

Прокофьев Игорь Игоревич

**РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В КАРДИОПРОТЕКТОРНОМ
ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД – 2017

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

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

Защита состоится « ____ » _____ 2017 г. в _____ часов
на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
(400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1)

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы во всем мире являются основной причиной смертности взрослого населения. Классическими причинами сложившейся ситуации остаются употребление табака, ожирение, малоактивный образ жизни [Петрухин И.С. и др., 2012; Телкова И.Л., 2012; Сайгитов Р.Т. и др., 2015]. Помимо этого, одной из особенностей развития современного общества является увеличение влияния психосоциальных факторов, вызывающих стресс, который служит одним из основных факторов риска заболеваний сердца и сосудов [Kivimaki M. et al., 2015; Гимаева З.Ф. и др., 2017].

В результате избытка катехоламинов и глюкокортикоидов при стрессе нарушается работа кальциевого насоса, усиливается экспрессия индуцибельной NO-синтазы, активируются процессы перекисного окисления липидов с повреждением мембранных структур клетки, развивается митохондриальная и эндотелиальная дисфункции, что приводит к повреждению кардиомиоцитов и снижению инотропных резервов сердца [Тюренков И.Н. и др., 2014; Chen H.J. et al., 2014; Cocco N. et al., 2015; Перфилова В.Н. и др., 2016].

Ограничивают негативное влияние стресса на организм стресс-лимитирующие системы, наиболее мощными из которых являются нитроксид- и ГАМК-ергическая. NO на центральном уровне модулирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, снижая секрецию глюкокортикоидов корой надпочечников и выброс катехоламинов из окончаний симпатических нервов и мозгового отдела надпочечников [Малышев И.Ю. и др., 1998; Jang S.J. et al., 2011; Puzserova A. et al., 2016]. Оксид азота, регулируя тонус коронарных сосудов, симпатические и парасимпатические влияния на сердце, дыхательную функцию митохондрий, играет большую роль в устойчивости миокарда к различным повреждающим факторам [Rastaldo R. et al., 2007]. ГАМК также оказывает симпатингибирующее действие, снижает АД, участвует в метаболических процессах в кардиомиоцитах [Goddard A.W., 2016].

Предшественником ГАМК является глутамат – нейроактивная аминокислота с кардиопротекторными свойствами и играющая определенную роль в патофизиологии сердечно-сосудистых нарушений. Глутаминовая кислота участвует в центральном и периферическом контроле сердечно-сосудистой системы, обладает антигипоксическими и антиоксидантными свойствами, является субстратом цикла Кребса [Jennings A. et al., 2015; Zheng Y. et al., 2016].

Оксид азота тесно взаимосвязан в функциональном плане с нейроактивными аминокислотами, являясь внутри- и межклеточным сигнальным звеном в глутаматергической нейротрансмиссии в ЦНС [Raju K. et al., 2015]. Активация ионотропного NMDA-рецептора приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция, в результате чего усиливается экспрессия конститутивных изоформ NO-синтаз [Santini C.O. et al., 2013]. При стимуляции метаболитических рецепторов глутамата снижается синтез iNOS [Yao H.H. et al., 2005]. Имеются данные и о тесной взаимосвязи NO- и ГАМК-

ергической систем. Показано, что оксид азота вызывает высвобождение ГАМК из синаптических везикул в цитозоль [Merino J.J. et al., 2014; Tarasenko A.S., 2016]. Также NO способен ингибировать ГАМК-трансаминазу – основной фермент, участвующий в деградации ГАМК [Jayakumar A.R. et al., 1999].

В этой связи актуальным является поиск веществ, ограничивающих стресс-реакцию и влияющих на систему оксида азота, среди производных нейроактивных аминокислот. В ранее проведенных исследованиях показаны кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты – глуфимета и производного ГАМК – фенибута при стрессорном воздействии [Перфилова В.Н. и др., 2009; Тюренков И.Н. и др., 2014].

Степень разработанности проблемы

В отечественной и зарубежной литературе имеется много данных о биологической роли оксида азота, в частности о его регуляторном влиянии на работу сердца и сосудов [Massion P.V. et al., 2003; Rastaldo R. et al., 2007; Strijdom H. et al., 2009; Dias R.G. et al., 2011; Кузнецова В.Л. и др., 2015; Bohlen H.G., 2015]. Также показаны защитные и повреждающие эффекты оксида азота и его участие в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы [Рахматуллина Ф.Ф., 2005; Naseem K.M., 2005; Bian K. et al., 2008; Khazan M. et al., 2014; Ritchie R.H. et al., 2017]. NO оказывает стресс-лимитирующее действие, на центральном и периферическом уровнях ограничивает повреждение органов и тканей при стрессорном воздействии [Мальшев И.Ю. и др., 1998; Манухина Е.Б. и др., 2000; Парахонский А.П., 2010; Gulati K. et al., 2015; Puzserova A. et al., 2016]. Известно о регуляции оксидом азота кардиоваскулярных эффектов глутамата и глутаматергической нейротрансмиссии [Пожилова Е.В. и др., 2015; Raquel H.A. et al., 2016]. Также имеются данные о тесной взаимосвязи NO и ГАМК-системы. Оксид азота опосредует вазодилатирующий эффект ГАМК, высвобождение ее из корковых нейронов [Kamran M. et al., 2013; Merino J.J. et al., 2014].

Вместе с тем, мы не нашли в доступной литературе данных, указывающих на участие NO-ергической системы в реализации кардиопротекторного действия производных ГАМК и глутаминовой кислоты при стрессорных повреждениях сердца, что и послужило основанием к выполнению данного исследования.

Цель исследования

Комплексная оценка участия системы оксида азота в кардиопротекторном действии нового производного глутаминовой кислоты – глуфимета и производного ГАМК – фенибута в условиях острого стрессорного воздействия.

Задачи исследования

1. Провести анализ центрального и периферического NO-ергического компонента в механизме кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута.
2. Изучить *in vitro* влияние глуфимета и фенибута на сократимость миокарда интактных животных в условиях активации β_1 -адренорецепторов и М-холинорецепторов изолированных предсердий при неселективной блокаде NO-синтазы.

3. Исследовать *ex vivo* роль системы оксида азота в модуляции производными нейроактивных аминокислот симпатических и парасимпатических влияний на сердце интактных и стрессированных животных.

4. Изучить влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO, процессы перекисного окисления липидов и дыхательную функцию митохондрий клеток сердца и головного мозга, артериальное давление и состояние системы гемостаза у животных, подвергшихся острому стрессорному воздействию при селективной блокаде нейрональной и индуцибельной NO-синтазы.

Научная новизна исследования

Впервые показан периферический NO-ергический механизм действия производного глутаминовой кислоты – глуфимета и производного ГАМК – фенибута в условиях *in vitro*, о чем свидетельствует отсутствие ослабления инотропной реакции изолированных предсердий крыс при стимуляции β_1 -адренорецепторов под влиянием исследуемых соединений и неселективной блокаде NO-синтазы. В условиях *ex vivo* обнаружено, что глуфимет и фенибут также ослабляют увеличение амплитуды сокращений изолированных предсердий интактных животных при активации β_1 -адренорецепторов, однако этот эффект не ингибируется неселективной блокадой NO-синтазы. Выявлено, что исследуемые соединения *ex vivo* уменьшают усиление инотропного ответа изолированных предсердий стрессированных животных на стимуляцию адренорецепторов как на фоне блокады NOS, так и без нее, реализуя свое действие, вероятно, через другие механизмы, не связанные с NO-системой. Впервые показано влияние глуфимета и фенибута на активность индуцибельной изоформы NO-синтазы, о чем свидетельствует снижение уровня конечных метаболитов NO в гомогенатах сердца, головного мозга и сыворотке крови, уровня продуктов ПОЛ, повышение активности антиоксидантных ферментов, показателей дыхания митохондрий, нормализация параметров системы гемостаза и АД в условиях селективной блокады нейрональной NOS и отсутствие перечисленных эффектов при блокаде iNOS.

Выявлено ингибирующее влияние глуфимета и фенибута на экспрессию iNOS в перитонеальных макрофагах мышей. Впервые показан центральный NO-ергический компонент кардиопротекторного действия глуфимета, на что указывает отсутствие снижения артериального давления на фоне ингибирования NOS при введении производного глутамата в боковые желудочки мозга крысы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования демонстрируют новые аспекты механизма кардиопротекторного действия фенибута и производного глутаминовой кислоты – глуфимета. Выявленные закономерности свидетельствуют о наличии NO-ергического компонента в реализации эффектов изученных соединений, что позволяет рекомендовать поиск среди производных ГАМК и глутаминовой кислоты высокоактивных веществ, ограничивающих стресс-реакцию и модулирующих NO-ергическую систему. Полученные данные указывают на

перспективность дальнейшего изучения фармакологических эффектов, связанных с ингибированием iNOS.

Методология и методы исследования

Выбранные методологические подходы соответствовали поставленным задачам. Исследование на изолированных предсердиях проводили на основе методических рекомендаций [Миронов А.Н., 2012], а также общепринятых подходах по работе на изолированных органах [Блаттнер Р. и др., 1983]. Иммуобилизационно-болевого стресс моделировали по методике Ковалева Г.В. и соавт. [Ковалев Г.В. и др., 1983]. Ингибирующее влияние исследуемых соединений на индуцибельную NO-синтазу изучали на липополисахарид-активированных перитонеальных макрофагах мышей [Fortier A.N. et al., 1982]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием рекомендованных методов [Сергиенко В.И. и др., 2012].

Проведение экспериментов осуществляли в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при РАН, а также международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997). Работа одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г).

Реализация результатов

Результаты диссертационной работы используются при обучении студентов и провизоров на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ, в научно-исследовательской работе лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ.

Положения, выносимые на защиту

1. Изучаемые производные нейроактивных аминокислот имеют периферический NO-ергический механизм кардиопротекторного действия, о чем свидетельствует одинаковый прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий при стимуляции β_1 -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз у интактных животных контрольной и опытных групп.

2. Механизм кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута при стрессорном повреждении обусловлен их влиянием на активность индуцибельной изоформы NO-синтазы, о чем свидетельствует отсутствие изменения концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга, показателей антиоксидантного статуса, дыхания митохондрий сердца и головного мозга, системы гемостаза и уровня АД при ингибировании iNOS у животных, получавших изучаемые соединения.

3. В механизме кардиопротекторного действия глуфимета принимает участие центральный NO-ергический компонент, о чем свидетельствует отсутствие его влияния на систолическое АД при введении в боковые желудочки

мозга в условиях неселективной блокады NO-синтаз. Фенибут реализует свое центральное действие через другие механизмы, не связанные с NO-системой.

4. Исследуемые производные нейроактивных аминокислот снижают экспрессию индуцибельной NO-синтазы, на что указывает уменьшение концентрации iNOS, конечных метаболитов оксида азота и цГМФ в перитонеальных макрофагах мышей, активированных липополисахаридом в условиях *in vitro* и при внутрибрюшинном введении в течение трех дней ЛПС и изучаемых производных ГАМК и глутамата.

