

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

САРАПУЛЬЦЕВ АЛЕКСЕЙ ПЕТРОВИЧ

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ДИСТРЕССА И
ОБОСНОВАНИЕ ПОИСКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ СТРЕСС-
ЛИМИТИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ (ТЕОРЕТИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.03.03 Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:

Черешнева М.В., ЗДНРФ, доктор
медицинских наук, профессор

Данилова И.Г., доктор биологических наук,
доцент

Екатеринбург – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
Введение	3
Глава 1 - Стресс и инфаркт миокарда	14
1.1 - Концепция стресса.	14
1.2 - Инфаркт миокарда	32
1.3 - Экспериментальные методы терапии инфаркта миокарда	35
1.4 - Поиск новых лекарственных средств	54
Глава 2 - Материалы и методы	62
2.1 - Общий дизайн исследования	62
2.2 - Исследуемое соединение. Краткое описание синтеза.	62
2.3 - Материалы и методы, используемые для прогноза <i>in silico</i>	64
2.4 - Материалы и методы, использованные в экспериментах <i>in vivo</i>	86
Глава 3 - Мультицелестаргетность механизма действия соединения L-17 по данным системного анализа <i>in silico</i>	104
Глава 4 - Кардиопротективное действие соединения L-17 на модели экспериментального инфаркта миокарда <i>in vivo</i>	145
Глава 5 - Стресс-протективное действие соединения L-17 на модели иммобилизационного стресса <i>in vivo</i>	190
Заключение	212
Выводы	240
Практические рекомендации	242
Список сокращений	243
Список использованной литературы	245
Приложения	289

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения сердечно-сосудистых заболеваний не только не теряет, но приобретает всё большую актуальность, поскольку является причиной 12,8% всех смертей в популяции [386]. Особое место среди сердечно-сосудистых заболеваний занимает инфаркт миокарда (ИМ), поскольку общая смертность от ИМ, практически не изменившаяся за последние 30 лет, достигает 50% в течение одного месяца [153, 333].

Но если в странах Европы, Северной Америки, Японии с начала 70-х годов зарегистрирована устойчивая тенденция к снижению летальности от инфаркта миокарда, то в России выявляется тренд к росту смертности от инфаркта миокарда, особенно у женщин. Так, с 2000 по 2009 гг. у женщин этот показатель возрос с 34,9 до 41,1 на 100 000 популяции, а у мужчин – с 52,3 до 55,9 на 100 000 [73]. В первую очередь, это обусловлено разницей в частоте использования интервенционных вмешательств. Так, если в США частота выполнения реваскуляризации при остром коронарном синдроме (ОКС) еще в 2001 г. составляла 51% [186], то в России доля вмешательств, выполняемых при ОКС, в среднем не превышает одной трети всех интервенционных вмешательств [73].

Тем не менее, согласно данным популяционных исследований внутрибольничная смертность от ИМ даже при использовании интервенционных вмешательств варьирует от 6 до 14 % [213], а после выписки из стационара достигает 7,1% в течении первого года, 13,6% в течении 5 лет и 23,8% в 10-ти летнем периоде выживания [214].

Одной из причин недостаточной эффективности лечения ИМ, по мнению S.H. Rezkalla и R.A. Kloner (2002), является то, что большинство стратегий направлено на ликвидацию окклюзий эпикардальных коронарных артерий, но даже после купирования окклюзий приток крови к ишемической ткани может оставаться затруднённым из-за сохранения или появления феномена no-reflow, под которым понимается нарушение микроциркуляции в капиллярах и

артериолах [244, 319]. При этом, развитие синдрома no-reflow является независимым предиктором смерти; при этом, у пациентов с синдромом no-reflow достоверно чаще возникает застойная сердечная недостаточность и злокачественные аритмии [99, 206]. В свою очередь, использование для лечения синдрома no-reflow классических препаратов, применяемых при лечении ИБС, либо неэффективно, как в случае применения нитратов, либо приводит только к улучшению, но не нормализации проходимости микрососудов, как в случае внутрикоронарного введения антагонистов кальция или аденозина, либо сказывается только на снижении острой (30-дневной) фазы смерти и рецидивировании ИМ, но может вызывать тяжёлые кровотечения, как в случае применения ингибиторов рецепторов гликопротеина IIb / IIIa [99, 302]. Именно поэтому, S.H. Rezkalla и R.A. Kloner (2002), проанализировав значимость и низкую эффективность лечения феномена no-reflow, высказали мнение о том, что если предыдущие 2 десятилетия были десятилетиями реперфузии крупных эпикардиальных артерий, то первые десятилетия нового тысячелетия будут десятилетиями микроциркуляторного кровотока [244, 319].

Однако ещё более проблематичным, чем лечение синдрома no-reflow, представляется лечение воспалительного процесса при ИМ, который начинается развиваться ещё до начала гибели кардиомиоцитов, с момента появления «воспалительных» клеток вокруг коронарных сосудов, причём, воспалительная реакция при ИМ, помимо своей роли в инициации процесса и создании предрасполагающих для его развития условий, также оказывает важное влияние на развитие процессов восстановления и формирования рубца [161]. При этом, в клинической практике практически отсутствуют методы лечения, улучшающие процессы заживления инфарктированного миокарда [186, 210], поскольку эффективность воздействия применяемых препаратов (нитроглицерин или каптоприл), осуществляется только за счёт уменьшения сердечной преднагрузки и постнагрузки, то есть за счёт биофизического, а не иммуномодуляторного (противовоспалительного) действия [186].

Так, попытки экспериментального воздействия на отдельные компоненты и звенья системы врожденного иммунитета и воспалительной реакции либо усугубляли течение ИМ, либо не оказывали необходимого эффекта.

Так, описанные в литературе попытки ограничить размер инфаркта путем снижения уровня супероксид-анионов (ROS) в миокарде, показали либо частичную, либо полную [185] неэффективность антиоксидантов для коррекции течения ИМ [284]. Ингибирование ангиотензин-превращающего фермента в экспериментах снижало конечно диастолическое давление левого желудочка, но задерживало созревание инфарктного рубца за счёт снижения содержания коллагена [180], а блокада рецепторов ангиотензина II, даже приводила увеличению показателей смертности [14, 355, 166]. Также достаточно спорные результаты были получены при ингибировании эндотелина-1, что приводило к расширению левого желудочка сердца и снижению его систолической функции [180, 181]. Низкую эффективность показало и применение человеческих моноклональных антител, ингибирующих фрагмент комплемента C5 в виде лекарственного препарата Rexelizumab, который не влиял на показатели смертности [298].

Хотя участие провоспалительных интерлейкинов в развитии и тяжести воспалительной реакции при поражении сердца не вызывает сомнения, попытки использования специфических ингибиторов цитокинов также не достигли успеха [139, 290]. Так, было показано, что ингибирование IL-6, уровень которого повышается при ИМ и коррелирует с повышенной смертностью, не влияло на размер инфаркта, функцию левого желудочка и постинфарктное ремоделирование [211, 167]. В свою очередь, блокада IL-1 вызывало снижение выраженности нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации. Однако приводило к одновременному снижению количества миофибробластов и отложению коллагена в зоне инфаркта, причём, не влияя на размеры инфаркта [120]. Экспериментальные попытки воздействовать на ход ИМ за счет блокады действия TNF- α также не привели к успеху: в экспериментах наблюдалось усиление дисфункции и признаки дилатации левого желудочка сердца,

развивались гипертрофия миоцитов и интерстициальный фиброз в интактном миокарде, увеличивались уровни транскрипции IL-6 и IL-1 β [222, 375]. Наконец, неэффективность подхода, включающего в себя воздействие на уровни отдельных цитокинов подтвердилась и на примере противовоспалительного IL-10, подавляющего воспалительные медиаторы при ИМ. Оказалось, что при блокаде выработки IL-10 происходило одновременное подавление провоспалительных цитокинов и хемокинов через 24 часа реперфузии и отсутствовала разница в показателях смертности по сравнению с интактными животными [210].

Нельзя не отметить, что воздействие на систему приобретенного иммунитета казалось привлекало достаточно большое внимание исследователей, поскольку, в целом ряде экспериментальных исследований на различных животных, выявлялось значительное уменьшение размеров инфаркта после введения anti-CD11/CD18 антител [95]. Однако в дальнейшем, подключение к лечению больных ИМ блокаторов CD11/CD18 интегриновых рецепторов как при использовании тромболизиса, так и при использовании ангиопластики не выявило уменьшения размеров ИМ по сравнению с традиционными подходами к лечению [361].

В целом, можно свидетельствовать, что результаты вышеописанных экспериментальных работ привели к пониманию того, что любые попытки воздействия на отдельные компоненты иммунного ответа имеют крайне ограниченное влияние на изменение размера ИМ [132, 224]. Более того, необходимо учитывать, что воспалительный каскад основан на сети молекулярных посредников с плеiotропными эффектами, зависящими от временных переменных, а потому вмешательство, вызывающее ослабление ранних проявлений воспалительного повреждения, может привести даже к ухудшению процесса заживления при ИМ [186].

Вышесказанное свидетельствует о необходимости поиска химических соединений, способных оказывать системное биологическое действие на

иммунопатофизиологические механизмы развития ИМ, и послужить основой для создания принципиально нового типа лекарственных средств.

Указанный перечень вопросов определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель диссертационного исследования: – выявить основные патофизиологические механизмы повреждения тканей и провести теоретико-биоинформационно-экспериментальное обоснование нового метода патогенетической терапии инфаркта миокарда на примере биологически-активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия биологически активных соединений ряда замещённых 1,3,4-тиадиазинов на примере 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромида.

2. Изучить возможность коррекции дистресса в экспериментальной модели нервно-мышечного напряжения *in vivo* биологически активными соединениями группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов.

3. Определить влияние биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов на развитие и динамику патоморфологических изменений в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo*.

4. Определить влияние биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов на активность ферментов в плазме крови и в гомогенате миокарда в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo*.

5. Определить влияние биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов на показатели цитокинемии в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo*.

6. Определить влияние биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов на апоптоз кардиомиоцитов в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo*.

7. Сопоставить данные системного анализа *in silico* мультитаргетного механизма действия соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов с экспериментальными данными на моделях нервно-мышечного напряжения и инфаркта миокарда *in vivo*.

Методология и методы исследования. Для достижения цели и решения поставленных задач использованы расчетные методы компьютерного прогноза в специализированных компьютерных программах, в том числе методы молекулярной механики и квантовой химии, а также биохимические, иммунологические и статистические методы исследования.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора. Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе экспериментальных животных, использованных в экспериментах, полноте и широте литературного обзора, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с применением программ Statistica v. 8.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19, глубоком и аргументированном анализе полученных результатов. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации от 22.12.2017.

Основные положения диссертации представлены на международных конференциях Experimental Biology, 2013 (Boston, USA), 2014 (San Diego, USA), 2015 (Boston, USA), 2016 (San Diego, USA), Российском научном форуме с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (Екатеринбург, 2014), XXII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва 2015), XX Менделеевском съезде под эгидой Международного союза по теоретической и прикладной химии (IUPAC) (Екатеринбург, 2016), международной конференции 7th International Conference on Drug Discovery & Therapy (Sharjah, UAE 2016), международной конференции XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry, (Perugia, Italy 2016).

Планирование научной работы, постановка цели и задач проводились совместно с научными консультантами – Маргаритой Владимировной

Черешневой, ЗДН РФ, д.м.н., профессором, и Ириной Георгиевной Даниловой, д.б.н., доцентом.

Синтез 1,3,4-тиадиазинов осуществлялся в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук и Уральском Федеральном Университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина к.х.н. Л.П. Сидоровой, под руководством академика РАН О.Н. Чупахина. Расчеты *in silico* были осуществлены совместно с сотрудником кафедры фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации д.б.н., профессором П.М. Васильевым. Часть экспериментальных исследований 1,3,4-тиадиазинов осуществлялась совместно с сотрудниками ЦКП «SPF-виварий» Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, д.б.н., профессором М.П. Мошкиным и Н.Б. Илларионовой. Гистологические исследования осуществлялись в Институте иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН совместно с к.м.н. С.Ю. Медведевой, биохимические и иммуногистохимические исследования проводились совместно с к.м.н. И.Ф. Гетте.

Автор выражает искреннюю благодарность названным коллективам и сотрудникам.

Выбор методов исследования, научно-информационный поиск, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной научной литературы, анализ и интерпретация полученных данных, статистическая обработка, подготовка научных публикаций, написание и оформление рукописи, внедрение результатов диссертационной работы в учебно-образовательную практику учреждений высшего образования осуществлен лично автором.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов показал, что кардиопротективный эффект данных соединений обусловлен

одновременным ингибированием обратного захвата дофамина, норадреналина и серотонина

2. В экспериментах *in vivo* показана возможность снижения выраженности стрессорной реакции, проявляющееся уменьшением уровня стрессорной гипергликемии и предотвращением стрессорного опустошения таргетных органов-мишеней вследствие действия соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов.

3. На экспериментальной модели *in vivo* установлена возможность снижения глубины и обширности поражения миокарда с формированием нетрансмурального инфаркта, вследствие уменьшения выраженности лейкоцитарной и увеличения лимфоцитарно-моноцитарной инфильтрации зоны повреждения, и ускорения репаративных процессов в результате действия соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов.

4. На экспериментальной модели *in vivo* показана возможность снижения объёма повреждения тканей и предотвращения рецидивирования инфаркта миокарда, за счет активации апоптической смерти кардиомиоцитов на фоне общего снижения некротической гибели клеток, в результате действия соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов.

5. На экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo* установлена возможность предотвращения развития критических осложнений и системного воспаления в результате снижения уровня цитокинемии (по данным определения TNF, IL-1, IL-6 и IL-10) за счет действия соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов.

Научная новизна работы. Впервые, с использованием 3D-молекулярного моделирования методом сходства к препаратам-эталонам, а также с использованием докинга, проведен анализ особенностей взаимодействия представителей группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов с наиболее вероятными белками-мишенями (серотониновый рецептор типа 3A5-HT3A, серотониновый транспортер SERT, мускариновый холинорецептор типа 1 CHRM1, дофаминовый рецептор типа 1 DRD1, дофаминовый рецептор типа 2 DRD2,

дофаминовый транспортер DAT, $\alpha 1$ -адренорецептор ADRA1A, норадреналиновый транспортер NET).

Впервые выявлено свойство соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов уменьшать величину и предотвращать рецидивирование инфаркта миокарда (патент № 2395850 РФ от 27.07.2010).

Впервые продемонстрировано наличие иммуномодуляторного эффекта соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов, проявляющееся уменьшением нейтрофильной и увеличением макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации зоны инфаркта.

Впервые подтверждена способность соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов стимулировать, как внешний, так и внутренний апоптоз, активность которого коррелирует с уменьшением зоны повреждения, предотвращением рецидивирования и ускорением репарации при инфаркте миокарда.

Впервые выявлена способность соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов уменьшать выраженность стрессорной реакции при иммобилизационном стрессе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании возможности системного воздействия на иммунопатофизиологические формы реакции организма на повреждение, приводящие к развитию воспалительного процесса и стрессорной реакции, что, в свою очередь, позволяет предложить новые подходы к разработке и получению новых лекарственных препаратов, обладающих свойствами регуляторов иммунопатофизиологических процессов при воспалении. Полученные экспериментальные данные обосновывают ведущую роль характера стрессорной реакции, возникающей при повреждении, на интенсивность ответной воспалительной реакции.

Проведенные исследования создают теоретическую основу для выявления и синтеза новых химических соединений, способных снижать активность

иммунопатофизиологических механизмов воспаления и стрессорного ответа организма.

На основании проведенных исследований доказано, что соединения ряда замещенных 1,3,4-тиадиазинов воздействуют на основные патофизиологические механизмы развития воспалительной реакции при инфаркте миокарда путём уменьшения гиперцитокинемии, иммуномодуляции, приводящей к уменьшению числа нейтрофилов и увеличению числа моноцитов в зоне воспаления, стимуляции апоптоза и снижения выраженности стрессорной реакции, возникающей в ответ на воспаление. Полученные данные значительно расширяют представления о роли различных иммунопатологических механизмов в развитии гиперергической воспалительной реакции и способах снижения интенсивности этой реакции путём уменьшения распространения реактивного некроза тканей и ускорения формирования клеточного и грануляционного барьеров.

Научно-практическая значимость работы заключается в экспериментальном доказательстве возможности медикаментозного обеспечения кардиопротективного эффекта при инфаркте миокарда за счет действия на центральные звенья развивающейся стрессорной реакции. Полученные данные о терапевтической эффективности соединения L-17 группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов являются основанием для планирования его дальнейших расширенных доклинических химико-фармацевтических, фармакокинетических и токсикологических исследований.

По результатам проведенных исследований получено 3 патента на изобретение (пат. 2395850. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс; пат. 2437165. Способ лечения иммунокорректорами инфаркта миокарда у крыс; пат. 2437163. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс) [41-43]. В рамках работы разработана новая *in silico* методология системного анализа мультитаргетных механизмов действия лекарственных соединений, основанная на сочетании методов молекулярного моделирования, докинга, технологии искусственных нейронных сетей с подходами системной биологии и сетевой фармакологии. Созданная

методология может быть успешно применена для поиска новых мультитаргетных фармакологически активных веществ.

Конкурсная поддержка. Работа поддержана грантами РФФИ – «Урал» 07-04-96122 «Экспериментальное изучение принципиально нового подхода к лечению инфаркта миокарда и панкреонекроза с применением препаратов группы тиаминов (соединение «117») (2007-2009) и программами Президиума УрО РАН 09-П-4-3001 «Разработка препаратов нового поколения и выявление механизмов их гипометаболического и терапевтического действия» (2009-2011), 2-М-34-2064 «Системные защитные реакции организма при стрессе и их коррекция производными 1,3,4-тиадиазинов» (2011-2013), 15-3-4-27 (2015-2017) «Мишень-ориентированный поиск биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья воспалительной и стрессорной реакций, лежащих в основе стрессорной кардиомиопатии, с использованием технологий компьютерного моделирования, медицинской химии и биологии».

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», а также в научных разработках ФГБУН «Институт Иммунологии и Физиологии УрО РАН».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 33 научные работ, из них 13 статей и 5 тезисов в рецензируемых научных изданиях, получено 3 патента на изобретение. Общий объем публикаций – 19,2 печатных листа, авторский вклад 93,5 %.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 299 страницах машинописного текста, состоит из введения, главы обзора литературы, главы материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций, а также списка литературы, включающего в себя 391 источник, из них 79 отечественных и 312 зарубежных и приложения. Работа содержит 36 таблиц, 47 рисунков.

ГЛАВА 1 – СТРЕСС И ИНФАРКТ МИОКАРДА

1.1 – Концепция стресса

Современная концепция стресса основана на фундаментальных работах Ганса Селье, который изучал развитие стрессорных реакций и их влияние на физиологические функции и гомеостаз биологических организмов [333-338].

1.1.1 – Стресс и дистресс

Само понятие «стресс» трактуется в литературе достаточно противоречиво: так, Г. Селье (1956) использовал термин «стрессор» для описания внешней силы или воздействия, оказываемого на индивид, а термин «стресс» – для обозначения полученной в результате воздействия «стрессора» ответной реакции, что было принято и рядом других авторов (таких как Code и Langan-Fox, 2001; Maslach, 1998; Quick et al., 2001) [24, 134, 249]. В то же время, часть авторов использовали термин стресс для обозначения внешней силы, воздействия, а термин «напряжение» (strain) – для ответной реакции (Edwards, 1998), в то время как многие вообще не могут четко определить границы применяемых терминов (например, Smit and Schabracq, 1998; Wiholm et al., 2000) [375]. Более того, некоторые авторы вообще используют понятие стресс в качестве общего термина, охватывающего весь процесс внешнего воздействия, его оценки, последующей реакции на него и получаемого эффекта. Сам же Г. Селье в более поздних работах (1964, 1987), определял стресс как «неспецифический ответ организма на любой запрос, отнесенный к нему» (“...the non-specific response of the body to any demand placed upon it”), при этом, различия, «эустресс» и «дистресс», которые являлись различными и отделенными друг от друга реакциями [334, 335, 337, 338]. Причиной этого послужило то, уже при описании

первого этапа развития общего адаптационного синдрома после первоначальной травмы Г. Селье выявил его проявления, которые явно не укладывались в понятие адаптации организма: накопление плеврального и перитонеального транссудатов; образование острых эрозий в желудочно-кишечном тракте, в частности в желудке, тонком кишечнике и аппендиксе [334]. Именно поэтому, Г. Селье пришлось разделить стресс на эустресс, действие которого на организм благотворно и требования, предъявляемые к организму, соответствуют его возможностям и дистресс, который возникает тогда, когда требования, предъявляемые к организму (в широком смысле, включая как психологические, так и физиологические аспекты), превышают его возможность расходовать энергию для поддержания гомеостаза [337, 338].

