГ***

Помимо функциональной оценки работоспособности эндотелия в условиях терапии препаратом сравнения и PMS4OH на фоне НПГ был проведен гистологический анализ структуры как клеток эндотелия, так и тканей головного мозга.

При гистологическом исследовании ткани головного мозга у ЛО крыс, все слои коры были сохранены, четко определялись нейроны различной формы, строго соответствующие определенному слою коры (рис. 1). Данная морфологическая характеристика совпадает с подобными исследованиями других авторов [145].

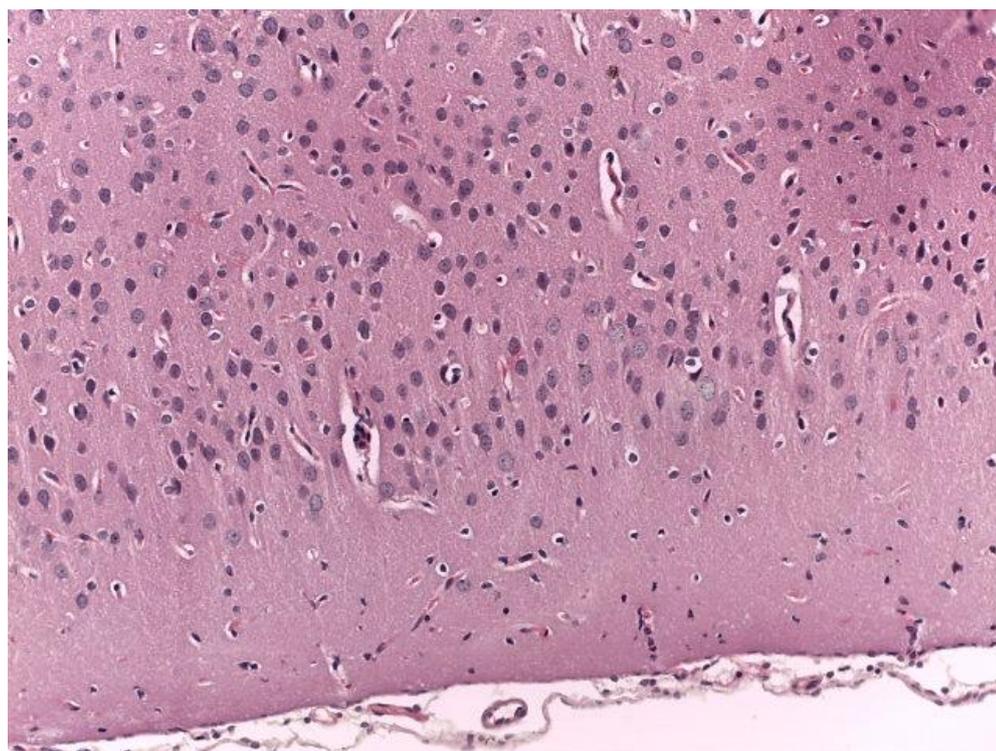


Рис. 1. Фотография коры головного мозга животных контрольной группы (ЛО-группа). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x10.

В данной группе животных клетки глии представлены основными популяциями: астроцитами, олигодендроцитами, имевшими характерное строение. Сосуды всех отделов мозга были обычного кровенаполнения. В этой же группе при использовании окраски по Нислю цитоплазма нейронов прокрашивалась в синий цвет с более темными гранулами «тигроидная субстанция» в основании дендритов, что свидетельствовало об активности белково-синтетических процессов в клетке (рис.2).

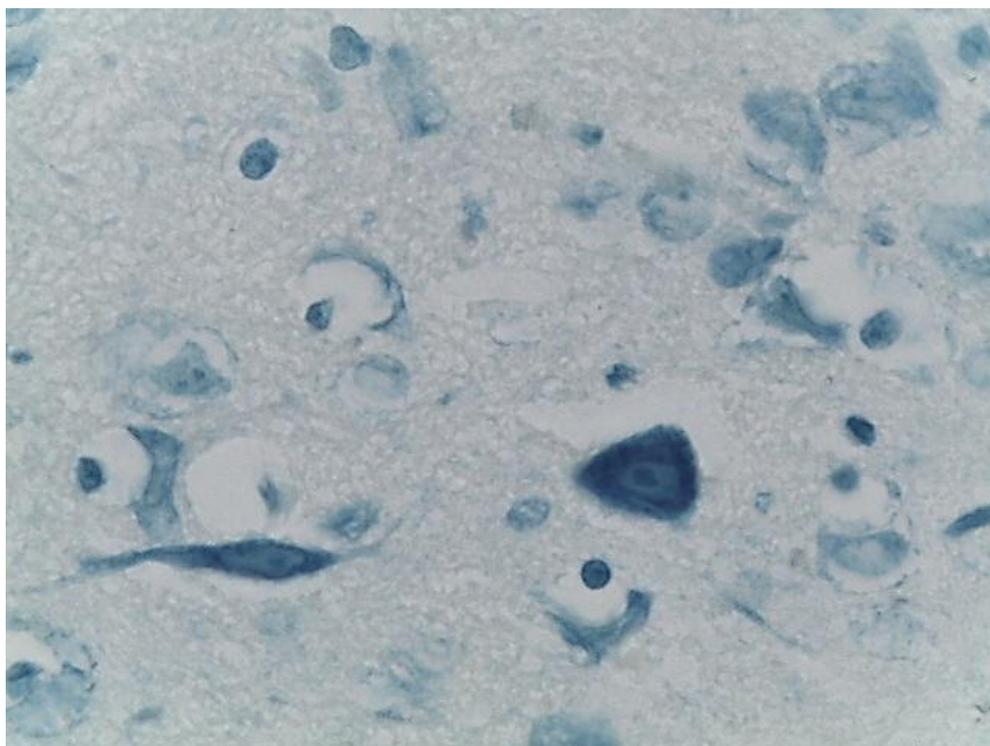


Рис. 2. Фотография коры головного мозга животных контрольной группы (ЛО-группа). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x40.

В качестве негативного контроля использованы животные с недостаточностью половых гормонов (НПГ-группа). При проведении морфологического исследования головного мозга таких животных наблюдалось деформация и дистрофические изменения нейронов. Отмечено значительное снижение количества нейронов в слоях коры по сравнению с группой положительного контроля. В отдельных клетках

ядра не определялись, цитоплазма была базофильна, окрашена неравномерно. Наблюдалась умеренная глиальная реакция с неравномерным расположением клеток микро- и макроглии. Сосуды мозговой оболочки были умеренного кровенаполнения, в то время как капилляры коры и базальных отделов характеризовались выраженным полнокровием в сочетании с периваскулярным отеком (рис.3).

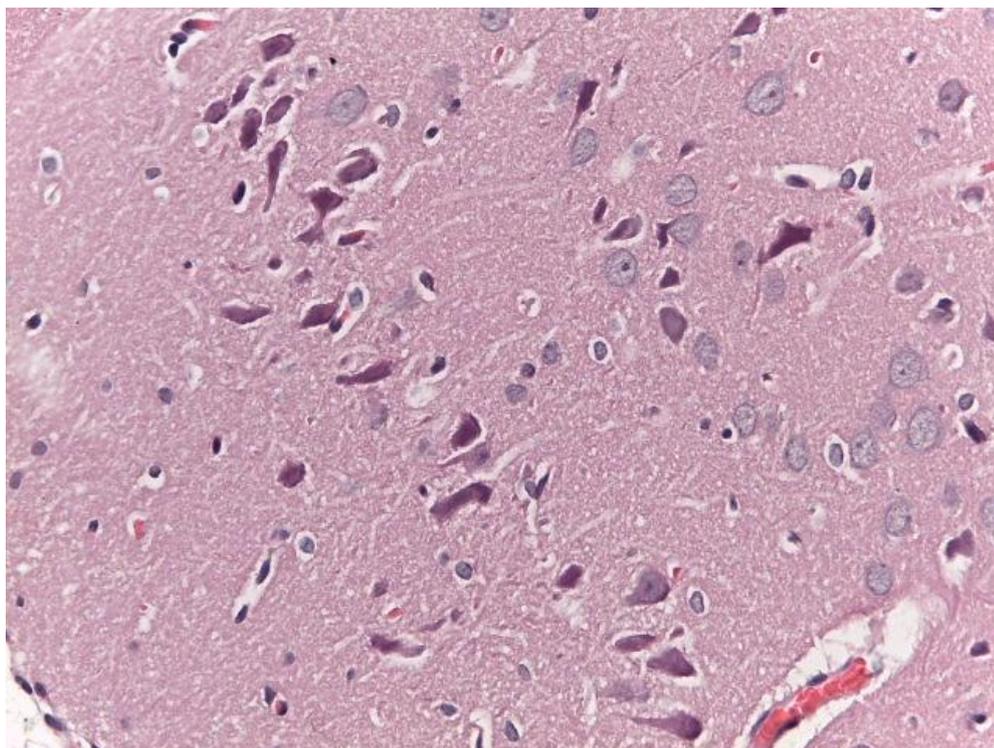


Рис. 3. Дистрофические изменения нейронов, периваскулярный отек головного мозга у животных с недостаточностью половых гормонов (НПГ-группа). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x40.

В отдельных капиллярах головного мозга животных с НПГ были выявлены микроучастки стаза эритроцитов, в эндотелии капилляров имелись дистрофические изменения и полиморфность эндотелиоцитов: наличие округлых эндотелиальных клеток или напротив уплощенных эндотелиоцитов с пикнотичными ядрами, что косвенно свидетельствовало об эндотелиальной дисфункции при недостаточности половых гормонов и такая морфологическая тенденция коррелирует с данными исследований других авторов и может свидетельствовать о развитии ЭД [145].

При окраске по Ниссию наблюдалось неравномерное расположение «тигроидного вещества» в цитоплазме клеток (рис. 4). Так, в нейронах неправильной формы базофильные гранулы располагались диффузно, отмечалось распыление тигроидной субстанции в единичных сохранных нейронах, что свидетельствовало об изменении белково-синтетических процессов в клетке.

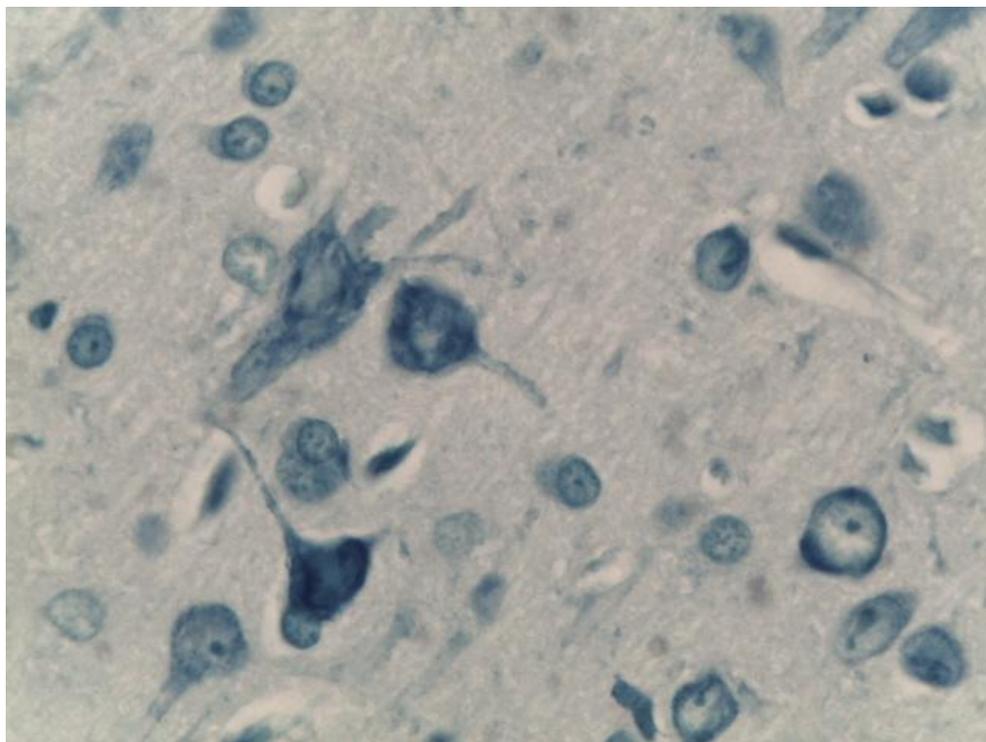


Рис. 4. Нейроны коры головного мозга у животных с недостаточностью половых гормонов. Окраска по Ниссию. Увеличение x100.

При гистологическом исследовании ткани головного мозга крыс, которым проводили экспериментальную терапию с помощью препарата сравнения сулодексида, было установлено, что нейроны коры головного мозга сохраняли нормальное строение и располагались согласно соответствующему слою: молекулярный, наружный зернистый, слой пирамидных клеток, внутренний зернистый, ганглионарный и слой полиморфных клеток. Клетки глии не имели отличительных особенностей от нормального гистологического строения. Сосуды оболочки головного мозга были умеренного равномерного кровенаполнения. Следует обратить внимание на неравномерное кровенаполнение капилляров коры головного мозга, капилляры более крупного калибра были полнокровными,

определялся периваскулярный отек (рис. 5). В более глубоких отделах мозга мелкие ветви артерий виллизиева круга также были полнокровны с незначительным периваскулярным отеком.

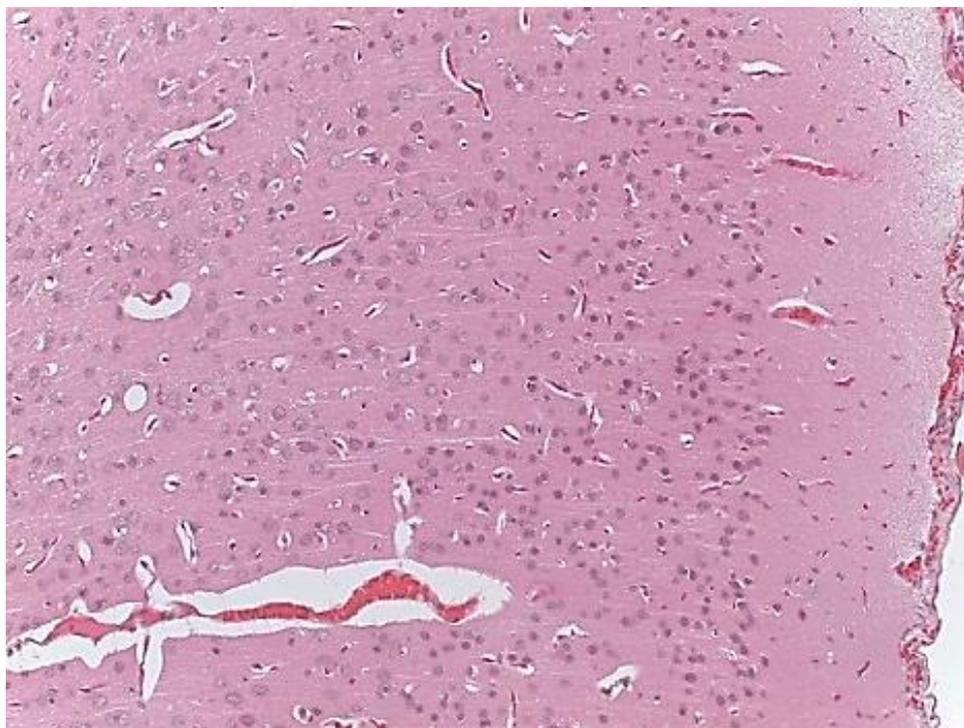


Рис. 5. Периваскулярный отек и полнокровие крупных капилляров коры головного мозга крысы при фармакокоррекции препаратом сравнения (сулодексид). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x20.

В сулодексид-группе крыс анализ белково-синтетических процессов в нейронах головного мозга с использованием окраски по Ниссля выявил равномерное распределение «тигроидной субстанции», базофильного вещества, в цитоплазме нейронов, что было схоже с картиной ЛО-группы (рис.6).

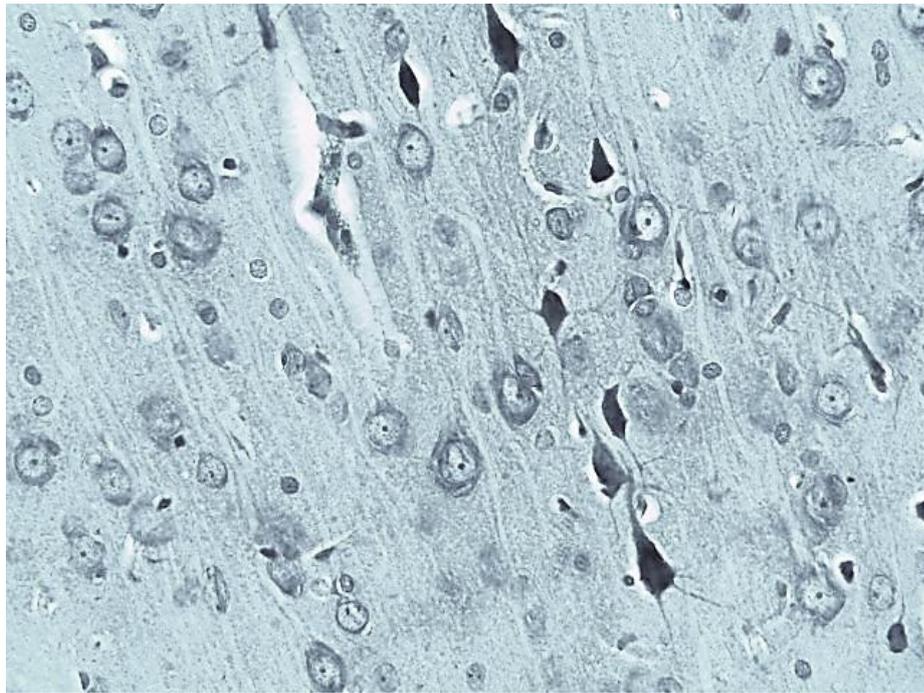


Рис.6 . Нейроны коры головного мозга животных при использовании препарата Сулодексид. Окраска по Нисслю. Увеличение x100.