Личный вклад

Вклад автора заключается в непосредственном участии в формировании рабочей концепции, в анализе литературных данных, проведении экспериментов, статистической обработке результатов, подготовке рукописи диссертации. Автор принимал участие в планировании экспериментальной части исследования, формулировании цели и задач, подготовке публикаций по основным положениям диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом полученных данных в экспериментальных исследованиях, проведенных на нелинейных крысах и мышах, с использованием современных методических подходов и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных методов статистической обработки результатов.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XIX региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2014, диплом II степени); 73-ей, 74-ой и 75-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2015, 2016 диплом II степени, 2017). По результатам диссертационного исследования опубликовано 13 печатных работ, из них 7 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 8 таблицами и 20 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов исследования (глава II), экспериментальной части (главы III-V), обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 313 источников, включая 60 отечественных и 253 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ литературы роли системы оксида азота в функционировании сердечно-сосудистой системы в норме и при стрессорном повреждении. Показано, что оксид азота является регулятором сократительной функции миокарда, модулирует симпатические, парасимпатические влияния на сердце, функционирование ионных каналов, а также дыхательную функцию

митохондрий и работу других органелл кардиомиоцитов. Рассмотрена функциональная взаимосвязь между системой NO и нейроактивными аминокислотами. Проанализированы повреждающее действие стресса на сердце и стресс-лимитирующие влияния оксида азота.

Вторая глава содержит описание материалов и методов исследования, использовавшихся для реализации поставленных задач. Были изучены соединения: производное глутаминовой кислоты – глуфимет и производное ГАМК – фенибут, синтезированные на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена (г. Санкт-Петербург, Россия)¹. Выбор данных соединений обусловлен их выраженными кардиопротекторными свойствами при стрессорном повреждении сердца согласно ранее проведенным исследованиям [Перфилова В.Н. и др., 2014; Тюренков И.Н. и др., 2014; Садикова Н.В., 2016].

Исследование выполнено на 204 нелинейных крысах и 60 белых мышах, которые были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторных исследований при проведении доклинических испытаний в РФ (ГОСТ 33216 – 2014), а также приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием лабораторных животных. Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук, а также международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997). Работа была одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г).

Острое стрессорное воздействие моделировали подвешиванием самок, находящихся в стадии диэструса, за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа с помощью зажима Кохера [Ковалев Г.В. и др., 1983]. Соединения вводили внутрибрюшинно за 10 минут до стрессирования в наиболее эффективных дозах: глуфимет 28,7 мг/кг, фенибут – 50,0 мг/кг [Перфилова В.Н. и др., 2009; Садикова Н.В., 2016]. Блокаду NO-синтаз осуществляли с использованием неселективного ингибитора L-NAME (Sigma, США) в дозе 10 мг/кг [Воронков А.В., 2011], селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы – амингуанидина (Sigma, США) в дозе 50,0 мг/кг [Laszlo F. et al., 1995], нейрональной NOS – 7-нитроиндазола (Sigma, США) в дозе 50,0 мг/кг [Kwon Y.B. et al., 1999].

Изучение *in vitro* влияния глуфимета и фенибута на сократимость миокарда при активации β_1 -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз

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

проводили на изолированных предсердиях. После декапитации животного извлекали сердце, отделяли предсердия и помещали в резервуар с раствором Кребса установки для изолированных органов (Ugo Basile, Италия), прикрепляя верхний конец препарата к изометрическому датчику. К краям препарата присоединяли электроды и стимулировали электрическими импульсами с различной частотой (от 150 до 300 имп/мин). Концентрация исследуемых соединений и L-NAME в перфузируемом растворе Кребса составляла 1×10^{-5} М. Симпатический и парасимпатический отделы нервной системы активировали добавлением в перфузат дофамина и ацетилхолина соответственно в концентрации 1×10^{-6} М. Эксперимент проводили по следующей схеме: после промывания препарата изолированных предсердий добавляли дофамин в раствор и регистрировали амплитуду сокращений (исход). Далее препарат промывали раствором Кребса до достижения исходной амплитуды сокращения и добавляли исследуемое соединение/ингибитор, дофамин и вновь регистрировали амплитуду сокращений. После этого препарат снова промывали раствором Кребса до получения первоначальной амплитуды сокращения. Аналогично проводили исследование и при активации М-холинорецепторов ацетилхолином. Рассчитывали изменение прироста (при активации адренорецепторов) и снижения (при активации холинорецепторов) амплитуды сокращений относительно исходных данных в процентах. Для определения изменения расслабления препарата предсердий оценивали смещение от изолинии амплитуды сокращений.

Для изучения *ex vivo* влияния исследуемых соединений на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных и стрессированных крыс при стимуляции адрено- и холинорецепторов и неселективной блокаде NOS были сформированы следующие группы животных: 1) положительный контроль – интактная, n = 7; 2) интактная + глуфимет (28,7 мг/кг), n = 7; 3) интактная + фенибут (50 мг/кг), n = 7; 4) интактная + L-NAME (10 мг/кг), n = 6; 5) интактная + L-NAME + глуфимет, n = 7; 6) интактная + L-NAME + фенибут, n = 7; 7) отрицательный контроль – стресс + физ.раствор (0,1 мл/100 г веса), n = 7; 8) стресс + глуфимет, n = 7; 9) стресс + фенибут, n = 7; 10) стресс + L-NAME, n = 7; 11) стресс + L-NAME + глуфимет, n = 7; 12) стресс + L-NAME + фенибут, n = 7.

Подготовку препарата изолированных предсердий проводили по схеме, описанной выше. В рабочий раствор добавляли дофамин в концентрации 1×10^{-6} и регистрировали амплитуду сокращений. После этого препарат вновь промывали раствором Кребса до получения первоначальных показателей, вводили ацетилхолин и регистрировали амплитуду навязанного ритма. Результаты оценивали по изменению амплитуды сокращений и расслаблению миокарда.

Для изучения NO-ергического компонента кардиопротекторного действия исследуемых соединений при стрессорном повреждении сердца животные были разделены на группы: 1) положительный контроль – интактная, n = 8; 2) отрицательный контроль – стресс + физ. раствор (0,1 мл/100 г веса), n = 8; 3) стресс + глуфимет (28,7 мг/кг), n = 8; 4) стресс + фенибут (50 мг/кг), n = 8; 5) стресс + 7-нитроиндазол (50 мг/кг), n = 8; 6) стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет,

n = 8; 7) стресс + 7-нитроиндазол + фенибут, n = 8; 8) стресс + амингуанидин (50 мг/кг), n = 8; 9) стресс + амингуанидин + глуфимет, n = 8; 10) стресс + амингуанидин + фенибут, n = 8. Все вещества вводились внутривентриально однократно до стрессирования.

Измерение артериального давления проводили у всех животных до и после стрессирования. Изучение параметров системы гемостаза проводили по степени и скорости агрегации тромбоцитов на двухканальном лазерном анализаторе (НПФ «Биола», Россия) [Габбасов З.А. и др., 1989], а также по АЧТВ, ПВ и уровню фибриногена (с использованием коммерческих наборов) в плазме крови на оптико-механическом коагулометре (ООО «Эйлитон», Россия). Получение митохондриальных клеток сердца и головного мозга производили путем дифференциального центрифугирования гомогенатов органов при температуре окружающей среды +4-8°C [Lanza I.R. et al., 2009]. Изучение дыхательной функции митохондрий проводили полярографическим методом измерения концентрации кислорода в ячейке с помощью электрода Кларка ("Эконикс-Эксперт", Россия). Функциональное состояние I и II комплексов дыхательной цепи оценивали путем определения интенсивности потребления кислорода после добавления соответствующих субстратов окисления (5 мМ малат/5 мМ глутамат и 5 мМ сукцинат соответственно). Скорость дыхания выражали в нмоль O₂ / мин / мг белка митохондрий и регистрировали в следующих метаболических состояниях: V₃ – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием в присутствии АДФ, V₄ – скорость дыхания после исчерпания добавленного АДФ. Кроме того рассчитывался коэффициент дыхательного контроля как отношение V₃/V₄ [Brand M.D. et al., 2011]. В полученных митохондриальных фракциях из гомогенатов исследуемых органов определяли концентрацию первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (дикетоны, малоновый диальдегид) продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы) [Стальная И.Д. и др., 1977; Моин В.М., 1986; Королюк М.А. и др., 1988; Костюк В.А. и др., 1990; Ушкалова В.Н. и др., 1993] Концентрацию белка определяли методом Lowry О.Н. и соавт. [Lowry, О.Н., 1951]. Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови и гомогенатах сердца и головного мозга проводили скрининг-методом в модификации Метельской В.А. [Метельская В.А. и др., 2005].

Оценку центрального NO-ергического компонента механизма действия исследуемых соединений проводили по изменению уровня систолического АД после введения исследуемых веществ в боковые желудочки мозга наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутривентриально) животных на фоне блокады NOS и ГАМК_A-рецепторов. Исследуемые вещества вводили с помощью микроинъектора цифрового стереотаксического аппарата (Shenzhen RWD Life Science Co, Китай) в полость бокового желудочка головного мозга крысы по координатам стереотаксического атласа относительно брегмы: 1,40 мм латеральнее, 0,36 мм дистальнее в лобно-затылочном направлении, глубина введения 4,30 мм [Paxinos G. et al., 2004]. Все вещества вводили в объеме 10 мкл в

физ. растворе в концентрациях: глүфимет – 25 мг/мл, фенибут – 5 мг/мл, L-NAME – 50 мг/мл, бикикулин – 0,05 мг/мл. Выбор доз обусловлен максимальной выраженностью центрального гипотензивного эффекта.

Изучение влияния исследуемых соединений на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в условиях *in vitro* проводили на перитонеальных макрофагах мышей [Fortier A.H. et al., 1982]. Для получения активированных перитонеальных макрофагов создавали асептическое воспаление путем внутрибрюшинного введения 1 мл 3% раствора ферментативного пептона (Диа-М, Россия). Мышей экспонировали в течение 72 часов, после чего промывали брюшную полость охлажденным раствором питательной среды DMEM (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию макрофагов в объеме высевали в планшет для клеточных культур, формировали интактную, контрольную и опытные группы из расчета по 9 лунок планшета для культивирования на группу. Макрофаги в контрольной и опытной группах активировали добавлением липополисахарида *E. coli* (ЛПС) (Sigma, США) в каждую лунку в концентрации 100 нг/мл [Mu L. et al., 2017]. В лунки с клетками опытных групп отдельно добавляли глүфимет и фенибут в концентрации 10^{-5} М. После инкубации в течение 24 часов отбирали культуральную среду для последующего определения уровня конечных метаболитов NO. Оставшиеся в лунках макрофаги «снимали» с культурального пластика и лизировали для последующего определения в них концентрации индуцибельной NO-синтазы (Cloud-Clone Corp., США) и цГМФ (Thermo Fisher Scientific, США) методом ИФА.