При этом требования к расходу энергии могут восприниматься как «приятные» или «неприятные» для реципиента. В концепции Г. Селье, степень спроса является основополагающей для конечного результата [249]. Так, если весь стресс разбить на эустресс и дистресс, и дистресс представляет из себя слишком малый или слишком большой объём спроса, то эустресс должен восприниматься как «оптимальный» уровень стресса. Эта дифференциация ведет к идее, что чрезмерная стимуляция ведет к бедствиям, в то время как «умеренный стресс» является благоприятным, представляя собой эустресс. Описанная концепция «оптимального количества стресса» возникла из закона Йеркса-Додсона (1908), который определяется как зависимость наилучших результатов от средней интенсивности мотивации, и графически представляется в виде инвертированной U, когда на горизонтальной оси отмечается интенсивность нагрузки (стресса), а на вертикальной – производительность [249]. Интересно то, что понятия «возбуждение» и «производительность» не встречаются в оригинальной работе 1908 года, а являются более поздними переосмыслениями, так как авторы изучали взаимосвязь между силой раздражителя (электрического тока) и результатом (выбором правильного окна) в экспериментах на мышах. Однако в дальнейшем, результаты этого эксперимента обрели самостоятельную жизнь, и стали основой целого ряда работ. Сам Г. Селье, 1987, при объяснении

результатов Йеркса-Додсона подчеркивал, что то, будет ли каждый конкретный стимул вызывать эустресс или дистресс, определяется тем, как организм воспринимает этот стимул, и как на него реагирует. Harris (1970) вообще приравнивал эустресс к удовольствию, а Edwards и Cooper (1988) определяли эустресс как положительное несоответствие между восприятием и желанием. При этом, общим моментом у этих авторов являлось то, что эустресс воспринимался, в первую очередь, как результат позитивного восприятия стрессоров, а дистресс – как результат негативного восприятия [249].

Таким образом, исходя из литературы, «стресс» может определяться как набор внешних факторов, действующих на индивида («стрессор»), как психологическая реакция на подобные воздействия (первоначальная концепция Г. Селье, 1956), как психологическая интерпретация комплекса внешних воздействий и психологических реакций (Code and Langan-Fox, 2001; Selye, 1983), и даже как комплекс неблагоприятных поведенческих реакций, проявляющихся во время работы и/или социальных взаимодействий (Richmond and Kehoe, 1999; Vasse et al., 1998) [249]. При этом, необходимо учитывать, что, как это было отмечено в работах Cummings и Cooper, 1998, особо осложняет проблемы терминологии тот факт, что проблемой стресса занимаются специалисты четырех разных дисциплин (медицины, психологии, социологии и экономики), при том, что каждая из них имеет свою собственную методологию, терминологию и подлежащие парадигмы, что существенно осложняет задачу сравнения разных концепций и создания любых когерентных теорий [143, 249].

1.1.2 – Стрессорная реакция и ее взаимосвязь с иммунной системой

Согласно современным представлениям, ответ позвоночных животных на новые раздражители (стресс) опосредуется активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (НРА) и симпатoadреналовой системы, что и определяет характер, и интенсивность оказываемых стрессорной реакцией эффектов.

К основным продуктам симпатoadреналовой системы относятся катехоламины. Катехоламины модулируют целый ряд иммунных функций организма, таких как пролиферация, продукция цитокинов и антител, цитолитическая активность и миграция иммунокомпетентных клеток. Данные воздействия осуществляются благодаря тому, что адренорецепторы (АР) (особенно $\beta 2$ -АР) находятся практически на всех клетках, участвующих в иммунном ответе, а стимуляция $\beta 2$ -АР ингибирует клеточный иммунитет и стимулирует гуморальный иммунитет [367]. Так, стимуляция $\beta 2$ -АР моноцитов и макрофагов вызывает снижение продукции воспалительных цитокинов IL-1, TNF- α , IL-6 и IL-8, а при длительной инфузии агониста β -рецепторов происходит не только значительное уменьшение продукции TNF- α , но и повышения продукции IL-10 [199]. Также активация АР снижает генерацию нейтрофилами супероксида, который играет важную роль в бактерицидной активности, ингибирует хемотаксис, ингибирует хемотаксис, и активизирует апоптоз.

Основным продуктом НРА являются глюкокортикоиды (ГК). ГК оказывают непосредственное влияние на активность иммунной системы, причём это влияние осуществляется как на молекулярном, так и на клеточном уровне за счёт прямого и непрямого способов воздействия. На клеточном уровне, ГК ингибируют доступ лейкоцитов к воспалительным участкам; нарушают функции лейкоцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов, а также подавляют образование и действие гуморальных факторов, участвующих в воспалительной реакции. На молекулярном уровне при прямом способе воздействия ГК связываются с глюкокортикоидными рецепторами в цитоплазме, которые димеризуются и перемещаются в ядро, где в свою очередь связываются с глюкокортикоидными элементами реагирования (GRE) на глюкокортикоид-чувствительных (responsive) генах, что приводит к увеличению транскрипции генов, кодирующих противовоспалительные белки, в том числе липокортин-1, IL-10, антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA) и ингибитор нейтральной эндопептидазы (NEP) [107, 315]. Непрямое действие ГК проявляется в их способности ингибировать синтез почти всех известных цитокинов и некоторых

молекул клеточной поверхности, что осуществляется за счёт снижения выработки провоспалительных факторов, таких как NK-kb или AP-1 [107, 315].

Показано, что стресс вызывает изменение иммунной регуляции путём увеличения активности интерлейкинов, в частности IL-6, являющегося важным медиатором различных видов воспалительных и иммунных реакций [152, 211, 288]. Однако поскольку уровень эндогенного IL-6 повышается как при стрессе, так и после введения экзогенного адреналина, а введение β -адреноблокаторов предотвращает развитие этой реакции, то можно предположить, что стимуляция секреции IL-6 опосредуется именно β -АР. В то же время, согласно данным экспериментов *in vitro* и *in vivo*, ГК подавляют экспрессию IL-6 у человека и животных за счет NF-kB-зависимого ядерного механизма, (IkB- α) [94]. С помощью данного механизма ГК также снижают концентрацию других интерлейкинов, таких как IL-1 α и IL-1 β [81]. В свою очередь, снижение уровня IL-1 под влиянием ГК индуцирует транскрипцию гена IL-6 [94]. Помимо этого, согласно экспериментальным данным, ГК подавляют производство активированными моноцитами/макрофагами TNF- α и PGE2 [105].

Продукты активации НРА воздействуют и на клеточные эффекторы иммунной системы. Развитие стрессорной реакции вызывает типичные изменения периферической крови. ГК увеличивают содержание гемоглобина и содержание эритроцитов в крови, возможно, путем замедления эритрофагоцитоза. В свою очередь, нейтрофилия, наблюдаемая при остром или хроническом стрессе (введении кортикостероидов) обусловлена как усилением выхода полиморфноядерных лейкоцитов из костного мозга, так и их возвращением в циркуляцию клеток из стенок сосудов [8]. В отличие от числа нейтрофилов, число лимфоцитов, эозинофилов, моноцитов и базофилов уменьшается, начиная с 4-6 ч., что обусловлено перераспределением клеток, а также активацией индуцированного ГК апоптоза клеток. Поэтому при стрессе возрастание уровня ГК отрицательно коррелирует с числом лимфоцитов. Интересно, что ГК-опосредованное усиление апоптоза нейтрофилов не вызывает высвобождения хемокинов, IL-8 и MCP-1; но, тем не менее, введение высоких

доз ГК (например, метилпреднизолона) в течение 24 ч при трансмуральном ИМ приводит к истончению и увеличению аневризматического рубца из-за проскальзывания некротических миоцитов, вследствие недостатка коллагена [347].

Стресс избирательно подавляет функции Th-1 и осуществляет сдвиг в сторону образования Th2-фенотипа с продукцией соответствующих цитокинов [143, 367], причем, чем сильнее стрессор, тем более явно это проявляется. Данный сдвиг осуществляется как за счёт активности как ГК, так и катехоламинов. При этом, если ГК, норадреналин и адреналин подавляют производство IL-12, который является одним из ключевых индуктором дифференциации незавершенных клеток к фенотипу Th-1, то норадреналин и адреналин ещё и увеличивают производство IL-10, ингибирующего функцию Th-1 и усиливающего функцию Th-2 [367]. Более того, было показано, что ГК способны модулировать паттерн активации клеток Th (в основном, CD4+ клеток), что также смещает активность иммунной системы от клеточного в сторону гуморального ответов [175].

В исследованиях *in vitro* доказан дифференцированный эффект кортикостероидов на различных этапах активации В-клеток: они подавляют пролиферацию и дифференцировку активации и пролиферации стимулированных В-клеток; в меньшей мере ГК влияют на пролиферативный ответа В-клеток на действие В фактора роста клеток (B cell growth factor), и практически не влияют на дифференциацию В-клеток в иммуноглобулин производящие плазматические клетки [175]. При стрессе также изменяется и число тимоцитов [61, 135]. Было показано, что дексаметазон и кортикостерон убивают молодые тимоциты *in vitro* путём расщепления ДНК эндонуклеазой, конститутивно содержащейся в ядрах тимоцитов; при том, что зрелые Т-клетки, также содержащие эндогенную эндонуклеазу, не имеют ГК-индуцируемого механизма её активации, и, таким образом, обладают глюкокортикоидной устойчивостью [135, 196]. Кроме тимоцитов, ГК стимулируют клеточную смерть моноцитов человека, хотя обработка моноцитов IL-1- β практически полностью

предотвращает данный тип гибели клеток [195]. Помимо этого, ослабление активности естественных киллеров, и снижение спонтанной цитотоксичности под действием кортикостероидов обусловлено ингибированием адгезии данных клеток с клетками-мишенями [294].

Немаловажным аспектом противовоспалительной деятельности ГК является их существенное влияние и на адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам за счёт ингибирования накопления мРНК для ELAM-1 и экспрессии ELAM-1 и ICAM-1 [80]. При этом, под действием ГК не только ослабляется адгезия полиморфноядерных нейтрофилов, к эндотелиальной поверхности, но и в три-четыре раза удлиняется процесс трансмиграции клеток, уже начавших процесс диапедеза [256].

Стрессорная реакция оказывает свое воздействие и на процессы фагоцитоза. Как правило, наблюдаемые при стрессе изменения показателей нейтрофильного фагоцитоза имеют двухфазный характер [24, 66]. Первая фаза характеризуется снижением относительных и повышением абсолютных параметров нейтрофильного фагоцитоза, а вторая (спустя 24 часа от начала воздействия) - увеличением как абсолютных, так и относительных показателей фагоцитоза. Депрессия относительных показателей нейтрофильного фагоцитоза в первую фазу связана с выходом из костного мозга относительно незрелых нейтрофилов [24, 66]. Высокие концентрации катехоламинов, характерные для стрессорной реакции, также вызывают выраженное подавление макрофагального фагоцитоза, в то время как низкие концентрации катехоламинов значительно стимулируют фагоцитоз, что может свидетельствовать о наличии двух различных путей действия катехоламинов: классическом не-геномном - при высоких концентрациях катехоламинов и геномном - при низких концентрациях [327].

Изменение уровня ГК, наблюдаемое при стрессе, оказывает существенное влияние на функции и фенотип макрофагов. Обобщая результаты исследований по данной тематике, A.J. Rickard и M.J. Young, 2009, постулировали, что, поскольку минералокортикоидные рецепторы (MR) и глюкокортикоидные

рецепторы (GR) имеются у моноцитов и макрофагов, то MR и GR сигнализация в макрофагах играет ключевую роль в патогенезе целого ряда заболеваний, включая ишемическое повреждение сердца [320]. ГК способствуют выживанию противовоспалительных моноцитов путем ингибирования окислительного стресса, поскольку не вызывают глобального подавления функций моноцитов, но приводят к дифференциации конкретных противовоспалительных фенотипов. При этом, эффект воздействия ГК зависит от их концентрации. Так, низкие уровни кортикостерона повышают производство NO, хемокинов и ферментов, а также экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов, тогда как высокие концентрации ГК оказывают иммуносупрессивное воздействие [194].

1.1.3 – Основные биологические механизмы воздействия стресса на сердечно-сосудистую систему

В настоящее время наличие психической стресс-индуцированной ишемии миокарда (mental stress-induced myocardial ischaemia, MSIMI) является общепризнанным фактом: стресс считается ключевым фактором патогенеза и развития сердечно-сосудистых заболеваний [263, 225]. При этом, основными пусковыми факторами повреждения тканей (возникновения ишемии) при стрессе является выброс цитокинов и чрезмерная активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой осей.

Гиперактивация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Гиперактивация НРА считается одним из основных механизмов, обуславливающих связь между перенесенным стрессом и последующей ишемией миокарда. Так, A.I. Lazzarino, 2013, установил, что повышенный уровень кортизола в ответ на перенесенный ментальный стресс ассоциируется с повышением уровня сердечного тропонина Т в плазме здоровых людей, что свидетельствует о наличии прямого повреждения миокарда вследствие стресса [360]. Также было показано, что вызванная стрессом эндотелиальная дисфункция может быть предотвращена при блокировании продукции кортизола, что

являлось подтверждением роли последнего в развитии стресс-индуцированной ишемии миокарда и предлагает механизмы, посредством которых стресс способствует возникновению ИБС и внезапной сердечной смерти [125, 226]. Более того, согласно клиническим данным у пожилых людей даже при отсутствии ИБС в анамнезе, повышенный уровень реактивности кортизола (как проявление большей восприимчивости к стрессу) ассоциируется с большей выраженностью кальцификации коронарных артерий и являются фактором риска развития ИБС [330].

Гиперактивация симпатикоадреналовой оси. Как известно, любой стресс сопровождается активацией симпатической нервной системы, причём, факторы, которые стимулируют симпатическую нервную систему и высвобождение катехоламинов, могут спровоцировать острый инфаркт миокарда. При интактном, ауторегулируемом коронарном кровообращении коронарные артериолы избегают влияния адренергической активации, но во время коронарной гипоперфузии, когда ауторегуляторные корректировки притупляются, коронарные артериолы чувствительны как к альфа-1- и альфа-2-адренергическим агонистам, демонстрируя значительные констрикторные ответы [130, 285]. Повышение тонуса коронарных сосудов может быть обусловлено также потерей защитной роли α -2 адренергических рецепторов, являющихся основными ингибиторами обратной связи симпатического высвобождения норадреналина, причём причиной потери защитной роли α -2 адренергических рецепторов является десенситизация этих рецепторов, вызываемая высокой концентрацией катехоламинов в синаптической щели при хронической болезни сердца [192].

Особый интерес представляет влияние катехоламинов на агрегацию тромбоцитов. Дело в том, что адреналин в одиночку не вызывает изменений морфологии, обмена веществ, функции интактных или промытых человеческих тромбоцитов, и поэтому он не может рассматриваться как таковой в качестве препарата, вызывающего агрегацию. Тем не менее, норадреналин потенцирует биохимические и агрегационные реакции, индуцируемые другими агонистами

тромбоцитов [179]. Например, одновременное добавление серотонина и адреналина вызывает синергический эффект на уровне трансдукции сигнала тромбоцитами [144]. О значимости такой катехоламиновой агрегации тромбоцитов свидетельствует то, что утреннее возрастание адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов может совпадать с внезапной смертью, развитием инфаркта миокарда и инсульта [358].

Микроциркуляторные нарушения. Значимость нарушения микроциркуляции при стрессе трудно переоценить. Об этом свидетельствует то что Европейское кардиологическое общество (European Society of Cardiology, ESC) признало возможность возникновения стенокардии в ответ на психическую нагрузку при отсутствии значимой обструкции эпикардальных коронарных артерий, вызываемую нарушением микроциркуляции (синонимы: микрососудистая стенокардия, Х стенокардия) [98, 104, 356, 364]. Причём, стенокардия и ишемия миокарда без обструктивной болезни коронарных артерий являются не раритетными, а широко распространенными клиническими проявлениями [104] – психологический стресс вызывает ишемию миокарда у 58% больных стенокардией [238]. Ментальная стресс-индуцированная ишемия миокарда также связана со значительным увеличением системного сосудистого сопротивления и небольшим увеличением частоты сердечных сокращений и произведения ЧСС на давление (ПЧД), по сравнению с ишемией, вызванной физическими упражнениями, что может быть опосредовано надпочечниковой секрецией адреналина [238].

В принципе, микрососудистая стенокардия обусловлена либо недостаточным сосудорасширяющим коронарным ответом, либо повышенной чувствительностью кардиальной микроциркуляции к вазоконстрикторным стимулам. Причём, речь идёт не только о патологии капилляров, но и о патологии микроартерий. Так, М. Mosseri, 1986, с помощью эндомиокардиальной биопсии выявили у больных со стенокардией без обструкции эпикардальных коронарных артерий, патологические изменения небольших коронарных артерий проявляющиеся фиброзно-мышечной гиперплазией, гипертрофией

медии, миоинтимальной пролиферацией и эндотелиальной дегенерацией [206]. При этом в капиллярах выявлялись набухшие эндотелиальные клетки, выступающие в просвет капилляров. Важно отметить, что подобные изменения распространялись на оба желудочка сердца, то есть носили не локальный, а системный характер [206].

Пациенты с синдромом X имеют неравномерно распределенное ненормальное сужение преартериоларных коронарных сосудов, не участвующих в метаболических ауторегуляции потока. Увеличение сопротивления преартериоларных сосудов может объяснить пониженную коронарную сосудорасширяющую реакцию, наблюдаемую у этих больных, даже когда артериолы расширяются максимально [262]. Подтверждением роли повышенного сопротивления именно преартериоларных коронарных микрососудов являются данные о неэффективности действия нитратов, как при феномене замедления коронарного кровотока (CSFP) [183], так и в некоторых случаях при синдроме X [85]. Причиной неэффективности нитроглицерина при SCF является то, что нитроглицерин выборочно расширяет только микроартерии от 201 до 386 микрон, но не действует на преартериоларные микроартерии с диаметром меньше 200 микрон [173], а, следовательно, и ишемия вызывается патологией именно преартериоларных коронарных сосудов. Интересно, что в отличие от локального воздействия спазма коронарных артерий на миокард, нарушения микроциркуляции, в принципе являются частью генерализованного расстройства всей сосудистой системы организма. Так, F.L. Sax, 1987, используя плетизмографию у больных с микроциркуляторной стенокардией, установили, что сосудистое сопротивление периферического кровообращения не только выше у больных с микрососудистой стенокардией по сравнению с контролем, но и хорошо коррелирует со степенью нарушений сосудорасширяющего эффекта в коронарном кровообращении [216]. Более того, у больных с синдромом X имеется системное повышение чувствительности гладких мышц к констрикторным реакциям, что доказано, в частности для гладких мышц бронхов и пищевода [112].

Основным механизмом развития нарушений микроциркуляции является патология адренорецепторного аппарата. Так, при хроническом стрессе патология чувствительности адренорецепторного аппарата, достоверно коррелирующая с состоянием микроциркуляции, выявляется у 90, 59% мужчин и 81,82% женщин, причём изменения артериол выявляются в 43,85% случаев, а повышение тонуса преартериол в 52,38% случаев [50]. По данным G.A. Lanza с соавт., 1994, у 75% пациентов с синдромом Х обнаружена аномальная функция сердечного адренергического нерва [85].

Именно стрессорная стимуляция коронарных адренергических рецепторов вызывает дисфункцию коронарной микроциркуляции у больных с микроциркуляторной стенокардией [85]. Дело в том, что особенно широко альфа-адренергические рецепторы распространены в коронарной микроциркуляции, с преобладанием базовых функциональных ответов на адренергическую активацию альфа-1-адренорецепторов в мелких артериях, и альфа 2-адренорецепторов в артериолах. Надо учитывать, что коронарная микрососудистая конструкция, вызываемая активацией альфа-1- и альфа-2-адренергических рецепторов, в значительной степени модулируется эндотелий-зависимой релаксацией, и заметно усиливается при ингибировании активности синтазы оксида азота. Эти данные указывают на то, что альфа-адренергической активации может иметь существенное значение в качестве детерминанты коронарного сопротивления микрососудов в патофизиологических ситуациях, связанных с коронарными эндотелиальными нарушениями.