При гистологическом исследовании коры головного мозга животных с фармакологической коррекцией лидером PMS4OH структура нейронов и глии не имела отличий от ткани животных группы положительного контроля, т.е. ЛО-группы (рис.7).

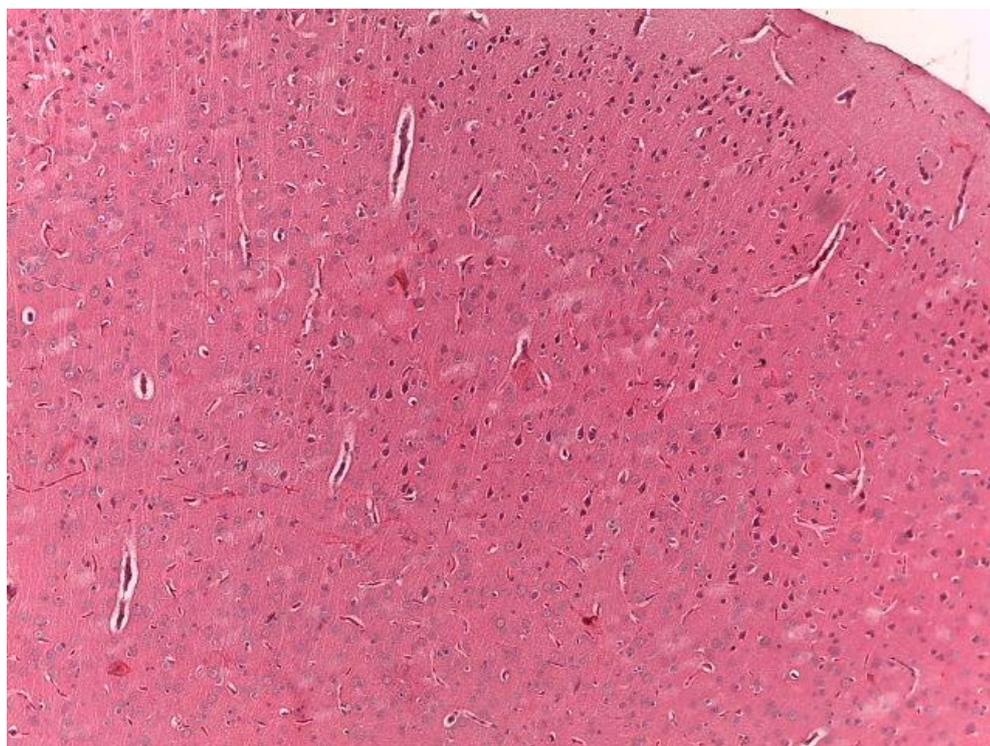


Рис. 7. Ткань головного мозга животных группы с фармакологической коррекцией PMS4OH. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x10.

Кора головного мозга этих же животных имела типичное строение, определялись пирамидные, звёздчатые, веретенообразные, паукообразные, горизонтальные нейроны, расположение нерезко отграниченными слоями. Молекулярный слой коры содержал небольшое количество мелких ассоциативных клеток веретеновидной формы. Наружный зернистый слой был образован мелкими нейронами, имеющими округлую, угловатую и пирамидальную форму, и звёздчатыми нейронами. Внутренний зернистый слой был образован мелкими звёздчатыми нейронами. Ганглионарный слой - крупными пирамидными клетками, которые характеризовались наличием крупных глыбок хроматофильного вещества. Слой мультиформных клеток был представлен нейронами различной, преимущественно веретенообразной формы. Внешняя зона этого слоя содержала более крупные клетки. Строение и кровенаполнение сосудистой оболочки, капилляров коры и базальных отделов не отличалось от группы положительного контроля. При окраске по Нисслю наблюдалась четко выраженная структура нейрона с аксоном и дендритами, мембрана нейрона была сохранна. Ядро округлой

формы, по периметру в основании дендритов определялось «тигроидное вещество», что свидетельствовало о восстановлении белково-синтетических процессов в клетке (рис.8), по сравнению с НПГ-группой без фармакокоррекции.

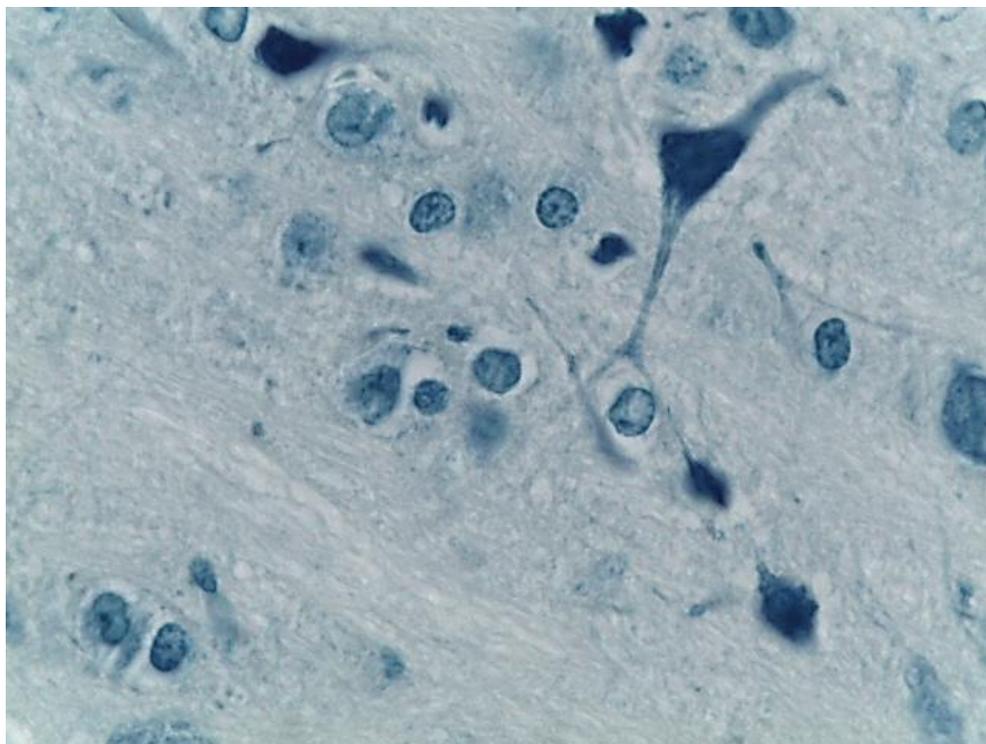


Рис 8. Нейроны коры головного мозга животных с фармакологической коррекцией PMS4OH. Окраска по Нислю. Увеличение x40.

Итак, в результате комплексного гистологического исследования лидером для фармакологической коррекции с точки зрения морфологических изменений в головном мозге является препарат PMS4OH. При изучении головного мозга у животных данной группы выявлены следующие морфологические признаки: сохранность стратификации коры головного мозга, восстановление белково-синтетических процессов в нейрональной ткани и функции эндотелиоцитов в сосудах головного мозга, по сравнению с группой НПГ. В целом, ткань головного мозга у животных, получавших PMS4OH, не имела достоверных отличий от таковой в контрольной группе.

Результаты морфометрического анализа состояния эндотелия сосудов головного мозга у животных исследуемых групп представлены в таблице 17.

Таблица 17.

Морфологические признаки состояния эндотелия сосудов головного мозга у крыс  
исследуемых групп

Признаки	Группы животных			
	ЛО	НПГ	Сулодексид	PMS4OH
1. Толщина интимы сосуда, мкм	1,57±0,03	1,21±0,12 <sup>#</sup>	1,48±0,08**	1,53±0,09**
2. Соотношение комплекса интима/медиа	0,41±0,09	0,63±0,08 <sup>#</sup>	0,49±0,05**	0,48±0,07**
3. Отек, плазморрагия стенки сосуда	отсутствует	++	+	отсутствует
4. Признаки воспаления	отсутствует	+++	+	отсутствует
5. Стаз, тромбоз	отсутствует	+++	+	+
6. Десквамация, некроз эндотелиоцитов	отсутствует	+++	+	+
7. Увеличение проницаемости эндотелия	отсутствует	+++	отсутствует	отсутствует
8. Пролиферация эндотелия	отсутствует	+++	+	+
9. Ядерно-цитоплазматическое отношения эндотелиоцитов	0,55±0,03	0,23±0,07 <sup>##</sup>	0,43±0,05**	0,45±0,04**
10. Размер ядер, мкм	3,19±0,09	1,69±0,17 <sup>#</sup>	2,41±0,11**	2,42±0,13**

Примечание: + - единичные морфологические элементы до 5 в поле зрения, ++ - от 5 до 10; +++ - более 10 по всему полю зрения; \*-,\*\* - различия статистически значимы по сравнению с группой животных с недостаточностью половых гормонов ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ );<sup>#</sup>;<sup>##</sup> различия статистически значимы по сравнению с группой ЛО-животных ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ )

Из представленных данных следует, что у животных с недостаточностью половых гормонов имеются выраженные изменения сосудов головного мозга, в виде отека, плазморрагии стенок сосудов и наличия признаков воспаления. Отмечаются нарушения реологических свойств крови, сопровождающиеся стазом и тромбозом на фоне увеличения проницаемости эндотелия. Выявлена активная пролиферация эндотелиоцитов, обусловленная некрозом и десквамацией эндотелиоцитов. Толщина интимы сосудов была достоверно меньше, чем у ЛО-крыс и составила  $1,21\pm 0,12$  мкм ( $p<0,05$ ). При недостаточности половых гормонов толщина интимы сосудов

головного мозга уменьшалась и составила  $1,21 \pm 0,12$  мкм, и, как следствие, нарушалось соотношение комплекса интима/медиа. Размер ядер эндотелиоцитов достоверно уменьшался по сравнению с ЛО-животными ( $1,69 \pm 0,17$  мкм и  $3,19 \pm 0,09$  мкм соответственно),  $p < 0,05$ . В результате ядерно-цитоплазматическое отношение снизилось до  $0,23 \pm 0,07$ .

При коррекции сулодексидом толщина интимы увеличилась по сравнению с группой крыс с НППГ и составила  $1,48 \pm 0,08$  мкм ( $p < 0,05$ ), соотношение комплекса интима/медиа -  $0,49 \pm 0,05$ . Размер ядер эпителиоцитов увеличился до  $2,41 \pm 0,11$  мкм и ядерно-цитоплазматическое отношение до  $0,43 \pm 0,05$ . Определялась незначительная пролиферация эндотелиоцитов, умеренный отек, явления стаза.

Препарат PMS4OH являлся безусловным лидером, при его применении толщина интимы сосудов головного мозга составила  $1,53 \pm 0,09$  мкм, что было достоверно выше, чем у крыс с НППГ ( $p < 0,01$ ) и не имела достоверных различий от такового показателя у животных контрольной группы. Размер ядер увеличился до  $2,42 \pm 0,13$  мкм, определялась незначительная пролиферация, явления отека и признаки воспаления отсутствовали.

#### **7.4 Заключение**

1) У животных с недостаточностью половых гормонов, по сравнению с ЛО-группой, наблюдается усиление воспалительных и пролиферативных процессов, выраженных в увеличении количества лейкоцитов в 1,47 раза, количества СРБ в плазме крови в 3,7 раза, морфологически выявленных признаков усиления процессов воспаления, отека и плазмораргии некроза и десквамации эндотелиоцитов в сосудах мозга, пролиферации эндотелия;

2) Введение препарата сравнения сулодексида и вещества PMS4OH позволило уменьшить выраженность воспалительных и пролиферативных процессов, относительно НППГ-группы, путем снижения СРБ в 1,54 и в 1,35 раза соответственно, морфологически выявленных признаков уменьшения процессов воспаления, отека и плазмораргии некроза и десквамации эндотелиоцитов в сосудах мозга, пролиферации эндотелия;

3) Модель ЭД, вызванная НПГ, приводит к выраженным морфо-функциональным изменениям в эндотелии и тканях головного мозга: дистрофические изменения нейронов, распыление тигроидного вещества, неравномерным кровенаполнением сосудов, периваскулярным отеком и дистрофическими изменениями эндотелия, количественно выраженным в снижении толщины интимы 1,3 раза, увеличении соотношения интимы/медии в 1,54 раза, уменьшении размера ядер и ядерно-цитоплазматических отношений в 1,89 и 2,4 раза соответственно.

4) Курсовое введение препарата сулодексида животным с НПГ позволило уменьшить вышеописанные изменения, но сохранялся периваскулярный отек отдельных участков головного мозга как в коре, так и в базальных отделах, количественно проявляющиеся в увеличении толщины интимы в 1,22 раза, снижении соотношения интимы/медии в 1,29 раза, увеличении размера ядер и ядерно-цитоплазматических отношений в 1,43 и в 1,87 раза соответственно;

5) Введение лидера PMS4OH более выражено снижали изменения морфо-функционального состояния при НПГ, чем применение сулодексида, и практически не отличались от таковых у крыс контрольной группы, что демонстрировалось увеличением толщины интимы в 1,26 раза, снижением соотношения интимы/медии в 1,31 раза, увеличением размера ядер и ядерно-цитоплазматических отношений в 1,43 и в 1,96 раза соответственно;

## ГЛАВА 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ RMS40H ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НПГ

С целью определения потенциальных путей реализации эндотелиотропного действия исследуемого соединения сначала осуществляли молекулярный прогноз, который затем подтверждали с помощью ИГХ и ИФА – анализов.

### 8.1 Прогноз биологической активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она с помощью программ молекулярной динамики

Предварительный анализ фармакологических свойств и возможных механизмов действия виртуальных структур исследуемых соединений (с общей формулой рисунок 9), программой PASS выявил, что все соединения ряда 2-винилзамещенных производных 6-метил-4-оксо-5-фенилпиримидина с фрагментом *n*-аминобензсульфамида в положении N1, могут обладать широким спектром фармакологических свойств. Наиболее характерными для большинства структур является возможное влияние на дофаминергическую систему, ингибирование ЦОГ и нитрат редуктаз, а также проявление мембраностабилизирующей активности.

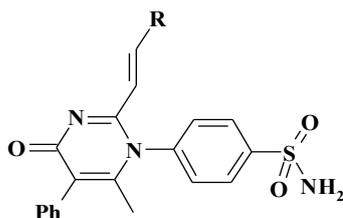


Рисунок №9. Общая химическая формула 2-стирилпроизводных 4-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида

С целью повышения достоверности молекулярного конструирования структур, влияющих на активность протеинкиназ, осуществлен молекулярный докинг: лиганд - биологическая мишень.

Результаты молекулярного докинга наиболее перспективных соединений показывают, что связывание лигандов с активным центром происходит различными

способами. Одна из конформаций соединения в активном центре протеинкиназы С, полученная путем моделирования молекулярной динамики, приведена на рисунке 10.

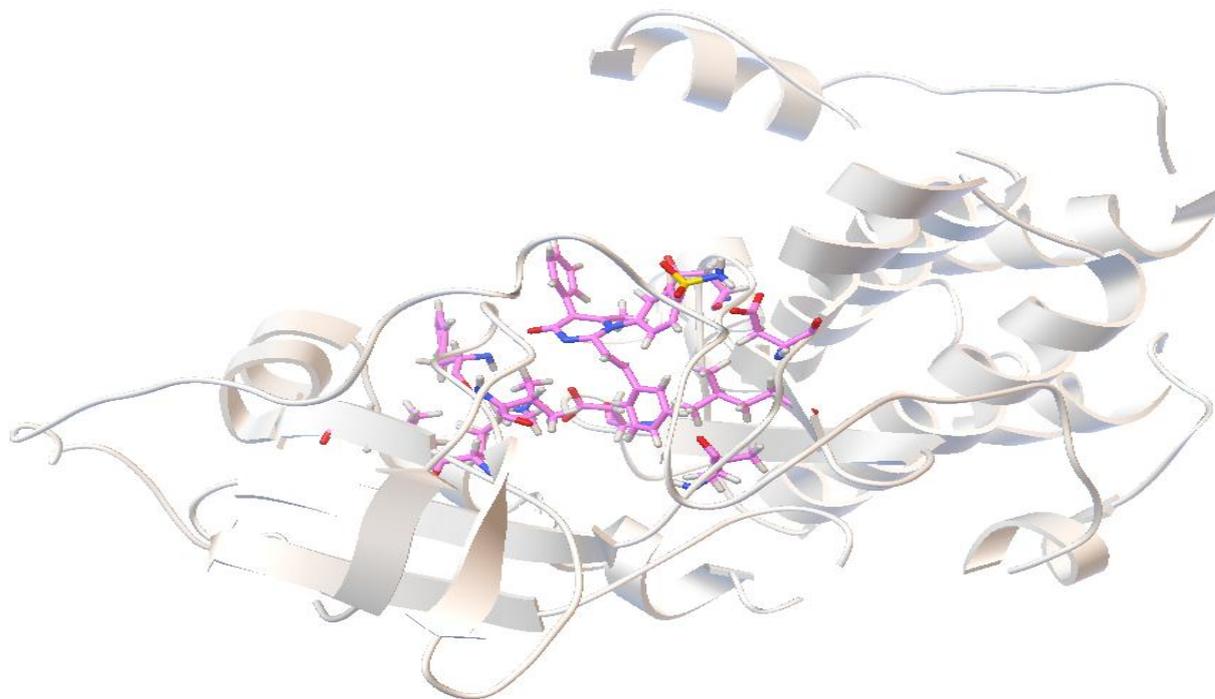


Рисунок 10. Расположение вещества №1 в активном центре протеинкиназы С-η

По результатам анализа молекулярных траекторий оценивалась средняя длительность связывания лигандов с аминокислотами активного центра протеинкиназы-С-η: ASP440, ASP483 LEU486 PHE366, а также рассчитывалась  $IC_{50}$ , или концентрация полумаксимального ингибирования и ее показатель -  $pIC_{50}$  (таблица 18).