При исследовании *ex vivo* глүфимет и фенибут вводили внутрибрюшинно дважды в день в течение всего времени экспонирования, ЛПС в дозе 100 мкг/кг – однократно внутрибрюшинно [Тюренков И.Н. и др., 2014]. Получение и культивирование макрофагов перитонеального экссудата проводили по вышеописанной методике, за исключением добавления ЛПС и исследуемых соединений в лунки планшета для культивирования. Полученные клетки лизировали и использовали для определения концентрации индуцибельной изоформы NO-синтазы и цГМФ методом ИФА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10». Предварительная проверка выборок данных на нормальность распределения осуществлялась по W-критерию Шапиро-Уилка. Различия между выборками оценивались по параметрическому t-критерию Стьюдента для парных сравнений и по критерию Ньюмена-Кейлса – для множественных. Статистически достоверными различия считали при уровне значимости $p < 0,05$.

В третьей главе представлены результаты изучения *in vitro* и *ex vivo* влияния глүфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных и стрессированных крыс при стимуляции β_1 -адренорецепторов и М-холинорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз.

Было выявлено, что глүфимет и фенибут в условиях *in vitro* снижали прирост амплитуды сокращений при стимуляции β_1 -адренорецепторов

дофамином и улучшали расслабление миокарда. Блокада синтеза NO приводила к значительному усилению сократимости изолированных предсердий, а исследуемые соединения в меньшей степени снижали изучаемый параметр, что свидетельствует о вероятной реализации их действия через NO-систему (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние *in vitro* глуфимета и фенибута на изменение сократимости изолированных предсердий интактных крыс при стимуляции β_1 -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз ($M \pm \sigma$)

Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %						
Частота электростимуляции, имп/мин	Исход	Глуфимет	Фенибут	L-NAME	L-NAME + глуфимет	L-NAME + фенибут
150	44,0 ± 4,1	40,2 ± 2,4* (-8,6%)	39,8 ± 2,5* (-9,5%)	99,0 ± 7,5* (+125,0%)	94,1 ± 4,3 (-4,9%)	95,7 ± 5,4 (-3,3%)
180	39,5 ± 3,1	36,2 ± 3,2 (-8,3%)	36,0 ± 2,5 (-8,9%)	88,0 ± 3,6* (+122,8%)	84,5 ± 6,3 (-4,0%)	86,1 ± 5,6 (-2,1%)
210	34,4 ± 4,3	29,0 ± 3,0* (-15,7%)	27,7 ± 2,7* (-19,5%)	73,5 ± 3,8* (+113,7%)	69,5 ± 4,9 (-5,4%)	71,3 ± 3,0 (-3,0%)
240	28,6 ± 3,0	22,1 ± 2,5* (-22,7%)	21,2 ± 3,3* (-25,9%)	58,7 ± 3,0* (+105,2%)	53,2 ± 3,6# (-9,4%)	55,3 ± 3,2 (-5,8%)
270	23,1 ± 3,0	17,1 ± 3,6* (-26,0%)	16,6 ± 1,5* (-28,1%)	45,7 ± 2,9* (+97,8%)	42,1 ± 3,9 (-7,9%)	41,1 ± 4,7 (-10,1%)
300	20,2 ± 3,0	16,1 ± 2,1* (-20,3%)	15,5 ± 1,8* (-23,3%)	41,6 ± 3,4* (+105,9%)	37,7 ± 3,7 (-9,4%)	35,9 ± 4,4# (-13,7%)

Примечание: * - изменения достоверны относительно исходных показателей (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В скобках представлены проценты изменения в группах: показателей после добавления глуфимета или фенибута – относительно исходных значений прироста/снижения сократимости; показателей после добавления глуфимета или фенибута на фоне блокады NOS – относительно прироста/снижения сократимости после добавления L-NAME.

После добавления изучаемых соединений уменьшалось смещение от изолинии амплитуды сокращений относительно исходных значений, что свидетельствует об улучшении расслабления миокарда при увеличении частоты навязанного ритма. При дефиците оксида азота наблюдалось выраженное повышение исследуемого показателя. При добавлении глуфимета и фенибута на фоне неселективного ингибирования NOS изучаемый параметр не отличался от такового только после введения L-NAME (рис. 1).

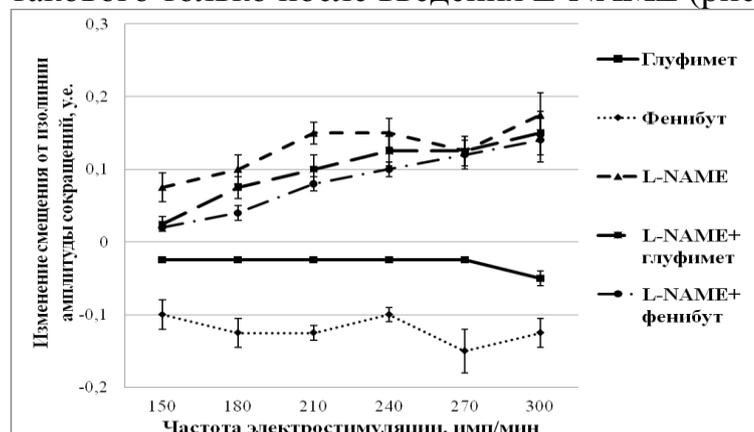


Рисунок 1. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп относительно исходных значений ($M \pm m$).

В условиях целого организма, когда и глуфимет, и фенибут вводили животным внутрибрюшинно, также регистрировали снижение прироста сократимости изолированных предсердий, однако при блокаде NO-синтаз не наблюдалось ограничения их инотропного влияния на сердце (табл. 2).

В группах животных, получавших глуфимет и фенибут на фоне дефицита NO, смещение от изолинии амплитуды сокращений практически не отличалось от такового крыс с блокадой NOS, что, вероятно, свидетельствует о наличии NO-ергического компонента в механизме их действия (рис. 2).

Таблица 2.

Влияние *ex vivo* глуфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных крыс при стимуляции β_1 -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз ($M \pm \sigma$).

Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %						
Частота электростимуляции, имп/мин	Группы животных					
	Интактная (n = 7)	Глуфимет (n = 7)	Фенибут (n = 7)	L-NAME (n = 6)	L-NAME + глуфимет (n = 7)	L-NAME + фенибут (n = 7)
150	44,5 ± 3,0	40,9 ± 4,4* (-8,1%)	46,7 ± 3,0 (+4,9%)	96,6 ± 7,5* (+117,1%)	40,2 ± 3,0# (-58,4%)	45,5 ± 3,7# (-52,9%)
180	42,3 ± 5,4	26,5 ± 2,9* (-37,3%)	34,6 ± 3,9* (-18,2%)	75,1 ± 4,3* (+77,5%)	39,4 ± 3,9# (-47,5%)	42,4 ± 3,6# (-43,5%)
210	35,9 ± 3,5	24,3 ± 3,1* (-32,3%)	28,3 ± 4,2* (-21,2%)	63,4 ± 4,4* (+76,6%)	34,5 ± 4,0# (-45,6%)	33,8 ± 2,5# (-46,7%)
240	32,1 ± 4,1	17,9 ± 3,4* (-44,2%)	24,5 ± 4,0* (-23,7%)	48,6 ± 3,8* (+51,4%)	29,9 ± 4,2# (-38,5%)	29,1 ± 2,3# (-40,1%)
270	29,5 ± 3,4	16,6 ± 2,8* (-43,7%)	16,1 ± 3,2* (-45,4%)	43,4 ± 2,6* (+47,1%)	26,9 ± 3,9# (-38,0%)	30,8 ± 4,0# (-29,0%)
300	27,6 ± 3,5	16,3 ± 2,6* (-40,9%)	15,1 ± 3,5* (-45,3%)	42,2 ± 2,8* (+52,9%)	25,7 ± 4,0# (-39,1%)	27,1 ± 4,2# (-35,8%)

Примечание: * - изменения достоверны относительно показателей крыс интактной группы (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); # - изменения достоверны по сравнению с показателями группы животных, которым вводили L-NAME (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$). В скобках представлены проценты изменения в группах: животных, получавших глуфимет или фенибут – относительно значений интактной группы; крыс, которым вводили глуфимет или фенибут на фоне блокады NOS – относительно значений группы самок, получавших только L-NAME.

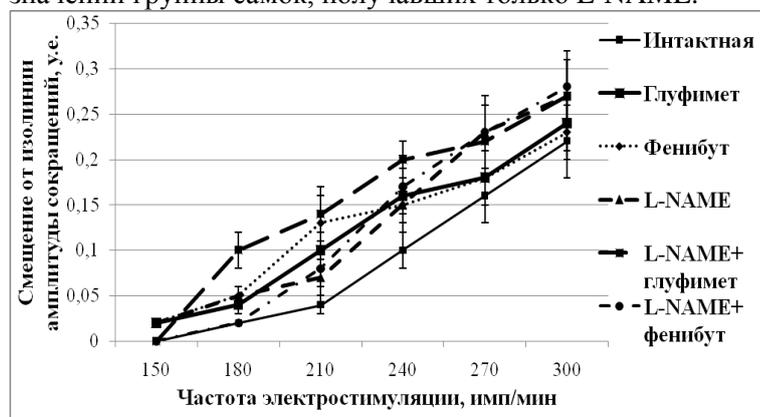


Рисунок 2. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп ($M \pm m$).

Стрессорное воздействие приводило к усилению инотропного ответа изолированных предсердий крыс по сравнению с интактными самками. Блокада NOS вызывала возрастание амплитуды сокращений предсердий стрессированных

животных по сравнению с контрольной группой только при малой частоте навязанного ритма; при увеличении числа импульсов в минуту прирост сократимости на адреностимуляцию был ниже такового самок группы негативного контроля. Дефицит NO приводил к значительному ухудшению расслабления миокарда, что, вероятно, является одним из механизмов уменьшения инотропного ответа при увеличении частоты электростимуляции. Исследуемые соединения снижали прирост сократимости изолированных предсердий на стимуляцию адренорецепторов в условиях острого стрессорного воздействия и на фоне блокады NOS (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние *ex vivo* глуфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий стрессированных крыс при стимуляции β_1 -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз ($M \pm \sigma$).