Вызванная стрессом эндотелиальная дисфункция в настоящее время воспринимается как один из факторов риска ССЗ, основной чего послужили исследования, доказавшие влияние острого стресса на эндотелий. A. Sherwood с соавт., 1999, на основании выявления увеличения системной реакции резистентности периферических сосудов во время ментального стресса сделал предположение, что подобная регуляции сосудистого тонуса может отражать эндотелиальную дисфункцию, возникающую за счёт взаимодействия между симпатической нервной системой и эндотелием [177]. Позже было доказано, что

при остром стрессе действительно возникает дисфункция эндотелия, сохраняющаяся на протяжении 1,5 часов после стрессорного воздействия [303].

В заключение, необходимо отметить, что для части вопросов, касающихся воздействия стресса на ССС, необходимо проведение дальнейших исследований.

1.1.4 – Стресс как этиологический фактор развития ИМ

Принято считать, что одно из первых описаний стенокардии в медицинской литературе принадлежит W. Heberden, который в 1772 отметил, что стенокардия усиливается при возмущениях разума (“...it is increased by disturbance of the mind”), что можно условно считать первым упоминанием значения стрессорного фактора для сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Однако несмотря на то, что концепция, подразумевающая влияние стресса (как ментального, так и физического) достаточно широко распространена, и, в целом, не отвергается, результаты отдельных исследований, показывающих зависимость возникновения ИМ от перенесенного ранее стресса, наоборот, часто подвергаются сомнению, в основном, основываясь на расплывчатости понятия «стресс» и невозможности точной оценки его силы [346].

В этом ключе, практически не подвергаются сомнению результаты исследования, согласно которому частота внезапной смерти резко увеличивалась во время землетрясений (как землетрясение 1994 года в Лос-Анджелесе), так как, несомненно, все были испуганы во время подобного события, и это понятно [225, 263, 272, 277]. Однако схожие наблюдения были получены и в случае техногенных угроз, таких, как угроза ракетных атак в Ираке, и в случае значительных событий, таких, как спортивные соревнования, где уровни стрессорного воздействия достаточно трудно оценить. При этом, в литературе имеется целый ряд исследований, показавших вполне однозначно трактуемые результаты, несомненно свидетельствующие о наличии взаимосвязи между действием стрессора и последующими сердечно-сосудистыми событиями, в том числе, и ИМ [277].

В 90-х годах XX века в ряде клинических исследований было показано, что ментальный стресс (переживания) вызывают транзиторную ишемию миокарда у 30-70% больных с ИБС, причем, в основном, возникала безболевого форма стенокардии, зачастую не замечаемая больными. В свою очередь, у 20 % пациентов с высоким риском развития ИМ, направленных на диагностическую ангиографию, также выявлялись признаки депрессивных расстройств [124, 146, 147].

В экспериментах было показано, что депрессия (стресс) вызывает нарушения вариабельности сердечного ритма и деятельности автономной нервной системы у людей [103, 124]; и повышает ЧСС и активность симпатической нервной системы у животных [198], тем самым, усиливая восприимчивость миокарда к развитию аритмий и чувствительность к последующим повреждениям.

Помимо этого, данные, полученные при анализе результатов Whitehall II cohort study также выявили явственное наличие взаимосвязи между испытанным индивидуумом стрессом (социальным) и частотой возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [203]; однако разные авторы получили различные результаты касательно влияния длительности стресса на развитие ССЗ [311, 376]. Так, согласно части исследователей, наибольший риск ССЗ отмечался при наблюдении (длительность рабочего стресса) в течение 5,3 лет [376]. По-видимому, факт разночтения может объясняться как тем, что за 11 лет многие наблюдаемые, подверженные влиянию стресса, просто покинули/сменили работу, и как следствие, меньший срок стал лучше отражать возможные риски; так и разным выбором конечных точек, так как Н. Vosma, 1998, [376] в качестве конечных точек исследования считал заболеваемость и смертность, а во втором случае, когда были получены данные об 11 годах – считалась только смертность [311].

Первый же систематический обзор ранее опубликованных работ по стресс-индуцированной ишемии миокарда был опубликован в 2003 Р. Strike и А. Steptoe [348]. Анализ данных позволил авторам сделать следующие выводы: 1) стресс-

индуцированная ишемия миокарда возникает у 70% больных ИБС, 2) большинство эпизодов не вызывают болезненных ощущений и возникают на меньшем уровне потребности миокарда в кислороде, чем ишемия, возникающая вследствие физической нагрузки, 3) частота возникновения стресс-индуцированной ишемии не зависит от степени тяжести ИБС 4) наличие приступов стресс-индуцированной ишемии может служить предиктором неблагоприятных осложнений безотносительно других факторов риска, и 5) фармакологические способы воздействия на стресс-индуцированную ишемию отсутствуют [348].

В последующем, был опубликован ряд работ, в частности, выявивших временную связь между перенесенным стрессом (сильным переживанием) и ССЗ. Согласно U. Wilbert-Lampen, 2008, в период проведения чемпионата мира по футболу 2006 года в Германии частота возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у немцев была в 2,7 раза выше в те дни, когда играла национальная сборная, так как эти дни отмечались сильными эмоциями у болельщиков [123]. При этом через 2 часа после начала каждого матча у субъектов, которым уже была диагностирована ИБС, количество осложнений (ИМ с подъёмом сегмента ST, ИМ без подъема сегмента ST и возникновение пароксизмов аритмий) выросло в 4 раза, что свидетельствовало о наличии достоверной связи с предшествующим стрессорным фактором [123, 225, 263, 366].

В вышедшем в 2012 году мета-обзоре было проанализировано 1769 статей, опубликованных в период 1977-2010 гг., из которых 26 работ удовлетворяли критериям включения в исследование, при том, что все найденные работы представляли из себя когортные исследования, ни одного рандомизированного слепо контролируемого исследования по данной тематике к 2010 году опубликовано не было [366]. Согласно полученным результатам статистически достоверные результаты, свидетельствующие о наличии связи между перенесенным стрессом и ССЗ были получены в 14 из 26 исследований. За исключением одного исследования Nurses Health Study [81], в большинстве работ были получены доказательства увеличения риска возникновения ССЗ при

стрессе [366]. В дальнейшем, гипотеза о возникновении ИМ вследствие стресса также была подтверждена в крупном исследовании, проведенном с 2006 по 2013 годы в Швеции (SWEDEN HEART National Registry Study), включившем в себя 156 тыс пациентов. Согласно результатам, частота возникновения ИМ существенно увеличивалась во время Рождественских и Новогодних каникул, по понедельникам и по окончании выходных, по сравнению со среднемесячными показателями, что соответствовало периодам с повышенной психоэмоциональной нагрузкой [357].

В целом можно заключить, что несмотря на существенные разногласия в литературе, вклад психосоциальных факторов в развитие ИМ можно оценить примерно в 25-32,5% (по данным исследования INTER HEART) [162], причем, стресс любой этиологии приводит к уменьшению фракции выброса левого желудочка на 8 и более процентов [169, 178, 203].

1.1.5 – Влияние стресса на течение инфаркт миокарда

Влиянию стресса на течение ИМ посвящено достаточно большое количество экспериментальных работ [331, 332, 340, 346]. Так, в исследовании D.A. Scheuer и S.W. Mifflin, 1988, впервые было показано, что повторные прерывистые иммобилизационные стрессы существенно ухудшают течение ИМ [332]. Интересно, что хронический стресс оказывает более вредоносное воздействие, чем острый. Так, хроническая терапия кортикостероном увеличивает размер инфаркта миокарда у крыс, хотя острое введение кортикостерона не влияет на артериальное давление или размер инфаркта [331, 332]. Также у крыс, подвергнутых воздействию хронического психосоциального стресса, выявлялись значительно большие инфаркты и ослаблялось пост-ишемическое восстановление сократительной функции сердца [332, 340]. Последующие работы показали, что хроническое воздействие эмоционального стресса увеличивает размер инфаркта у крыс за счёт стрессорной симпатической гиперактивности, приводящей к повышению оксидативного и нитрозативного

повреждений. Подтверждением роли стрессорной симпатической гиперактивности являются данные о том, что химическая симпатэктомия элиминировала отрицательное действие стресса при ИМ [182, 215].

Важно отметить, что хронический стресс вредоносно воздействует не только на острый ИМ, но и на постинфарктный период. Так у нормотензивных животных в постинфарктном периоде хронический психосоциальный стресс имеет более высокий риск развития летальных аритмий и сократительной недостаточности, чем острый краткосрочный прекодиционирующий стресс [215]. Учитывая, что изменения в системах 5-НТ и стрессовых гормонов, вызванных устойчивым стрессом, в значительной степени имитируют нарушения в этих системах, которые наблюдаются при депрессии, причём, нарушения 5-НТ и стрессовых гормонов в депрессии имеют патофизиологическое значение, а не просто являются следствием депрессивного состояния или результатом стресса, вызванного депрессивным состоянием [304], имеет смысл оценить влияние депрессии на ИБС и постинфарктный период, тем более, что депрессии достаточно часто выявляются при ИБС. Так, у пациентов, проходящих диагностическую сердечную катетеризацию и коронарную ангиографию в 17% случаев выявляются большие депрессивные эпизоды, а еще 17% случаев выявляются незначительные депрессивные эпизоды [147].

Однако единого консенсуса в оценке роли депрессии в постинфарктном периоде к настоящему времени не достигнуто, как среди клиницистов, так и среди экспериментаторов. Так, по данным R.M. Carney и K.E. Freedland, 2003, депрессия является фактором риска сердечной заболеваемости и смертности, особенно для пациентов с недавно перенесенным острым инфарктом миокарда [125]. Однако В. Ruо с соавт., 2003, обследовавшие 1024 пациентов с депрессивными симптомами и ишемической болезнью сердца (54% с инфарктом миокарда в анамнезе, 23% с реваскуляризацией без инфаркт миокарда, и 23% с заболеваниями коронарных артерий, подтверждённых ангиограммой или тестами на беговой дорожке) не выявили у них достоверного снижения переносимости физической нагрузки, фракции выброса левого желудочка и

ишемии [149]. Тем не менее, анализ 8 этиологических исследований, 16 прогностических исследований, 2 публикаций, сочетающих этиологические и прогностические исследования, и 23 обзорных статей, показал, что большинство исследований подтверждают, как этиологическую, так и прогностическую роль депрессии при ИБС; меньшее число исследований, не показывающие никакой связи между депрессией и прогнозом ИБС, не имеют адекватной статистики [188, 295].

Аналогичные разночтения существуют и в экспериментальных исследованиях на животных. Так подтверждением того, что большое депрессивное расстройство (MDD) является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и влияет на возникновение и прогнозирование сердечно-сосудистых событий является экспериментальное исследование, показавшее, что использование антидепрессанта из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (Escitalopram) при экспериментальном ИМ приводило к уменьшению размера инфаркта миокарда и значительному уменьшению числа апоптотических миокардиальных клеток [363].

В эксперименте на крысах депрессия увеличивает симпатическое действие и усиливает ремоделирование миокарда после инфаркта миокарда, сопровождающееся увеличением размеров левого желудочка, уменьшает толщину стенки миокарда и повышает восприимчивость к желудочковой аритмии [148]. В то же время, согласно W.J. Кор, 2015, социальная изоляция и скученность у самцов крыс Wistar не вызывает прогрессирования сердечной недостаточности после ИМ [168]. Наконец, по данным Y. Wang, 2013, развитие постинфарктной депрессии не влияет на размеры инфаркта миокарда, но усиливает гибель клеток путем апоптоза [362].

1.2 – Инфаркт миокарда

Термин «инфаркт миокарда» отражает гибель (некроз) клеток сердечной мышцы (кардиомиоцитов) в результате ишемии. До недавнего времени существовало множество определений понятия инфаркт миокарда, включавших в себя целый комплекс симптомов, ЭКГ проявлений и изменений уровня различных кардиальных ферментов.

Однако в 2001 году специально созданная рабочая группа международных экспертов (First Global MI Task Force) предложила новое определение ИМ, в соответствии с которым острый инфаркт миокарда определяется как гибель клеток миокарда из-за длительной ишемии миокарда [272].

На основании данного определения второй рабочей группой в 2007 г. и было сформулировано определение ИМ, которое было утверждено Европейским и Американским Кардиологическим обществами (European Society of Cardiology, ESC; American College of Cardiology Foundation, ACCF) и Всемирной Ассоциацией Сердца (World Heart Federation, WHF) [272, 290, 370, 386, 388]. В соответствии с этим определением к основным критериям спонтанного ИМ относятся: 1) 1-й критерий - выявление повышения и/или снижения сердечных биомаркеров (сердечного тропонина Т) с одним повышением более 99-го персентилия эталонной контрольной группы в качестве верхнего разделительного уровня в сочетании хотя бы с одним из перечисленных свидетельств ишемии (симптомы ишемии; изменения ЭКГ, свидетельствующие о новой ишемии; развитие нового патологического зубца Q на ЭКГ; визуализационные свидетельства); 2) 2-й критерий - внезапная сердечная смерть, в сочетании с новыми подъемами сегмента ST или новой полной блокадой ЛНПГ и/или свидетельствами присутствия тромба при ангиографии и/или аутопсии, при условии, что смерть наступила до получения образцов крови или во время, когда биомаркеры еще не повышены; 3) 3-й критерий - в случае чрезнажного вмешательства (ЧКВ) у больных с нормальным исходным уровнем тропонинов повышение сердечных биомаркеров, превышающее разделительный уровень в 3

раза; 4) 4-й критерий - в случае коронарного шунтирования (КШ) у больных с нормальным исходным уровнем тропонинов повышение сердечных биомаркеров, превышающее разделительный уровень в 5 раз, считается выявляющим ИМ при наличии: нового зубца Q, окклюзии артерии или шунта при КАГ; визуализационного свидетельства; 5) 5-й критерий - свидетельства ИМ, выявленные при аутопсии [54, 356].

1.2.1 – Эпидемиология инфаркта миокарда

С начала XX столетия сердечно-сосудистые заболевания – коронарная патология и ИМ постепенно становятся одним из самых распространенных заболеваний в странах Европы и Центральной Америки. Если в 1930 году в США было зарегистрировано 8 «коронарных смертей» на 1000 населения, в 1935 году - 21 случаев, то в 1940 году уже - 74,4 случая [385]. В настоящее же время, частота госпитализации с диагнозом ИМ с подъемом ST составляет около 66 случаев на 100000 населения в год, причем данный показатель характерен для большинства развитых стран (Чехия, Бельгия, США) [73, 386].

При этом в Европе и Средиземноморском бассейне госпитальная смертность пациентов с ИМ и подъемом сегмента ST составляет 7,0%, а 30-дневная смертность 8,4% [82]. Несколько меньшая 30-дневная смертность (5,5%) наблюдается в Японии, что может быть связано с различием в генотипе пациентов, характеристиками систем медицинского обслуживания и применяемыми лечебными процедурами [133]. Ещё больше риск общей смертности за 10 лет после выписки из стационара, который достигает 33.6% для ИМ с подъемом сегмента ST; а при использовании 1-го критерия ИМ (выявление повышения и/или снижения сердечного тропонина Т) – 70,1% [214].

Важно отметить, что если в странах Европы, Северной Америки и Японии с начала 70-х годов зарегистрирована устойчивая тенденция к снижению летальности от ИМ, то в России выявляется тренд к росту смертности от ИМ, особенно у женщин. Так, с 2000 по 2009 гг. у женщин этот показатель возрос с

34,9 до 41,1 на 100000, а у мужчин – с 52,3 до 55,9 [73]. Для сравнения: в Великобритании смертность от острого ИМ в периоде с 2000 до 2008 г. снизилась почти в 2 раза [122, 364]. Считается, что данные отличия, в первую очередь, обусловлены разницей в частоте использования интервенционных вмешательств. Так, если в США частота выполнения реваскуляризации при остром коронарном синдроме (ОКС) еще в 2001 г. составляла 51%, а в странах Европы частота выполнения транслюминальной баллонной ангиопластики (ТЛАП) при ОКС варьирует от 9% (Великобритания) до 62% (Германия) [84], то в России доля вмешательств, выполняемых при ОКС, в среднем не превышает одной трети всех интервенционных вмешательств, частота выполнения аортокоронарного шунтирования (АКШ) при ОКС не превышает 0,4%, частота выполнения ТЛАП при ОКС – 3,5%, и при остром ИМ – 5,5% [73]. Помимо этого, приведённые данные свидетельствуют также и о недостаточной эффективности лекарственной терапии при ИМ, поскольку лекарственная терапии ИМ в настоящее время стандартна и однотипна, как в России, так и во всех развитых странах [73, 84].

Необходимость проведения активной противовоспалительной терапии при ИМ с подъёмом сегмента ST подтверждается тем, что уже в первые 24 часа ИМ 8,1% пациентов соответствуют критериям синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), а в первые 48 часов критериям SIRS соответствуют 18,8% [368]. Всего же в течение ИМ критериям синдрома системного воспалительного ответа соответствуют 25,0% пациентов, причём, диагноз синдрома системного воспалительного ответа и совокупное число критериев синдрома системного воспалительного ответа независимо связаны с 90-дневными клиническими исходами у пациентов с инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST [97]. Более того, у 3,4% пациентов с инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST в течение 30 дней после ОИМ развивается синдром множественной органной дисфункции (MODS), который является одной из ведущих причин летальности после острого инфаркта миокарда у пожилых людей [305]. Особую же опасность представляет то, что популяция пациентов с

SIRS прогрессирует от SIRS к септическому шоку. У пациентов с острым инфарктом миокарда, осложненным кардиогенным шоком, симптомы сепсиса выявляются в 17,8% [354].

1.3 – Экспериментальные методы терапии инфаркта миокарда

Несмотря на то, что последние достижения в области сердечно-сосудистой терапии привели к разработке новых стратегий, спасающих миокард и уменьшающих смертность у пациентов с ИМ до начала реперфузии, в клинике практически отсутствуют методы лечения, улучшающие процессы заживления инфарктированного миокарда [186].

1.3.1 – Иммунная система как терапевтическая мишень при инфаркте миокарда

Гуморальные компоненты врожденного иммунного ответа. Ингибирование окислительного стресса и белков острой фазы. Попытки повлиять на размер инфаркта за счет снижения уровня супероксид-анионов в миокарде показали либо неэффективность использования супероксиддисмутаза (SOD), аллопуринола, ингибитора ксантин оксидазы, либо малую эффективность, зависящую от особенностей экспериментальной модели ИМ. Так, эксперименты с использованием рекомбинантной человеческой супероксиддисмутаза (SOD-ч) у больных с острым ИМ, как при проведении коронарной ангиопластики у больных с острым ИМ, так и при использовании тромболитической терапии показали отрицательные результаты [174]. Возможно, в основе объяснения части отрицательных результатов лежит то, что хотя высокие концентрации ROS вредны для клеток, Однако более низкие концентрации ROS оказывают благотворное воздействие и участвуют в защите при формировании ишемического preconditionирования.

Как известно, основную роль в местной воспалительной реакции играет не нативный CRP, а mCRP, поскольку в экспериментах на культуре эндотелиальных клеток артерий человека было доказано, что именно mCRP, вызывает быстрое повышение концентраций компонентов воспалительного ответа, таких как MCP-1 и IL-8 [138]. Более того, активация CRP может являться основным посредником ишемического повреждения миокарда, так как в экспериментальных работах показано, что после перевязки коронарной артерии у крыс введение человеческого CRP вызывает увеличение размера инфаркта на ~ 40%, в то время как инъекции очищенного человеческого CRP здоровым крысам (без ишемического повреждения) не вызывает у них никаких побочных эффектов [138, 141]. Аналогичные результаты фиксируются и при других локализациях ишемического повреждения: церебральном инфаркте и ишемии кишечника [191]. Окончательно же значение роли CRP в развитии ишемического воспаления и необходимость разработки блокаторов CRP доказал цикл работ М.В. Перус с соавт. (2001-2006), в которых было показано, что введение крысам с экспериментальным ИМ блокатора CRP 1,6-бис(фосфохолин)-гексана предотвращало увеличение размера ИМ и сердечной дисфункции после инъекции человеческого CRP [141, 191]. Однако эффективные стратегии воздействия на белки острой фазы до сих пор не представлены.