Результаты молекулярной динамики 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она к активному центру ПКС

Название соединений	Длительность связывания с активным центром ПКС, нс	pIC50	IC50, нМ
AzoTF	0,3	-3,4	2662
PMS2NO245DiMeO	0,2	-4,0	8994
PMS34DiMeO	0,4	-3,0	1019
PMS4DMAB	0,0		
PMS4OH	0,8	-1,3	21
PMS5BroVn	0,2	-4,0	10690
PMS5MeSI	0,4	-3,0	1019
PMSB	0,6	-2,3	181
PMSmMeO	0,0	-4,8	64491
PMSoVn	0,2	-4,1	11455
PMSpMeOB	0,0		
PMSSI	0,3	-3,6	3662
PMSTbSI	0,0		
PMSTF	0,0		
QTF_	0,6	-2,0	92

Исходя из молекулярных прогнозов, наиболее выраженно связываться с ПКС будет соединение, у которого дольше время связывания с активным центром ПКС, меньше концентрация полумаксимального ингибирования и выше ее показатель.

Для дальнейшего фармакологического исследования, были отобраны соединения, обладающие разной степенью связывания с ПКС (выделены зеленым в таблице №3), и, отталкиваясь от того, что повышенная активность ПКС приводит к нарушению вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной и антипролиферативной функций эндотелия, то ее ингибирование с помощью экспериментальных соединений приведет к эндотелиопротекторному эффекту, причем, согласно расчетам, его выраженность будет убывать в ряду: PMS4OH > QTF ≥ PMSB > PMS5MeSI = PMS34DiMeO > AzoTF.

## **8.2 Проведение ИГХ-анализа срезов головного мозга крыс для выявления иммунопозитивных клеток к ПКС и eNOS на фоне экспериментальной терапии PMS4OH при ЭД, взванной НПГ**

Для оценки состояния ферментных систем эндотелия сосудов головного мозга ЛО-крыс было проведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител против eNOS. У животных ЛО-группы иммунопозитивные клетки эндотелия распределялись равномерно в сосудах оболочки, капиллярах головного мозга, а также сосудах Виллизиева круга (рис.11). Эндотелиоциты имели типичное строение с равномерным прокрашиванием цитоплазмы и более интенсивным прокрашиванием мембраны клеток, обращенной в просвет сосуда.

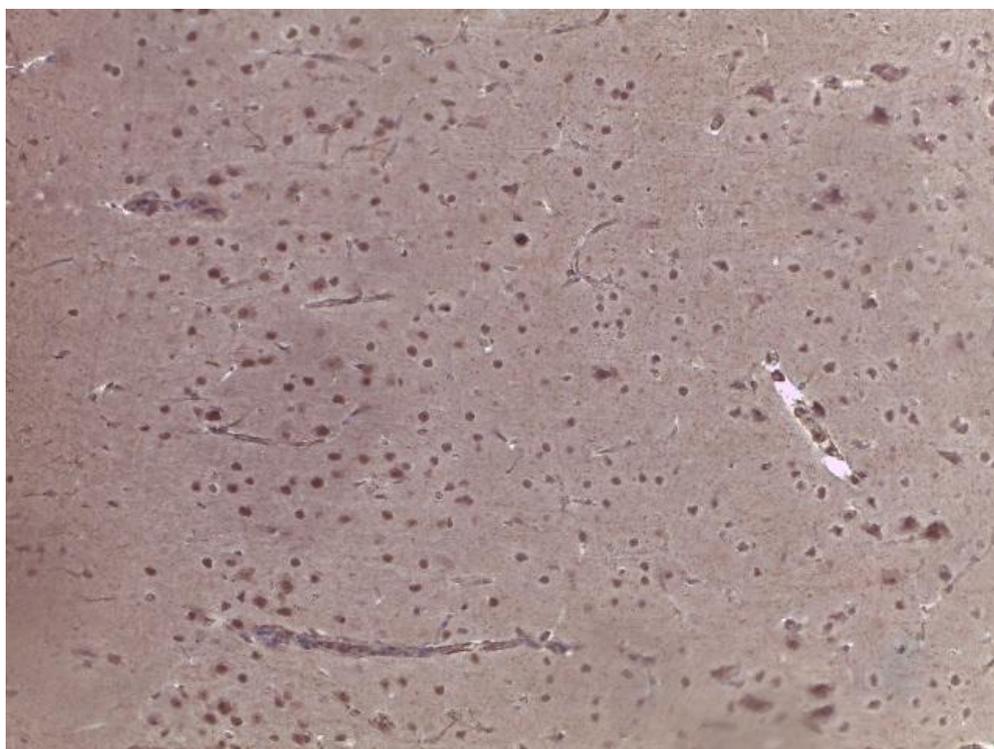


Рис. 11. Равномерное распределение иммунопозитивных эндотелиоцитов к eNOS в сосудах головного мозга животных контрольной группы. Увеличение x20.

Распределение изоферментов протеинкиназы С в ткани головного мозга животных ЛО-группы было неравномерным: определялись единичные иммунопозитивные клетки в базальных отделах головного мозга. Иммунопозитивные клетки были представлены компонентами микроглии и

единичными эндотелиоцитами, что соответствует физиологической норме. В коре головного мозга иммуноположительные клетки к протеинкиназе С отсутствовали (рис.12).

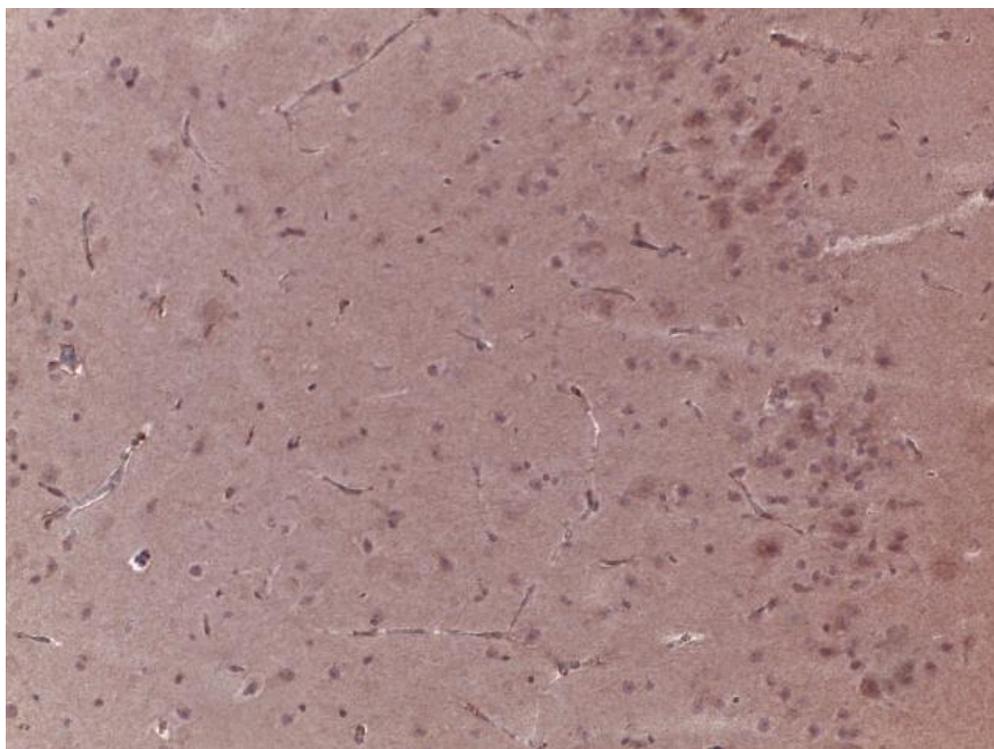


Рис. 12. Отсутствие иммунопозитивных клеток головного мозга крыс контрольной группы к протеинкиназе С. Увеличение x20.

ИГХ анализ экспрессии иммунопозитивных клеток к eNOS выявил единичные эндотелиоциты в базальных отделах головного мозга животных с НПГ, а также в сосудах оболочки головного мозга, в капиллярах коры иммунопозитивные клетки практически отсутствовали. Что может говорить о развитии эндотелиальной дисфункции в условиях НПГ, которая могла стать причиной спазма капилляров и дистрофическим изменениям нейронов (рис.13). При иммуногистохимическом исследовании клеток с помощью антител против протеинкиназы С выявлено значительное увеличение количества иммунопозитивных клеток, преимущественно за счет представительства микроглии, что, по-видимому, лежит в основе развития, выявленной нами ранее, глиальной реакции. Экспрессия иммунопозитивных клеток отмечалась в коре головного мозга, в то время как в

базальных отделах их представительство было минимальным (рис.14). Увеличение экспрессии ПКС может быть путем развития ЭД при НПГ [6].

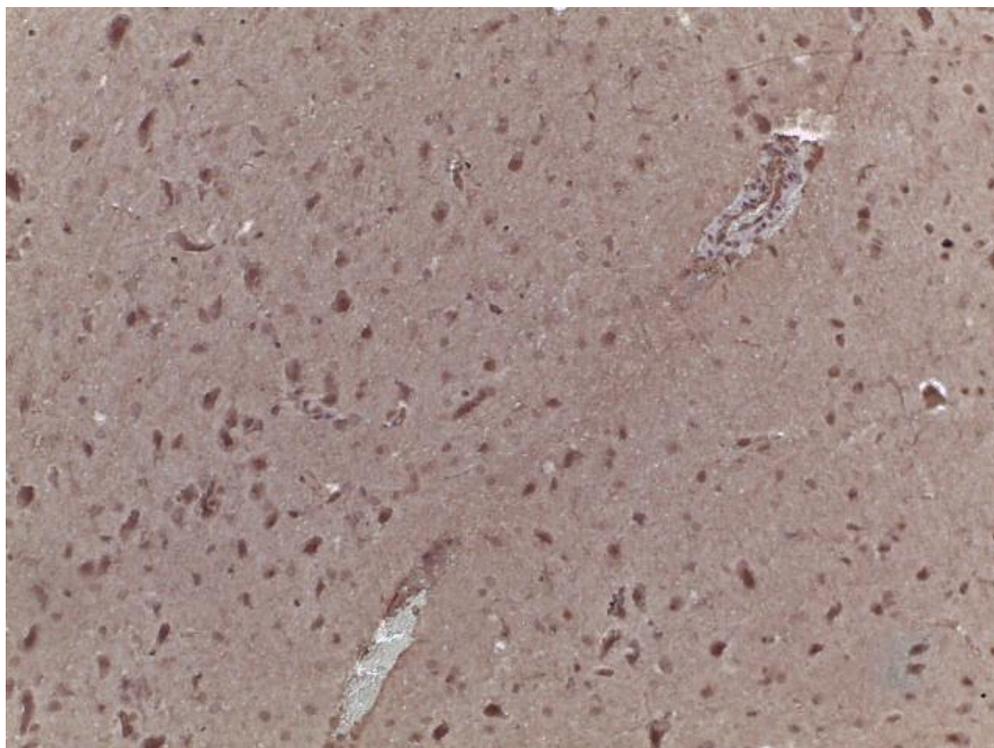


Рис. 13. Единичные иммунопозитивные к eNOS эндотелиоциты в капиллярах ткани головного мозга крыс при недостаточности половых гормонов. Ув.х20.

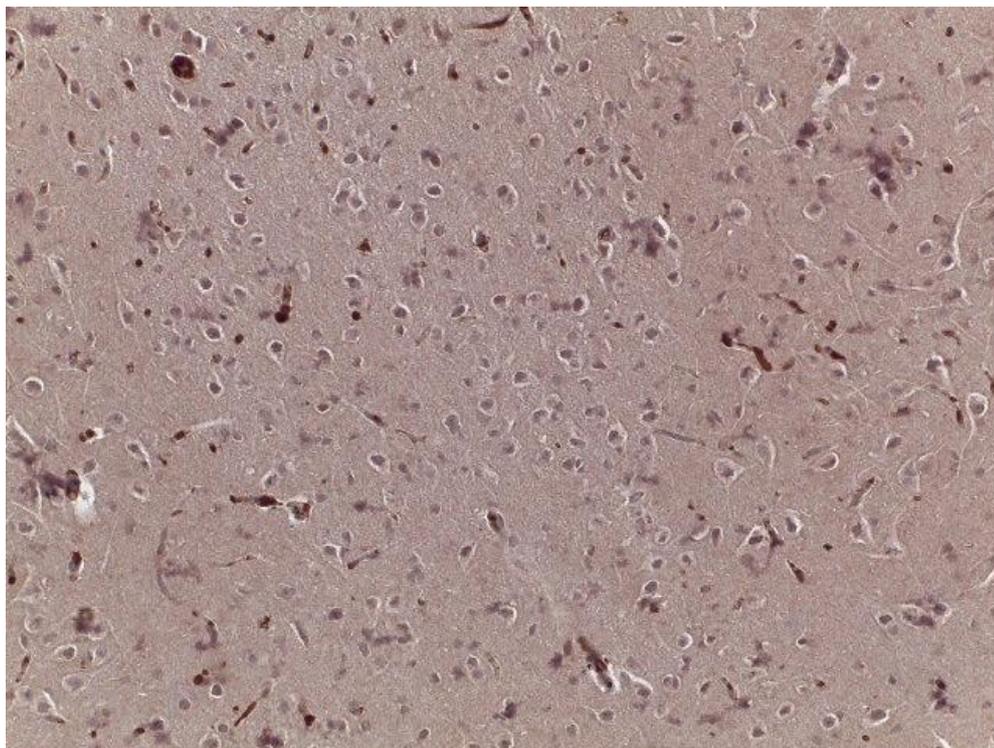


Рис. 14. Выраженная экспрессия иммунопозитивных клеток к протеинкиназе С в ткани головного мозга крыс с НПГ (негативный контроль). Ув.х20.

При анализе экспрессии иммунопозитивных клеток к системе eNOS в группе крыс, которым вводили сулодексид, было установлено их равномерное распределение во всех сосудах головного мозга с равномерным прокрашиванием цитоплазмы, аналогично группе положительного контроля (рис.15).

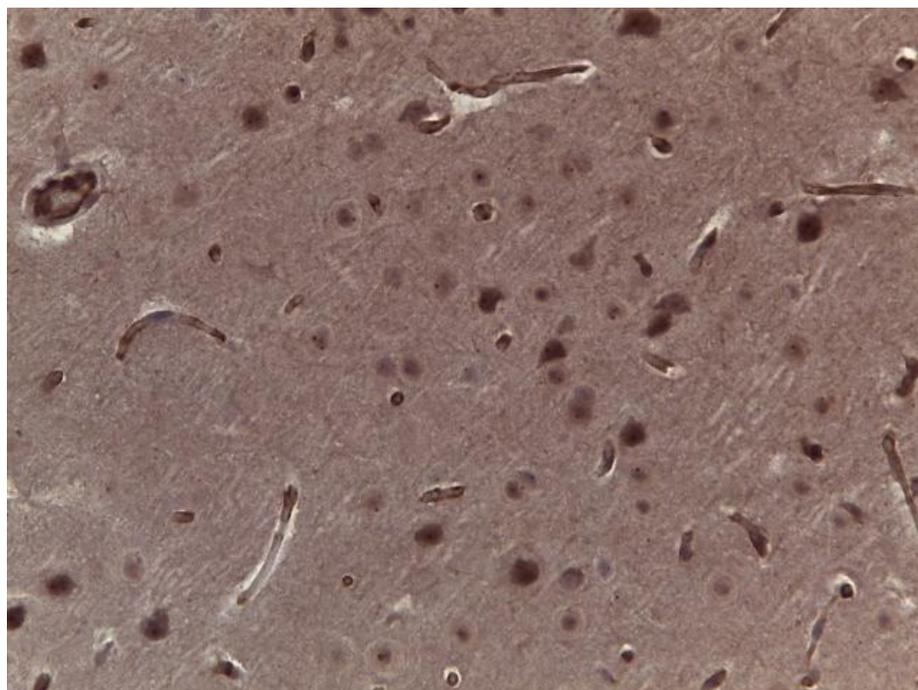


Рис. 15. Экспрессия иммунопозитивных клеток к eNOS в сосудах головного мозга крыс при фармакологической коррекции «Сулодексидом». Ув.х20.

У животных, которым водили сулодексид, количество иммунопозитивных клеток к изоферментам ПКС значительно превышало количество клеток в группе ЛО-крыс и не имело выраженных отличий с группой НПГ-животных. Иммунопозитивные клетки располагались преимущественно в базальных отделах и были представлены эндотелиоцитами капилляров коры головного мозга, а также иммунопозитивными глиальными клетками (рис. 16).