Частота стимуляции, имп/мин	Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %						
	Группы животных						
	Интактная (n = 7)	Стресс + физ. р-р (n = 7)	Стресс + глуфимет (n = 7)	Стресс + фенибут (n = 6)	Стресс + L-NAME (n = 7)	Стресс + L-NAME + глуфимет (n = 7)	Стресс + L-NAME + фенибут (n = 7)
150	44,5 ± 3,0	56,7 ± 2,7* (+27,4%)	49,0 ± 3,9# (-13,6%)	45,8 ± 2,0# (-19,2%)	73,5 ± 2,6# (+29,6%)	45,4 ± 3,7^ (-38,2%)	60,5 ± 2,2^ (-17,7%)
180	42,3 ± 5,4	55,4 ± 2,4* (+31,0%)	42,2 ± 2,0# (-23,8%)	30,4 ± 3,1# (-45,1%)	54,6 ± 3,6 (-1,4%)	40,5 ± 3,8^ (-25,8%)	45,3 ± 1,8^ (-17,0%)
210	35,9 ± 3,5	48,2 ± 2,9* (+34,3%)	41,5 ± 2,7# (-13,9%)	24,7 ± 2,6# (-48,7%)	41,6 ± 2,2# (-13,7%)	39,4 ± 4,4 (-5,3%)	37,1 ± 2,9^ (-10,8%)
240	32,1 ± 4,1	43,1 ± 3,5* (+34,3%)	38,9 ± 4,5 (-9,7%)	24,9 ± 3,3# (-42,2%)	31,3 ± 3,2# (-27,4%)	36,0 ± 3,9 (+15,0%)	28,4 ± 2,3 (-9,3%)
270	29,5 ± 3,4	38,7 ± 2,9* (+31,2%)	31,2 ± 2,8# (-19,4%)	24,5 ± 1,8# (-36,7%)	28,6 ± 3,5# (-26,1%)	24,1 ± 3,1 (-15,7%)	24,3 ± 2,7 (-15,0%)
300	27,6 ± 3,5	35,3 ± 2,7* (+27,9%)	29,4 ± 2,8# (-16,7%)	23,7 ± 2,4# (-32,9%)	22,5 ± 2,5# (-36,3%)	24,6 ± 2,6 (+9,3%)	25,1 ± 2,5 (+11,5%)

Примечание: * - изменения достоверны относительно показателей крыс интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - изменения достоверны по сравнению с показателями группы стрессированных животных; ^ - изменения достоверны по сравнению с показателями стрессированных животных, получавших L-NAME (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$). В скобках представлены проценты изменения в группах: стрессированных самок – относительно аналогичных показателей интактных крыс; животных, получавших глуфимет или фенибут – относительно значений стрессированных самок; крыс, которым вводили глуфимет или фенибут на фоне блокады NOS – относительно значений группы животных, получавших только L-NAME.

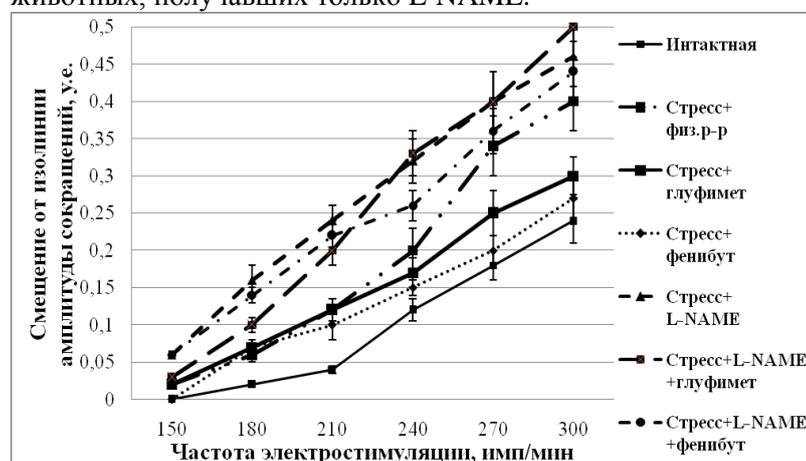


Рисунок 3. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп ($M \pm m$).

У животных, получавших глуфимет и фенибут на фоне ингибирования NOS, смещение от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий при увеличении частоты навязанного ритма значимо не отличалось от аналогичного показателя самок, которым вводили L-NAME (рис. 3).

При активации парасимпатической системы ацетилхолином и добавлении в перфузируемый раствор глуфимета или фенибута достоверного влияния на сократимость изолированных предсердий крыс обнаружено не было. При стрессорном воздействии было отмечено повышение инотропного ответа при добавлении ацетилхолина, что свидетельствует об увеличении рефлекторных холинергических влияний на сердце. Блокада NO-синтаз не приводила к изменению амплитуды сокращений по сравнению с исходными данными при малой частоте навязанного ритма; при увеличении количества импульсов в секунду было зарегистрировано достоверное повышение данного показателя. Однако известно, что NO усиливает холинергические влияния на инотропную функцию сердца, а также блокирует кальциевые каналы. Полученные данные по взаимодействию NO- и холинергической систем отличаются от данных литературы, что может быть связано с использованием различных моделей, методов исследования и требуют дальнейшего изучения.

В четвертой главе представлены результаты изучения кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута в условиях стрессорного повреждения и селективной блокады NO-синтаз.

При стрессе активируется индуцибельная изоформа NO-синтазы, производящая NO в больших количествах, оказывающий токсическое действие на клетки, в связи с чем было изучено влияние глуфимета и фенибута на концентрацию оксида азота в крови, тканях мозга и сердца при иммобилизационно-болевым воздействием и селективном ингибировании iNOS и nNOS. Выявлено, что стрессорное воздействие приводит к увеличению концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга, что, вероятно, связано с активацией экспрессии индуцибельной NOS и синтезом большого количества NO (табл. 4). Блокада nNOS приводила к некоторому снижению уровня нитрит- и нитрат-ионов, однако данный параметр существенно не отличался от контрольной группы стрессированных крыс, что вероятно связано с развитием истощения в результате острого иммобилизационно-болевого воздействия. Изучаемые соединения вызывали снижение концентрации конечных метаболитов NO в исследуемых органах на фоне ингибирования nNOS, вероятно снижая экспрессию iNOS. В поддержку этого свидетельствует отсутствие значимого влияния производных нейроактивных аминокислот на исследуемый показатель при блокаде индуцибельной изоформы NO-синтазы (табл. 4).

NO в большой концентрации вследствие активации iNOS взаимодействует с супероксид-анионом с образованием высокорекреационного соединения – пероксинитрита, который приводит к развитию перекисного окисления липидов, белков и повреждения ДНК. В этой связи целесообразным было изучить влияние глуфимета и фенибута на активность процессов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга в условиях стрессорного воздействия и селективной блокады NOS.

Таблица 4.

Влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови и гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS ($M \pm \sigma$).

Группы животных	Концентрация конечных метаболитов NO, мкмоль/л		
	Сыворотка крови	Гомогенат сердца	Гомогенат головного мозга
Интактная (n = 8)	21,6 ± 2,7	23,4 ± 2,6	14,6 ± 1,7
Стресс + физ.р-р (n = 8)	31,1 ± 2,8* (+44,0%)	32,8 ± 2,8* (+40,2%)	18,0 ± 0,7* (+23,3%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	22,7 ± 3,5# (-27,0%)	21,8 ± 2,9# (-33,5%)	16,4 ± 1,9 (-8,9%)
Стресс + фенибут (n = 8)	19,4 ± 2,2# (-37,6%)	24,7 ± 3,5# (-24,7%)	18,6 ± 2,9 (+3,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	25,6 ± 2,3# (-17,7%)	29,3 ± 2,1 (-10,7%)	20,4 ± 2,5 (+13,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	24,6 ± 3,4 (-3,9%)	25,1 ± 1,6^ (-14,3%)	14,2 ± 2,2^ (-30,4%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	26,7 ± 2,5 (+4,3%)	23,4 ± 2,4^ (-20,1%)	16,7 ± 1,7^ (-18,1%)
Стресс + амингуанидин (n = 8)	17,8 ± 2,2# (-42,8%)	18,9 ± 2,7# (-42,4%)	15,1 ± 0,8# (-16,1%)
Стресс + амингуанидин + глуфимет (n = 8)	20,7 ± 2,0 (+16,3%)	21,1 ± 2,9& (+11,6%)	17,4 ± 2,8 (+15,2%)
Стресс + амингуанидин + фенибут (n = 8)	16,5 ± 3,2 (-7,3%)	20,5 ± 2,3 (+8,5%)	16,5 ± 1,6 (+9,3%)

Примечание: изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей: * - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); ^ - самок, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); & - животных, которым вводили ингибитор iNOS амингуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В скобках представлены % изменения показателей в группе: стрессированных животных – относительно интактных крыс; самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных; крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

У животных после 24-х часового стрессорного воздействия наблюдалось увеличение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ и снижение активности антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца и головного мозга (табл. 5). Исследуемые соединения ограничивали ПОЛ, снижая концентрацию продуктов и увеличивая активность антиоксидантных ферментов. Блокада iNOS ограничивала образование АФК и окисление липидов. Ингибирование nNOS приводило к достоверному увеличению интенсивности процессов ПОЛ, выражающееся в повышении уровня диеновых конъюгатов, дикетонов и МДА. При этом активность антиоксидантных ферментов также была выше по сравнению с контрольной группой. Производные нейроактивных аминокислот подавляли окислительный стресс на фоне блокады нейрональной NOS и не оказывали влияния у животных, получавших амингуанидин, что может свидетельствовать об их ингибирующем влиянии на активность или экспрессию iNOS (табл. 5).

Таблица 5.

Влияние глужфимета и фенибута на концентрацию продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS ($M \pm \sigma$).