Воздействие на систему цитокинов и интегринов. В то время как участие провоспалительных интерлейкинов в развитии и тяжести воспалительной реакции при поражении сердца не вызывает сомнения, лечение специфическими ингибиторами цитокинов представляет значительные трудности из-за многофункциональности и противоречивости их эффектов, обусловленных плейотропным ответом генов на цитокины и до конца не изученными синергическими и антагонистическими эффектами взаимодействия цитокинов между собой [27, 217, 301]. В подтверждении этого можно привести данные М. Fuchs, 2003, в соответствии с которыми, отсутствие IL-6, уровень которого повышается при ИМ и коррелирует с повышенной смертностью [160, 323], не влияет на размер инфаркта, функцию левого желудочка и постинфарктное

ремоделирование, за счёт того, что другие медиаторы компенсируют отсутствие IL-6, активируя JAK/STAT пути и, тем самым, сохраняя фосфорилирование STAT3 [222, 323]. Кроме того, существуют свидетельства, что блокада провоспалительного IL-1 при экспериментальном ИМ у IL-1RI α/α мышей вызывает не только подавление воспаления, но и нарушает постинфарктное ремоделирование за счёт ослабления фиброзной реакции.

Среди провоспалительных цитокинов наибольшее внимание исследователей привлекли IL-1 и TNF- α [120, 233, 278]. Однако однозначных результатов получено не было. Так, в ряде исследований было показано, что применение в лечении ИМ антител к IL-1 β приводило к подавлению экспрессии генов про-коллагена, замедляло заживление и увеличивало число случаев разрывов желудочка после ИМ [371]. В то же время, в работах B.W. Van Tassell, 2010, применение мощного ингибитора IL-1 (IL-1 Trap) улучшало ремоделирование сердца и уменьшало апоптоз кардиомиоцитов при экспериментальном ИМ у мышей [233]. Более того, в исследовании A. Abbate (2011) было показано, что по сравнению с мышами, имеющими нормальную выработку IL-1, у генно-модифицированных животных, лишенных IL-1-рецепторов и не реагирующих на IL-1, уменьшалась величина экспериментального инфаркта и выраженность апоптоза кардиомиоцитов, а также определялись меньший конечно-диастолический размер и менее выраженная дисфункция левого желудочка сердца [92].

Попытки воздействия на течение ИМ через TNF- α также не оказали однозначного эффекта. В принципе, роль TNF- α в патогенезе ИМ далеко не однозначна. С одной стороны, имеются данные о том, что TNF- α является важным медиатором повреждения миокарда при остром инфаркте миокарда, а заметное увеличение TNF приводит к снижению сократительной способности миокарда, коронарного кровотока и увеличению конечно-диастолического давления. Также TNF- α влияет на увеличение аутокринного производства IL-6, который является основным стимулом для индукции миоцитами ICAM-1, необходимых для адгезивного взаимодействия между трансмигрирующими

нейтрофилами и кардиомиоцитами, и их последующей активации с продуцированием провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-8 [120, 145, 243, 313]. С другой стороны, при ИМ у животных с заблокированными TNFR1/TNFR2 рецепторами наблюдалось увеличение площади поражения миокарда и количества апоптотизированных клеток [176]. Аналогичные результаты, свидетельствующие об антиапоптотическом эффекте TNF- α при ишемии, получены и в исследованиях M.N. Sack, 2000 [328]. Более того, было показано, что введение нейтрализующих анти-TNF- α антител ингибировало ангиотензин II стимулированную пролиферацию фибробластов при ИМ [374].

По-видимому, подобные результаты могут объясняться тем, что TNF- α может вызывать различные биологические эффекты путем связывания двух различных рецепторов: R1 (p55) и R2 (p75). Так, у мышей с отсутствием рецепторов R1 отмечаются менее выраженная сократительная дисфункция и большая выживаемость после ИМ, а также снижаются уровни транскрипции IL-6, IL-1 β , TGF и MCP-1 (CCL2) через 4 недели после перевязки коронарной артерии, по сравнению с контролем [375]. В то же время, у мышей с отсутствием рецепторов R2 происходит усиление дисфункции и дилатации желудочков сердца, усугубляются гипертрофия миоцитов и интерстициальный фиброз в неинфарктированном миокарде, увеличиваются уровни транскрипции IL-6 и IL-1 β [375].

Как оказалось даже противовоспалительный IL-10 [71] не является критически необходимым для подавления воспалительных медиаторов, разрешении воспалительного ответа и формирования грануляционной ткани после ИМ. Прямое доказательство влияния IL-10 на воспаление было получено в экспериментах Z. Yang, 2000 [390]. Дефицит IL-10 у исследуемых животных приводил к увеличению проникновения нейтрофилов через 6 часов после реперфузии, увеличению размеров экспериментального инфаркта и некроза миокарда. Помимо этого, в отсутствие IL-10 усиливалась и воспалительная реакция: повышалась концентрация в плазме крови фактора некроза опухоли- α , нитритов/нитратов (продуктов распада NO). Через 24 часа летальность в группе

IL-10-дефицитных мышей достигала 75%, при нулевой летальности в контрольных группах животных без дефицита IL-10. На основании этих результатов были сделаны выводы, что эндогенный IL-10 ингибирует выработку TNF- α , NO и служит для защиты ишемического и реперфузионного миокарда путем подавления привлечения нейтрофилов в зону поражения [390].

В то же время, сравнение изменений при экспериментальном ИМ у мышей с генетическим дефицитом и без дефицита IL-10, позднее проведенное Р. Zymek, 2007, показало сопоставимые пики плотности нейтрофилов через 24 и 72 часа после реперфузии и одинаковые показатели смертности в исследуемых группах животных, при том что более высокие пики TNF- α и MCP-1, экспрессия мРНК в инфарктном сердце после реперфузии неоспоримо свидетельствовали о значительной роли IL-10 в подавлении пика провоспалительных генов. При этом авторы исследования не исключали, что разница результатов по сравнению с предшествующими работами, могла быть объяснена тем, что в них животные подвергались большей травматизации, и у них развивался трансмуральный ИМ [209, 235]. В данном ключе достаточно интересными являются данные исследований J.S. Burchfield с соавт., 2008, согласно которым введение моноклеарных клеток костного мозга (BM-MNCs), выделяющих значительное количество IL-10, приводило к значительному снижению конечно-диастолического давления и конечно-систолического объема левого желудочка сердца при инфаркте миокарда [234]. При этом данный эффект становился менее выраженным, если вводятся BM-MNCs с меньшей концентрацией или без IL-10. Однако по мнению исследователей, в основе наблюдаемых изменений, лежало не уменьшение размеров инфаркта, нейтрофильной инфильтрации или плотности капилляров, а скорее, снижение накопления Т-лимфоцитов, реактивная гипертрофия миокарда и интенсификация отложения коллагена [234].

Необходимо отметить, что значительные трудности при воздействии на изолированный фактор воспалительной реакции может представлять различие его эффектов на разных стадиях воспалительной реакции. Так, для TGF- β было

установлено, что он способен защищать кардиомиоциты от ишемии-реперфузии за счёт влияния на выработку NO, и за счёт предотвращения выработки реактивных видов кислорода (ROS) и ингибирования фактора некроза опухоли- α (TNF- α). Однако в более отдаленные периоды ИМ увеличивает степень гипертрофии и выраженность интерстициального фиброза миокарда, приводя тем самым к развитию сердечной недостаточности [228].

TGF- β вырабатывается в раннем периоде ИМ активированными макрофагами и обеспечивает формирование фенотипа фибробластов и экспрессию генов, являясь ключевым посредником в патогенезе развития гипертрофии и дилатации желудочка, и уменьшает деградацию матрицы путем индукции ингибиторов протеазы [120]. На более поздних этапах ИМ синтез TGF- β 1 поддерживают миофибробласты MyoFb, а после формирования рубца оказывает влияние на их апоптоз и отключает активность воспалительных макрофагов [154, 187, 359]. Своё же действие TGF- β осуществляет путем регуляции альфа-актина гладких мышц (α -SMAc) на поверхности клеток. При этом, постоянная экспрессия α -SMAc на поверхности фибробластов, как это было показано в экспериментах, продолжается еще по меньшей мере 8 недель после ИМ [352]. Однако попыткам использования TGF- β в терапевтических целях предотвращения гипертрофии и фиброза сердца препятствует разнообразие его плеiotропных эффектов и множество факторов, влияющих на эффективность его действия. [154, 187].

Противоречивы и свойства ядерного фактора NF- κ B, активация которого может стимулировать макрофаги и воспалительные клетки на производство провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, активировать транскрипцию TNF- α в макрофагах через активацию p53. Однако было показано, что NF- κ B может также и подавлять апоптоз, вызванный гипоксией или ишемическим повреждением миокарда [282], что осуществляется за счёт способности NF- κ B повышать регуляцию антиапоптозных генов. Более того NF- κ B участвует в регуляции клеточного выживания, опосредуя пролиферативный эффект и модулируя метаболизм межклеточного матрикса путем регулирования синтеза

MMP [115]. J.W. Gordon, 2011, объясняет эту способность NF-kB стимулировать как выживаемость клеток, так и их смерть тем, что именно стадия воспалительного процесса, в конечном счете, определяет профиль экспрессии генов, которые и диктуют тот или иной результат действия NF-kB [197]. Возможно поэтому, первые исследования, мишенью в которых являлся NF-kB, не только не показали положительного эффекта, но и обнаружили усиление степени выраженности атеросклероза [227].

За последние тридцать лет было осуществлено значительное количество экспериментальных исследований, направленных на изучение роли интегринов и/или воздействие на них с терапевтической целью. Так, введение моноклональных антител, направленных против Р-селектина, заметно уменьшало повреждение миокарда в экспериментальных моделях ИМ, а сравнение выраженности ИМ у обычных мышей и у Р-селектин дефицитных мышей показало, что при 30 мин ишемии миокарда и 120 мин реперфузии величина инфаркта у Р-селектин дефицитных мышей была в 2 раза меньше, чем у обычных мышей [139]. Интересно, что при увеличении длительности ишемии (до 60 мин) и реперфузии (до 120 мин) величина ИМ была одинаковой у мышей обоих типов, что позволяет предполагать, что при длительном периоде окклюзии коронарной артерии гибель клеток миокарда не зависит от ПМН [139].

В то же время, оценка влияния эндотелина-1 (ЕТ-1) на течение ИМ достаточно противоречива. Так, по данным В.К. Podesser, 2001, содержание ЕТ-1 увеличивается в миокарде в конце постинфарктного периода, что активирует MMPs желудочка, а ингибирование ЕТ-1 рецепторов предотвращает активацию MMPs и расширение левого желудочка [181]. В то же время, по данным D. Fraccarollo, 2002, ранняя блокада рецепторов ЕТ-1 при ИМ способствует неблагоприятному расширению и снижению систолической функции левого желудочка сердца [137].

В общем, несмотря на то, что роль интегринов в патогенезе ИМ достаточно хорошо изучена, белые пятна также присутствуют. Так, сравнение структурных и функциональных изменений у мышей дикого типа (WT) и у мышей без beta1-

интегрин через месяц после ИМ показало, что дефицит beta1-интегрин приводит к увеличению дисфункции миокарда в постинфарктном периоде: увеличиваются конечно систолический и конечно диастолический диаметры, снижается фракция укорочения, увеличивается конечно-диастолическое давление и время изоволюмического расслабления ЛЖ (IVRT) [145]. В то же время, устранение ростового фактора дифференцировки-15 (GDF-15), ингибирующего адгезию, останавливающего передвижение и трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов, приводило к повышению числа ПМН в инфарктном миокарде и, в последующем, увеличению частоты разрыва сердца [189].

Воздействие на систему комплемента. Также малоэффективно и применение человеческого моноклонального антитела, ингибирующего фрагмент комплемента C5 (Pexelizumab). Уже в начале испытаний препарата на больных ИМ выяснилось, что, при первичной ангиопластике у больных с подъёмом сегмента ST, Pexelizumab не влиял на размеры инфаркта, хотя и снизил девятидневную смертность, но при лечении ИМ тромболитиками блокирование активности комплемента не уменьшило ни размеры инфаркта, ни показатели смертности [161]. Принципиальным подтверждением этих выводов явились данные о неэффективности использования Pexelizumab у 15196 пациентов с ИМ, не выявившие влияния Pexelizumab ни на показатели смертности, ни на развитие тяжёлых осложнений ИМ (инсульт и сердечная недостаточность). Положительные результаты отмечались только при использовании Pexelizumab во время проведения аортокоронарного шунтирования, когда было зафиксировано 26%-ное снижение риска смерти [297].

Воздействие на клеточные компоненты системы врожденного иммунитета. В рамках целого ряда экспериментов были предприняты экспериментальные попытки воздействовать как на сами клеточные элементы системы врожденного иммунитета (в первую очередь, на нейтрофилы и макрофаги), и на их продукты.

Как известно, основные доказательства значимости сериновых протеаз в повреждении миокарда при ишемии-реперфузии, в основном, базируются на эффектах ослабления повреждения миокарда, наблюдаемых при их ингибировании и дезактивации. Так, эластаза нейтрофилов, не только усугубляет воспалительный процесс при ишемии-реперфузии, но и активирует свертывание в системе микроциркуляции [280], а введение ее ингибитора оказывает благотворное воздействие на воспалительный процесс при ишемии-реперфузии [111]. Ослабление выраженности патологических изменений объясняется уменьшением прайминга нейтрофилов. Данный факт особо интересен тем, что прайминг является промежуточной стадией между исходным и активированным состоянием фагоцитов, и возникает при прединкубации не активированных нейтрофилов стимуляторами, концентрация которых недостаточна для активации гранулоцитов. Состояние прайминга позволяет нейтрофилам, при последующем воздействии стимуляторов в концентрации достаточной для активации, достигать значительно большего эффекторного ответа, чем при прямой стимуляции не активированных нейтрофилов.

В экспериментальных исследованиях также было доказано, что протеаза каспаза-3 участвует в апоптозе при ишемии-реперфузии сердца крысы, а ингибирование протеазы каспаза-3 в два раза снижало некротическую гибель клеток миокарда при ишемии-реперфузии у крыс [291]. Более того, было показано, что применение в клинике препарата Baicalin, ингибирующего протеазные рецепторы, ослабляет ишемические реперфузионные повреждения [106].

Значимость макрофагов для благополучного разрешения воспалительной реакции при ИМ была хорошо показана в литературе [254, 379]. Так, использование в экспериментах макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), повышающего инфильтрацию макрофагов после ИМ, хотя и не изменяло зону инфаркта, но способствовало ангиогенезу и улучшало функцию сердца по данным гемодинамики и эхокардиографии, а уменьшение поступления макрофагов в зону инфарктирования заметно ухудшало заживление,

повышало ремоделирование желудочков сердца и смертность [254, 379]. В свою очередь, непосредственные инъекции активированных макрофагов (AMS) в ишемизированный миокард сразу после перевязки коронарной артерии, ослабляло ремоделирования и сохраняло функции ЛЖ [183]. Аналогичные результаты были получены и в экспериментах с блокировкой поступления нейтрофилов при реперфузии миокарда [184].

Один из продуктов тучных клеток, гепарин (и его аналоги) успешно применяются для лечения воспалительных заболеваний различных внутренних органов. Так по данным A. Oler, 1996, добавление гепарина к аспирину у больных с пристеночным тромбозом (нестабильная стенокардия и ИМ без зубца Q) снижало частоту развития ИМ и смертность на 33%, что, прямо или косвенно, было подтверждено в целом ряде исследований [88].

Воздействие на систему приобретенного иммунитета. Учитывая трудности воздействия на отдельные медиаторы воспалительной реакции, особенно перспективным для клиники [20] представлялось использование анти-интегриновых антител, тем более, в целом ряде экспериментальных исследований на различных животных, в том числе и с использованием изолированных Лангендорф-перфузированных сердец крыс, выявлялось значительное уменьшение размеров инфаркта после введения anti-CD11/CD18 антител [95]. Однако подключение к лечению больных ИМ блокаторов CD11/CD18 интегриновых рецепторов как при использовании тромболизиса, так и при использовании ангиопластики не выявило уменьшения размеров ИМ по сравнению с лечением пациентов без применения блокаторов CD11/CD18 интегриновых рецепторов.

В работе J-F. Légaré, 2007, в которой использовались радиоактивно меченные полиморфноядерные лейкоциты, была выделена одна из причин клинической неэффективности блокаторов CD11/CD18 интегриновых рецепторов [223]. Оказалось, что если использовать экспериментальную модель, имитирующую реальный ИМ, при котором закупоренная коронарная артерия не открывается, а не модели ишемии реперфузии, в которых за фиксированным

периодом ишемии (15-60 мин) следует реперфузии кислородом, то оказывается, что миграция нейтрофилов при развитии острого ИМ сохраняется 6 ч после начала ишемии, и что ни $\beta 2$ интегрины, ни CD18 не являются абсолютно необходимыми для инфильтрации нейтрофилов в инфарцированный миокард [223].

В последнее время особое внимание исследователей привлекают, в качестве мишени терапевтического действия, Т-лимфоциты. Именно активация CD4+Т-лимфоцитов, как было показано U. Hofmann, 2012, улучшает заживление ран и выживание при экспериментальном ИМ, а отсутствие CD4+Т-клеток приводит к увеличению расширения левого желудочка, увеличению количества провоспалительных лейкоцитов и моноцитов (Ly6C+), снижению уровней цитокинов IL-10 и IFN- γ , нарушению формирования коллагеновой матрицы в зоне инфаркта и значительно большей смертности от разрыва миокарда [83]. Клиническим же подтверждением положительной роли CD4+ при ИМ являются данные о том, что низкий процент клеток CD4+ и CD4+/CD8+ у больных ИМ свидетельствует в пользу неблагоприятного прогноза заболевания [353].

Основываясь на данных о том, что введение антигена через слизистые оболочки может быть использовано для лечения не только аутоиммунных, но и воспалительных процессов, а оральные антигены индуцируют появление Т-хелперов 2 (IL-4/IL-10) и CD4 + CD25 + регуляторных клеток, что усиливает продукцию IL-4 и IL-10 [283], D. Frenkel с коллегами осуществили назальное введения трех субъединиц тропонина (C, I и T изоформы) до или через 1 час после ИМ и последующей реперфузии [275]. В результате, размер инфаркта через 24 часа уменьшился на 40%, а через 1,5 месяца на 50%, при этом, по данным эхокардиографии, улучшалась и функция сердца [275]. Защитный эффект, по мнению авторов, был связан со снижением клеточного иммунитета к тропонину, обусловленному секрецией IL-10 вновь появившимися CD4 + Т-клетками [275]. Это исследование, показавшее, какую роль играет в развитии ИМ предварительная сенсебилизация тропонином, может в какой-то степени объяснить почему ИМ в молодом возрасте протекает значительно тяжелее, чем у

пожилых. Дело в том, что у большинства людей, у которых ИМ возникает до 45 лет, отсутствует сенсibilизация к тропонину, поскольку развитию ИМ не предшествует клиника прогрессирующей стенокардии, а сам ИМ часто возникает вследствие спазма коронарной артерии во время приступа паники, повышенной свёртываемости крови при антифосфолипидном и нефротическом синдромах или употреблении рекреационных наркотиков.

Альтернативные терапевтические подходы, включающие в себя применение противовоспалительных средств. Можно предполагать, что идеальные терапевтические подходы к лечению больных с ОКС и ИМ должны быть нацелены на триггеры воспалительной реакции. К сожалению, на настоящий момент точки приложения подобной терапии достаточно иллюзорны. В качестве альтернативного подхода может рассматриваться использование неспецифических противовоспалительных средств [72, 140].

Так, в ряде исследований было показано, что статины способны подавлять часть эффектов воспалительной реакции; снижать адгезивные свойства лейкоцитов и активность макрофагов, а также снижать уровень CRP, независимо от снижения уровня липидов. Анализ результатов исследований выявил преимущества применения статинов у пациентов с повышенным уровнем CRP, причем как у лиц с ИМ в анамнезе, так и без, а в исследовании MIRACLE было продемонстрировано значительное снижение частоты приступов у больных с ОКС на фоне лечения высокими дозами атростастина [204, 310].

Стероиды тоже рассматривались как потенциальные противовоспалительные агенты, однако в проведенных клинических испытаниях не было получено подтверждения их действия на прогноз у пациентов с ОКС и ИМ без подъема сегмента ST [309]. Однако короткая длительность лечения (2 дня) не позволяет сделать четкие выводы; при том, что в исследовании IMPRESS у пациентов в группе с повышенным уровнем CRP было проведено исследования длительного применения (на протяжении 45 дней) стероидов, и получены данные о снижении частоты возникновения осложнений с 35 до 5 % [213].

Ингибиторы циклооксигеназы (COX)-2, которые являются потенциальными противовоспалительными средствами, могут быть использованы и при ИМ у пациентов из групп с высоким риском с четкими признаками наличия воспалительной реакции [93, 381]. Так, были получены данные о безопасности и эффективности применения целекоксиба (celecoxib) у пациентов с рефрактерной устойчивой стенокардией, которым не было показано применение методов реваскуляризации [329]. В соответствии с результатами исследования, недельное применение целекоксиба ассоциировалось с улучшением симптоматики, снижением уровня CRP и продукции IL-6 после липополисахаридной нагрузки моноцитов *invitro* [329].