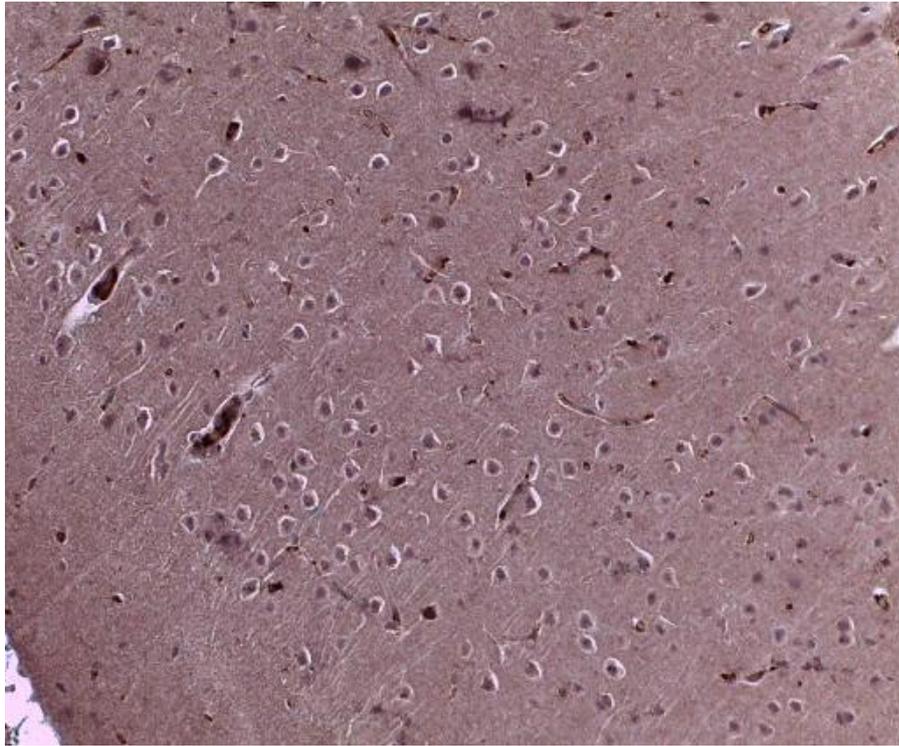


Рис. 16. Единичные иммунопозитивные клетки к протеинкиназе С в ткани головного мозга крыс при фармакологической коррекции «Сулодексид». Ув.х20.

Сравнительный анализ в группе крыс, которым вводили PMS4OH, клеточных компорментов стенки сосудов микроциркуляторного русла выявил наличие большого количества иммунопозитивных клеток интимы к eNOS, сопоставимых по количеству с контрольной группой. Иммунопозитивные клетки были выявлены во всех сосудах: как в капиллярах коры головного мозга, так и в сосудах мелкого и среднего калибра основания головного мозга, а также в сосудах оболочки (рис. 17).

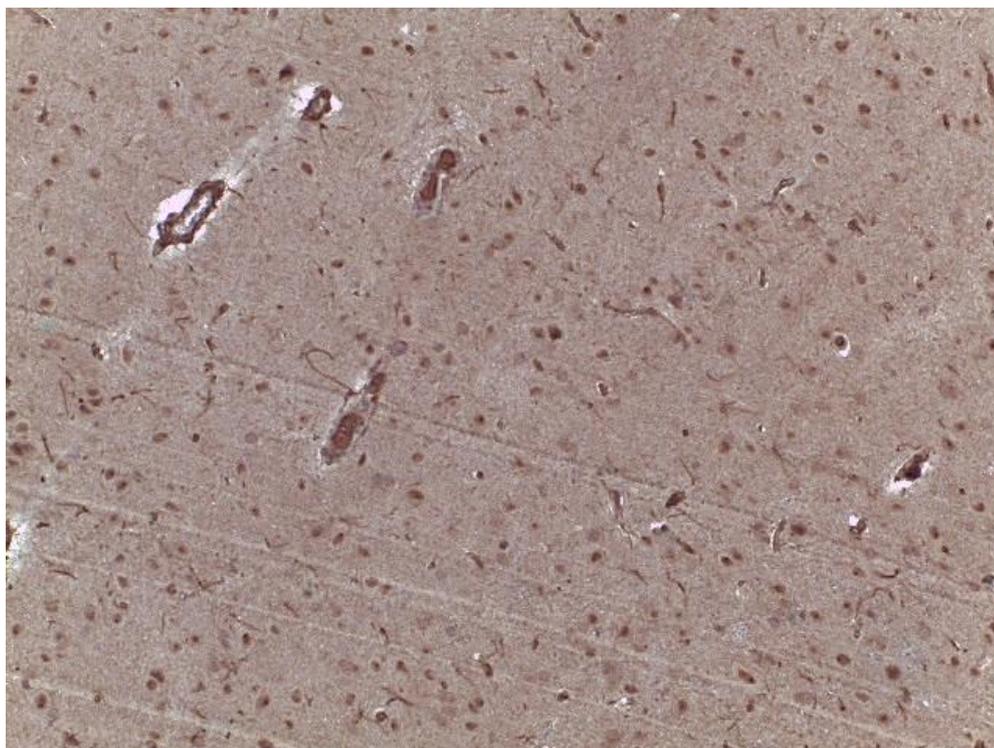


Рис. 17. Иммунопозитивные клетки сосудов головного мозга крыс к eNOS при фармакологической коррекции PMS4OH. Ув.х20.

При оценке гистотопографического распределения иммунопозитивных клеток к протеинкиназе С в PMS4OH-группе крыс были выявлены единичные клетки эндотелия капилляров головного мозга и микроглии, расположенные в коре головного мозга и его базальных отделах (рис.18) и не было выявлено достоверных отличий от группы положительного контроля.

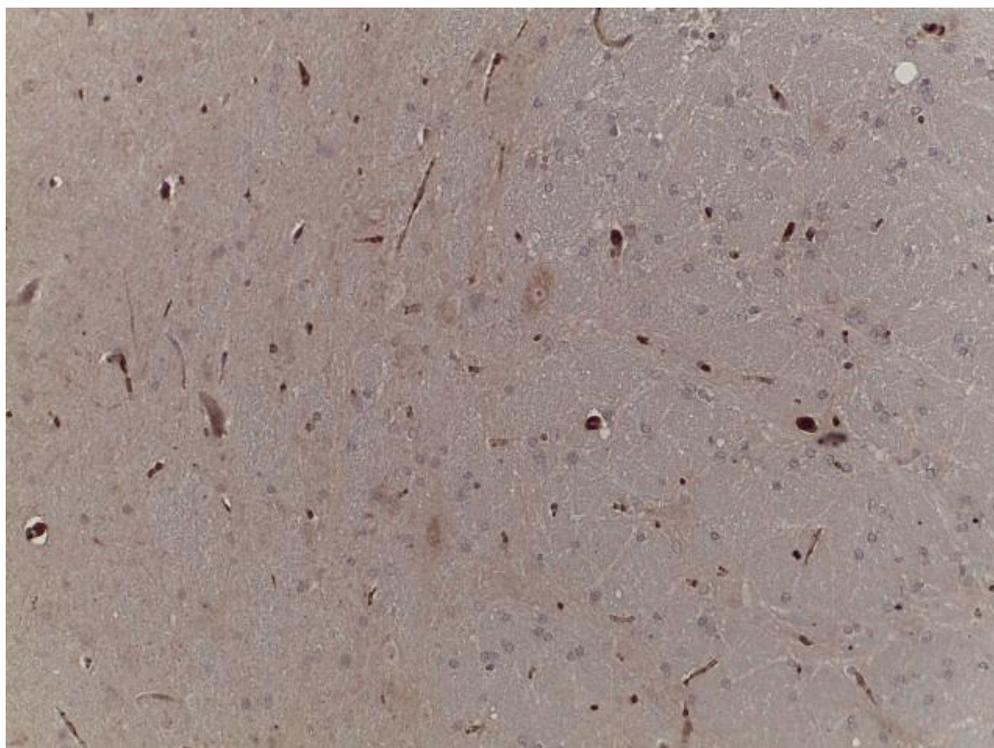


Рис.18. Незначительное количество иммунопозитивных клеток к протенкиназе С в ткани головного мозга крыс при фармакологической коррекции препаратом PMS4OH. Ув.х20.

Таким образом, исходя из результатов ИГХ исследования в основе нарушения работы эндотелия, выраженной в стазе крови в сосудах, их отеке, ухудшении морфологических характеристик ЭК лежит снижение экспрессии eNOS, повышение уровня ПКС, что, вероятно приводит к изменению структуры нейронов и глиальных клеток, с повышением уровня ПКС в последних, снижением белково-синтетических реакций. Введение препаратов позволило уменьшить эти изменения у крыс с НПГ.

### ***8.3 Проведение ИФА различных маркеров с целью определения потенциальных механизмов действия PMS4OH при ЭД, вызванной НПГ***

Для дальнейшего изучения механизма реализации эндотелиопротекторного действия исследуемого вещества PMS4OH целесообразно провести определение ИФА-методом уровня фермента ПКС, как потенциальную и прогнозируемую мишень для данного соединения [10,44], наряду с измерением маркеров ЭД:

асимметрического диметил-L-аргинина (ADMA) [9,146,168], eNOS, ее коферментов nNOS и iNOS [10,11,24,25], проагрегационного фактора TxA2 [14,77], матричной металлопротеиназы 1 (MMP1) – внеклеточной эндопептидазы, эндотелийспецифичного маркера воспаления и пролиферации [169,170,171]. Кроме того, необходимо при изучении механизма эндотелиопротекторной активности PMS4OH при НПГ оценить и исключить его влияние на уровень гормонов, регулирующих половой цикл и созревание фолликулов (ФСГ), а также на выделяемый ими эстрадиол (таблица 19 а,б).

Как видно из таблицы 19, при сравнении показателей группы негативного контроля с абсолютными значениями ЛО-группы наблюдалось выраженное снижение уровня эстрадиола в 3,01 раза у животных с НПГ. В тоже время уровень ФСГ у НПГ-самок был достоверно выше в 6,45 раза, чем в группе положительного контроля, что может говорить о эстрогеновой недостаточности и согласно данным [8] снижение эстрогенов ниже 30 нг/мл и повышения ФСГ выше 25 мМЕ/мл свидетельствует о наступлении менопаузы, что соответствует нашим значениям.

При определении эндотелиоспецифичных маркеров у животных с экспериментальной патологией наблюдалось статистически значимое снижение eNOS в 1,62 раза, на фоне повышения уровней nNOS в 1,47 раз, iNOS в 4,64 раз, ADMA в 2,5 раз, относительно ЛО-группы. Таким образом, наряду с уменьшением уровня eNOS, повышаются уровни nNOS, iNOS и ADMA что является нежелательным и указывает на возможные звенья механизма развития ЭД при НПГ.

Наряду с изменениями маркеров ЭД в НПГ-группе достоверно повышается уровень проагреганта тромбоцитов TxA2 в 6,69 раз, относительно ЛО-группы, что подтверждает повышение тромбогенного потенциала при ЭД, вызванного НПГ.

Увеличение MMP1 в плазме крови животных группы негативного контроля в 13,07 раз, при сравнении с ЛО-группой, что указывает на значительное усиление воспалительно-пролиферативных процессов в условиях системной патологии.

Таблица 19 (а,б)

Определение методом ИФА эстрадиола, ФСГ, ADMA, ТхА2, MMP1 (плазма крови), nNOS, iNOS, eNOS и ПКС (гомогенат) у крыс с НПГ, при экспериментальной фармакотерапии PMS4OH

Группа/ маркер	Эстрадиол, пг/мл	ФСГ, мМЕ/мл	nNOS, нг/мл	iNOS, нг/мл	eNOS, пг/мл
ЛО-группа	62,93±4,78	11,52±2,13	17,46±1,31	14,19±0,59	112,42±6,96
НПГ- группа	20,89±3,15*	74,28±7,13**	24,53±2,56***	65,15±13,69***	69,39±7,12*
Сулодексид – группа	22,01±2,88*	66,92±4,64*	24,89±5,21	45,9±6,34*	114,88±11,27 <sup>#</sup>
PMS4OH - группа	18,5±2,82*	63,95±5,56*	23,99±3,84	49,32±4,18*	128,83±11,28 <sup>#</sup>

а)

Группа/ маркер	ADMA, нг/мл	ТхА2, нг/мл	MMP1, нг/мл	ПКС, нг/мл
ЛО-группа	31,78±2,25	12,98±2,05	27,03±1,31	44,16±7,89
НПГ-группа	80,93±7,14**	86,55±14,4*	353,1±19,86*	272,23±19,28*
Сулодексид – группа	56,83±5,29 <sup>##,*</sup>	51,38±5,37 <sup>##,*</sup>	243,1±14,12 <sup>#,*</sup>	257,33±10,76*
PMS4OH - группа	47,82±6,08 <sup>##,***</sup>	53,68±6,6 <sup>##,*</sup>	131,33±40,92 <sup>##</sup> , αα,***	142,18±30,81 <sup>##,α,*</sup>

б)

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$ , \*\* -  $P \leq 0,02$ , \*\*\*-  $P \leq 0,05$ - достоверно по отношению к аналогичным показателям ЛО-группы; # -  $P \leq 0,02$ , ## -  $P \leq 0,05$ - достоверно по отношению к аналогичным показателям НПГ-группы; α -  $P \leq 0,02$ , αα -  $P \leq 0,05$  - достоверно по отношению к аналогичным показателям группы, которым вводили сулодексид

Вместе с изменениями выше описанных маркеров в плазме крови ОВЭ животных наблюдалось выраженное повышение уровня ПКС (в 6,18 раз), относительно ЛО-группы, что является крайне нежелательным и может быть ключевым звеном нарушения основных функций эндотелия при гормональном дисбалансе и ЭД.

Введение препарата сравнения, обладающего выраженными эндотелиопротекторными свойствами [146,147], к изменению гормонального фона (ФСГ и эстрадиола) не приводило, если сравнивать с НПГ самками не подвергавшихся терапии. При применении сулодексида наблюдалось достоверное изменение уровней маркеров ЭД: увеличение eNOS в 1,67 раз и снижении ADMA в 2,53 раза, относительно НПГ, при отсутствии достоверных отличий в уровне eNOS с ЛО-группой. Достоверных изменений концентраций nNOS и iNOS не отмечалось, что указывает на слабое влияние на эти системы препарата сравнения. Снижение уровня TxA2 в 1,7 раз в сулодексид-группе демонстрирует улучшение антиагрегационного потенциала в условиях НПГ. Достоверное уменьшение концентрации MMP1 в плазме крови при лечении сулодексидом крыс с эстрогеновой недостаточностью в 1,46 раза, при сравнении с НПГ-группой, характеризуя уменьшение интенсивности воспалительно-пролиферативных процессов. Необходимо подчеркнуть, что изменение уровня ПКС сулодексид, по сравнению с НПГ-группой, не вызывает.

Экспериментальное лечение животных с НПГ исследуемым соединением PMS4OH изменений уровня эстрадиола и количества ФСГ не вызывает, аналогично НПГ- и сулодексид – группам. Введение PMS4OH позволило уменьшить ЭД путем увеличения концентрации eNOS в 1,87 раз (не отличалось от значений ЛО-группы) и снижению ADMA в 1,69 раз у крыс с овариэктомией. Интересно, что изменения эндотелиальных маркеров коррелируют со снижением, относительно группы негативного контроля, агрегационного фактора тромбоцитов TxA2 в 1,61 раза, уменьшением MMP1 в 2,69 раз и уровня ПКС в 1,92 раза, но при этом эти показатели сохраняли достоверную разницу со значениями ЛО-группы.

Важно подчеркнуть, что препарат сравнения и PMS4OH продемонстрировали высокую активность на состояние показателей, определяемых ИФА методом, причем PMS4OH превосходил сулодексид по влиянию на уровни MMP1 (в 1,86 раза) и ПКС (1,81 раза), что, судя по всему, связано с различными механизмами реализации эндотелиотропного действия.

## 8. 4 Заключение

1) Результаты, полученные с помощью программ молекулярного конструирования, выявили способность производных пиримидина связываться с активными центрами ПКС, которая уменьшается в ряду: PMS4OH > QTF  $\geq$  PMSB > PMS5MeSl = PMS34DiMeO > AzoTF.

2) НПГ, вызванная экстирпацией матки с придатками, приводит к выраженному снижению уровня эстрадиола и повышению ФСГ, свидетельствуя о наступлении менопаузы у самок. Эстрогеновая недостаточность половых гормонов приводит к ухудшению эндотелиальных маркеров ЭД (увеличению ADMA, pNOS, iNOS и снижению eNOS) и коррелирует с повышением уровней TxA<sub>2</sub>, MMP1 и ПКС.

3) Введение препарата сравнения и исследуемого вещества позволило уменьшить нарушения функциональной активности ЭК путем увеличения количества eNOS и уменьшения ADMA, TxA<sub>2</sub>, MMP1 и не изменяя уровни ФСГ и эстрадиола, что исключает этот механизм эндотелипротекторного действия.

4) PMS4OH превосходил сулодексид по влиянию на MMP1 (в 1,86 раза) и ПКС (1,81 раза), что судя по всему связано с различными механизмами реализации эндотелиотропного действия.

5) Более выраженное влияние PMS4OH, чем сулодексида на уровень ПКС подтверждается ИГХ-методом у крыс с НПГ, причем сулодексид сопоставимо с PMS4OH изменял уровень eNOS, но на уровень ПКС почти не влиял.

6) Уровень ПКС достоверно снижал только PMS4OH и в совокупности с прогнозами позволяет предположить, что снижение активности ПКС является звеном механизма реализации эндотелиопротекторного действия исследуемого вещества.

## ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным ВОЗ смертность, инвалидность и снижение качества больных с сердечно-сосудистой патологией возрастает и общим звеном патофизиологии этих заболеваний является дисфункция эндотелия. При этом наблюдается нарушение работы ЭК, которое заключается в смещении синтеза БАВ эндотелием и изменениям его функций в сторону вазоконстрикции, повышения тромбогенного потенциала и усиления воспалительно-пролиферативных и др. процессов, что отчетливее всего наблюдается при снижении эффектов эстрогеновых гормонов и повышении активности ПКС [5,6,7,8].