Группы животных	Исследуемый показатель					
	Диеновые конъюгаты, D ₂₃₃ /мг белка		Дикетоны, D ₂₇₈ /мг белка		Малоновый диальдегид, ммоль/мг белка	
	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг
Интактная (n = 8)	2,69 ± 0,16	2,05 ± 0,20	0,72 ± 0,02	0,41 ± 0,03	6,67 ± 1,50	11,59 ± 0,50
Стресс+физ.р-р (n = 8)	3,27 ± 0,12* (+21,6%)	2,61 ± 0,18* (+27,3%)	0,83 ± 0,04* (+15,3%)	0,54 ± 0,03* (+31,7%)	9,92 ± 1,11* (+48,7%)	18,11 ± 0,75* (+56,2%)
Стресс+глужфимет (n = 8)	2,42 ± 0,26# (-26,0%)	2,05 ± 0,23# (-21,5%)	0,65 ± 0,05 (-21,7%)	0,44 ± 0,04 (-18,5%)	7,57 ± 0,51# (-23,7%)	12,72 ± 2,16# (-29,8%)
Стресс+фенибут (n = 8)	2,75 ± 0,09 (-15,9%)	1,67 ± 0,22# (-36,0%)	0,67 ± 0,08 (-19,3%)	0,39 ± 0,06# (-27,8%)	8,18 ± 0,3 (-17,5%)	11,06 ± 2,48# (-38,9%)
Стресс+7-нитроиндазол (n = 8)	4,34 ± 0,32# (+32,7%)	2,39 ± 0,12 (-8,4%)	1,17 ± 0,16# (+41,0%)	0,60 ± 0,05 (+11,1%)	11,03 ± 0,89 (+11,2%)	18,71 ± 1,38 (+3,3%)
Стресс+7-нитроиндазол +глужфимет (n = 8)	3,29 ± 0,29^ (-24,2%)	1,92 ± 0,09^ (-19,7%)	0,84 ± 0,10^ (-28,2%)	0,48 ± 0,05 (-20,0%)	8,63 ± 0,84^ (-21,8%)	17,29 ± 1,84 (-7,6%)
Стресс+7-нитроиндазол +фенибут (n = 8)	3,11 ± 0,14^ (-28,3%)	2,02 ± 0,17 (-15,5%)	0,75 ± 0,04^ (-35,9%)	0,48 ± 0,04 (-20,0%)	8,35 ± 0,65^ (-24,3%)	13,22 ± 1,27^ (-29,3%)
Стресс+аминогуанидин (n = 8)	2,98 ± 0,17 (-8,9%)	1,73 ± 0,19# (-33,7%)	0,77 ± 0,03 (-7,2%)	0,42 ± 0,04# (-22,2%)	8,53 ± 0,62 (-14,0%)	14,90 ± 1,40# (-17,7%)
Стресс+аминогуанидин +глужфимет (n = 8)	2,99 ± 0,11 (+0,3%)	1,69 ± 0,29 (-2,3%)	0,71 ± 0,05 (-7,8%)	0,39 ± 0,03 (-7,1%)	8,52 ± 0,99 (-0,1%)	11,36 ± 2,10& (-23,8%)
Стресс+аминогуанидин +фенибут (n = 8)	3,01 ± 0,12 (+1,0%)	1,95 ± 0,17 (+12,7%)	0,72 ± 0,05 (-6,5%)	0,44 ± 0,04 (+4,8%)	7,39 ± 0,83 (-13,4%)	15,50 ± 1,43 (+4,0%)
Группы животных	Исследуемый показатель					
	Супероксиддисмутаза, у.е./мг белка		Каталаза, мг H ₂ O ₂ /мин/мг белка		Глутатионпероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	
	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг
Интактная (n = 8)	54,2 ± 3,3	24,8 ± 4,2	13,5 ± 1,5	8,7 ± 0,8	55,1 ± 5,9	17,5 ± 1,0
Стресс+физ.р-р (n = 8)	32,7 ± 4,1* (-39,7%)	18,4 ± 1,5 (-25,8%)	8,4 ± 0,8* (-37,8%)	7,8 ± 1,6 (-10,3%)	26,6 ± 2,9* (-51,7%)	11,6 ± 1,1* (-33,7%)
Стресс+глужфимет (n = 8)	42,1 ± 3,5 (+28,7%)	22,5 ± 3,8 (+22,3%)	13,6 ± 0,6# (+61,9%)	8,8 ± 1,6 (+12,8%)	37,0 ± 3,1 (+39,1%)	15,6 ± 3,5 (+34,5%)
Стресс+фенибут (n = 8)	53,9 ± 3,9# (+64,8%)	28,3 ± 5,2# (+53,8%)	13,0 ± 1,4# (+54,8%)	8,6 ± 1,6 (+10,3%)	56,9 ± 5,5# (+113,9%)	18,0 ± 3,1# (+55,2%)
Стресс+7-нитроиндазол (n = 8)	43,9 ± 4,0# (+34,2%)	34,0 ± 4,4# (+84,8%)	14,7 ± 0,5# (+75,0%)	9,7 ± 1,0 (+24,3%)	39,7 ± 3,0# (+49,2%)	17,0 ± 3,5# (+46,5%)
Стресс+7-нитроиндазол +глужфимет (n = 8)	54,0 ± 6,1 (+23,0%)	36,4 ± 6,0 (+7,1%)	12,0 ± 0,6^ (-18,4%)	9,9 ± 1,7 (+2,1%)	32,1 ± 2,9^ (-19,1%)	17,6 ± 3,3 (+3,5%)
Стресс+7-нитроиндазол +фенибут (n = 8)	43,5 ± 5,5 (-0,9%)	26,0 ± 4,5 (-23,5%)	10,9 ± 0,6^ (-25,8%)	8,0 ± 1,3 (-17,5%)	35,1 ± 5,8 (-11,6%)	17,8 ± 5,0 (+4,7%)
Стресс+аминогуанидин (n = 8)	44,7 ± 3,5# (+36,7%)	27,1 ± 3,8# (+47,3%)	11,9 ± 1,2# (+41,7%)	8,0 ± 1,9 (+2,6%)	39,9 ± 7,6# (+50,0%)	16,2 ± 3,1# (+39,6%)
Стресс+аминогуанидин + глужфимет (n = 8)	39,6 ± 6,9 (-11,4%)	29,9 ± 4,5 (+10,3%)	10,7 ± 0,8 (-10,1%)	7,4 ± 1,0 (-7,5%)	42,5 ± 6,5 (+6,5%)	18,0 ± 4,3 (+11,1%)
Стресс+аминогуанидин +фенибут (n = 8)	44,8 ± 6,7 (+0,2%)	25,4 ± 4,4 (-6,3%)	9,3 ± 1,6& (-21,8%)	8,0 ± 1,3 (0,0%)	34,6 ± 6,8 (-13,3%)	15,9 ± 3,0 (-1,8%)

Примечание: изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей: * - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - группы стрессированных крыс; ^ - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол; & - животных, которым вводили аминогуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$). В скобках представлены % изменения показателей в группе: стрессированных животных – относительно интактных крыс; самок, получавших глужфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных; крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

Развивающийся при иммобилизационно-болевым воздействии оксидативный стресс, вероятно, вследствие гиперпродукции NO и образования пероксинитрита, приводил к нарушению функционирования митохондрий сердца и головного мозга: снижалась скорость АДФ-индуцированного потребления кислорода (V_3) и увеличивалась после истощения АДФ (V_4), что свидетельствует о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования (рис. 1-2, табл. 6). У животных, получавших производные нейроактивных аминокислот до стрессирования, отмечалось снижение V_4 и увеличение V_3 , что подтверждается повышением дыхательного контроля. Улучшение дыхательной функции митохондрий сердца и мозга под влиянием изучаемых соединений, вероятно, связано с уменьшением экспрессии iNOS, гиперпродукции NO и ограничением повреждающего действия АФК и азота на митохондрии. Блокада нейрональной NOS усугубляла дисфункцию митохондрий, наиболее выражено в клетках головного мозга стрессированных животных. Уменьшение синтеза оксида азота этой изоформой NO-синтазы, по-видимому, является причиной гиперактивации стресс-системы из-за отсутствия регуляторного влияния NO. Ингибирование iNOS приводило к значительному улучшению функционирования митохондрий клеток сердца и головного мозга на фоне стрессорного воздействия, а изучаемые соединения в этих условиях достоверно не изменяли исследуемые показатели. Можно предположить, что изучаемые производные нейроактивных аминокислот реализуют свои протекторные свойства путем снижения синтеза NO индуцибельной NOS, а также посредством активации конститутивных NO-синтаз (рис. 4-5, табл. 6).

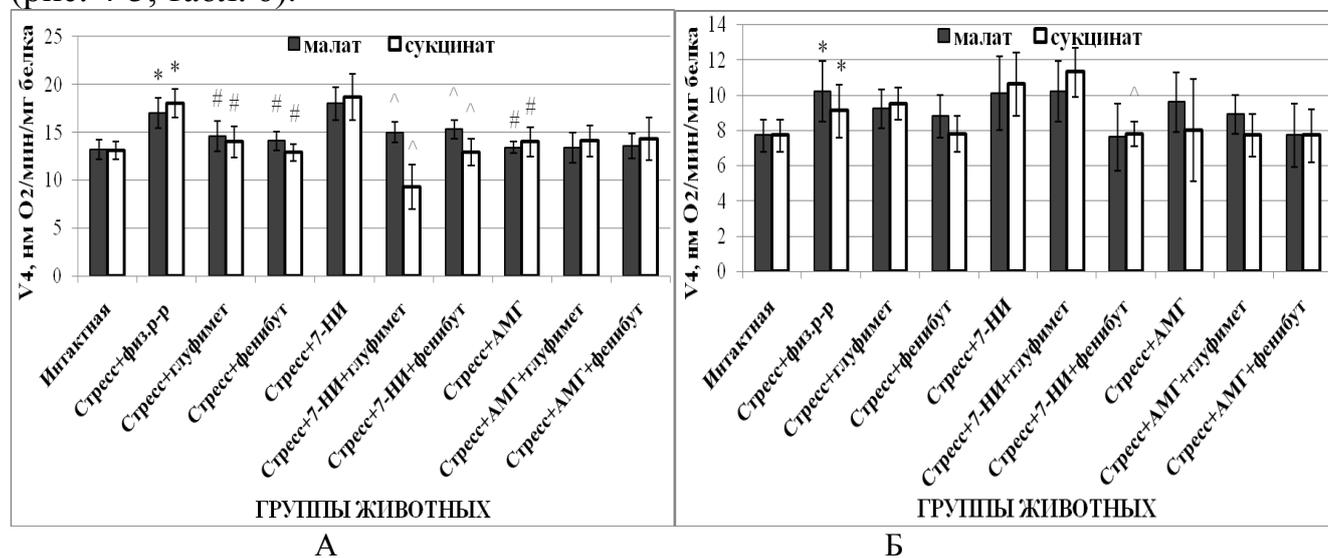


Рисунок 4. Нестимулированная скорость поглощения кислорода (V_4) митохондриями клеток сердца (А) и головного мозга (Б) животных исследуемых групп при использовании различных субстратов дыхательной цепи ($M \pm \sigma$).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - аминогуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно: * - животных интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - стрессированных крыс контрольной группы (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); ^ - стрессированных самок, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

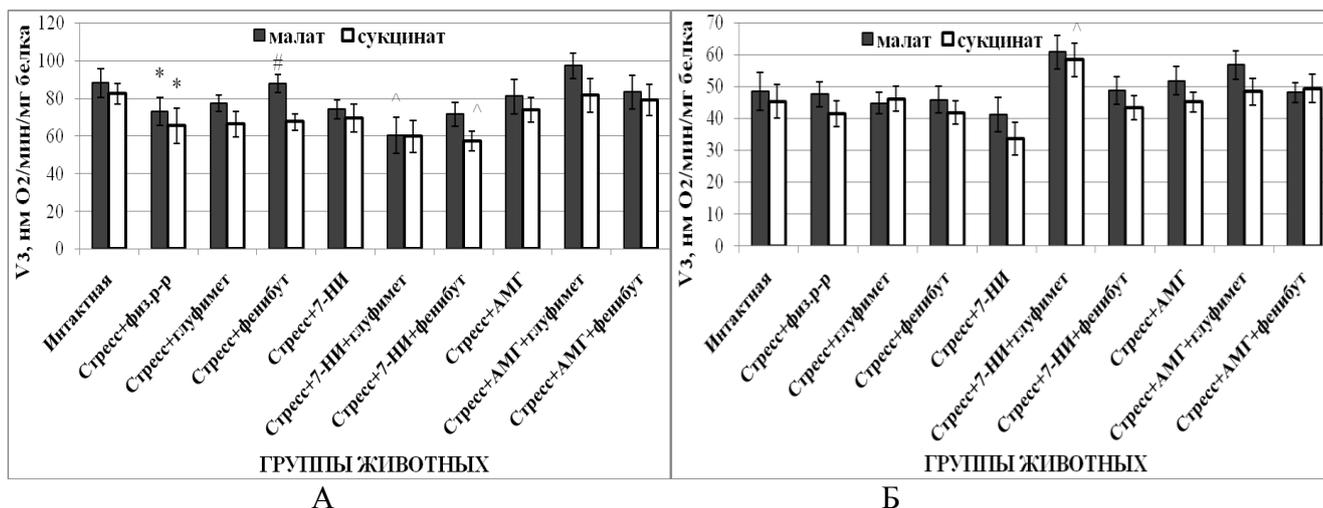


Рисунок 5. Скорость поглощения кислорода митохондриями клеток сердца (А) и головного мозга (Б) животных исследуемых групп после добавления АДФ (V_3) при использовании субстратов I и II комплексов дыхательной цепи ($M \pm \sigma$).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - амингуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно: * - животных интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - стрессированных крыс контрольной группы; ^ - стрессированных самок, получавших только 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Таблица 6.