Фибраты, класс веществ, используемых для лечения дислипидемии, являются синтетическими лигандами для пероксисомальных пролифераторактивированных рецепторов, в то время как инсулин-сенситизирующие агенты (insulin-sensitizing agents), такие как глитазоны (glitazones), являются высокоактивными лигандами для данных рецепторов. При этом, пероксисомальные пролифераторактивированные рецепторы взаимодействуют с ядерным фактором NF-κB, тем самым, изменяя экспрессию различных генов [365]. Было показано, что подобные лекарственные вещества, помимо их метаболического действия, также обладают противовоспалительным и антитромботическими свойствами [93, 381]. Подтверждением служат данные исследований, согласно которым, введение фенофибрата пациентам с дислипидемией сопровождалось снижением плазменной концентрации IL-6 и T [170]. В свою очередь, отмечалось, что применение глитазона у больных с СД 2 типа также сопровождалось снижением показателей IL-6, CRP и CD40L [163].

Ангиотензин-превращающие ферменты (ACE) и блокаторы ангиотензина (AT1) могут обладать важными противовоспалительными свойствами, так как ангиотензин-2 (AngII), помимо вазоконстрикторного действия, стимулирует выработку цитокинов, хемокинов, матричных металлопротеиназ и ростовых факторов эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов. Значимость локально генерированных в сердце AngII и TGF-β1 для ремоделирования ткани

при ИМ подтверждается тем, что введение в начале или вскоре после возникновения экспериментального ИМ ACE или AT1 приводит к уменьшению его размеров. Также, по данным T. Zdrojewski, 2002, ингибирование ACE снижает конечно диастолическое давление левого желудочка (LVEDP), хотя и задерживает созревание инфарктного рубца за счёт снижения содержания коллагена [382]. В случае же блокады рецепторов AT2, практически вдвое увеличивается смертность экспериментальных животных вследствие нарушения коллагеновой структуры [355]. В то же время, по данным С.М. Yu, 2001, применение антагонистов AT1 (валсартана) в сочетании с ингибитором ACE, тормозящим образование ангиотензина II из ангиотензина I (фозиноприлом), позволяло нормализовать образование коллагена I типа [166]. Однако в клинической практике, одновременное применение при ИМ каптоприла (ингибитора ACE) и валсортана, приводит к увеличению выраженности сердечной недостаточности, и развитию дисфункции левого или обоих желудочков сердца [378].

В настоящее время достаточно перспективным кажется использование препаратов типа такролимуса (Tacrolimus). По химическому строению такролимус относится к макролидам [237]. Активация рецепторов T-клеток обычно вызывает увеличение концентрации внутриклеточного кальция, который действует через кальмодулин и активирует кальциневрин. Кальциневрин в последующем дефосфорилирует транскрипционный фактор (ядерный фактор активированных T-клеток, nuclear factor of activated T-cells), который воздействует на ядро клетки и повышает активность генов, ответственных за выработку ИЛ-2 и схожих с ним цитокинов [237]. Такролимус, в свою очередь предотвращает дефосфорилирование транскрипционного фактора, в итоге предотвращая как трансдукцию сигнала, так и транскрипцию IL-2. Действие такролимуса схоже с действием циклоспорина, который уменьшает размеры ИМ и сохраняет функцию ЛЖ после ИМ [241]. В соответствии с данными исследований, использование такролимуса при экспериментальном ИМ вызывает снижение уровня окислительного стресса и воспалительного ответа

[237]. Возможное же его действие на размеры ИМ и сохранение функции ЛЖ в настоящее время активно изучается [237, 241].

Основные причины малой эффективности воздействия на иммунную систему при инфаркте миокарда. Воспалению при инфаркте миокарда начали придавать значение только в последние 25 лет; с тех пор было проведено значительное количество исследований, раскрывающих роль медиаторов воспаления при инфаркте миокарда, при этом, в целом ряде исследований фиксировалось уменьшение размеров инфаркта под действием противовоспалительных стратегий. Однако попытки перенести результаты этих исследований в практику не принесли никаких результатов. Более того, разочаровывающие результаты второй фазы исследования с применением блокаторов CD11/CD18 интегриновых рецепторов привели к большой волне критики и сворачиванию целого ряда работ. Основным же аргументом данной критики была попытка объяснить все неудачи видовыми особенностями экспериментальных животных, которые не позволяли экстраполировать лабораторные данные на человека.

В целом, неэффективность использования результатов экспериментальных исследований в клинической практике вполне может быть, по меньшей мере, частично обусловлена видовыми различиями человека и экспериментальных животных. Например, макрофаги участвуют в привлечении и активации полиморфноядерных лейкоцитов у мышей, но не являются хемоаттрактантами для человеческих нейтрофилов. Также исследования на животных почти всегда выполняется на молодых или взрослых животных, но у людей ИМ чаще всего возникает в среднем или пожилом возрасте. В этом плане в исследовании, проведенном М. Vujak, 2008, было продемонстрировано, что у стареющих мышей происходит задержка формирования грануляционной ткани и заметно снижается отложение коллагена по сравнению с молодыми животными, которых наиболее часто используют в экспериментах [274]. Более того, с возрастом у крыс снижается плотность TNF-рецептор 1 (TNF-R1) в субэндокардиальном эндотелии, а, следовательно, уменьшается индукция TNF- α

кардиопротекторного тромбоцитарного фактора роста (PDGF), что в свою очередь приводит к увеличению посткоронарной смертности у 24 месячных старых крыс [90]. В литературе так же имеются данные, что если использование для лечения экспериментального ИМ комплекса из гранулоцитарного колонии-стимулирующего фактора (G-CSF), способного стимулировать производство гранулоцитов и стволовых клеток в костном мозге, выживание, пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность предшественников и зрелых нейтрофилов, и фактора стволовых клеток (SCF), являющегося индуктором дифференцировки предшественников лимфоцитов и эритроцитов, у молодых крыс приводило к уменьшению размеров инфаркта и апоптоза кардиомиоцитов, а также снижению гипертрофии кардиомиоцитов, то у старых 20-месячных крыс с постоянной перевязкой левой коронарной артерии эти положительные воздействия коктейля G-CSF/SCF на структуры и функции сердца отсутствовали [91].

В заключение, было бы интересно привести мнения видных исследователей о причинах частого несовпадения результатов эффективности предлагаемых методов лечения воспаления при ИМ в эксперименте и клинике. Так, N.G. Frangogiannis, 2008, считает, что во-первых, значение повреждения кардиомиоцитов при воспалении может быть преувеличено, поскольку, в отличии от клинических испытаний, экспериментальные исследования не могут быть опубликованы, когда данные не показывают никаких существенных эффектов от применения противовоспалительной стратегии [186]. Во-вторых, необходимо учитывать, что воспалительный каскад основан на сложной сети молекулярных посредников с плеiotропными эффектами, зависящими от временных переменных. А потому, вмешательство, вызывающее ослабление ранних проявлений воспалительного повреждения, может привести к ухудшению заживления. И в-третьих, сложность клинического сценария не может быть адекватно смоделирована в экспериментальных исследованиях, поскольку не учитывает влияния таких факторов, как возраст, пол, наличие сопутствующих заболеваний (диабет, ожирение и гиперлипидемия), сроков реперфузии и

генетических вариаций у пациентов. Позже, N.G. Frangogiannis добавил к причинам несовпадения результатов ещё два принципиальных положения. Во-первых, автор, ссылаясь на конкретные исследования, обратил внимание на то, что использование в экспериментах генетически целевых животных привело к появлению результатов, свидетельствующих об ограниченности влияния выключения одного из провоспалительных факторов на сокращение размеров инфаркта. И, во-вторых, исследователь привлекли внимание ученых к отличию причин смертности от ИМ у человека и у экспериментальных животных. А ведь смертность является наиболее важной конечной точкой клинических испытаний при инфаркте миокарда. Дело в том, что распространенными причинами смерти у больных с острым ИМ являются аритмии, однако у мышей, небольшие размеры сердца и учащенное сердцебиение значительно снижают частоту появления аритмий. Помимо этого, модели мышей с коронарной окклюзией не предоставляют информацию о возможности развития повторных коронарных событий, связанных с нестабильностью бляшки, но именно нестабильность бляшки является одной из основных причин смертности у больных, перенесших инфаркт миокарда [186].

Таким образом, если исключить особенности атеросклеротического процесса в коронарных сосудах, то основной причиной малой эффективности лечения воспалительной реакции при ИМ является то, что для лечения используются только средства, воздействующие на единичные составляющие воспалительной реакции сердца. Поэтому необходимость разработки метода лечения, оказывающего системное воздействие на воспалительный процесс при ИМ, не вызывает сомнения. При этом, хотя видовые особенности и могут играть какое-то значение, большинство неудач обусловлены не ими, а недостаточным пониманием тонких и взаимосвязанных процессов, происходящих при воспалении. В целом же, вопросы, касающиеся воздействия на иммунную систему при ИМ остаются еще недостаточно проработанными и требуют дальнейших исследований.

1.3.2 – Терапия стресс-опосредованных повреждений миокарда

В литературе описаны результаты достаточно немногочисленных исследований, направленных на поиск возможных путей воздействия на стресс-индуцированную ишемию миокарда. Так, в рандомизированное контролируемое исследование J. Blumenthal с соавт., 2005, было включено 134 больных ИБС которым проводили аэробные тренировки и специально подобранную психотерапию для снижения уровня стресса. Согласно результатам этого исследования, и физические тренировки и психотерапия приводили к тому, что во время тестов с психической нагрузкой (mental stress testing) у пациентов наблюдалось меньшее снижение фракции выброса левого желудочка и более низкие значения индекса ненормальности движения стенок левого желудочка (wall motion abnormality score) по сравнению с больными, получавшими только стандартную терапию [169, 178].

Так как серотониновая система достаточно активно задействована в ответе на стресс, то были предприняты попытки терапии больных ИБС со включением в протоколы лечения ингибиторов обратного захвата серотонина (SSRI). При этом, согласно результатам многоцентрового рандомизированного контролируемого клинического исследования у тех пациентов, которым назначались SSRI наблюдалось снижение частоты рецидивирования ИМ на 28% и значительное снижение смертности. Определённым подтверждением этого исследования является более позднее исследование, проведенное на 127 пациентах с клинически стабильной ишемической болезнью сердца и лабораторно-диагностированными проявлениями психической стресс-индуцированной ишемии миокарда (MSIMI включает в себя развитие или ухудшение региональной аномалии движения стенок, снижение фракции выброса левого желудочка на 8% и более процентов, и/или горизонтальное или наклонное смещение сегмента ST на 1 мм и более в 2 или более отведениях), получавших лечение из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина эсциталопрамом (Escitalopramum) на протяжении 6 недель.

Интересно, что лечение эсциталопрамом приводило к снижению MSIMI, но было не эффективно при ишемии, индуцированной физической нагрузкой [159]. Однако рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, проведенное в 40 амбулаторных кардиологических центрах и психиатрических клиниках в США, Европе, Канаде и Австралии, показало, что сертралин является безопасным и эффективным средством лечения рецидивирующей депрессии у пациентов с недавним ИМ или нестабильной стенокардией, но его влияние на сердечно-сосудистую систему статистически недостоверно [339]. Более позднее рандомизированное, двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности использования сертралина в течение 12 недель, показало, что сертралин был безопасен у пациентов со значительной сердечной недостаточностью. Однако лечение сертралином по сравнению с плацебо не обеспечивало большего снижения депрессии или улучшения сердечно-сосудистого статуса у пациентов с сердечной недостаточностью и депрессией. Возможно это связано с тем, что в данной работе лечение сертралином проводилось не при острой или подострой стадии ИБС, а уже при её последствиях, приводящих к развитию хронической сердечной недостаточности.

В литературе, выявленные эффекты ингибиторов обратного захвата серотонина обычно объясняют тем, что они снижают агрегацию тромбоцитов и предотвращают вазоспастические реакции. Действительно, тромбоциты участвуют как в тромботической реакции на интимальное поражение стенки артериол, так и в развитии вазоспазма, даже если эти два явления не связаны напрямую. Спастическая реакция является следствием тромботического процесса, потому что без локализованной активации тромбоцитов (образование тромбов) не происходит вазоспастической реакции [326]. В свою очередь, усиление образования тромбов возникает в местах повреждения сосудов за счёт выделения тканевого фактора (TF), из фосфолипидных микропузырьков тромбоцитов, обогащенных тканевым фактором человека (TF + MV) [236]. Кроме того тромбоциты, агрегирующиеся на морфологически измененных

участках артерий, высвобождают серотонин и тромбоксан A₂, действующие непосредственно на гладкие мышцы и вызывающие сужение артерий. Возникающая при этом гипоксия миокарда ещё более увеличивает сужение артерий [341].

Проведённый литературный анализ показывает, что при ИМ необходимо дополнить стандартную кардиологическую терапию активным использованием препаратов, обладающих одновременно противовоспалительными и антистрессорными свойствами. Тем более, что в настоящее время по данным литературы подобные препараты не разработаны, а следовательно, исследования в данной области являются актуальными.

1.4 – Поиск новых лекарственных средств

Развитие фармацевтической науки. Методические подходы, используемые исследователями на протяжении истории фармацевтической отрасли претерпевали существенные закономерные изменения, обусловленные общим развитием науки.

Исторически, первым типом подхода можно считать применение растительного и животного сырья в различных вариантах; зачастую, в виде экстрактов с неустановленным действующим началом – галеновые препараты. Галеновые препараты не являются химически индивидуальными веществами, а представляют собой комплекс веществ более или менее сложного состава [38]. При этом, само биологическое (лечебное) действие данного типа препаратов является комплексным продуктом взаимодействия целого ряда отдельных агентов [38].

В 60-х годах XIX века развитие технологии привело к появлению новых препаратов галенового типа, так называемых новогаленовых. Подобные лекарственные препараты представляют собой извлечения из лекарственных растений, частично или полностью освобожденные от сопровождающих веществ, что и отличает их от галеновых препаратов [37, 38].

Качественный же скачок произошел во второй половине XIX века, когда были выявлены активные компоненты целого ряда лекарств и созданы первые чисто синтетические лекарственные препараты, такие как синтетические галогенпроизводные (с 1869 г. хлораль стал применяться в качестве седативного и успокаивающего средства) и салициловая кислота, используемая в качестве обезболивающего средства [21, 22]. К концу же XIX века синтез лекарств приобрел уже промышленные масштабы, и в 1888 г. фирма Байера выпустила в продажу первое эффективное жаропонижающее средство, фенацетин, а в 1899 г. – противовоспалительное средство, известное как аспирин (ацетилсалициловую кислоту) [21, 22]. На рубеже веков, в 1909–1910 гг. немецкий ученый Пауль Эрлих синтезировал сальварсан – первое эффективное средство против сифилиса, что обусловило возникновение концепции химиотерапии [21, 22]. Данная концепция предполагала уже не просто возможность использования химических веществ для лечения отдельных заболеваний, но включала в себя возможность направленной модификаций структуры предполагаемого химического соединения в целях повышения эффективности лечебного действия [21, 22]. Также П. Эрлихом была разработана теория рецепторов (и предложен сам термин «рецептор») и структурных изменений физиологически активных органических соединений, происходящих при взаимодействии с рецептором, которая (вместе с его концепцией химиотерапии) явилась отправной точкой для развития современной медицинской химии [21, 22]. В последующие десятилетия, до начала 70-х годов XX в. химики создали многие тысячи аналогов, пытаясь воспроизвести и улучшить созданное природой, в том числе барбитураты и сульфамиды [21, 22]. С 70-х же годов начался бурный расцвет медицинской химии, который сопровождался разработкой и внедрением целого спектра новых лекарственных средств. Однако именно тогда стала явственно вырисовываться проблема несоответствия между практически неограниченными возможностями синтеза новых химических соединений, и лимитированностью ресурсов для выявления/тестирования их биологического действия [46, 65].

Современные подходы к созданию лекарственных препаратов. Оценка потенциальных мишеней действия химических соединений (лекарственных средств). Процесс создания нового лекарственного средства можно условно разделить на четыре стадии. К первой стадии (I этап) будет относиться поиск или синтез *de novo* ряда химических соединений и вычленение из него, по совокупности желаемых свойств, соединений-лидеров, которые в последующем будут исследоваться более детально. На данной стадии (этапе) испытаний осуществляется основной фармакологический и биохимический скрининг исследуемых соединений и проводятся первичные токсикологические исследования в целях определения максимально переносимых доз; также возможно проведение оценки патентоспособности.

Описание процесса химического синтеза (с данными о структуре и чистоте препарата) может быть включено в первую или вторую стадию испытаний. На второй стадии доклинических испытаний (II этапу) проводят расширенные фармакологические исследования (определение основного действия, его длительность), а также исследуют фармакокинетику (всасывание, распределение, метаболизм и выведения) исследуемых веществ [37].

Часть авторов [65] выделяют еще третий и четвертый этапы доклинических испытаний, на которых проводится изучение острой и хронической токсичности исследуемых соединений, оценка возможного вреда на репродуктивную систему, а также подготовка к синтезу препарата и производству лекарственных форм для прохождения клинических исследований.

После успешного прохождения этих этапов стадии, соединения-лидеры подвергаются клиническим испытаниям в условиях лицензированных медицинских учреждений [4]. В целом, можно сказать, что наиболее пристальный интерес в академической науке вызывает первый этап доклинических исследований, связанный с поиском нового потенциального лекарственного агента, так как этапы оценки биологического (в том числе и токсического действия) являются общеизвестными и стандартизированными.

Затратность разработки лекарственных средств. Методы оптимизации разработок. Еще одним фактором, обуславливающим интерес к фазе доклинических испытаний является то, что осуществить полноценную оптимизацию данного процесса можно только на этой фазе. При этом, сама оптимизация описанного многоступенчатого процесса создания лекарственных средств крайне необходимой мерой, так как стоимость вывода лекарственных средств на рынок неуклонно возрастает. Стоимость вывода одного препарат на рынок с 1975 по 2010 год увеличилась почти в десять раз (с 138 миллионов долларов до 1,3 миллиарда), а доля затрат на проведение клинических испытаний достигла 60% [150]. Подобные показатели затрат обусловлены не только возрастающими требования регуляторных органов: несмотря на то что на ранних стадиях исследования какого-либо соединения перспективы могут быть весьма многообещающими, эффективность, качество и безопасность препарата выявляются только на стадии доклинических и клинических исследований.

Большие затраты, необходимые для создания новых (инновационных) типов лекарственных средств, наложенные на тот факт, что России после распада СССР досталась далеко не передовая технологическая база, сформированная к середине 70-х годов 20 века, и нацеленная крупнотоннажный выпуск лекарственных субстанций [19] привели к тому, что основную часть продуктовых портфелей отечественных производителей составляют дженериковые препараты [33], и разработка принципиально новых типов лекарственных средств практически не осуществима.

В целом, можно говорить о том, что необходимость создания новых высокорентабельных инновационных типов лекарственных средств вынуждает, в создавшихся условиях, искать способы оптимизации процесса поиска новых химических соединений и снижения его стоимости. Необходимо отметить, что неудовлетворительные результаты фазы клинических исследований обходятся в разы дороже тех, которые обнаруживаются в ходе доклинических исследований [255], а, так как клинические испытания представляют собой весьма длительную стадию, которую практически невозможно ускорить, то основной вклад в

оптимизацию процесса разработки лекарственных средств можно внести только на стадиях доклинических исследований, к которым в полной мере применимы многочисленные подходы, основанные на моделировании/анализе соотношений «структура-свойства» [26].

Подход «структура-свойство» как основа современной системы создания и прогнозирования свойств химических соединений. Практически неисчерпаемое химическое пространство размером около 10^{180} органических производных, и возможности органического синтеза, позволяющие получить любое мыслимое соединение, казалось бы, являются прекрасной базой для поиска новых типов лекарственных средств. В то же время, каждое химическое соединение обладает сугубо индивидуальным набором физических, химических и биологических свойств, и подобрать необходимое их сочетание методом тотального скрининга практически невозможно [46]. Данный факт обусловил необходимость поиска взаимосвязей между составом, а затем строением и структурой химических элементов и веществ, и их свойствами, чему были посвящены усилия ученых, начиная с 19 века.

Согласно О.А. Раевскому, 2015, началом реального использования соотношений «структура-свойства» можно считать работу К. Ханша и К. Фуджиты о корреляции токсичности небольшого ряда производных бензойной кислоты с липофильностью и константами Гаммета, опубликованную в 1964 г. [50, 201]. Именно эта работа рассматривается как основополагающая для создания и развития целого ряда новых научных направлений, таких как физическая органическая химия, хеометрика, компьютерный скрининг, молекулярное моделирование и др. [46].