Установлено [12], что ПКС экспрессируются во всех тканях и на разных этапах развития. ПКС участвует в регуляции сосудистого тонуса, воспаления, влияет на процессы тромбообразования, пролиферации, дифференцировки клеток. В то же время при патологических состояниях они приобретают уникальные и противоположные свойства [58,59]. Увеличение активации ПКС наблюдалось при злокачественных новообразованиях, острых и хронических болезнях легких, почек, ССЗ, аутоимунных и нервно-психических [12,105,114-120]. В эндотелии содержатся различные изоформы ПКС:  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  и практически не содержат  $\gamma$  [13], причем экспрессия изоферментов ПКС может быть связана с эффектами эстрогенов [60].

Кроме того, оказалось, что у самцов уровни ПКС- $\alpha$  и ПКС- $\delta$  выше, чем у самок, а ПКС- $\zeta$  более выражена у самок, и активность ПКС может зависеть как от уровня эстрогенов, так и от рецепторов для эстрогенов [60].

В ЭК супероксидный радикал может активировать ПКС различными механизмами и самостоятельно ПКС приводит к образованию свободных радикалов, формируя тем самым «порочный круг активации ПКС» [17].

В миоцитах гладких мышц основная роль ПКС состоит в повышении чувствительности микрофиламентов к ионам кальция, что приводит к вазоконстрикции [70]. Кроме того, ПКС фосфорилирует потенциал-зависимые кальциевые каналы, ингибируют калиевые, связывает многие другие

внутриклеточные сигнальные пути включающие киназу легких цепей миозина, систему оксида азота, систему внутриклеточного кальциевого депо, тирозинкиназу и ее субстраты, такие как митогенактивируемая протеинкиназа (МАПК) и Таким образом ПКС имеет мультифакторный спектр влияния на многие процессы, в том числе приводящие к церебральному вазоспазму [71,72].

В процессах тромбообразования ПКС- $\alpha$  и - $\beta$ , как типичные изоферменты, в соответствии с [81] усиливают процессы агрегации (секреция электроноплотных и  $\alpha$  гранул, экспрессия интегрин  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3), и в итоге стимулирующая роль ПКС на процесс тромбообразования является преобладающей[80].

В ЭК экспрессия антигенных молекул занимает центральную роль в воспалительных реакциях - ПКС может быть посредником в экспрессии молекул адгезии – VCAM, ICAM и E-селектина при воздействии на ЭК пупочной вены ФНО и ИЛ-1[7,77,87]. Важно подчеркнуть роль отдельных изоферментов ПКС в воспалении. Провоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ) -1 $\beta$  играет большую роль в повышении проницаемости ГЭБ и способствует его отеку посредством повышения активности ПКС- $\theta$ . Некоторые исследования показали, что ФНО- $\alpha$  может вызвать ЭД и даже апоптоз ЭК посредством повышения активности ПКС- $\beta$  (2) и ПКС- $\zeta$ , которые в свою очередь приводят к активации и продукции АФК. Также ПКС-активированная НАДФН-оксидаза и пути сигнализации NF- $\kappa$ B/TLR-4 играют большую роль в миграции ЭК [88,89,90,91].

В процессах ангиогенеза большую роль отводят VEGF и основному фактору роста фибробластов (bFGF), которые индуцируют пролиферативные процессы посредством активации ПКС [53] и ингибирование ПКС подавляет VEGF-индуцированный ангиогенез, но повышает VEGF-индуцируемую NO-зависимую проницаемость сосудов. Влияние ПКС на процессы пролиферации довольно противоречивое, что может быть связано с действием многих факторов, в том числе с различными эффектами изоферментов ПКС, функции которых имеют существенные отличия: ПКС- $\beta$ 2 приводит к митогенному эффекту VEGF, аденовирусная избыточная экспрессия ПКС- $\alpha$  может как повышать миграцию эндотелиальных клеток [97] , так и снижать активность ПКС- $\delta$  [98].

В нервной ткани в частности ПКС-ε участвует в ишемическом прекондиционировании. Свой эффект оказывает ПКС эпсилон за счет активации митохондриальной альдегиддегидрогеназы 2, которая обезвреживает продукты СПОЛ [99]. ПКС активирует ERK и MAPK – киназные пути, участвующие в антиапоптотических сигнальных процессах и способствующие выживанию клеток [100]. Установлена роль нейронной ПКС-γ в глутамат-индуцированной эксайтотоксичности [101] и роль ПКС-δ в запоздалых процессах апоптоза во время реперфузии [105,106].

На основе литературного обзора и вышеизложенного материала, а также данных по митоген-активируемым протеинкиназам [172,173,174,175], для наглядности представляем схему возможных путей регуляции eNOS с помощью протеинкиназ (ПК). Осуществление регуляции eNOS в условиях нормы и патологии может проходить разными механизмами (рисунок 19). Внешние рецепторные сигналы посредством протеинкиназ могут влиять на процесс образования оксида азота из аргинина, который сводится к переносу электронов с оксигеназного домена на редуктазный, причем дефосфорилируя оксигеназный домен по серину-116 и треонину-495 и фосфорилируя редуктазный домен по серину-1177, они повышают активность eNOS-системы и образование ею оксида азота, отвечающего за функции эндотелия [11,33].

Интересно отметить, что из большинства киназ (ПКГ, ПКВ, ПКСа, АМПК, СаМК), представленных на схеме, практически все повышают активность eNOS, фосфорилируя редуктазный домен по серину-1177. Только ПКА наряду с этим еще и дефосфорилирует треонин-495 и также может повышать образование оксида азота [11,33] и улучшать ЭФ.

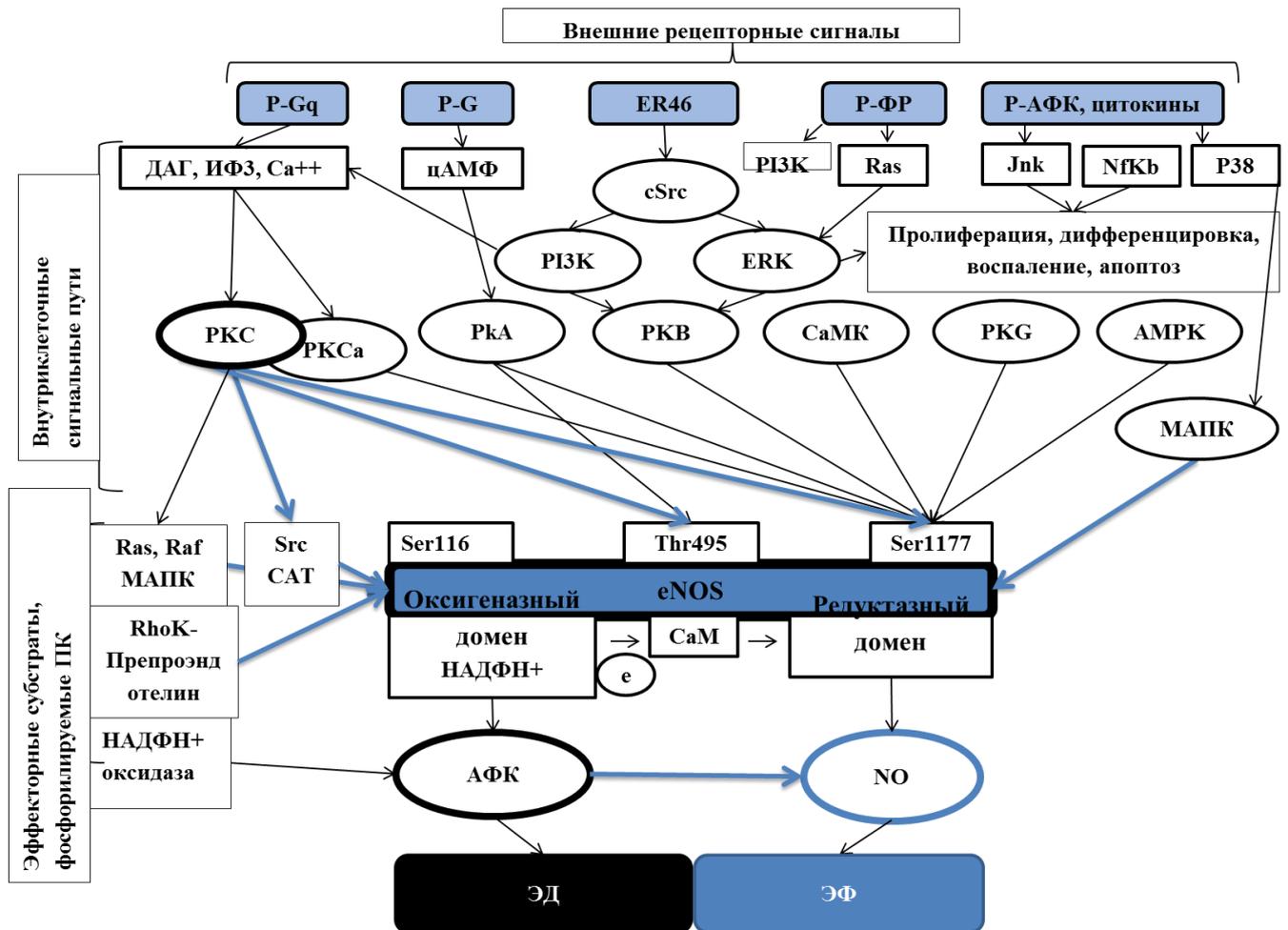


Рис. 19. Схема киназных путей, регулирующих активность eNOS.

Примечание: ER46 – рецепторы для эстрогеновых гормонов; P-ФР – рецепторы факторов роста; P- G – рецепторы, связанные с G-белками; P – АФК – рецепторы для цитокинов и активных форм кислорода; Erk, Ras, Raf, Jnk, p38, NfKb – белки посредники в сигнальных путях MAPK (митогенактивируемые протеинкиназы); cSrc – тирозинкиназа; PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназы; DAG – диацилглицерол; ИФ3 – инозитол-3-фосфат; PKC,PKA,PKB,PKG – протеинкиназы C, A, B, G; AMPK – 5АМФ-активируемая протеинкиназа; САТ – белок-транспортер для L-аргинина; RhoK - Rho-киназа; e – электроны; Ser – аминокислота серин; Thr – аминокислота треонин; CaM – кальмодулин; CaMK – кальмодулин-активируемая протеинкиназа; ЭФ – эндотелиальная функция; ЭД – эндотелиальная дисфункция.

Тонкие стрелки указывают на субстрат (или процесс), активность которого увеличивается;

Толстые стрелки указывают на субстрат (или процесс), активность которого уменьшается;

Негативное влияние PKC на процесс образования оксида азота, согласно литературному обзору более выражено, причем PKC не только прямо может

уменьшать работу системы, но и также может - уменьшать транспорт аргинина через транспортер CAT в ЭК, снижать активность src – киназ и повышая Rho-киназ (приводят к образованию эндотелина), повышать активность НАФН+оксидазы и образование АФК, что в условиях патологии в совокупности приводит к разобщению работы элементов eNOS-системы, которая вместо образования оксида азота увеличивает уровни АФК и способствует развитию ЭД. Причем такая картина характерна для НПГ [5,159,160,162,163].

Исходя из всей проанализированной информации, можно предположить, что в условиях ЭД, когда НПГ приводит к снижению активности многих сигнальных путей регулирующих eNOS, повышение активности ПКС может носить как патологический, так и компенсаторно-приспособительный характер (например, ПКСα, которая может активировать и eNOS; ПКСε, участвующая в ишемическом прекондиционировании), не улучшающий работу в достаточной мере всех элементов системы eNOS, что приводит к образованию ею АФК, а не оксида азота и способствует развитию ЭД. Так или иначе, снижать в таких условиях активность ПКС терапевтически выгодно, что будет уменьшать не только ее негативное влияние на eNOS, но на этом фоне другие протеинкиназы смогут лучше выполнять свои функции по регулированию работы эндотелиальной системы и улучшать выполняемые ей функции.

НПГ может приводить прямо или опосредованного к увеличению активности ПКС [7,8,60,61], возможно путем увеличения АФК, эндотелина-1 или посредством ядерных механизмов [17]. Для коррекции нарушенных функций предлагается группа производных пиримидина, обладающих потенциальной тропностью к активным центрам ПКС.

На начальных этапах исследования проводили изучение вазодилатирующей функции эндотелия при введении эндотелиоспецифических анализаторов АХ и L-NAME и измерение соответствующих колебаний АД в группе без фармакотерапии.

При изучении вазодилатирующей функции эндотелия введение эндотелиоспецифического анализатора АХ привело к значительному увеличению СК в ЛО-группе с соответствующим снижением АД, что объясняется

стимулированием выброса сосудорасширяющих веществ эндотелием, главным из которых является оксид азота синтезируемым eNOS. Введение L-NAME приводило к снижению СК и повышению АД, что согласуется с другими исследованиями и, вероятно, связано с конкурентной блокадой субстратного центра связывания L-аргинина eNOS-системы [10]. Также уменьшенная реакция на АХ, введенный после L-NAME, в виде менее выраженного подъема СК и снижения АД, чем до, также говорит о L-NAME-индуцированном нарушении вазодилатирующей функции эндотелия. Данная тенденция на введение анализаторов согласуется с предыдущими исследованиями [144,154].

Модели ЭД, вызванная НПГ, привела к неоднозначным изменениям СК и АД, и всех животных негативного контроля по этим показателям распределили на 3 группы и, таким образом, продемонстрировано 3 возможных варианта сосудистой реакции при введении анализаторов:

1) В первой группе направленность изменений СК и АД при введении анализаторов была такая же, как в ЛО-группе, но выражена меньше, также колебания АД со СК. Кроме того, исходная СК была ниже, а показатели АД выше, чем у ЛО-животных;

2) Вторую группу отличает от животных первой более выраженное снижение СК при введении L-NAME (недостоверно отличается от ЛО-группы) при показателях АД, аналогичных первой. Интересно отметить, что при повторном введении АХ наблюдается снижение кровотока ниже его исходного уровня, что может отражать тяжелые нарушения в работе эндотелиальной системы [7,144], которые, возможно, приводят к напряжению работы систем, обеспечивающих адекватное кровоснабжение головного мозга, в которых эндотелиальный механизм играет значительную роль [157,158].

3) В третьей группе при введении L-NAME наблюдается обратная реакция, в отличие от других групп – СК достоверно увеличивается, а АД снижается. Также интересно отметить, что введение АХ после блокады с помощью L-NAME приводит у этой группы к увеличению СК и снижению АД достоверно не отличающихся с таковыми у ЛО-группы и отличающиеся от группы НПГ №1 и №2.

Можно предположить, что данный феномен в третьей группе связан со следующими особенностями функционирования eNOS-системы. Как уже отмечалось выше, работа eNOS-системы сводится к передаче электронов к оксигеназному домену, где происходит окисление L-аргинина с образованием цитруллина и оксида азота [10,44]. Существенно и то, что результатом работы eNOS-системы может быть не только образование оксида азота, но и продукция супероксидного радикала. Таким образом, эндотелиальная система поддерживает тонкий баланс между образованием NO и активных форм кислорода (АФК) [160]. При различных нарушениях эндотелиальной функции, вызванной эндокринными заболеваниями [161] или др. факторами [159,162] может возникать разобщение работы eNOS-системы, при которой повышается активность НАДФН-оксидазы (структурный элемент eNOS, генерирующий АФК) [161], уменьшается уровень тетрагидроптерина (Н4В, кофактор eNOS) [159,161,162], увеличивается уровень супероксидного радикала и пероксинитрита. Также может увеличиваться активность ЦОГ и продукция ТхА2, который приводит к вазоконстрикции [162]. Существенно и то, что введение L-NAME и Н4В может приводить к снижению уровней АФК и уменьшению вазоконстрикции [161,162]. Необходимо здесь же отметить, что в других исследованиях введение селективного модулятора эстрогеновых рецепторов ралоксифена приводило к уменьшению ЭД, вызванной свободно-перекисным окислением, причем ралоксифен повышал ЭФ посредством увеличения фосфорилирования Akt-киназой eNOS, а не путем связывания АФК, ни увеличением уровня супероксиддисмутазы или уменьшения активности ксантиоксидазы [160].

Возможно, такая парадоксальная реакция на введение L-NAME, и на АХ, вводимый после L-NAME, связана с тем, что L-NAME может уменьшать разобщение работы eNOS-системы (проявляющееся в увеличении синтеза свободных радикалов), вызванное НПГ, что, в свою очередь, может приводить к увеличению СК и снижению АД [159,160,161,162].

Таким образом, можно сказать, что развитие ЭД при НПГ, можно оценить по снижению АХ-индуцированной СК и увеличению АД, и чем выраженнее проявление этого, тем, возможно, сильнее нарушены процессы ЭЗВД. Отклонения реакции на

введение L-NAME и АХ после инъекции L-NAME, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения СК (а также колебания АД), отличное от показателей ЛО-группы может говорить о развитии вазодилатирующей дисфункции, причина которой может крыться в различных механизмах нарушения работы eNOS (возможно блокада продукции eNOS либо оксида азота, либо АФК, что, вероятно, зависит от степени повреждения ЭК и разобщения работы eNOS).

Дальнейшее исследование включало скрининг выделенных производных фармакологическими методами. Влияние исследуемых производных и препарата сравнения вазодилатирующую функцию оценивался путем измерения АХ-индуцированного прироста кровотока в бассейне СМА, что позволило выделить PMS4ОН как лидера, по влиянию на этот показатель.

Также проводили исследование влияния выбранных производных на антиагрегационную активность тромбоцитов путем анализа скорости и степени агрегации при введении в плазму индуктора агрегации АДФ и лидером по этим показателям оказался PMS4ОН.