Значения коэффициента дыхательного контроля в митохондриях клеток сердца и головного мозга животных исследуемых групп ($M \pm \sigma$).

Группы животных	Митохондрии клеток сердца		Митохондрии клеток головного мозга	
	Малат	Сукцинат	Малат	Сукцинат
Интактная (n = 8)	6,7 ± 0,9	6,4 ± 0,7	6,4 ± 1,2	5,9 ± 1,1
Стресс + физ.р-р (n = 8)	4,3 ± 0,6* (-35,8%)	3,6 ± 0,6* (-43,7%)	4,8 ± 1,0* (-25,0%)	4,7 ± 0,9* (-20,3%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	5,3 ± 0,3# (+23,2%)	4,8 ± 0,9# (+33,3%)	4,9 ± 0,5 (+2,1%)	4,8 ± 0,5 (+2,1%)
Стресс + фенибут (n = 8)	6,2 ± 0,5# (+44,2%)	5,2 ± 0,5# (+44,4%)	5,3 ± 0,7 (+10,4%)	5,3 ± 0,9 (+12,8%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	4,2 ± 0,4 (-2,3%)	3,9 ± 0,7 (+8,3%)	4,4 ± 1,4 (-8,3%)	3,2 ± 0,7# (-31,9%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	4,0 ± 0,8 (-4,8%)	7,2 ± 2,0^ (+84,6%)	6,3 ± 1,8^ (+43,2%)	5,2 ± 0,4^ (+62,5%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	4,7 ± 0,5 (+11,9%)	4,5 ± 0,7 (+15,4%)	6,4 ± 1,0^ (+45,4%)	5,9 ± 1,3^ (+84,4%)
Стресс + амингуанидин (n = 8)	6,1 ± 0,8# (+41,9%)	5,4 ± 0,9# (+50,0%)	6,0 ± 1,0 (+25,0%)	6,1 ± 1,7# (+29,8%)
Стресс + амингуанидин + глуфимет (n = 8)	7,3 ± 0,7& (+19,7%)	5,9 ± 1,2 (+9,3%)	6,4 ± 1,2 (+6,7%)	6,6 ± 2,3 (+8,2%)
Стресс + амингуанидин + фенибут (n = 8)	6,1 ± 0,5 (0,0%)	5,5 ± 0,6 (+1,8%)	6,6 ± 2,5 (+10,0%)	6,6 ± 1,4 (+8,2%)

Примечание: изменения статистически достоверны относительно: * - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - группы стрессированных крыс; ^ - самок, получавших ингибитор pNOS 7-нитроиндазол; & - животных, которым вводили амингуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$). В скобках представлены % изменения показателей в группе: стрессированных животных – относительно интактных крыс; самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных; крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

Оксидативный стресс и нарушение функционирования митохондрий играют одну из важнейших ролей в нарушении функции эндотелия [Tang X. et al., 2014]. В связи с этим было изучено влияние глуфимета и фенибута на уровень АД и показатели системы гемостаза в условиях стрессорного воздействия и селективной блокады NOS.

У пяти животных из восьми был отмечен прирост уровня артериального давления после стрессирования, а у остальных трех самок АД несколько снижалось к 24-ому часу иммобилизации (рис. 3). У всех самок, которым вводили ингибитор nNOS 7-нитроиндазол, наблюдалось резкое снижение АД после 24-х часового стрессирования. Это, вероятно, свидетельствует об истощении надпочечников в результате отсутствия стресс-лимитирующего действия nNOS. Блокада индуцибельной NOS предотвращала прирост АД, что, вероятно, связано со снижением производства больших количеств NO и пероксинитрита и их негативного действия на эндотелиоциты. У животных, получавших производные нейроактивных аминокислот как на фоне блокады nNOS, так и iNOS, изменений АД относительно исходного уровня отмечено не было, что свидетельствует об ограничении повреждения эндотелия АФК и азота (рис. 6).

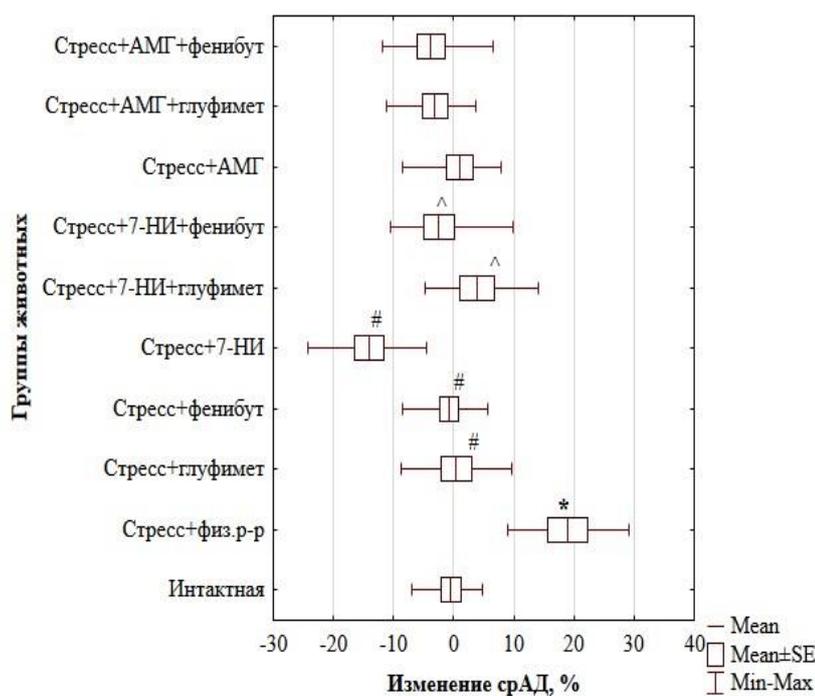


Рисунок 6. Изменение прироста уровня среднего артериального давления у животных исследуемых групп в %.

Примечание: 7-НИ – 7-нитроиндазол, АМГ – амингуанидин.

* - изменения достоверны относительно животных интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самок (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); ^ - изменения достоверны относительно группы стрессированных крыс, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

У стрессированных животных был отмечен сдвиг антитромботической функции эндотелия в сторону прокоагулянтных свойств, о чем свидетельствует увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов, концентрации фибриногена, а также укорочение АЧТВ и ПВ (табл. 7). У крыс, получавших до стрессирования исследуемые соединения, было отмечено достоверное снижение агрегационной способности тромбоцитов. Улучшение показателей гемостаза под действием производных нейроактивных аминокислот при блокаде nNOS и отсутствие такового при ингибировании iNOS свидетельствует о возможном

влиянии глүфимета и фенибута на активность или экспрессию индуцибельной NO-синтазы (табл. 7).

Таблица 7.

Влияние глүфимета и фенибута на показатели системы гемостаза стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS (M ± σ).

Группы животных	Степень агрегации, %	Скорость агрегации, %/мин	АЧТВ, с	ПВ, с	Концентрация фибриногена, г/л
Интактная	25,0 ± 2,5	24,7 ± 3,0	16,3 ± 0,9	23,1 ± 5,3	3,3 ± 1,1
Стресс + физ.р-р (n = 8)	31,1 ± 3,5* (+24,4%)	35,2 ± 2,9* (+42,5%)	13,1 ± 0,5* (-19,6%)	18,6 ± 3,7* (-19,5%)	5,3 ± 0,4* (+60,6%)
Стресс + глүфимет (n = 8)	23,6 ± 3,2# (-24,1%)	25,4 ± 2,8# (-27,8%)	13,9 ± 0,9 (+6,1%)	18,2 ± 2,7 (-2,1%)	4,6 ± 1,1# (-13,2%)
Стресс + фенибут (n = 8)	23,7 ± 2,5# (-23,8%)	24,4 ± 3,6# (-30,7%)	14,2 ± 0,7# (+8,4%)	19,7 ± 2,7 (+5,9%)	4,8 ± 1,2 (-9,4%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	30,6 ± 3,1 (-1,6%)	35,2 ± 4,9 (0,0%)	12,9 ± 1,5 (-1,5%)	17,8 ± 3,9 (-4,3%)	5,1 ± 0,4 (-3,8%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глүфимет (n = 8)	26,2 ± 1,6^ (-14,4%)	27,6 ± 3,7^ (-21,6%)	13,2 ± 2,4 (+2,3%)	21,4 ± 2,4^ (+20,2%)	5,3 ± 0,5 (+3,9%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	28,8 ± 2,7 (-5,9%)	26,8 ± 1,9^ (-23,9%)	14,1 ± 1,7^ (+9,3%)	18,9 ± 4,2 (+6,2%)	4,8 ± 0,8 (-5,9%)
Стресс + аминугуанидин (n = 8)	24,5 ± 2,8# (-21,2%)	28,2 ± 2,9# (-19,9%)	12,9 ± 1,5 (-1,5%)	18,2 ± 3,1 (-2,1%)	4,9 ± 0,9 (-7,5%)
Стресс + аминугуанидин + глүфимет (n = 8)	22,3 ± 2,6 (-9,0%)	27,6 ± 3,3 (-2,1%)	13,6 ± 1,8 (+5,4%)	19,0 ± 3,7 (+4,4%)	5,0 ± 0,6 (+2,0%)
Стресс + аминугуанидин + фенибут (n = 8)	23,7 ± 1,6 (-3,3%)	27,5 ± 4,5 (-2,5%)	14,0 ± 1,3 (+8,5%)	18,1 ± 2,5 (-0,5%)	4,8 ± 0,9 (-2,0%)

Примечание: изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей:

* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); ^ - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$);

В скобках представлены % изменения показателей в группе: стрессированных животных – относительно интактных крыс; самок, получавших глүфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных; крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

В пятой главе представлено изучение центрального и периферического NO-ергического компонента в механизме действия исследуемых производных ГАМК и глүтамата.