Что касается развития хеометрического направления в России, его первопроходцем можно считать Н.В. Лазарева: в первой же его работе были сформулированы задачи промышленной токсикологии, требующие немедленного решения, в частности, необходимость изучения связи между физико-химическими свойствами веществ и их токсическим действием [46]. В 1941-1944 гг. этот ученый проанализировал значения токсичности и

коэффициенты распределения в системе «оливковое масло – вода» для тысячи органических соединений и построил графические зависимости логарифмов токсичных концентраций от логарифмов коэффициентов распределения.

В настоящее время, анализ соотношения «структура-свойства» активно применяется на всех доклинических этапах создания лекарственных средств, в том числе для оценки наличия предполагаемых биологических (в том числе токсических [11] свойств исследуемых соединений и их потенциальных мишеней действия [9, 31, 30, 128].

Оптимизация процесса создания лекарственного препарата может осуществляться разнообразными методами, которые могут применяться на этапе выбора/синтеза химического соединения (весь комплекс методов, основанных на подходе «структура-свойство»), или на этапе первоначального биологического тестирования. Например, оптимизация на этапе биологического тестирования может заключаться в виде введения дополнительного этапа – скрининга лекарственных веществ на малых модельных организмах [190]. Подобный подход позволяет с достаточно низкими затратами выявить новые активные соединения, дополнительные мишени и/или молекулярные механизмы действия химического соединения, и обеспечивает получение потенциально полезной информации о биологическом действии соединений [190]. Также оптимизация возможна и с помощью совершенствования инструментальной базы, что включает в себя скрининг больших химических библиотек в комплексе с автоматизированным анализом данных, и с момента своего появления в середине 1990-х годов, активно используется ведущими фармацевтическими компаниями и исследовательскими центрами [260].

В целом, можно вычленить два принципиальных подхода к оптимизации поиска и оценке мишеней действия лекарственных препаратов (химических соединений), таких как экспериментальное тестирование лекарственных соединений на связывание с белками человека и прогноз *in silico* [25].

Несомненно, наиболее оптимальным и дающим наиболее точные результаты подходом, считается экспериментальное тестирование

лекарственных соединений на связывание с белками человека [25]. Однако экспериментальное тестирование большого количества соединений на активность к большому количеству белков является трудновыполнимой задачей, в первую очередь, из-за высокой стоимости экспериментов, и потому данный подход используется, в основном, только крупными фармацевтическими компаниями типа, которые используют панели *in vitro* для оценки белков-мишеней лекарственных соединений с изученными побочными эффектами [25]. Также для оценки потенциальных мишеней лекарственных соединений может быть использован прогноз *in silico* [25, 30]. В этом случае, стратегия поиска или создания (синтеза) биологически активных молекул во многом определяется тем, известны или нет трехмерные структуры молекулы-биолиганда и рецептора-мишени.

Знание структуры белка-мишени позволяет исследователям проводить прямое моделирование; в то время как не прямое базируется на сравнительном анализе структурных особенностей активных и неактивных соединений [128, 314, 384]. Прямое моделирование является одним из наиболее эффективных подходов при поиске потенциальных лекарственных средств, поскольку в его рамках воссоздается структура лиганд-рецепторного комплекса с оценкой конформаций и взаимного сродства [26]. В рамках данного подхода, докинг-процедуры оценивают комплементарность известных структур данному активному центру с помощью специально разработанных программных пакетов реализации этого подхода [267]; либо создается структура целевых молекул *de novo* путем постепенного конструирования на основе небольших фрагментов, помещаемых в активный сайт рецептора, с учетом минимизации энергии отталкивания (стерический фактор) и максимизации энергии связывания групп [26]. Основные же методологические трудности данного подхода связаны с учетом конформаций лиганда, гибкости рецептора и построением оценочной функции, относительно невысокой надежности оценки сродства лигандов к связыванию (что может привести к ложно положительным результатам) и слишком общими правилами построения молекул, вследствие чего значительная

доля генерируемых структур не может быть синтезирована на практике) [26]. В том же случае, если структура специфического требуемого белка (рецептора) не найдена или не известна, используются т.н. «непрямые подходы», на основе использования построенных взаимосвязей «структура-активность» (Quantitative Structure – Activity Relationship (QSAR)). При этом, в большинстве подобных подходов используются фрагментные дескрипторы для описания структуры соединений и алгоритмы оценки биологической активности по сходству структурных формул или алгоритмы, основанные на наивном Байесовском подходе [25].

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 – Общий дизайн исследования

Исследование, направленное на поиск новых стратегий коррекции восстановительных процессов при экспериментальном инфаркте миокарда включало в себя два логических блока: блок системного анализа *in silico* мультитаргетного механизма действия 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида и блок экспериментов *in vivo*.

В рамках первого блока было определен *in silico* спектр перспективных таргетных видов активности; осуществлен поиск валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней и выявлены их сайты связывания; проведен докинг исследуемого соединения, препаратов сравнения и референсных веществ в специфические сайты релевантных белков-мишеней; осуществлен сравнительный анализ таргетного *in silico* спектра фармакологической активности исследуемого соединения; построены нейросетевые системные модели мультитаргетного механизма действия исследуемого соединения

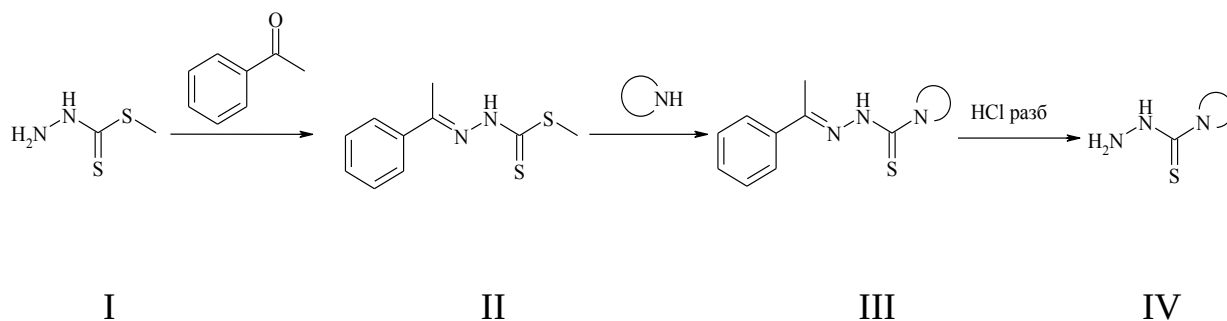
В рамках блока экспериментов *in vivo* была проведена серия экспериментов на лабораторных животных (крысы), которая включала в себя экспериментальное моделирование острого инфаркта миокарда, в целях подтверждения гипотезы о наличии центрального антистрессорного действия – экспериментальное исследование на модели острого иммобилизационного стресса.

2.2 – Исследуемое соединение. Краткое описание синтеза

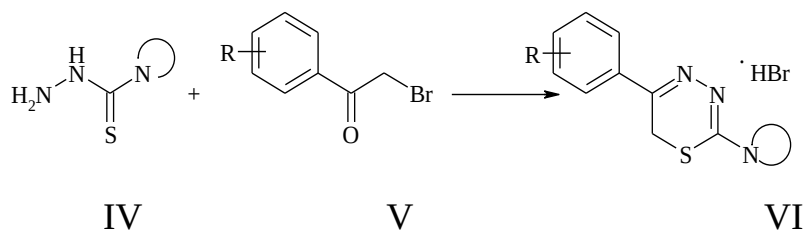
В работе использовалось биологически активное соединение 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид (соединение L-17) из группы замещенных 5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминов, синтезированных в ФГАОУ

ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и ФГБУН РАН Институт Органического Синтеза им И.Я. Постовского УрО РАН (патент РФ № 2259371 от 27 августа 2005 г., патент РФ 2456284 от 12.04.2011) [74, 77].

На основе методики синтеза метилдитиокарбазона ацетофенона (II) (В.Я. Казаков, И.Я. Постовский, 1960) были получены тиосемикарбазиды (IV):



Синтез новой группы соединений 2-циклоалкиламино-5-(4'-R-фенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромидов (VI), основан на циклоконденсации оригинальных 4-замещенных тиосемикарбазидов (IV) с соответствующими α-галогенацетофенами (V).



Данный класс соединений известен также как 1,3,4-тиадиазины, 2-циклоалкиламино-5-(4'-R-фенил)-6Н-1,3,4-тиадиазины, 6Н-1,3,4-Thiadiazines, 5-(3-bromophenyl)-2-(4-morpholinyl, 5-phenyl Substituted-6Н-1,3,4-thiadiazine-2-amines.

Структурная формула представлена на *рисунке 1*, пространственная формула – на *рисунке 2*.

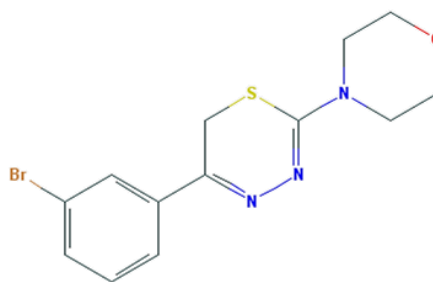


Рисунок 1 – Структурная формула соединения L-17 из группы замещенных 5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминов

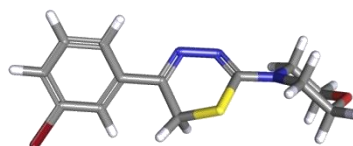


Рисунок 2 – Пространственная формула соединения L-17 из группы замещенных 5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминов

2.3 – Материалы и методы, используемые для прогноза *in silico*

2.3.1 – Общее описание системного анализа *in silico*

Цель исследования. Системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия соединения L-17. В проведенном исследовании в качестве материалов выступали данные по 2D- и 3D-структуре изучаемых химических соединений, референсных препаратов и веществ, а также белков-мишеней:

- 1) 2D-структурная формула соединения-лидера L-17;

2) 2D-структурные формулы наиболее близких к L-17 по спектру фармакологической активности препаратов сравнения миртазапина и сульпирида;

3) 3D-модели и данные о сайтах связывания белков-мишеней, релевантных спектру фармакологической активности L-17;

4) 2D-структурные формулы референсных препаратов и соединений, аффинных к релевантным белкам-мишеням;

5) 2D-структурные формулы новых производных 1,3,4-тиадиазина.

При выборе белков-мишеней, релевантных спектру фармакологической активности L-17, использовались обобщенные данные по результатам экспериментального тестирования данного соединения.

Для получения указанных структурных данных выполняли поиск в следующих интернет-ресурсах: 1) база знаний по структуре и функциям белков UniProtKB [377]; 2) база данных по экспериментальным 3D-моделям белков PDBe (европейское зеркало); 3) база данных по теоретическим 3D-моделям белков ModBase [266]; 4) база данных по фармакологически релевантным белкам и их лигандам IUPHAR [239]; 5) база данных по известным лекарственным препаратам DrugBank [158].

Для последовательной обработки и анализа данных в настоящем исследовании использовались следующие компьютерные программы, с помощью которых проводили: 1) прогноз спектра биологической активности химических соединений – PASS 10.4 Professional Extended [51]; 2) анализ взаимозависимостей различных видов биологической активности химических соединений – PharmaExpert 10.1 [53]; 2) анализ связывания лигандов с сайтами биомишеней с целью определения ключевых связывающих аминокислот – LigPlot+ 1.4.5 [248]; 3) прогноз проницаемости соединений через гемато-энцефалический барьер – BBB Predictor 0.90; 4) построение методами молекулярной механики конформеров соединений – MarvinSketch 15.6.15 [258]; 4) оптимизацию методами квантовой химии конформации соединений – MORAC2016; 5) докинг низкомолекулярных лигандов в специфические сайты

связывания белков-мишеней – AutoDockVina 1.1.1 [373]; 6) виртуальный скрининг методом докинга новых химических соединений – PyRx 0.8 [312]; 7) дисперсионный анализ, нейросетевое моделирование и ландшафтный анализ – Statistica 8 [345]; 8) трансляцию структурных химических баз данных и формирование обучающих выборок – ИТ «Микрокосм» 7.1 [51]; 9) анализ химических соединений методом структурного сходства – TestSim 7.1 [6]; 10) детальный анализ молекулярных механизмов связывания соединений с сайтами биомитеней – LigandScout 4.0 Advanced [232]; 11) рисование и обработка структурных формул, формирование и ведение химических баз данных – ChemOffice 9.0 [296]; 12) общую обработку данных и построение графиков – MSOfficeExcel 2013.

2.3.2 – Определение *in silico* для соединения-лидера L-17 наиболее перспективных таргетных видов активности

Структура соединения L-17 была представлена в виде файла стандартного коммуникативного формата *.mol.

Прогноз для соединения L-17 спектра системных видов фармакологической активности выполняли с помощью программы PASS (версия 10.4 Professional Extended [52]). Программа позволяет по структурной формуле оценивать наличие/отсутствие у прогнозируемого соединения тех видов биологической активности, информация о которых имеется в базе данных по известным биологически активным веществам. Химическая структура описывается с помощью двухуровневых атом-центрированных MNA-дескрипторов окружения. Метод прогноза основан на оценке условной вероятности по формуле Байеса с использованием арксинусного преобразования Фишера. При прогнозе рассчитываются вероятности P_a и P_i принадлежности прогнозируемого вещества к классам соединений, проявляющих и не проявляющих заданную активность. Соединение считается активным, если $P_a > P_i$.

Всего программа PASS 10.4 ProfessionalExtended прогнозирует более 7500 видов биологической активности, из которых к системным фармакологическим эффектам относится 480 видов. Для более детального анализа результатов прогноза для L-17 указанных 480 видов активности рассчитывали отношение правдоподобия P_a/P_i . Активность считали весьма перспективной, если $P_a/P_i \geq 1.5$.

Интерфейс программы PASS при прогнозе системных видов фармакологической активности соединения L-17 приведен на *рисунке 3*.

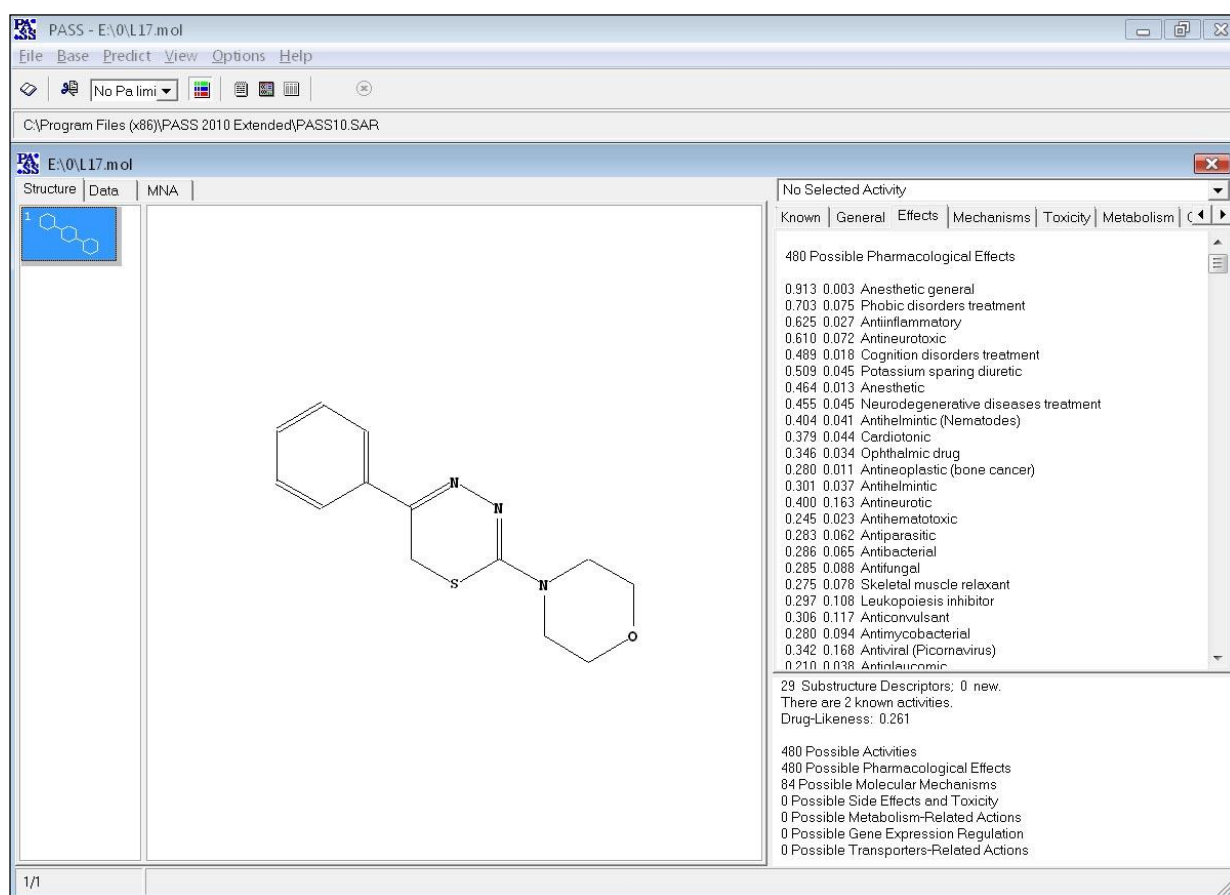


Рисунок 3 – Интерфейс программы PASS

Перечень перспективных для L-17 по прогнозу в PASS системных видов активности расширяли с учетом результатов экспериментального изучения фармакологических эффектов данного соединения. Анализ таргетных механизмов действия наиболее перспективных системных видов активности соединения L-17 выполняли с помощью программы PharmaExpert 10.1 [53]. Для каждого перспективного системного вида активности выявляли набор связанных

с конкретными белками-мишенями видов активности, определяющих наличие данного системного вида активности. Для найденных мишень-ориентированных видов активности в программе PASS вычисляли значения P_a , P_i и P_a/P_i . Перечень перспективных для L-17 таргетных видов активности определяли, как с учетом результатов прогноза в PASS, так и по данным его экспериментального фармакологического тестирования.

2.3.3 – Поиск валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней и выявление их специфических сайтов связывания

На данном этапе сначала выполняли поиск валидных экспериментальных или теоретических 3D-моделей белков-мишеней, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17. Первичная информация об этих белках для *Homo sapiens* была получена из базы знаний UniProtKB [377]. Наилучшая экспериментальная рентгеноструктурная 3D-модель из списка UniProtKB выбиралась по трем критериям:

- 1) как можно большая длина смоделированной аминокислотной последовательности (в идеале – полностью вся последовательность);
- 2) как можно меньшая длина волны рентгеновского излучения (желательно, менее 2 Å);
- 3) как можно меньшее число фрагментов смоделированного белка (желательно, одна полностью разрешенная цепочка).

Пример страницы UniProtKB с перечнем экспериментальных моделей JAK3 киназы приведена на *рисунке 4*.

Если в UniProtKB ссылки на экспериментальные 3D-модели анализируемого белка отсутствовали, проводился поиск наилучшей теоретической модели в базе данных ModBase [266], ссылка на поиск в которой также имеется в описании белка на UniProtKB.

Наилучшая теоретическая 3D-модель из списка ModBase выбиралась по трем критериям: 1) как можно большая длина смоделированной аминокислотной

последовательности (в идеале — полностью вся последовательность); 2) как можно больший процент идентичных аминокислот в моделируемом белке, в сравнении с белком-шаблоном; 3) как можно большая статистическая достоверность модели, по совокупности критериев оценки качества теоретической модели.