Таким образом, лидером по связыванию по влиянию на вазодилатирующую функцию эндотелия и антиагрегационную является соединение PMS4ОН, с которым продолжали дальнейшее исследование. Кроме того, дальнейшее проведение расчетов с помощью программ молекулярной динамики показало наиболее длительное время связывание с С3-субстратным центром ПКС у соединения PMS4ОН, подтвержденных, впоследствии, ИГХ и ИФА анализами, что позволяет говорить о снижающем влиянии PMS4ОН на активность ПКС.

Дальнейшее исследование включало оценку вазодилатирующей функции эндотелия при введении эндотелиоспецифичных анализаторов: АХ, L-аргинина и L-NAME. Так как предыдущие исследования показали, что реакции на введение L-NAME и АХ после инъекции L-NAME могут иметь разнонаправленный характер, то целесообразным считалось измерять СК в разные периоды развития ЭД (1-й период – до моделирования НППГ, второй – 14-й день и последний – 28-й день) для уменьшения вероятности получения ошибочных результатов на фоне экспериментального лечения.

В ЛО-группе при первом измерении СК наблюдались характерные для интактных животных реакции: значительное увеличение СК при введении АХ, отсутствие ответа на введение L-аргинина, незначительное снижение СК при введении L-NAME, и менее выраженная реакция на введённый АХ после L-NAME. Показатели второго и третьего периодов измерений практически не отличались от первого. Наблюдалось незначительное увеличение ответа на введение L-аргинина, и менее выраженный эффект от L-NAME, во 2-ом и 3-ем измерениях относительно первого, что может быть связано с различными факторами (хирургическое воздействие, трепанация и репозиция части костей черепа крысы, влияние наркоза, индивидуальные особенности животных и т.д.).

Первые измерения в группе НПГ привели к показателям, аналогичным первому измерению ЛО-группы, указывающая на то, что вазодилатирующая способность эндотелия обеих групп животных на начальном этапе эксперимента была на одном уровне.

Второе измерение привело к снижению СК при введении АХ, уменьшению реакции на АХ после применения L-NAME, что указывает на ухудшении работы ЭК. Третье измерение приводило к еще более выраженному снижению исходной СК, уменьшению реакции на АХ, повышению ответа при введении L-аргинина, инверсии ответа при введении L-NAME и парадоксальному увеличению СК, снижению СК при введении АХ на фоне действия L-NAME.

Данные результаты свидетельствуют о развитии и дальнейшем усугублении эндотелиальной дисфункции, вызванной НПГ, выраженной в изменении сосудистого ответа при введении анализаторов и снижении базальной СК и не противоречат предыдущим исследованиям [144,147,151,154]. Эти изменения могут быть связаны с недостаточностью эффектов эстрогеновых половых гормонов, которая приводит к нарушению функций эндотелия, работы eNOS-системы, накоплению метилированных производных аминокислот, снижению выброса вазодилатирующих веществ, главным из которых является оксид азота и др. Как видно из цифр СК, при ЭД снижается реакция на АХ, увеличивается ответ на введение L-аргинина (что описывает феномен т.н. «L-аргининового парадокса»

[9,146,177]), в меньшей степени снижается кровоток на введение L-NAME, кроме того последний может увеличиваться. Возможно, такая реакция на введение L-NAME, и на АХ, вводимый после L-NAME, связана с тем, что L-NAME может уменьшать синтез eNOS-системой свободных радикалов, вызванный НПГ, что, в свою очередь, может приводить к увеличению СК [159,160], как указывалось ранее при описании различных вариантов сосудистых реакций.

Введение исследуемого вещества-лидера PMS4OH, приводило к улучшению вазодилатирующей функции эндотелия, выраженной в изменении СК по направленности и выраженности приближающимся к показателям ЛО-группы. Интересно отметить, что эффект, наблюдаемый у группы животных, которым вводили исследуемое вещество, выраженный в улучшении функции эндотелия, наблюдается во втором и третьем периоде измерений, в то время как отчётливые изменения, что препарат сравнения демонстрировал только в 3 периоде. Исследуемое вещество превосходит препарат сравнения по способности повышать кровоток при введении АХ на фоне НПГ.

Возможно, различие в эффектах на вазодилатирующую функцию эндотелия исследуемого соединения и препарата сравнения кроется в различных механизмах их действия. Механизм действия соединения PMS4OH, можно объяснить тем, что он предположительно проявляет сродство к домену С3 (АТФ – связывающий сайт) протеинкиназы С. В результате чего происходит возможная деактивация данного фермента и дефосфорилирование eNOS (эндотелиальная синтаза оксида азота), что влечет за собой повышение активности NOSIII и увеличение выброса оксида азота [10,11,44]. Кроме того, ингибирование ПКС может привести к уменьшению образования АФК, эндотелина-1 и др. факторов воспаления, что также повысит биодоступность оксида азота [17].

Следующим этапом комплексной оценки эндотелиопротекторной способности соединения-лидера PMS4OH являлось изучение его влияние на процессы тромбообразования. Так как сосудистый эндотелий играет важную роль в процессах поддержания гемостаза, то влияние исследуемого соединения и препарата

сравнения на антитромботическую функцию в условиях НПГ проводилось в нескольких направлениях:

1) Определение времени до образования тромба на модели аппликации железа хлорида на адвентицию сонной артерии.

2) Влияние на сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза оценивалось по изменениям степени и скорости агрегации тромбоцитов при введении различных индукторов агрегации (АДФ, коллаген, ристомин), определением уровня FW, уровня TxA<sub>2</sub> в плазме крови.

3) Влияние на вторичное звено гемостаза оценивалось путем определения АЧТВ, ПВ, ТВ, уровня фибриногена в плазме крови.

4) Влияние на работу противосвертывающей системы путем определения уровня АТШ.

Важно сказать, что НПГ приводит значительному ухудшению работы системы свертывания крови и смещению в сторону усиления процессов тромбообразования, а введение вещества-лидера PMS4OH и сулодексида позволило уменьшить выраженность таких отклонений. Введение PMS4OH и сулодексида приводило как к уменьшению скорости образования тромба, так и к значительному снижению агрегационных показателей. Интересно отметить, что применение препарата сравнения и PMS4OH на фоне НПГ в равной направленности снижали показатели агрегации при введении всех трех индукторов агрегации (АДФ, коллаген, ристомин), что довольно важно при недостаточности эстрогеновых стероидных гормонов, которые могут изменять синтез белковых структур клеток отсроченными ядерными механизмами [5,8]. Возможные процессы, приводящие к снижению агрегации тромбоцитов, заключаются в смещении синтеза тромбоцитами и ЭК веществ в сторону антиагрегантов и уменьшения проагрегантов [152,153], что также подтверждается исследованием при проведении ИФА снижался уровень TxA<sub>2</sub> в плазме крови. Кроме того, ведущая роль в снижении этих процессов отводится эндотелию, что подчеркивается уменьшением активности FW [152,153,163,145], который является более эндотелиоспецифичным показателем. На выше описанные процессы агрегации (достоверно не отличавшиеся от ЛО-группы по показателям:

степень агрегации при введении АДФ и активность FW) PMS4OH оказывал большее влияние, нежели сулодексид. Вероятно, это обусловлено различными механизмами действия этих веществ, и, предположительно, PMS4OH ингибирует активность ПКС, что может приводить не только к улучшению функционирования ЭК, но и уменьшению активации и агрегации тромбоцитов, в которых ПКС приводит к повышению проагрегантного потенциала путем активации и секреции электроноплотных и  $\alpha$ -гранул тромбоцитов, экспрессии интегринов [81,82].

Экспериментальное лечение животных с НПГ сулодексидом и PMS4OH приводило к увеличению времени АЧТВ (характеризует внутренний механизм активации протромбиназы – факторы XII, XI, VIII), ПВ (характеризует внешний путь свертывания – факторы V, VII, X), ТВ (характеризует стадию образования фибрина) и снижению количества фибриногена, который также является маркером ЭД, увеличению антитромбина III (что указывает повышение активности противосвертывающей системы) что говорит о нормализации тромбогенного потенциала в комплексе при ЭД. Сулодексид превышал по активности исследуемый лидер (по показателям АЧТВ, ТВ, а также ПВ, которое не отличалось от значений ЛО-группы), причина чего может лежать в механизмах действия, т.к. является гепариноидом и основной эффект которого антикоагуляционный и даже больше антитромботический [113], а эндотелиотропные свойства являются скорее дополнительными (плейотропными). Вместе с тем, исходя из прогноза по ингибирующему влиянию PMS4OH на ПКС, снижение активности этого фермента может даже несколько повышать процессы коагуляции [79,80].

Для изучения противовоспалительной активности исследуемого лидера проводили подсчет количества лейкоцитов и определения количества СРБ. НПГ приводит к выраженному увеличению количества лейкоцитов и СРБ, что говорит о развитии воспалительных реакций [167], причем введение PMS4OH и сулодексида позволила уменьшить их выраженность, проявляемую снижением уровня СРБ. Эти данные говорят о снижении воспалительных реакций, при введении препаратов, но не указывают, что они реализованы посредством активности эндотелиальных клеток. Подчеркнуть роль эндотелия в воспалительных реакциях может определение

ИФА методом матриксной металлопротеиназы 1 (MMP1) внеклеточной эндопептидазы, эндотелийспецифичного маркера воспаления и пролиферации [169,170,171]. Кроме того, MMP-1 может нарушать образование оксида азота путем нарушения взаимного пространственного расположения белка кавеолина-1 и eNOS-системы. Уровень MMP-1 может зависеть от уровня половых гормонов и является пролиферативным фактором в развитии атеросклеротических бляшек [169,170,171]. Исследуемый лидер и препарат сравнения сулодексид снижали уровни MMP1, причем PMS4OH значительно активнее, свидетельствуя о большем вкладе активности ЭК в развитии противовоспалительного эффекта на фоне НПГ при фармакотерапии производным пиримидина.

После проведения экспериментов по оценке влияния лидера PMS4OH на основные функции эндотелия, был проведен анализ морфологического состояния клеток сосудистого эндотелия и тканей мозга на фоне лечения крыс с НПГ сулодексидом и PMS4OH.

Таким образом, было установлено, что у крыс с гормональной недостаточностью наблюдались дистрофические изменения нейронов, распыление тигроидного вещества, что свидетельствует о снижении синтетических процессов в клетке с крайним проявлением в виде тигролиза. Со стороны сосудов головного мозга были выявлены морфологические признаки эндотелиальной дисфункции, которые проявлялись неравномерным кровенаполнением сосудов, периваскулярным отеком и дистрофическими изменениями эндотелия. Использование PMS4OH с целью коррекции вызванных НПГ изменений позволило практически полностью нивелировать морфологические нарушения нервной ткани, клеток эндотелия уменьшение кровенаполнения как капилляров коры, так и сосудов базального отдела и мозговой оболочки. В тоже время использование сулодексида приводило к улучшению морфологии нейронов, глии, ЭК, уменьшением отека и кровенаполнения сосудов оболочки и коры, но сохранялся стаз крови и периваскулярный отек сосудов Вилизиевого круга, что может говорить о напряжении работы системы ауторегуляции мозгового кровотока в условиях НПГ и ее декомпенсации.

Более яркий эффект при использовании PMS4OH можно объяснить тем, что одним из возможных путей его действия является снижение активности изоферментов ПКС, что может иметь место не только в ЭК, но глиальных и нейрональных клетках. Другими авторами установлено [46,105], что при нарушении кровоснабжения головного мозга увеличивается активность некоторых изоформ ПКС, что приводит к усилению глутамат-индуцированной эксайтотоксичности, увеличению внутриклеточного кальция, митохондриальной дисфункции, возникновение волны деполяризации, повышающие АФК, активацию каспазы и усилению апоптических процессов [105].

С целью дальнейшего изучения возможных путей реализации эндотелиопротекторного эффекта соединением PMS4OH были проведены ИГХ-исследование головного мозга крыс с НПП с использованием антител против eNOS, и изоферментов ПКС, а также ИФА содержания гормонов эстрадиола и ФСГ, а также ферментов eNOS, iNOS, nNOS, ПКС, и ADMA.

Исходя из результатов ИГХ исследования в основе нарушения работы эндотелия, выраженной в стазе крови в сосудах, их отеке, ухудшении морфологических характеристик ЭК лежит снижение экспрессии eNOS, повышение ПКС, что, вероятно приводит к изменению структуры нейронов и глиальных клеток, с повышением ПКС в последних, снижением белково-синтетических реакций. Введение препаратов позволило уменьшить эти изменения у крыс с НПП. Кроме того, отчетливо наблюдается, что сулодексид, повышая экспрессию eNOS, улучшал морфохарактеристики тканей мозга, но при этом практически не влиял на активность ферментов ПКС, с чем возможно и связано его менее выраженное действие, по сравнению с PMS4OH.

Воспроизводимая нами модель ЭД, характеризовалась снижением уровня эстрадиола и повышением ФСГ, что также может говорить о повышенной работе системы гипоталамуса-гипофиза, которая направлена на компенсацию сниженного уровня эстрогенов. Исходя из анализа источников литературы [10,11] при ЭД активность eNOS всегда выгодно повышать, что приведет к улучшению вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной и

антипролиферативной функций эндотелия. Напротив, повышение активности iNOS нежелательно, так как приводит к образованию токсического пероксинитрита и может довести до апоптоза нервные клетки. Также iNOS может повышать активность симпатического отдела нервной системы. Также нежелательна активация nNOS, приводящая к образованию пероксинитрита и индукции глутаматопосредованной эксайтотоксичности. Кроме изоферментов NOS, интересно изменение уровня метилированных аминокислот, таких как ADMA (асимметрический диметиларгинин), который является маркером ЭД, и одним из механизмов, которые приводят к ЭД, является конкуренция с L-аргинином за субстратный центр eNOS-системы уменьшающая выработку ей NO [9,177,178]. Также ADMA может повышать активность iNOS, усиливать сосудосуживающие влияния и пролиферативные процесс в эндотелии [168,179].

Экспериментальное лечение животных с НПГ соединением PMS4OH приводило к изолированному увеличению активности eNOS, без видимого влияния на iNOS и nNOS, снижению уровня ADMA и активности ПКС, что в совокупности с другими исследованиями указывает на наличие истинных эндотелиопротекторных свойств у PMS4OH, возможным звеном механизма которых является снижение активности ПКС, при отсутствии влияния на уровень эстрадиола и ФСГ. Необходимо отметить, что данные ИГХ и ИФА анализов наряду с прогнозом молекулярной динамики, которые также указывают и подтверждают влияние производного пиримидина на активность ПКС, могут объяснить механизмы, посредством которых реализуется комплексное эндотелиопротекторное действие PMS4OH, отличное от сулодексида при ЭД, вызванной НПГ.

Высокую эффективность PMS4OH, чем у сулодексида, можно объяснить тем, что на фоне снижения активности ПКС может повышаться влияние других сигнальных путей протеинкиназ, улучшаться работа eNOS-системы и уменьшаться разобщение в ее работе по производству оксида азота, снижаться нарушения, вызванные eNOS-независимыми ПКС-опосредованными механизмами как в ЭК, так и в гладких мышцах, глии, нейронах в условиях развитой ЭД.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1) ЭД, вызванная НПГ, может приводить к нарушению вазодилатирующей функции эндотелия, выраженной в различных вариантах сосудистого ответа на введение анализаторов: АХ, L-NAME и АХ после L-NAME, относительно исходных показателей, по сравнению с ЛО-группой: реакция по направленности схожа с ЛО-группой, но достоверно менее выражена по показателям АД и СК ( $P \leq 0,01$ ); реакция на введенный АХ после L-NAME выраженная в снижении СК ниже исходных показателей ( $P \leq 0,01$ ); реакция на введенный L-NAME, выраженная в повышении СК и снижении АД ( $P \leq 0,05$ ), с последующим усилением ответа на введенный АХ;

2) Предварительный скрининг производных пиримидина показал, что наиболее высокой эндотелиопротекторной активностью обладает соединение PMS4OH, которую выявили по способности увеличивать АХ-индуцированную СК (в 1,6 раз ( $P \leq 0,01$ )) и снижать АДФ-индуцированную степень и скорость агрегации тромбоцитов (в 2,2 ( $P < 0,01$ ) и 5,1 ( $P < 0,01$ ) раза соответственно), относительно негативного контроля;

3) Использование PMS4OH в условиях НПГ приводило к улучшению вазодилатирующей функции эндотелия при введении эндотелиоспецифических анализаторов: на 14 день развития НПГ, что проявлялось увеличением СК при введении АХ на 17,4% ( $P \leq 0,01$ ), и увеличением СК при введении АХ после L-NAME на 15,6% ( $P \leq 0,01$ ); на 28 день развития НПГ введение АХ увеличивало СК на 36,9% ( $P \leq 0,01$ ), L-аргинина – снижало СК на 16,3% ( $P \leq 0,05$ ), увеличивало отрицательную реакцию на введение L-NAME на 23% ( $P \leq 0,01$ ).

4) Экспериментальная терапия препаратом PMS4OH нормализовала нарушенный тромбогенный потенциал в условиях НПГ, что выражалось: увеличением времени до полной остановки кровотока в 1,3 ( $P \leq 0,01$ ) раза при аппликации железа хлорида на поверхность сонной артерии; практически одинаковым снижением степени и скорости агрегации при индуцировании АДФ, коллагеном и ристомицином, в среднем, в 1,5 раза ( $P \leq 0,05$ ); уменьшением FW в 1,3

раза ( $P \leq 0,01$ ); увеличением АЧТВ в 1,4 раза ( $P \leq 0,02$ ), ПВ – в 1,4 раза ( $P \leq 0,05$ ), ТВ – в 1,2 ( $P \leq 0,05$ ) и снижением количества фибриногена в 1,5 раз ( $P \leq 0,02$ ); повышением антитромбина III в 1,3 раз ( $P \leq 0,05$ ).