ГАМК и глүтамат являются центральными нейромедиаторами, в связи с чем было исследовано центральное действие глүфимета и фенибута на систему оксида азота. Было выявлено, что при введении изучаемого производного глүтамата в боковой желудочек мозга крысы происходит снижение систолического АД, которое предотвращалось неселективной блокадой NO-синтаз, что может свидетельствовать об участии нитроксидергической системы в механизме центрального действия глүфимета (рис. 7а). Фенибут более выражено снижал систолическое АД у крыс как на фоне ингибирования NOS, так и без него (рис.

7б). При блокаде ГАМК_A-рецептора бикукулином глүфимет оказывал гипотензивное действие, но в значительно меньшей степени (рис. 8а). Вероятно, в механизме действия данного производного глутаминовой кислоты определенную роль играет и система ГАМК. Фенибут проявлял аналогичный эффект, снижая АД и при блокаде ГАМК_A-рецептора (рис. 8б).

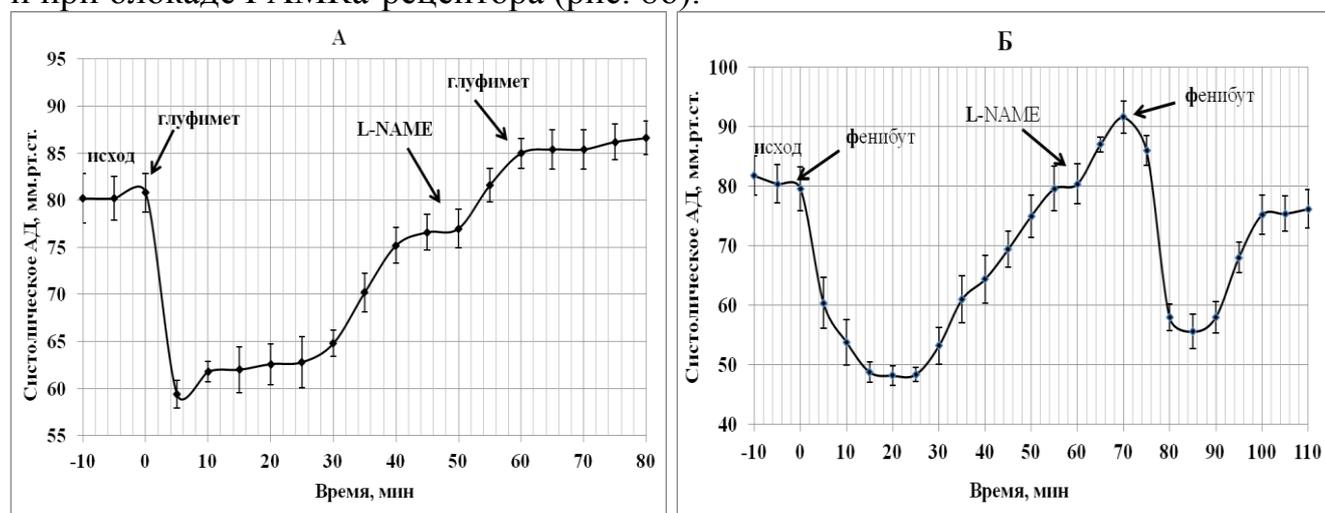


Рисунок 7. Изменение систолического АД после введения глүфимета (А) и фенибута (Б) в боковые желудочки мозга в обычных условиях и на фоне ингибирования NO-синтазы L-NAME ($M \pm m$).

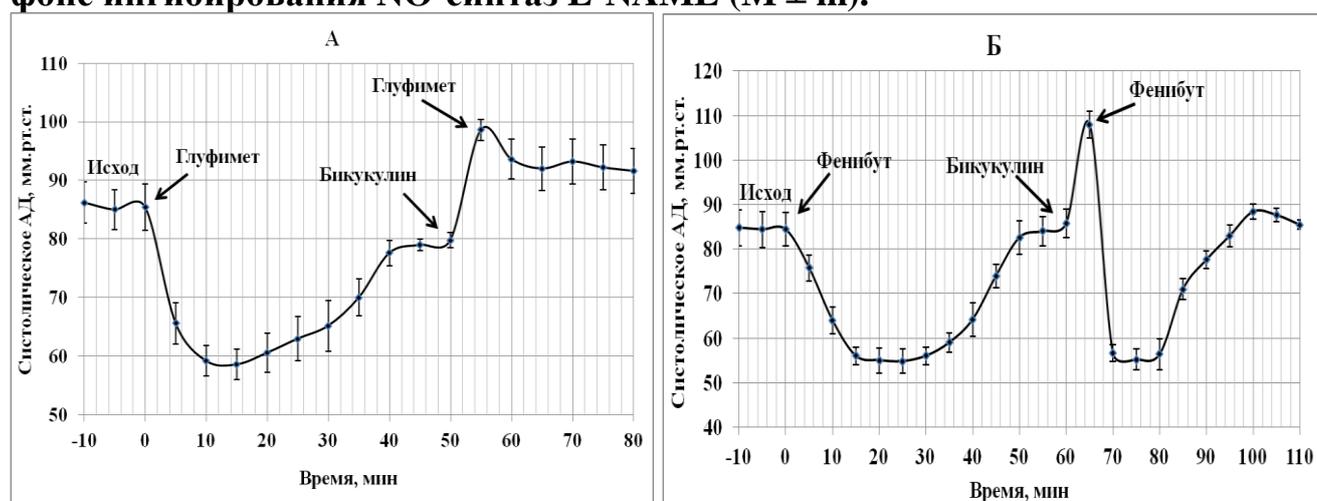


Рисунок 8. Изменение систолического АД после введения глүфимета (А) и фенибута (Б) в боковые желудочки мозга в обычных условиях и на фоне блокады ГАМК_A-рецепторов бикукулином ($M \pm m$).

В связи с тем, что глүфимет и фенибут реализовывали кардиопротекторные эффекты в условиях стрессорного воздействия и блокады нейрональной NO-синтазы, логично было предположить, что одним из механизмов действия указанных соединений является прямое ингибирование индуцибельной NOS.

ЛПС, добавленный в культуру макрофагов *in vitro*, усиливал экспрессию iNOS, что выражалось в увеличении ее концентрации, а также повышении концентрации конечных метаболитов оксида азота и цГМФ (рис. 9). Аналогичные результаты были получены и на модели *ex vivo*, когда вводили активатор

макрофагов – ЛПС мышам внутрибрюшинно (рис. 10). Производные нейроактивных аминокислот ингибировали экспрессию индуцибельной NO-синтазы, снижая уровень iNOS и цГМФ в лизатах макрофагов, а также суммарную концентрацию нитрит- и нитрат-ионов в культуральной среде как в условиях *in vitro*, так и *ex vivo* (рис. 9-10).

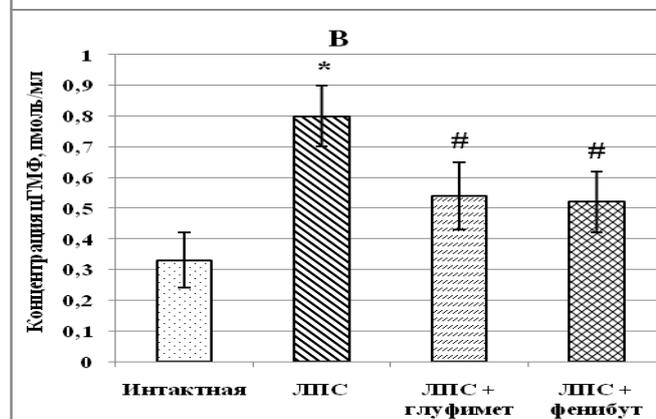
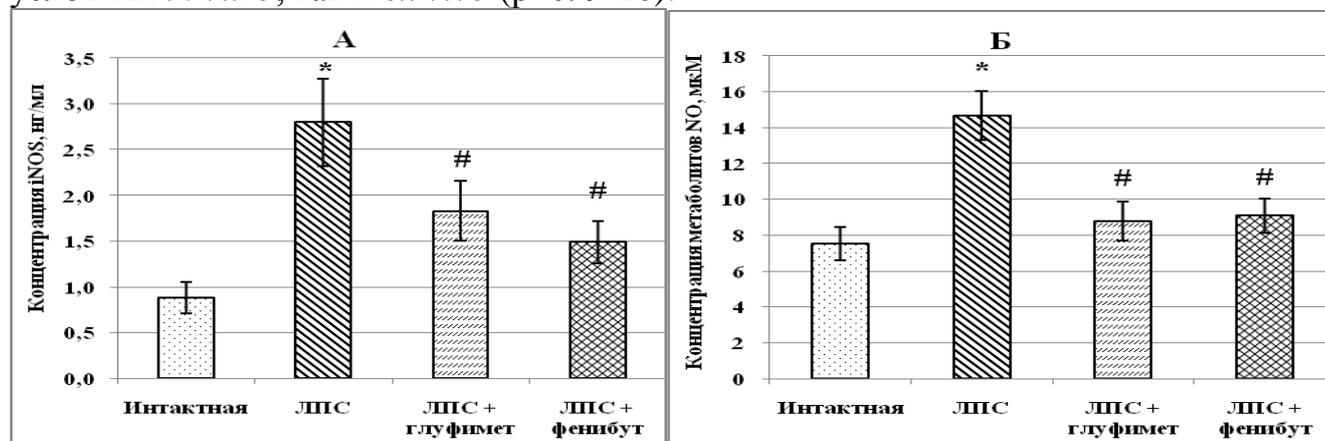


Рисунок 9. Влияние глюфимета и фенибута в условиях *in vitro* на концентрацию индуцибельной NOS (А), конечных метаболитов оксида азота (Б) и цГМФ (В) в перитонеальных макрофагах мышей ($M \pm \sigma$). Примечание:

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

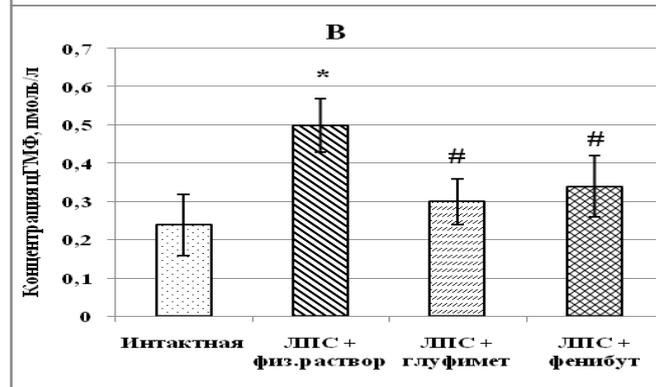
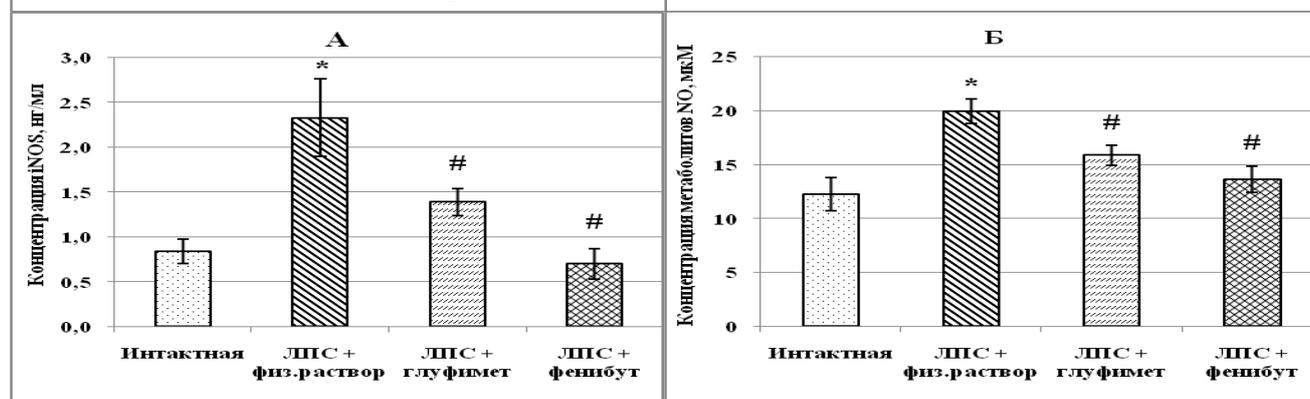


Рисунок 10. Влияние глюфимета и фенибута в условиях *ex vivo* на концентрацию индуцибельной NOS (А), конечных метаболитов оксида азота (Б) и цГМФ (В) в перитонеальных макрофагах мышей ($M \pm \sigma$). Примечание: * - изменения достоверны относительно интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - изменения достоверны относительно контрольной группы (ЛПС) (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлен центральный и периферический NO-ергический компонент кардиопротекторного действия производного глутаминовой кислоты – глюфимета и производного ГАМК – фенибута. Изучаемые соединения снижают концентрацию конечных метаболитов NO в крови, сердце и головном мозге, уменьшают уровень продуктов ПОЛ и увеличивают активность антиоксидантных ферментов, улучшают дыхательную функцию митохондрий в сердце и мозге, а также нормализуют АД и гемостаз при стрессорном воздействии. Указанные эффекты не наблюдались при блокаде iNOS. Показано ингибирующее влияние изучаемых соединений на экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы, что проявлялось в снижении концентрации iNOS, цГМФ и конечных метаболитов NO в ЛПС-активированных перитонеальных макрофагах мышей, а также в отсутствии кардиопротекторных эффектов при стрессорном повреждении при блокаде iNOS. Выявлен центральный NO-ергический компонент в кардиопротекторном действии глюфимета, о чем свидетельствует отсутствие его влияния на АД при введении в боковые желудочки мозга в условиях неселективной блокады NO-синтаз.

ВЫВОДЫ

1. Глюфимет и фенибут взаимодействуют с NO-ергической системой на центральном и периферическом уровне при формировании их кардиопротекторного действия у животных, подвергшихся длительному иммобилизационно-болевному стрессу.

2. Глюфимет и фенибут в концентрации 1×10^{-5} снижают прирост амплитуды сокращений в опытах на изолированных предсердиях интактных крыс в условиях стимуляции β_1 -адренорецепторов дофамином в разведении 1×10^{-6} максимально на 26,0% и 28,1% соответственно при частоте навязанного ритма 270 имп/мин. Неселективная блокада NO-синтаз предотвращает действие соединений. В таких же условиях эксперимента глюфимет и фенибут не изменяют эффекты, связанные с активацией M-холинорецепторов изолированных предсердий ацетилхолином в разведении 1×10^{-6} .

3. В условиях *ex vivo* глюфимет (28,7 мг/кг) и фенибут (50 мг/кг) снижают прирост сократимости изолированных предсердий интактных животных при активации симпатической системы и неселективной блокаде NOS. У животных, подвергшихся иммобилизационно-болевному воздействию, исследуемые соединения уменьшают усиление инотропного ответа изолированных предсердий максимально на 23,8% и 45,1% соответственно при частоте навязанного ритма 180 имп/мин и стимуляции адренорецепторов как на фоне блокады NOS, так и без нее.

4. Изучаемые производные нейроактивных аминокислот при стрессорном повреждении сердца оказывают выраженное кардиопротекторное действие, связанное с уменьшением образования оксида азота в тканях сердца и головного мозга в среднем на 22,5%, интенсивности процессов ПОЛ в среднем на 24,7%, увеличением активности антиоксидантных ферментов в среднем на 46,0%,

а также с увеличением дыхательного контроля в митохондриях сердца и головного мозга в среднем на 21,6%. Реализация указанных эффектов глуфиметом и фенибутом была отмечена при блокаде nNOS и отсутствовала при ингибировании iNOS.

5. Неселективная блокада NOS, вызванная введением L-NAME, предупреждала снижение систолического артериального давления при введении глуфимета в боковые желудочки мозга, что свидетельствует о наличии у данного соединения центрального NO-ергического действия. Фенибут в аналогичных условиях снижал АД как при блокаде NOS, так и ГАМК_A-рецепторов.

6. Глуфимет и фенибут в условиях *in vitro* снижают концентрацию iNOS в лизатах ЛПС-индуцированных перитонеальных макрофагов на 34,6% и 46,8%, цГМФ на 32,5% и 35,0%, а также уровень конечных метаболитов оксида азота в среде их культивирования на 40,0% и 38,0% соответственно. В условиях *ex vivo* производные нейрoактивных аминокислот оказывали аналогичное влияние на исследуемые показатели.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные позволяют считать перспективным поиск среди производных ГАМК и глутаминовой кислоты высокоактивных соединений, ограничивающих повреждающее действие стресса на сердце путем модуляции NO-ергической стресс-лимитирующей системы.

2. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения фенибута и глуфимета с целью разработки на их основе веществ, ингибирующих iNOS, активность которой повышается при различных патологических состояниях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Садикова, Н.В. Влияние нового производного глутаминовой кислоты – глуфимета на систему гемостаза стрессированных животных [Текст] / Н.В. Садикова, И.С. Мокроусов, **И.И. Прокофьев**, Д.Д. Бородин // Вестник Волгоградского Государственного Медицинского Университета. – 2014. – Т. 49, № 1. – С. 70-72.

2. Тюренков, И.Н. NO-зависимый механизм кардиопротекторного действия фенибута при стрессорном нарушении сократительной функции сердца [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова, **И.И. Прокофьев** // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 11. – С. 8-11.

3. Перфилова, В.Н. Изменение оксидантного статуса, функции митохондрий, артериального давления и показателей системы гемостаза у стрессированных животных и в условиях блокады NO-синтаз [Текст] / В.Н. Перфилова, Т.А. Попова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 7. – С. 833-846.

4. Перфилова, В.Н. Влияние фенибута и нового производного глутаминовой кислоты глуфимета на дыхание митохондрий клеток сердца и головного мозга стрессированных животных на фоне блокады индуцибельной

NO-синтазы [Текст] / В.Н. Перфилова, Т.А. Попова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 2. – С. 190-193.

5. Тюренков, И.Н. Стресспротекторное действие нового [Текст] / И.Н. Тюренков, Т.А. Попова, В.Н. Перфилова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63, № 1. – С. 47-55.

6. Перфилова, В.Н. Влияние глуфимета на оксидантную систему, дыхание митохондрий сердца и головного мозга, артериальное давление и показатели системы гемостаза у стрессированных животных [Текст] / В.Н. Перфилова, Т.А. Попова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 3. – С. 18-25.

7. Борисов, А.В. Подавление экспрессии индуцибельной NO-синтазы производными нейроактивных аминокислот – фенибутом и глуфиметом в условиях *in vitro* и *ex vivo* [Текст] / А.В. Борисов, **И.И. Прокофьев**, И.С. Мокроусов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 8. – С. 205-208.

Другие публикации по теме диссертации

8. **Прокофьев, И.И.** Изучение влияния производного глутаминовой кислоты на сократимость изолированных предсердий стрессированных крыс [Текст] / И.И. Прокофьев, Д.С. Забазлаева // Сборник тезисов XIX региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. – 2014. – С. 46-47.

9. **Прокофьев, И.И.** Изучение влияния фенибута на опосредуемую бета1-адренорецепторами инотропную реакцию изолированных предсердий стрессированных крыс при блокаде NO-синтаз [Текст] / И.И. Прокофьев, Д.С. Забазлаева // Сборник тезисов 73 открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – 2015. – С. 333-334.

10. Перфилова, В.Н. Влияние соединения РГПУ-238 на функциональные резервы сердца стрессированных животных разных возрастных групп [Текст] / В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Сборник тезисов 6-ой международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». – 2015. – С. 49.

11. **Прокофьев И.И.** Влияние глуфимета на функционирование митохондрий сердца и головного мозга стрессированных животных и в условиях блокады nNOS [Текст] / И.И. Прокофьев, И.С. Мокроусов // Сборник тезисов 74 открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – 2016. – С. 278-279.

12. Tyurenkov, I.N. Effect of Derivatives of Neuroactive Amino Acids on Respiratory Functional Changes in the Cardiac Mitochondria of Stressed Animals / I.N., Tyurenkov, V.N. Perfilova, T.A. Popova, **I.I. Prokofiev** [et al.] // Abstract book 30th Scientific Meeting of Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP).

Health Sciences: Frontiers in Translational Medicine. Putrajaya, Malaysia. – 2016. – P. 77.

13. Тюренков, И.Н. Роль NO-ергической системы в обеспечении стрессоустойчивости [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, **И.И. Прокофьев** [и др.] // Сборник тезисов XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Воронеж, 2017. – С. 1176-1177.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

7-НИ – 7-нитроиндазол
АДФ – аденозиндифосфат
АМГ – амингуанидин
АФК – активные формы кислорода
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ЛПС – липополисахарид
МДА – малоновый диальдегид
ПВ – протромбиновое время
ПОЛ – перекисное окисление липидов
САД – систолическое артериальное давление
СрАД – среднее артериальное давление
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
iNOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза
L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир
NMDA – N-метил-D-аспартат
nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза
NO – оксид азота
NOS – синтаза оксида азота

**Прокофьев
Игорь Игоревич**

**Роль системы оксида азота в кардиопротекторном действии производных
нейроактивных аминокислот**

*АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук*

Подписано в печать __.__.201__г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.-печ. л. __.
Усл. изд.л. __ Тираж 100 экз. Заказ __
Отпечатано в типографии