UniProtKB - P52333 (JAK3_HUMAN)

Display | BLAST | Align | Format | Add to basket | History | Help video | Other tutorials and videos | Feedback

Entry | Publications | Feature viewer | Feature table

Protein Tyrosine-protein kinase JAK3
Gene JAK3
Organism Homo sapiens (Human)
Status Reviewed - Annotation score: 5.00 - Experimental evidence at protein level¹

Function
 Non-receptor tyrosine kinase involved in various processes such as cell growth, development, or differentiation. Mediates essential signaling events in both innate and adaptive immunity and plays a crucial role in hematopoiesis during T-cells development. In the cytoplasm, plays a pivotal role in signal transduction via its association with type I receptors sharing the common subunit, gamma such as IL2R, IL4R, IL7R, IL9R, IL15R and IL21R. Following ligand binding to cell surface receptors, phosphorylates specific tyrosine residues on the cytoplasmic tails of the receptor, creating docking sites for STATs proteins. Subsequently, phosphorylates the STATs proteins once they are recruited to the receptor. Phosphorylated STATs then form homodimer or heterodimers and translocate to the nucleus to activate gene transcription. For example, upon IL2R activation by IL2, JAK1 and JAK3 molecules bind to IL2R beta (IL2RB) and gamma chain (IL2RG) subunits inducing the tyrosine phosphorylation of both receptor subunits on their cytoplasmic domain. Then, STAT5A AND STAT5B are recruited, phosphorylated and activated by JAK1 and JAK3. Once activated, dimerized STAT5 translocates to the nucleus and promotes the transcription of specific target genes in a cytokine-specific fashion. [4 Publications](#)

Catalytic activity
 ATP + a [protein] L-tyrosine = ADP + a [protein] L-tyrosine phosphate. [PROSITE-ProRule annotation](#)

3D structure databases

PDB entry	Method	Resolution (Å)	Chain	Positions	PDBsum
1YVJ	X-ray	2.55	A	814-1103	[*]
3LXK	X-ray	2.00	A	806-1124	[*]
3LXL	X-ray	1.74	A	806-1124	[*]
3PJG	X-ray	2.20	A	812-1124	[*]
3ZC6	X-ray	2.42	A/B/C/D	813-1100	[*]
3ZEP	X-ray	2.35	A/B/C/D	813-1047	[*]
			A/B/C/D	813-1100	[*]
4HVD	X-ray	1.85	A	811-1124	[*]
4HVG	X-ray	2.75	A	811-1124	[*]
4HVV	X-ray	2.30	A	811-1124	[*]
4HVT	X-ray	2.40	A	811-1124	[*]
4I6Q	X-ray	1.85	A	811-1124	[*]
4QPS	X-ray	1.80	A/C	811-1103	[*]
4QT1	X-ray	2.40	A	811-1124	[*]
4R1O	X-ray	2.69	A	810-1100	[*]
4V0G	X-ray	3.00	A/B	816-1098	[*]
4Z16	X-ray	2.90	A/B/C/D	811-1124	[*]
5LWM	X-ray	1.55	A	812-1103	[*]
5LWN	X-ray	1.60	A	812-1103	[*]
5TOZ	X-ray	1.98	A	812-1124	[*]
5TTS	X-ray	2.34	A	812-1124	[*]
5TTU	X-ray	1.72	A	812-1124	[*]
5TTV	X-ray	1.93	A	812-1124	[*]

ProteinModelPortal¹ P52333.
 SMR² P52333.
 ModBase³ Search...
 MobiDB⁴ Search...

Рисунок 4 – Пример записи в UniProtKB данных по экспериментальным моделям белка

После выбора лучшей 3D-модели заданного белка получали координатный файл этой модели в стандартном текстовом формате описания 3D-структуры белков *.pdb.

Пример страницы ModBase с перечнем теоретических 3D-моделей GAT1 ГАМК-транспортера приведены на *рисунке 5*.

Всего было найдено 16 3D-моделей белков-мишеней, релевантных прогнозируемому и экспериментальному спектру фармакологической активности соединения L-17.



ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models

[Sali Lab Home](#)
[ModWeb](#)
[ModLoop](#)
[ModBase](#)
[ModEval](#)
[PCSS](#)
[FoXS](#)
[IMP](#)
[ModPipe](#)

[ModBase Home](#)
[ModBase Datasets for User Anonymous](#)
[User Login](#)
[Help](#)
[News](#)
[Contact](#)
[Current Datasets](#)

Model Overview

[Go to Sequence Overview](#)

Search Summary

Perform Action on Selected Model(s)

Check model(s), then select option

Search

26 matches found.

Check All

Uncheck All

TARGET				MODEL DATA				TEMPLATE			
Model Icon	Model/Fold Reliability	Sequence Database Link	Database Annotation	Organism	Protein Size	Modeled Segment	Size	Seq Id(%)	PDB code	PDB Segment	PDB Comment
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	78-593	516	11.00	1fftA	53-552	the structure of ubiquinol oxidase from escherichia coli
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	44-554	511	22.00	2a5A	5-503	crystal structure of leutaa, a bacterial homolog of na+/cl-- dependent neurotransmitter transporters
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	43-576	534	47.00	4m48A	26-599	
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	43-593	551	11.00	3dtuA	13-551	catalytic core subunits (i and ii) of cytochrome c oxidase from rhodobacter sphaeroides complexed with deoxycholic acid
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	51-567	517	17.00	3giaA	11-431	crystal structure of apct transporter
		P30531	rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1;short=gat-1;altn ame: full=solute carrier family 6 member 1;	Homo sapiens	599	44-557	514	22.00	2qeiA	5-512	crystal structure analysis of leut complexed with l-alanine, sodium, and clomipramine
		P30531.2	sc6a1_human rcname: full=sodium- and chloride-dependent gaba transporter 1; sho rt=gat-1; altn ame: full=solute carrier family 6 member 1	Macaca fascicularis , Macaca mulatta , etc.	599	44-554	511	22.00	2a5A	5-503	crystal structure of leutaa, a bacterial homolog of na+/cl-- dependent neurotransmitter transporters

Рисунок 5 – Пример списка теоретических моделей из базы данных ModBase

Далее на этапе 2 во всех релевантных белках-мишенях по литературным данным были определены ключевые связывающие аминокислоты сайтов. При этом если в найденной валидной экспериментальной 3D-модели белка находился лиганд, коррелирующий с предполагаемой активностью соединения L-17, то с помощью программы LigPlot⁺ [248] анализировали связывание этого лиганда

с сайтом биомишени, с целью получения дополнительной информации о ключевых связывающих аминокислотах, которая обобщалась с данными, полученными из литературных источников. Пример анализа в программе LigPlot⁺ связывания ингибитора с сайтом кальпаина CAPN1, с обозначением возможных связывающих аминокислот, приведен на *рисунке 6*.

С учетом информации о ключевых связывающих аминокислотах, для каждого белка было определено пространственное расположение сайта связывания и на отобранной валидной 3D-модели с помощью программы PyRx 0.8 построено покрывающее сайт пространство (увеличенного объема), для последующего докинга низкомолекулярных химических соединений. Пример построения в программе PyRx пространства для докинга, покрывающего связывающий сайт кальпаина CAPN1, приведен на *рисунке 7*.

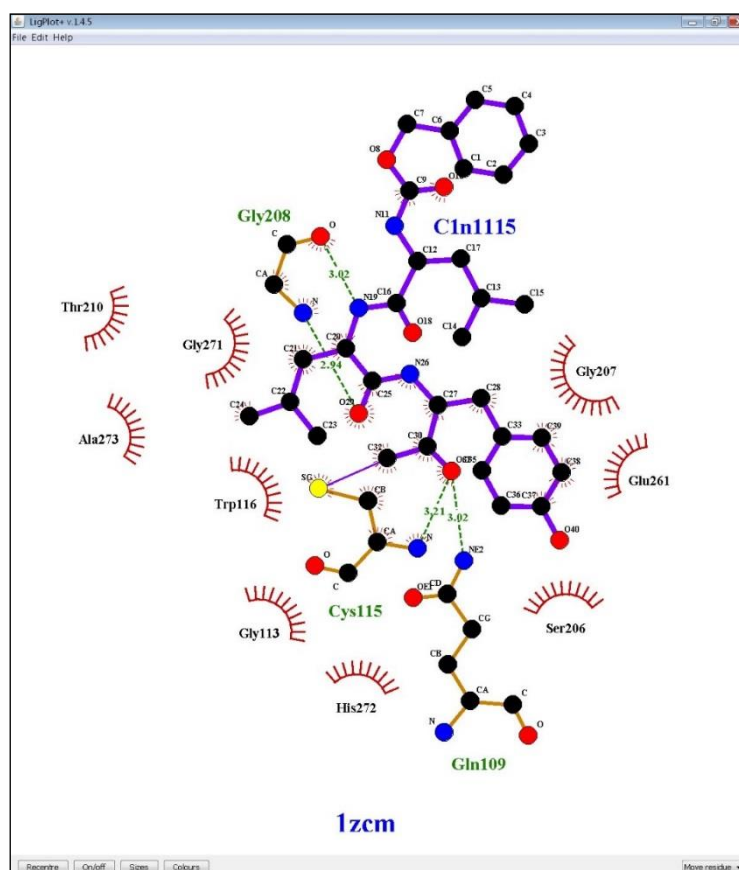


Рисунок 6 – Пример определения с помощью программы LigPlot⁺ связывающих аминокислот сайта

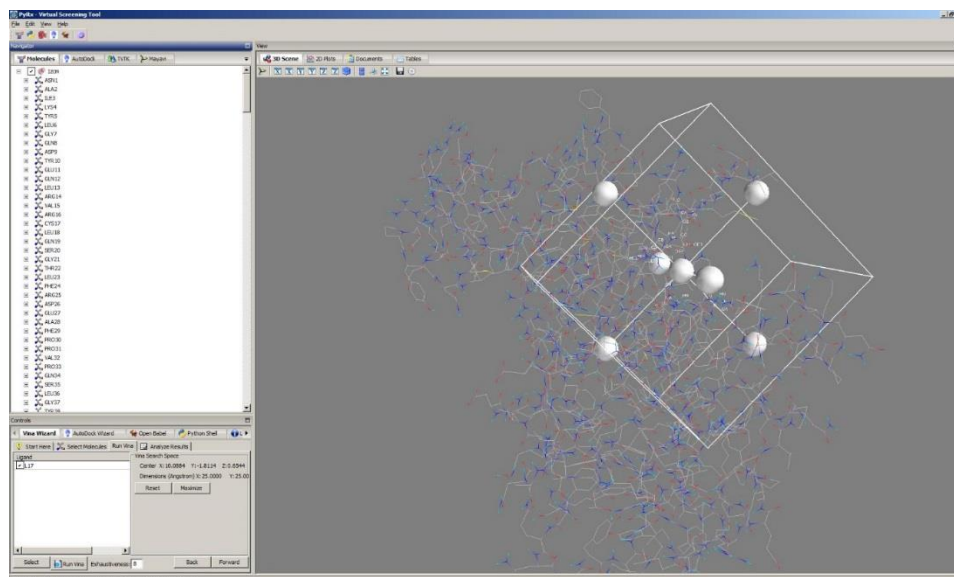
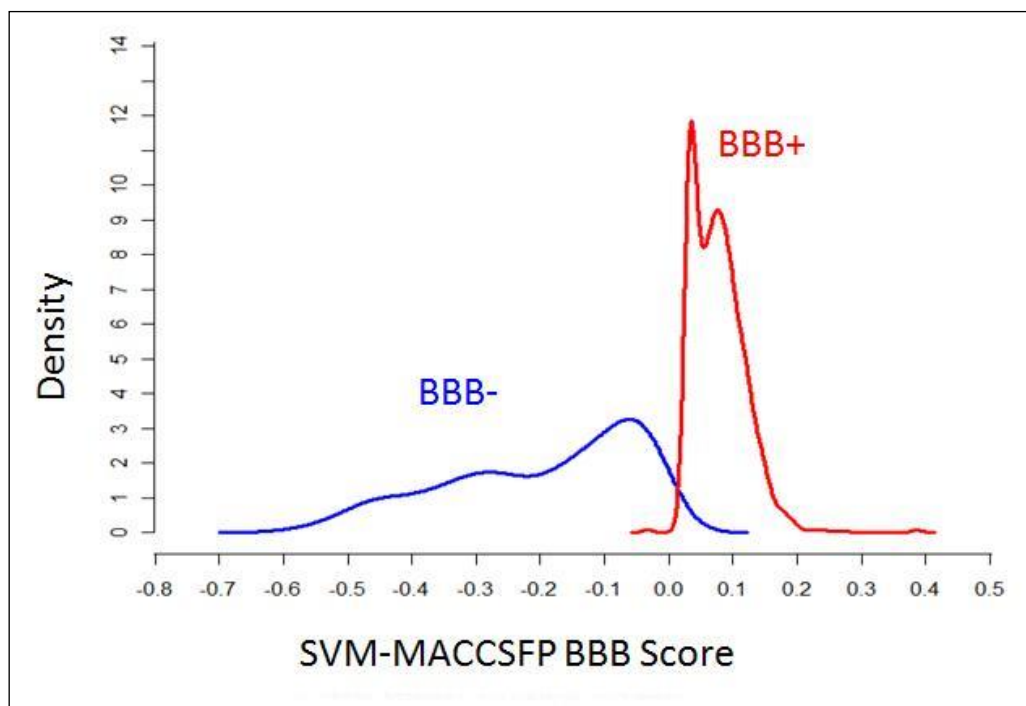


Рисунок 7 – Пример построения с помощью программы PyRx пространства для докинга, покрывающего связывающий сайт белка

2.3.4 – Выбор референсных веществ для релевантных биомишеней, построение и оптимизация их 3D-моделей

С помощью программы BBBPredictor 0.90 с использованием 8 различных алгоритмов был выполнен прогноз проникаемости соединения L-17 через гемато-энцефалический барьер. Пример прогноза в программе BBBPredictor 0.90 по алгоритму SVM-MACCS проникаемости соединения L-17 через ГЭБ приведен на *рисунке 8*.

Метрикой проникаемости через ГЭБ служило отношение значений оценочных функций BBB+/BBB–, которое рассчитывалось отдельно при прогнозе по каждому из 8 алгоритмов. Итоговая оценка вычислялась как 10%-ное усеченное среднее 8 найденных показателей. Полученная в результате прогноза информация в дальнейшем учитывалась при выборе референсных препаратов и соединений для отобранных релевантных биомишеней.



**Рисунок 8 – Пример прогноза в программе BBB Predictor
проницаемости через гемато-энцефалический барьер соединения L-17**

Далее для каждого из релевантных белков-мишеней в Интернет были найдены референсные препараты или соединения, по характеру действия и по химической структуре близкие к соединению L-17. Поиск выполняли с учетом расчетной оценки проницаемости соединения L-17 через ГЭБ.

По совокупности экспериментально изученных фармакологических эффектов соединения L-17, в качестве стандартных препаратов сравнения выбраны миртазапин и сульпирид, данные о которых были взяты из базы данных по известным лекарственным препаратам DrugBank.

Для релевантных белков-мишеней первичная информация об их референсах была получена из базы знаний UniProtKB. Для каждой биомишени по каждому приведенному в UniProtKB референсу был уточнен характер его действия по базе данных по известным лекарственным препаратам DrugBank. В случае отсутствия информации в UniProtKB и DrugBank поиск референсов выполнялся в базе данных по фармакологически релевантным белкам и их лигандам IUPHAR

Все референсные вещества и препараты сравнения были представлены в виде файлов стандартного коммуникативного формата *.mol

Для референсных веществ, препаратов сравнения мirtазапина и сульпирида и соединения L-17 методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 15.6.15, отдельно для каждого соединения, были построены по 10 конформеров с наименьшей энергией. Все конформеры были сохранены в виде файлов стандартного коммуникативного формата *.mol.

Пример построения ансамбля конформеров для соединения L-17 приведен на *рисунке 9*.

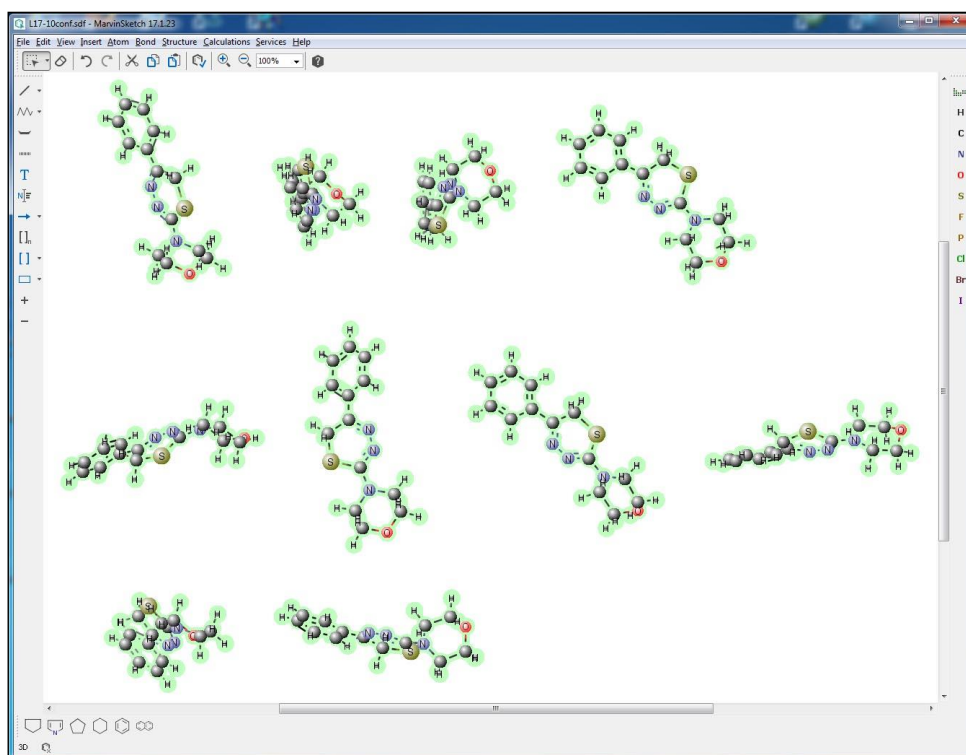


Рисунок 9 – Пример построения с помощью программы MarvinSketch десяти энергетически наиболее выгодных конформеров для соединения L-17

Построенные конформеры были оптимизированы с помощью программы МОРАС2016 с использованием полуэмпирического квантово-химического метода PM7. Среди оптимизированных конформеров были отобраны для каждого из референсных веществ, сульпирида, мirtазапина и соединения L-17 по одному конформеру с наименьшей общей энергией. Найденные наилучшие конформации были сохранены в виде текстовых файлов квантово-химического

формата *.out. Пример записи в файл результатов квантово-химических расчетов для энергетически наиболее выгодного конформера соединения L-17 приведен на *рисунке 10*.

```

PM7 XYZ AUX GNORM=0.01 NOMM
L17-004

GEOMETRY OPTIMISED USING EIGENVECTOR FOLLOWING (EF).
SCF FIELD WAS ACHIEVED

                                PM7 CALCULATION

                                MOPAC2012 (Version: 12.239L)
                                Fri Nov 18 13:38:56 2016
                                No. of days left = 0

FINAL HEAT OF FORMATION =          40.30878 KCAL/MOL =      168.65195 KJ/MOL

TOTAL ENERGY              =      -2828.53016 EU
ELECTRONIC ENERGY         =      -18932.24538 EU  POINT GROUP:   C1
CORE-CORE REPULSION        =      16103.71522 EU
COSMO AREA                 =      274.96 SQUARE ANGSTROMS
COSMO VOLUME               =      302.97 CUBIC ANGSTROMS

GRADIENT NORM              =      0.03404
IONIZATION POTENTIAL       =      8.741400 EU
HOMO LUMO ENERGIES (EU)    =      -8.741 -0.928
NO. OF FILLED LEVELS       =      47
MOLECULAR WEIGHT           =      261.341

MOLECULAR DIMENSIONS (Angstroms)

  Atom      Atom      Distance
  H      21      H      29      11.18615
  H      22      H      25      5.46016
  H      26      H      31      4.56342

SCF CALCULATIONS           =      228
COMPUTATION TIME           =      11.895 SECONDS

```

Рисунок 10 – Фрагмент листинга квантово-химической оптимизации в программе MOPAC2016 одной из конформаций соединения L-17

2.3.5 – Проведение докинга соединения L-17, препаратов сравнения и референсных веществ в специфические сайты релевантных белков-мишеней

Докинг оптимизированных конформеров соединения L-17, препаратов сравнения и референсов в специфические сайты связывания 16 релевантных биомишеней осуществлялся с помощью программ PyRx 0.8 и AutoDockVina 1.1.1, с учетом ранее найденных данных о ключевых аминокислотах сайтов связывания и покрывающих эти сайты пространств. Обработка данных

осуществлялась в потоковом режиме, с применением специально для этого написанных скриптов.

Для каждой биомишени и каждой структуры докинг выполняли 25 раз, каждый раз в новом расчете. По результатам одного такого расчета записывалось значение энергии докинга ΔE для энергетически наиболее выгодного конформера. Для каждого соединения, применительно к каждой биомишени, полученные 25 значений составляли вектор энергий докинга ансамбля конформеров этого соединения. Векторы энергий докинга ансамбля конформеров в совокупности по всем биомишеням составляли матрицу энергий ансамблевого докинга. Полученные матрицы в дальнейшем использовались в дисперсионном анализе ANOVA. По матрицам энергий ансамблевого докинга для каждой биомишени вычисляли минимальное значение энергии докинга. Совокупность этих значений составляла вектор минимальных энергий докинга. Полученные векторы минимальных энергий докинга в дальнейшем использовались для сравнительного анализа таргетного спектра фармакологической активности соединения L-17.