6) Применение PMS4OH позволило уменьшить выраженность воспалительных и пролиферативных процессов, относительно НПГ-группы, о чем свидетельствует снижение СРБ в 1,4 раза ( $P \leq 0,02$ ), уменьшение уровня MMP-1 в 2,7 раза, морфологически выявленных признаков уменьшения процессов воспаления, повышения проницаемости эндотелия, некроза и десквамации эндотелиоцитов, увеличение толщины интимы в 1,3 раза, снижение ее соотношения интимы/медии в 1,3 раза в сосудах мозга животных.

7) Снижение активности ПКС, наряду с увеличением уровня eNOS ( $P \leq 0,02$ , по сравнению с НПГ-группой) и уменьшением ADMA ( $P \leq 0,05$ , по сравнению с НПГ-группой) может являться одним из ключевых звеньев путей реализации специфической эндотелиопротекторной активности соединения PMS4OH, вводимого животным с ЭД, вызванной НПГ, что подтверждалось снижением уровня ПКС как ИГХ-методом, так и измеряемого путем ИФА в 1,92 раза ( $P \leq 0,05$ ), по сравнению с НПГ-группой, и достоверно превышающей в 1,81 раза ( $P \leq 0,05$ ) по сравнению с группой, которым вводили сулодексид.

### **Научно-практические рекомендации**

1. Полученные данные позволяют дать рекомендации для целенаправленного синтеза и дальнейшего поиска среди 2-стирилзамещенных производных 4-оксопиримидина высокоактивных и малотоксичных веществ с эндотелиопротекторным действием
2. Следует продолжить дальнейшее исследование соединения PMS4OH с целью создания на его основе эндотелиопротекторного лекарственного средства для терапии патологических состояний и осложнений, вызванных недостаточностью половых гормонов.

## Список сокращений

- ADMA – асимметрический диметиларгинин  
eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота  
FW – фактор фон Виллебранда  
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота  
L-NAME – Нитро-L-аргинин метиловый эфир  
MMP-1 – матриксной металлопротеиназы -1  
nNOS – нейрональная синтаза оксида азота  
TXA2 – тромбоксана A2,  
АДФ – аденозин-5-дифосфорной  
АХ – ацетилхолин  
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время  
ЕВЛ – единицы высвобождения липопротеидлипазы  
ИБС – ишемическая болезнь сердца  
ИФА – иммуноферментный анализ  
ЛО – ложнооперированные  
НПГ – недостаточность половых гормонов  
ОВЭ – овариэктомизированные животные  
ПВ – протромбиновое время  
ПКС – протеинкиназа С  
СК – скорости церебрального кровотока  
СМА – среднемозговая артерия  
СРБ – С-реактивного белка  
ССЗ – сердечно-сосудистых заболеваний  
ТВ – тромбиновое время  
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон  
ЦОГ – циклооксигеназа  
ЭД – эндотелиальной дисфункции  
ЭК – эндотелиальные клетки

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shalimova, A.S. Endothelial dysfunction and its correction in patients with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus / A.S. Shalimova // *Международ. Эндокринологич. Журн.* – 2014. – №2.(58). – С. 33-39.
2. Мельникова, Ю.С. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней / Ю.С. Мельникова, Т.П. Макарова // *Казан. Мед. Журн.* – 2015. – Т.96, № 4. – С. 659-665.
3. Комарова, Е.Б. Изменения эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса и молекулы межклеточной адгезии в зависимости от тяжести течения ревматоидного артрита / Е.Б. Комарова // *Забайкальск. Мед. Вестн.* – 2015. – №2. – С. 43-46.
4. Su, J.B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment / J.B. Su // *World J. of Cardiology.* – 2015. – Vol.7. – P.719-741.
5. Kim, KH. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium / KH Kim, JR. Bender // *Mol Cell Endocrinol.* – 2009. – Vol.308(1-2). – P.3-8.
6. Sexual dimorphism in rabbit aortic endothelial function under acute hyperglycemic conditions and gender-specific responses to acute 17-estradiol / Aditya Goel [et al.] // *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P.2411–2420.
7. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats / A.Z. Lamas [et al.] // *Life Sci.* – 2015. – Vol.124. – P.101-109.
8. Momoi, H. Estrogen-induced augmentation of endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in isolated rat cerebral small arteries / H. Momoi, F. Ikomi, T. Ohhashi // *Jpn. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 53(3). – P.193-203.
9. Тюренков, И.Н., Недостаточность половых гормонов, эндотелиальная дисфункция и ее коррекция / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, Робертус // *Эксперимен. и Клинич. Фармакология.* – 2009. – Т. 72, №6. – С.57-59.
10. Глушко, А.А. Молекулярные мишени для поиска веществ, обладающих

эндотелиопротекторными свойствами / А.А. Глушко, А.В. Воронков, М.В. Черников // Биоорганич. Химия. – 2014. – Т. 40, № 5. – С.515-527.

11. Kolluru, G. K. eNOS phosphorylation in health and disease / G. K. Kolluru, J. H. Siamwala, S. Chatterjee // *Biochimie*. – 2010. – Vol. 92. – P.1186-1198.

12. Mochly-Rosen, D. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? / D. Mochly-Rosen, K. Das, KV. Grimes // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11(12). – P.937-957.

13. Divergence of angiogenic and vascular permeability signaling by VEGF: inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, NO-dependent vascular permeability / I. Spyridopoulos [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 22(6). – P.901-906.

14. Герасимов, А.А. Эндотелиопротекция как плейотропный эффект различных групп фармакологических препаратов / А.А. Герасимов, С.А. Исаков, В.Г. Чикин // *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. – 2016. – № 2. – С. 131-138.

15. Gendron, M.E. A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endo-thelial dysfunction in mice / M.E.Gendron, E. Thorin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol.293. – P.2508-2515.

16. Sousa, J.B. Endothelial dysfunction impairs vascular neurotransmission in tail arteries. / J.B. Sousa, P. Fresco // *Neurochem. Int.* – 2015. – Vol. 80. – P. 7-13.

17. Maczewski, M. The Role of Endothelin, Protein Kinase C and Free Radicals in the Mechanism of the Post-ischemic Endothelial Dysfunction in Guinea-pig Hearts / M. Maczewski, A. Beresewicz // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2000. – Vol. 32. – P. 297–310.

18. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities/ ML Brocq [et al.] // *Antioxid Redox Signal*. – 2008 . –Vol.10(9). –P.1631-74.

19. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction/ T Münzel [et al.] // *Ann Med*. – 2008. –Vol.40(3) . –P.180-96.

20. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation / X. Shu [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol.72(23). – P.4561-4575.

21. Воронков, А.В. Взаимосвязь развития эндотелиальной дисфункции и активности протеинкиназы с при ишемическом повреждении головного мозга / А.В. Воронков, А.В. Мамлеев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т.60, № 4. – С. 134-142.
22. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention / G. Favero [et al.] // BioMed Research International.- 2014.- Vol. 18.- P.80-96.
23. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases [Электронный ресурс] / ED. Costa [et al.] // Front. Physiol. – 2016. – Vol. 7(206). – Режим доступа: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2016.00206/full>.
24. Garcia-Bonilla L. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice / L. Garcia-Bonilla, J.M. Moore, G. Racchumi // J. of immunology (Baltimore). – 2014.– Vol. 193.– P.2531-2537.
25. Terpolilli, N.A. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke / N.A. Terpolilli, M.A. Moskowitz, N. Plesnila // Cereb. Blood Flow Metab. – 2012. – Vol. 32(7). – P. 1332-1346.
26. Blocking a vicious cycle nNOS/peroxynitrite/AMPK by S-nitrosoglutathione: implication for stroke therapy / M. Khan [et al.] // BMC Neurosci. – 2015. – Vol. 15. – P.16-42.
27. Chen, H. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection / H. Chen, H. Yoshioka, G.S. Kim // Antioxidants & Redox Signaling. – 2011. – Vol.14. – P.1505-1517.
28. Nitric Oxide Plays a Key Role in Ovariectomy-Induced Apoptosis in Anterior Pituitary: Interplay between Nitric Oxide Pathway and Estrogen [Электронный ресурс] / S.A. Ronchetti [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol.11(9). – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017659/>.
29. El-Mas, M.M. Endothelial and neuronal nitric oxide synthases variably modulate the oestrogen-mediated control of blood pressure and cardiovascular autonomic control. / M.M. El-Mas, A.A. Abdel-Rahman // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2014. – Vol 41(3). – P. 246-254.

30. Altered neuronal nitric oxide synthase in the aging vascular system: implications for estrogens therapy / O. Lekontseva et al. // *Endocrinology*. – 2012. – Vol.153(8). – P. 3940-3948
31. Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries / O. Lekontseva [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2011. – Vol. 339(2). – P. 367-375.
32. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation / N. Melikian [et al.] // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2009. – Vol. 19(8). – P.256-262.
33. Stimulation and clustering of cytochrome b5 reductase in caveolin-rich lipid microdomains is an early event in oxidative stress-mediated apoptosis of cerebellar granule neurons / Samhan-Ariasa A. K. [et. al.] // *J. of Proteomics*. – 2012. – Vol. 75(10). – P.2934–2949.
34. Глушко, А.А. Молекулярные мишени для поиска веществ, обладающих эндотелиопротекторными свойствами (обзорная статья) / А.А. Глушко, А.В. Воронков, М.В. Черников // *Биоорганич. Химия*. – 2014. – Т.40, № 5. – С. 515-527.
35. Hatzoglou, M. Regulation of cationic amino acid transport: The Story of the CAT-1 Transporter / M. Hatzoglou, J. Fernandez, I. Yaman // *Annu. Rev. Nutr.* – 2004. – Vol. 24. – P. 377–399
36. Graf, P. The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase / C P. Graf, U. Forstermann, E.I. Closs. // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol.132. – P. 1193–1200.
37. Brazil, D.P. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow / D.P. Brazil, B.A. Hemmings // *Trends Biochem. Sci.* – 2001.– Vol. 26. – P. 657–664.
38. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women / Grady D [et al.] // *Ann Intern Med.* – 1992. – Vol. 117. - P. 1016–1037.
39. Levin, ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen / ER Levin // *Mol Endocrinol.* – 2005. – Vol. 19(8). – P. 1951-1959.
40. Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries. / Miller AP [et al.] // *Menopause.* – 2007. – Vol. 14. – P. 251–260.
41. Li, L. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$

variant (ER46) in human endothelial cells / L Li, MP Haynes, JR. Bender // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol.100. – P.4807–4812.

42. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. / Haas E [et al.] // Circ Res. – 2009. – Vol. 104. – P. 288–291

43. Chambliss, KL. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae./ KL Chambliss, PW Shaul // Steroids. – 2002. – Vol. 67(6). – P.413-419.

44. Воронков, А.В. Новая математическая модель для прогнозирования эндотелиопротекторной активности веществ на основе молекулярного докинга / Воронков А.В., Глушко А.А. // Вопросы биологич., мед. и фармац. химии. – 2013. – № 3. – С. 42-47.

45. Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. / Traupe T et al. // Hypertension. – 2007. – Vol .49. – P.1364–1370.

46. Ouyang, P. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions./ P. Ouyang, ED. Michos, RH. Karas // J. Am. Coll. Cardiol. – 2006. – Vol. 247(9). – P.1741-53.

47. Tsuda, K. Estrogen and asymmetric dimethylarginine in postmenopausal women. / K. Tsuda, I. Nishio // Circulation. – 2004. – Vol. 109(12). – P. 174.

48. Estrogen replackiment therapy lowers plasma levels of asymmetrical dimethylarginine in healthy postmenopausal women. / T. Teerlink [et al.] // Clin Sci. – 2003. – Vol. 105(1). – P. 67-71.

49. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. / A. Razmara [et al.] // J. Pharmacol. Exp Ther. – 2008. – Vol. 325. – P. 782–790.

50. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. / A. Pedram [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. -Vol. 277. - P. 50768–50775.

51. Estrogen replacement enhances EDHF-mediated vasodilation of mesenteric and uterine resistance arteries: role of endothelial cell Ca<sup>2+</sup>. / NZ. Burger [et al.] //Am J

Physiol Endocrinol Metab. – 2009. – Vol.296. – P.503–512.

52. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase / B.J. Michell [et al.] // Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P.17625-17628.

53. Therapeutic potential for protein kinase C inhibitor in vascular restenosis / R.Q. Ding et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. – 2011. – Vol. 16(2) – P.160-167.

54. Laher, I. Protein kinase C and cerebral vasospasm / I. Laher, JH. Zhang. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2001. – Vol. 21(8). – P. 887-906.

55. Meier, M. Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease / M. Meier, GL. King // Vasc. Med. 2000. – Vol.5. – P.173-185.

56. Freeley, M. Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites / M. Freeley, D. Kelleher, A. Long. // Cell Signal. – 2011. – Vol. 23. – P. 753-762.

57. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses / E.C. Dempsey [et al.] // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 429–438.

58. Murriel, C.L. Opposing roles of delta and epsilon PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery / C.L. Murriel, D. Mochly-Rosen // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 420. – P. 246–254.

59. Basu, A. Two faces of protein kinase C delta: The contrasting roles of PKC delta in cell survival and cell death / A. Basu, D. Pal. // The scientific. world journal. – 2010. – Vol.10. – P. 2272-2284.

60. Kanashiro, C.A. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle / C.A. Kanashiro, R.A. Khalil // Am J. Physiol. Cell Physiol. – 2001. – Vol. 280(1). – P. 34-45.

61. Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats / J. Blanco-Rivero [et al.] // J. Endocrinol. – 2007. – Vol. 192 (1). – P.189-197.

62. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine–metabolic diseases: an update / A.P. Davel [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2011. – Vol. 44(9). – P.920–

932.

63. Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion / D.A. Pelligrino [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol.269. – P.165-171.

64. Cohen, R.A. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase / R.A. Cohen, T. Adachi // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2006. – Vol.16. – P. 109–114.

65. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor / K. Matsushita [et al.] // *Cell.* – 2003. – Vol. 115.P.

66. Influence of duration of focal cerebral ischemia and neuronal nitric oxide synthase on translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus / X. Li [et al.] // *Neuroscience.* – 2007. – Vol. 144(1). – P. 56-65.

67. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide / C. Volbracht [et al.] // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 93(5). – P. 1280-1292.

68. Sprague, A.H. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease / A.H. Sprague, R.A. Khalil // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – Vol.78(6). – P. 539–552.

69. Fisher, M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction / M. Fisher // *Rev. Neurol. Dis.* – 2008. – Vol.5, №1. – P. 4-11.

70. Walsh, M. P. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries / M. P. Walsh, W. C. Cole // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2013. – Vol. 33(1). – P. 1-12.

71. Tani, E. Continuous elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> is essential for the development of cerebral vasospasm / E. Tani, T. Matsumoto // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 2(1). – P. 13-21.

72. Nishziawa, S. Roles of signal transduction mechanisms in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: overview / S. Nishziawa // *Acta. Neurochir.* – 2011.– Vol. 110(Pt 1). – P. 27-30.

73. Coucha, M. The effect of endothelin receptor A antagonism on basilar artery endothelium-dependent relaxation after ischemic stroke / M. Coucha, W. Li, A. Ergul // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 91(13-14). – P. 676-680.
74. Endothelin-1 initiates the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage through protein kinase C activation, but does not contribute to prolonged vasospasm / S. Nishizawa [et al.] // *Acta. Neurochir. (Wien).* – 2000. – Vol. 142. – P. 1409–1415.
75. Alteration of basilar artery rho-kinase and soluble guanylylcyclase protein expression in a rat model of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage / C. J. Wang [et al.] // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 531. – P. 508.
76. Loss of ischaemic preconditioning in ovariectomized rat hearts: possible involvement of impaired protein kinase C epsilon phosphorylation / K. Shinmura [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol.79(3). – P.387-394.
77. Miller, V.M. Vascular actions of estrogens: functional implications / V.M. Miller, SP. Duckles // *Pharmacol. Rev.* – 2008. – Vol.60(2). – P.210-241.
78. Pulsed estrogen therapy prevents post-OVX porcine dura mater microvascular network weakening via a PDGF-BB-dependent mechanism / O.V. Glinskii [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8(12).
79. Estrogens, progestogens and thrombosis / F.R. Rosendaal [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – Vol.1(7). – P.1371-1380.
80. Functional divergence of platelet protein kinase C (PKC) isoforms in thrombus formation on collagen / K. Gilio [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol.285(30). – P.23410-23419.
81. Dual role of platelet protein kinase C in thrombus formation: stimulation of pro-aggregatory and suppression of procoagulant activity in platelets / A. Strehl [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol.282(10). – P.7046-7055.
82. Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets / C. J. Pears [et al.] // *Plos One.* – 2008. – Vol.3. – P.3793.
83. Genetic analysis of the role of protein kinase Ctheta in platelet function and thrombus formation / K. J. Hall [et al.] // *Plos One.* – 2008. – Vol.3. – P.3277.

84. Tamoxifen alters the plasma concentration of molecules associated with cardiovascular risk in women with breast cancer undergoing chemotherapy / W.G. Romero et al. // *Oncologist*. – 2012. – Vol.17 (4). – P. 499–507.
85. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha / A.R.S. DeMedeiros [et al.] // *Regul. Pept. Elsevier B.V.* – 2012. – P.55–60.
86. Estrogen and mechanisms of vascular protection / D. Xing [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol.29(3). – P.289–295.
87. Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation / J.C. Mason [et al.] // *Am J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273(4 Pt 1). – P. 1233-1240.
88. TNF- $\alpha$  induces endothelial dysfunction via PKC- $\zeta$ -dependent NADPH oxidase activation / Y. Huang [et al.] // *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* – 2012. – Vol.32(5). – P.642-647.
89. Inhibition of protein kinase C  $\beta$ (2) prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and oxidative stress in endothelial cells: the role of NADPH oxidase subunits / B. Deng [et al.] // *J. Vasc. Res.* – 2012. – Vol.49(2). – P.144-159.
90. Interleukin-1 $\beta$ -induced barrier dysfunction is signaled through PKC- $\theta$  in human brain microvascular endothelium / R.R. Rigor [et al.] // *Am J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2012. – Vol.302(10). – P.1513-1522.
91. Endotoxin-induced vascular endothelial cell migration is dependent on TLR4/NF- $\kappa$ B pathway, NAD(P)H oxidase activation, and transient receptor potential melastatin 7 calcium channel activity / D. Sarmiento [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol.55. – P.11-23.
92. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury / A. Iwakura [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol.108 (25). – P.3115-3121.
93. PDGF/VEGF system activation and angiogenesis following initial post ovariectomy meningeal microvessel loss / O.V. Glinskii [et al.] // *Cell Cycle*. – 2008. –

Vol.7(10). – P.1385-1390.

94. Microvascular network remodeling in dura mater of ovariectomized pigs: role for angiopoietin-1 in estrogen-dependent control of vascular stability / O.V. Glinskii [et al.] // *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293(2). – P.1131-1137.

95. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. / I. Fleming [et al.] // *Circ. Res.* – 2001. – Vol.88. – P.68–75.

96. Huang, Q. Interaction of PKC and NOS in signal transduction of microvascular hyperpermeability / Q. Huang, Y.Yuan. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273(Heart Circ. Physiol. 42). – P. 2442–2451.

97. Enhancement of migration by protein kinase C $\delta$  and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C $\delta$  in capillary endothelial cells. / E.O. Harrington [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P.7390–7397.

98. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C $\delta$  activity / Y. Shizukuda [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – Vol.85. – P.247–256.

99. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / C.H. Chen [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol.321. – P.1493–1495.

100. Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice / C. Lange-Asschenfeldt [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2004. – Vol.24. – P.636–645.

101. Arundine, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury / M. Arundine, M. Tymianski. // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol.61. – P.657–668.

102. Prevention of NMDA-induced death of cortical neurons by inhibition of protein kinase Czeta / S. Koponen [et al.] // *J. Neurochem.* – 2003. – Vol.86. – P.442–450.

103. Impaired perfusion after myocardial infarction is due to reperfusion-induced deltaPKC-mediated myocardial damage / F. Ikeno [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol.73. – P.699–709.

104. Reperfusion-induced translocation of delta PKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation / E.N. Churchill [et al.] // *Circ. Res.* – 2005.

– Vol.97. – P.78–85.

105. Bright, R. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury / R. Bright, D. Mochly-Rosen // *Stroke*. – 2005. – Vol.36(12). – P.2781-2790

106. Sjakste, N. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications / N. Sjakste, A. Gutcaits, I. Kalvinsh // *CNS Drug Rev*. – 2005. – Vol.11(2). – P.151-168.

107. Comparison of endothelial function improvement estimated with reactive hyperemia index between ramipril and telmisartan in hypertensive patients / Y.J. Ki [et al.] // *Clin. Hypertens*. – 2017. - Vol.23:4.

108. Roush, G.C. Diuretics for Hypertension: A Review and Update / G.C. Roush, D.A. Sica. // *Am J. Hypertens*. – 2016. – Vol.29(10). – P.1130-1137.

109. Sandhu, K. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins / K. Sandhu, M. Mamas, R. Butler. // *World J. Cardiol*. – 2017. – Vol.9(1). – P.1-13.

110. Hypertension treatment in the Asia-Pacific: the role of and treatment strategies with nebivolol / C.H. Kim [et al.] // *Heart Asia*. – 2016. – Vol.8(1). – P.22-26.

111. Blood Pressure Reduction is Associated With the Changes in Oxidative Stress and Endothelial Activation in Hypertension, Regardless of Antihypertensive Therapy / M. Mihalj [et al.] // *Kidney Blood Press Res*. – 2016. – Vol.41(6). – P.721-735.

112. Angiotensin receptor blockers & endothelial dysfunction: Possible correlation & therapeutic implications / M. Radenkovic [et al.] // *Indian J. Med. Res*. – 2016. – Vol.144(2). – P.154-168.

113. Glycosaminoglycans, proteoglycans and sulodexide and the endothelium: biological roles and pharmacological effects / V. Masola 1 [et al.] // *Int. Angiol*. – 2014. – Vol. 33(3). – P.243-254.

114. Association of PKC $\zeta$  expression with clinicopathological characteristics of breast cancer [Электронный ресурс] / J. Yin [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol.9(6). – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946230/>.

115. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart / J. Heijman [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol*. – 2013. – Vol.64. – P.90-98

116. Balakumar, P. Implications of fundamental signalling alterations in diabetes

mellitus-associated cardiovascular disease / P. Balakumar // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2014. – Vol.51(6). – P.441-448.

117. Wnt/ $\beta$ -Catenin and Wnt5a/Ca Pathways Regulate Proliferation and Apoptosis of Keratinocytes in Psoriasis Lesions / Y. Zhang [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2015. – Vol.36(5). – P.1890-1902.

118. Zanin-Zhorov, A. PKC-theta function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting / A. Zanin-Zhorov, M.L. Dustin, B.R. Blazar. // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol.32. – P.358–363.

119. Altman, A. Protein kinase C inhibitors for immune disorders / A. Altman, KF. Kong // *Drug Discov. Today.* – 2014. – Vol.19(8). – P.1217-1221

120. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity / M.A. Burguillos [et al.] // *Nature.* – 2011. – Vol.472. – P.319–324.

121. Geraldès, P. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldès, G.L. King. // *Circ. Res.* – 2010. – Vol.106. – P.1319–1331.

122. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside / R. Bosco [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* - 2011. – Vol.11. – P.185–199.

123. DiazGranados, N. A review of the preclinical and clinical evidence for protein kinase C as a target for drug development for bipolar disorder / N. DiazGranados, C.A. Zarate. // *Curr. Psychiatry Rep.* – 2008. – Vol.10. – P.510–519.

124. Budas, G.R. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury / G.R. Budas, E.N. Churchill, D. Mochly-Rosen // *Pharmacol. Res.* – 2007. – Vol.55. – P.523–536.

125. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway / D. Pravdic [et al.] // *Anesthesiology.* – 2009. – Vol.111. – P.267–274.

126. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity / M.I. Davis [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2011. – Vol.29. – P.1046–1051.

127. A comparison of volatile and non volatile agents for cardioprotection during

on-pump coronary surgery / S. De Hert [et al.] // *Anaesthesia*. – 2009. – Vol.64. – P.953–960.

128. The myocardial protective effects of adenosine pretreatment in children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled clinical trial / Z. Jin [et al.] // *Eur. J.Cardiothorac. Surg.* – 2011. – Vol.39. – P.90–96.

129. Effect of adenosine-regulating agent acadesine on morbidity and mortality associated with coronary artery bypass grafting: the RED-CABG randomized controlled trial / M.F. Newman [et al.] // *J.Am.Med.Association*. – 2012. – Vol.308. – P.157–164.

130. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebo-controlled trial of tamoxifen / A. Yildiz [et al.] // *Arch. Gen. Psychiatry*. – 2008. – Vol.65. – P.255–263.

131. Double-blind, randomized, placebo-controlled 6-week study on the efficacy and safety of the tamoxifen adjunctive to lithium in acute bipolar mania / Z. Amrollahi [et al.] // *J. Affect Disord*. – 2011. – Vol.129. – P.327–331.

132. Phase II trial of sequential paclitaxel and 1 h infusion of bryostatin-1 in patients with advanced esophageal cancer / G.Y. Ku [et al.] // *Cancer Chemother. - Pharmacol*. – 2008. – Vol.62. – P.875–880.

133. A Gynecologic Oncology Group phase II trial of the protein kinase C-beta inhibitor, enzastaurin and evaluation of markers with potential predictive and prognostic value in persistent or recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies / L. Usha [et al.] // *Gynecol Oncol*. – 2011. – Vol.121. – P.455–461.

134. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3 / T. Fischer [et al.] // *J. Clin. Oncol*. – 2010. – Vol.28. – P.4339–4345.

135. Oral protein kinase C beta inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2 / L.P. Aiello [et al.] // *Retina*. – 2011. – Vol.31. – P.2084–2094.

136. Effect of ruboxistaurin (RBX) On visual acuity decline over a 6-year period with cessation and reinstatement of therapy: results of an open-label extension of the Protein Kinase C Diabetic Retinopathy Study 2 (PKC-DRS2) / M.J. Sheetz [et al.] // *Retina*. – 2011. – Vol.31. – P.1053–1059.

137. Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein kinase C: first clinical results in renal-transplant recipients / K. Budde [et al.] // *Am J. Transplant.* – 2010. – Vol.10. – P.571–581.

138. Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein-kinase C: randomized phase II study in renal transplant recipients / S. Friman [et al.] // *Am J. Transplant.* – 2011. – Vol.11. – P.1444–1455.

139. Синтез и анксиолитическая активность 2-стирилпроизводных 4-оксопиримидина / Э.Т. Оганесян и др.// *Фундаментальные исследования*. – 2014. – №8, Ч. 6.– С. 1413-1417.

140. Поиск и изучение эндотелиопротекторной активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она на фоне моделирования недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 5. – С. 285.

141. Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование и синтез ГАМК-ергических соединений / И.П. Кодониди, Э.Т. Оганесян. –Lambert Academic Publishing. – Hamburg, 2014 – С.107.

142. Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование и целенаправленный синтез N-производных 1,3-диазинона-4: дис... д-ра. фармац. наук: 14.04.02 / Кодониди Иван Панайотович. – Пятигорск, 2011.–339 с.

143. Синтез и биологическая активность N-гетероциклических производных 1,4-дигидро-4-оксопиримидина / И.П. Кодониди [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2012. – № 4. – С.19-26.

144. Тюренков, И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2008. – Т.71, №1. – С.49-51.

145. Морфологические и функциональные критерии оценки Эндотелиальной

дисфункции сосудов головного Мозга крыс при гормональных патологиях различного Генеза / И.Н. Тюренков [и др.] // Вестник новых медицинских технологий – 2011. – Т. 18, № 1. – С.197

146. Воронков, А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: автореф. дис. д-ра мед. Наук: 14.03.06 / Воронков Андрей Владиславович. – Волгоград: ВолгГМУ. – 2011.– С.46

147. Изучение влияния сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / И.Н. Тюренков [и др.] // Эксперим. диабетология. – 2011. – С.12-15

148. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle / M. Hashimoto [et al.] // Circulation. – 2005. – V.92. – P.3431-3435.

149. Бокерия, Л.А. Новейшие инновационные методы сосудистой диагностики / Л.А. Бокерия, Н.Н. Петрищев, М.Б. Гирина // Поликлиника. – 2013. – № 3-1. – С. 64-65.

150. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов [и др.] // Лабораторное дело. – 1989. – №10. – С.15-18.

151. Воронков, А.В. Влияние природных соединений полифенольной структуры на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях его фокальной ишемии / А.В. Воронков, И.Н. Дьякова, Д.И. Поздняков // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2016. – Т.79, № 5. – С. 7-9.

152. Воронков, А.В. Нарушение антитромботической функции сосудистого эндотелия и некоторых параметров плазменного гемостаза на фоне фокальной ишемии головного мозга и их коррекция 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислотой / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – №2 (70). – С. 73-78.

153. Анищенко, А.М. Влияние этинилэстрадиола на реологические свойства крови и гемостаз при экспериментальной овариоэктомии / А.М. Анищенко, О.И. Алиев, Т.М. Плотникова // Сиб. Науч. Мед. Журн. – 2013. – Т.33.№ 4. – С.30-34.

154. Оценка коррекции L-Name и гипоэстроген-индуцированной

эндотелиальной дисфункции препаратом импаза / Белоус А. С., Арустамова А. А., Покровский М. В. [и др.] // Научн. Ведомости Белгород. Гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т.4, №13. – С. 116-120.

155. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М. Ньюдиамед, 2008. –292 с.

156. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика, 1999. – 459 с.

157. Оценка ауторегуляции церебральной гемодинамики у крыс самок при эндотелиальной дисфункции, вызванной недостаточностью половых гормонов / А.В. Воронков [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке: журнал научных статей. – 2016. – Т.18, №3. – С.107-111.

158. Черток В.М. Регуляторный потенциал капилляров мозга / В.М.Черток, А.Г. Черток // Тихоокеан. Мед. Журн. – 2016. – №2 (64). – С.72-80.

159. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction. / S Varadharaj [et al.] // Respir Physiol Neurobiol. – 2015. – Vol. 207. – P. 40-47.

160. Raloxifene protects endothelial cell function against oxidative stress. / C M Wong [et al.] // Br J Pharmacol. – 2008. – Vol. 155(3). – P.326-334.

161. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. / MS Bitar [et al.] // Eur J Pharmacol. – 2005. – Vol. 511(1). – P.53-64.

162. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. / D Bonaventura et al. // J Inorg Biochem. – 2009 - Vol. 103(10). – P.1366-1374.

163. Фактор фон виллебранда, как показатель эндотелиальной дисфункции у больных дерматитами / ХМ.Х. Ходжаева [и др.] // Здравоохранение Таджикистана. – 2016. – С.54-58.

164. Ruef, J. Markers for endothelial dysfunction, but not markers for oxidative stress correlate with classical risk factors and the severity of coronary artery disease/ J. Ruef, W. Marz, B. R. Winkelmann// Scandinavian Cardiovascular J. – 2006. – Vol. 40. – P. 274-279.

165. Методы диагностики эндотелиальной дисфункции / А.Н. Иванов и др. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – Т.13, № 4 (52). – С. 4-11.
166. Дегтярь, Н.И. Эндотелий и системное воспаление: роль ядерных транскрипционных факторов и терапевтические возможности / Н.И. Дегтярь, Н.Д. Герасименко, М.С. Расин // Артериальная гипертензия – 2016. – №4(48). – С.21- 25
167. Макарова, В.Г. Справочник Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / под редакцией: В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. – Спб: ЛЕМА, 2013. – С.118.
168. Landim, M.B. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: Implications for atherogenesis / M.B. Landim, A.Casella Filho, A.C. Chagas // Clinics (Sao Paulo). – 2009.– Vol. 64.–P. 471–478.
169. Fetal insulin and IGF-II contribute to gestational diabetes mellitus (GDM)-associated up-regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in the human fetoplacental endothelium / U. Hiden [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol.97(10). – P.3613-3621.
170. Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-selectin/Matrix Metalloproteinase-1 Pathway / A. Carrizzo [et al.] // Circulation. – 2015. – Vol.131(17). – P.1495-1505.
171. Mueck, A.O. Medroxyprogesterone acetate versus norethisterone: effect on estradiol-induced changes of markers for endothelial function and atherosclerotic plaque characteristics in human female coronary endothelial cell cultures / A.O. Mueck, H. Seeger, D. Wallwiener // Menopause. – 2002. – Vol.9(4). – P.273-281.
172. Потехина, Е. С. Митоген активируемые протеинкиназные каскады и участие в них ste20 подобных протеинкиназ / Е. С. Потехина, Е. С. Надеждина // Успехи биологич. химии. – 2002. – Т. 42. – С. 235–256.
173. Левченкова, О.С. Возможности фармакологического прекондиционирования. / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков // Вестн. РАМН. – 2016. – №71(1).–С.16–24.
174. Essential role of Src suppressed C kinase substrates in endothelial cell

adhesion and spreading. / C. Cheng [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007 – Vol.358(1). – P.342-348.

175. Intermittent hypoxia induces NF- $\kappa$ B-dependent endothelial activation via adipocyte-derived mediators. / MY Lee [et al.] // *Am J. Physiol. Cell Physiol.* – 2016 – Vol. 310(6). – P.446-455.

176. PKC $\alpha$  activates eNOS and increases arterial blood flow in vivo. / C Partovian [et al.] // *Circ. Res.* – 2005 – Vol.97(5). – P.482-487.

177. Маньковский, Б.Н. Влияние L-аргинина на показатели мозгового кровотока у больных сахарным диабетом 2 типа с клиническими проявлениями хронической цереброваскулярной недостаточности / Б.Н. Маньковский, Е.А. Лихошапко, В.Н. Бульчак // *Діабет Ожиріння Метаболічний синдром.* – 2014. – №5. – С. 81-85.

178. Протективные свойства L-аргинина в отношении клеток сосудистого эндотелия выявляют остеопротективные эффекты при гипоестрогенном остеопорозе / О.С. Гудырев [и др.] // *Международ. Науч.-исслед. Журн.* – 2014. – №1-4(20). – С. 54-57.

179. Tain, Y-L. Targeting on Asymmetric Dimethylarginine-Related Nitric Oxide-Reactive Oxygen Species Imbalance to Reprogram the Development of Hypertension / Y-L. Tain, C-N. Hsu // *Intern. J. of Molecular Sciences.* – 2016.– Vol.17.–P.2020-2030.

180. Товажнянская, Е.Л. Эндотелиальная дисфункция. Клинические аспекты проблемы и пути ее решения / Е.Л. Товажнянская // *Журнал Неврології ім. Б.М. Маньковського.* – 2016. – Т.4, № 3. – С. 17-21.

181. Васина, Л.В. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры / Л.В. Васина, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2017. – Т.16, №1(61). – С. 4-15.

182. Эндотелий – орган-мишень терапевтического воздействия у женщин с артериальной гипертонией на фоне эстрогенового дефицита / Р.И. Стрюк [и др.] // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* – 2015. – № 3. – С. 61-67.