Докинг соединения L-17 был выполнен в сайты всех релевантных белков-мишеней. Сформированы матрица энергий ансамблевого докинга и вектор минимальных энергий докинга соединения L-17. Препараты сравнения миртазапин и сульпирид также были докированы в сайты всех релевантных белков-мишеней. Как для миртазапина, так и для сульпирида были сформированы отдельные матрицы энергий ансамблевого докинга и векторы минимальных энергий докинга. Докинг каждого референсного соединения выполняли только в сайт своей биомишени. Сформированы матрица энергий ансамблевого докинга и вектор минимальных энергий докинга референсных веществ.

2.3.6 – Сравнительный анализ таргетного *in silico* спектра фармакологической активности соединения L-17

Для соединения L-17, двух препаратов сравнения и референсных веществ по значениям минимальных энергий докинга были рассчитаны значения аффинности pK в отношении всех 16 релевантных биомишеней.

Зависимость энергии докинга ΔE от константы связывания вещества с сайтом белка-мишени K описывается формулой

$$\Delta E = -RT \ln K, \quad (1)$$

из которой получим

$$pK = -\lg e^{-\Delta E/RT},$$

где R – газовая постоянная, равная 8.314 Дж/(моль·К);

T – температура, стандартное значение в докинге равно 300 °К;

$\ln$ – натуральный логарифм;

$\lg$ – десятичный логарифм.

Относительная аффинность соединения L-17 для биомишени i в сравнении с другим соединением j (миртазапином, сульпиридом, референсными веществами) определяется вектором значений

$$Aff_{L17,i,j} = \frac{pK_{L17,i}}{pK_{i,j}}, \quad (2)$$

где $pK_{L17,i}$ – аффинность соединения L-17 в отношении биомишени i ;

$pK_{i,j}$ – аффинность соединения j в отношении биомишени i .

Совокупность значений $Aff_{L17,i,j}$ составляет вектор относительной аффинности соединения L-17 в сравнении с миртазапином, сульпиридом или референсными веществами.

2.3.7 – Сравнительный многомерный дисперсионный анализ спектров энергии докинга соединения L-17

С целью статистической оценки сходства/различия спектров энергии докинга соединения L-17, препаратов сравнения и референсных веществ был выполнен многомерный непараметрический однофакторный дисперсионный анализ ANOVA [2]. В программе Statistica 8 проведены сравнения матриц энергий ансамблевого докинга для следующих парных сочетаний: 1) соединение L-17 и референсные вещества; 2) соединение L-17 и миртазапин; 3) соединение L-17 и сульпирид.

Статистическую значимость различий вектор-средних энергий докинга оценивали по λ -критерию Уилкса в аппроксимации F-критерием Фишера.

2.3.8 – Формирование фокусированной библиотеки производных 1,3,4-тиадиазина, структурно сходных с соединением L-17

Сначала на этапе 7 с помощью СУБД ChemFinder 9.0 была сформирована первичная база данных из 77 производных 1,3,4-тиадиазина. С целью дальнейшей обработки структурной информации база данных была представлена в виде файла стандартного коммуникативного формата *.sdf. Далее был проведен анализ структурного сходства производных 1,3,4-тиадиазина с соединением L-17. Расчеты выполнены с использованием программного комплекса ИТ «Микрокосм» 7.2 [51, 128], модуль TestSim [6].

В ИТ «Микрокосм» структура соединений описывается набором дескрипторов 11 типов специализированного иерархического многоуровневого языка QL [6, 128]. Метрикой подобия соединения L-17 и соединения C из базы данных служил QL-модифицированный коэффициент сходства Танимото.

Общая формула коэффициента сходства Танимото

$$T = \frac{N_1 \cap N_2}{N_1 \cup N_2}, \quad (3)$$

где N_1 – число дескрипторов, присутствующих в соединении 1;
 N_2 – число дескрипторов, присутствующих в соединении 2;
 $N_1 \cap N_2$ – число дескрипторов, одновременно присутствующих как в соединении 1, так и в соединении 2;
 $N_1 \cup N_2$ – число дескрипторов, присутствующих или в соединении 1, или в соединении 2.

С учетом нотации QL-дескрипторами, сходство соединения C к соединению L-17 будет определяться формулой

$$T_{C, L17} = \frac{1}{11} \sum_{i=1}^{11} \frac{1}{d_i} \sum_{j=1}^{d_i} \frac{\min(K_{Cij}, K_{L17, i, j})}{\max(K_{Cij}, K_{L17, i, j})}, \quad i = 1, \dots, 11, \quad j = 1, \dots, d_i, \quad (4)$$

где K_{Cij} – число QL-дескрипторов вида j типа i в соединении C ;
 $K_{L17, i, j}$ – число QL-дескрипторов вида j типа i в соединении L-17;
 d_i – число QL-дескрипторов типа i в соединениях C и L-17.

Интерфейс программы TestSim 7.2 приведен на *рисунке 11*.

С целью дальнейшего использования в нейросетевом анализе мультитаргетного механизма действия соединения L-17, была сформирована фокусированная библиотека из 40 производных 1,3,4-тиадиазина, имеющих по коэффициенту Танимото структурное сходство с соединением L-17 больше 0.8. Все найденные структурные аналоги соединения L-17 были представлены в виде файлов стандартного коммуникативного формата *.mol.

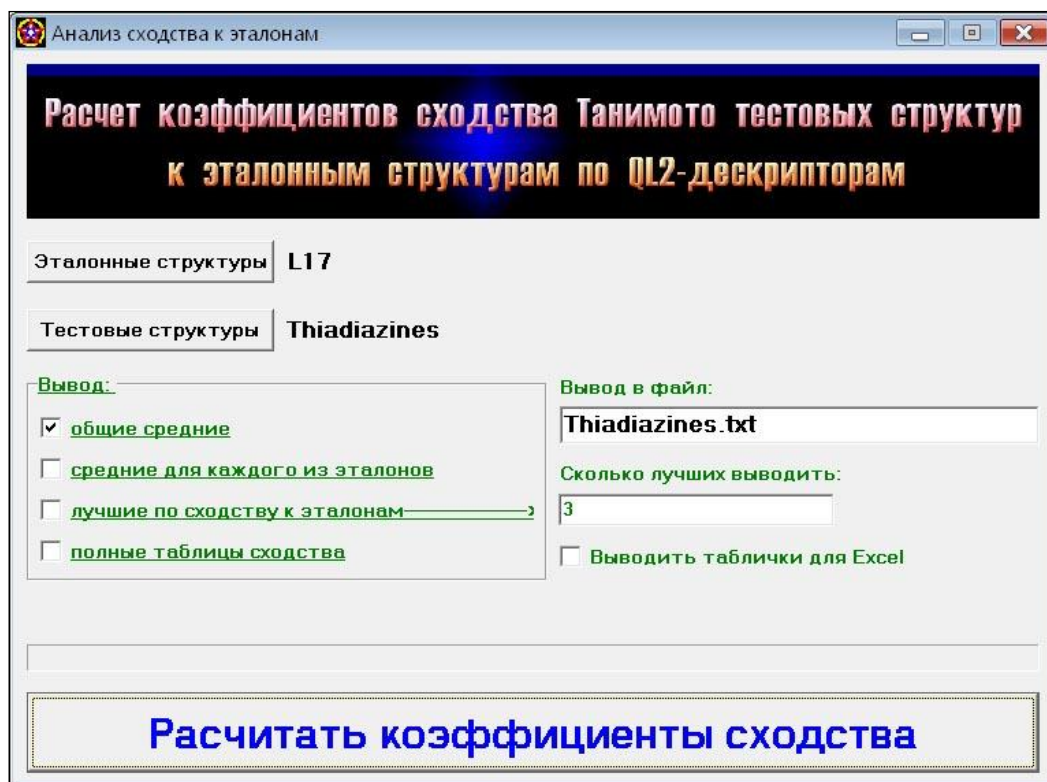


Рисунок 11 – Интерфейс программы TestSim 7.2 программного комплекса ИТ «Микрокосм»

2.3.9 – Построение и оптимизация 3D-моделей производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки

Построение для последующего докинга оптимальных конформаций 40 структурно сходных с соединением L-17 производных 1,3,4-тиадиазина выполняли по схеме, описанной выше в разделе 3: методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 15.6.15 с последующей оптимизацией в программе МОРАС2016.

Найденные оптимальные конформации были сохранены в виде файлов квантово-химического формата *.out.

2.3.10 – Выполнение докинга производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки в специфические сайты релевантных белков-мишеней

Докинг производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки в специфические сайты релевантных белков-мишеней был выполнен по схеме, описанной выше в разделе 4, с помощью программ PyRx 0.8 и AutoDockVina 1.1.1.

Матрица энергий ансамблевого докинга 40 структурных аналогов соединения L-17 была сформирована по минимальным значениям ΔE , найденным в результате 5-кратного докирования каждой структуры с сайт каждой биомишени. Полученная матрица в дальнейшем использовалась для нейросетевого моделирования.

2.3.11 – Построение нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17

Первоначально в результате детального анализа экспериментальных фармакологических эффектов соединения L-17 были определены две целевых биомишени, показатели докинга в сайты которых выступали как выходные нейроны в последующем нейросетевом моделировании.

В программе Statistica 8.0 было выполнено нейросетевое моделирование, с выбором двух лучших нейростей для каждой из целевых биомишеней.

Общая схема построения нейросетевых моделей состояла в следующем. Анализ начинали с выбора регрессионной модели. После загрузки матрицы энергий докинга в качестве выходной переменной выбирали колонку с данными для целевой биомишени, а в качестве входных переменных использовались остальные параметры (*рисунок 12*).

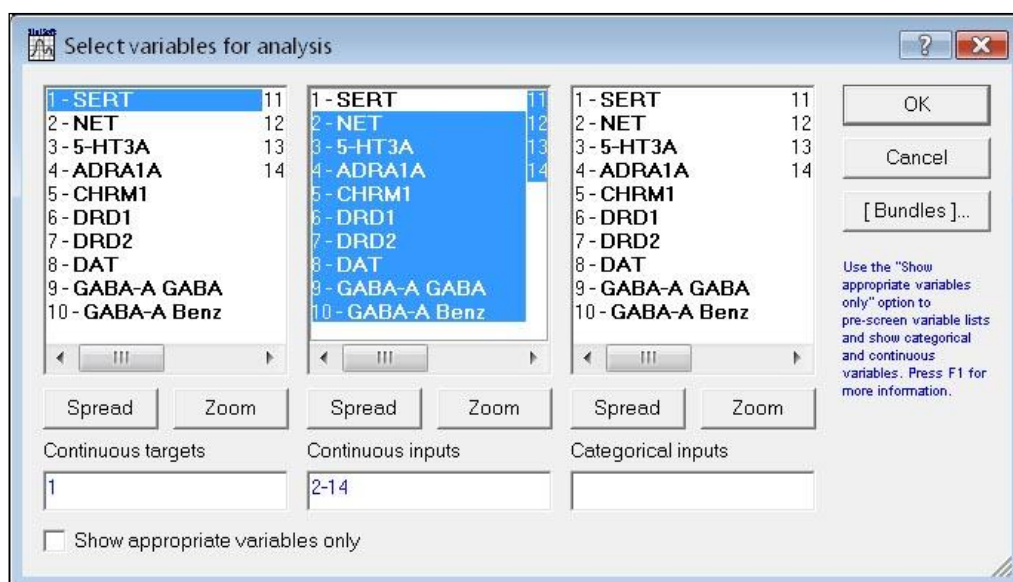


Рисунок 12 – Окно выбора переменных

При моделировании задавался случайный сэмплинг с объемами обучающей-тестовой выборки 80-20 %. В соответствии с теоремой Колмогорова [28], с помощью двухслойной искусственной нейронной сети может быть аппроксимирована зависимость любой сложности. Поэтому в настоящем исследовании использовалась архитектура сети в виде двухслойного перцептрона MLP $k-m-1$. Здесь k – число входных нейронов, в данном случае 13; m – число скрытых нейронов, устанавливается программой от 5 до 15.

В программе Statistica при построении перцептронных сетей для скрытого и выходного слоев используются пять наиболее распространенных активационных функций, попарный перебор которых осуществляется программой. Обучение нейросетей в программе Statistica проводится с использованием алгоритма обратного распространения ошибок. С целью достижения наилучшего результата обучения, число сетей для обучения было увеличено с 20 до 500, а число наилучших автоматически отбираемых сетей – с 5 до 50. После окончания обучения 50 лучших отобранных программой нейросетей выводятся в окно результатов.

По совокупности характеристик точности обучения и тестирования вручную выбиралась одна наилучшая нейросетевая модель, которая сохранялась на диске в виде файла формата *.xml. Для получения интегральных

характеристик точности найденной наилучшей нейросети ее тестировали на объединенной выборке, определяя соответствующие параметры программы и используя функцию «Predictions».

Полностью характеристики лучшей нейросети рассчитывали с помощью опций вкладки «Details»: архитектура сети и ее основные характеристик «Summary»; веса синаптических межнейронных связей «Weights»; коэффициенты корреляции между исходными и расчетными значениями целевой переменной «Correlation coefficients»; прогнозная статистика для целевой переменной «Predictions statistics» (минимальные и максимальные значения, ошибки); основные статистические характеристики исходных данных (среднее, стандартное отклонение и др.); данные анализа чувствительности «Global sensitivity analysis» и «Local sensitivity analysis» .

2.3.12 – Анализ нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17

В программе Statistica 8.0 на объединенной выборке с использованием двух найденных лучших нейросетей были рассчитаны энергии докинга 40 соединений в сайты двух целевых биомишеней, общие коэффициенты корреляции и веса синаптических межнейронных связей. Для этого каждую нейросеть загружали в режиме прогноза (*рисунок 13*), а затем выполняли расчеты. Полученные данные использовались в графическом анализе нейросетей.

Далее выполнялся выполнен общий и пошаговый анализ сензитивности двух найденных лучших нейросетевых моделей, результаты которого затем использовались в ландшафтном анализе. При анализе общей чувствительности для каждого входного нейрона определяется безразмерный показатель, характеризующий относительную интенсивность изменения сигнала выходных нейронов при изменении сигнала данного входного нейрона от минимального до максимального и постоянстве сигналов остальных входных нейронов. Для двух лучших нейросетей на основании найденных общих показателей

чувствительности определялся процентный вклад входных нейронов (индивидуальный и суммарный) в сигнал выходного нейрона. По результатам такого анализа выявлялась совокупность нейронов, обеспечивающая: 1) не менее чем 50%-ный вклад в сигнал выходного нейрона; 2) не менее чем 90%-ный вклад в сигнал выходного нейрона.

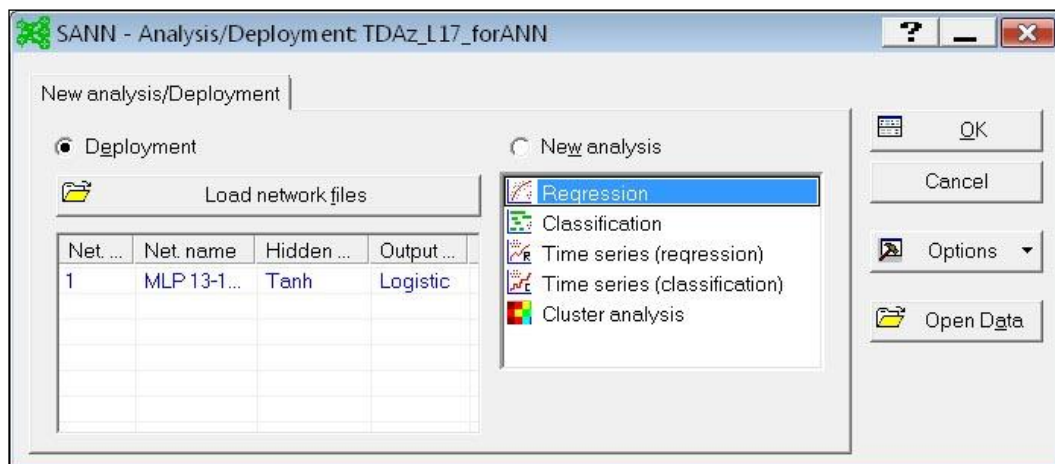


Рисунок 13 – Загрузка нейросети в режиме прогноза в программе Statistica

При пошаговом анализе чувствительности для каждого входного нейрона сигнал изменяется от минимального до максимального с шагом в 10%, при постоянстве сигналов остальных входных нейронов. На каждом шаге рассчитывается относительная интенсивность изменения сигнала выходных нейронов. В последующем, при помощи программы Statistica 8.0 [345] был выполнен ландшафтный анализ нейросетевых моделей по показателям их сензитивности. Для двух нейросетевых моделей были построены следующие ландшафты: 1) показателей пошагового анализа чувствительности всех нейронов; 2) показателей пошагового анализа чувствительности нейронов, обеспечивающих 50%-ный ответ в наиболее вариабельной сети. Проведено визуальное попарное сравнение ландшафтов показателей сензитивности двух нейросетей. Пример построения ландшафта приведен на *рисунке 14*. Путем сопоставления результатов анализа сензитивности нейросетевых моделей и

данных их ландшафтного анализа сделано предположение о существовании нового, ранее не известного пути передачи сигнала между релевантными биомишенями соединения L-17.

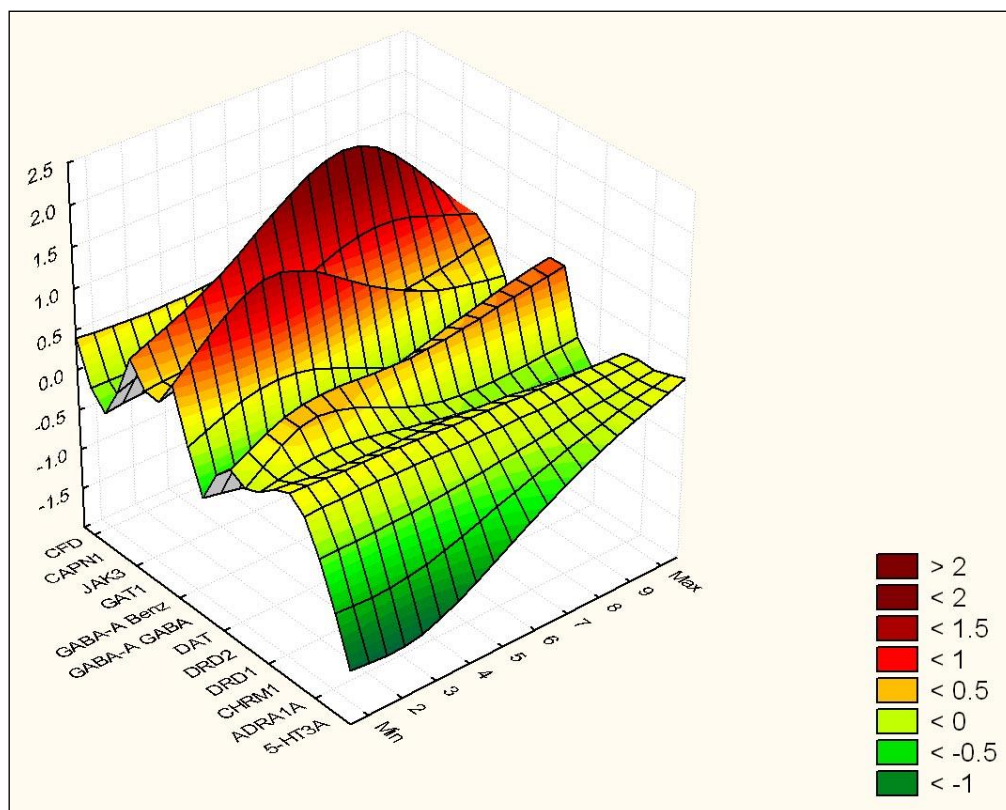


Рисунок 14 – Пример построения ландшафта показателей пошагового анализа чувствительности нейронов

2.3.13 – Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17, референсных веществ и препаратов сравнения со специфическими сайтами целевых биомишеней

Анализ механизмов связывания соединения L-17, референсных веществ и препаратов сравнения с сайтами связывания биомишеней выполняли с помощью программы LigandScout 4.0 Advanced. Эта программа позволяет индицировать 11 различных типов взаимодействия низкомолекулярного лиганда с сайтом связывания белка. Для соединения L-17 выполнен анализ механизмов связывания с сайтами всех релевантных биомишеней. Проведен анализ спектра

молекулярных механизмов мультитаргетного действия соединения L-17. Пример анализа механизма связывания соединения L-17 с сайтом биомишени приведен на *рисунке 15*.

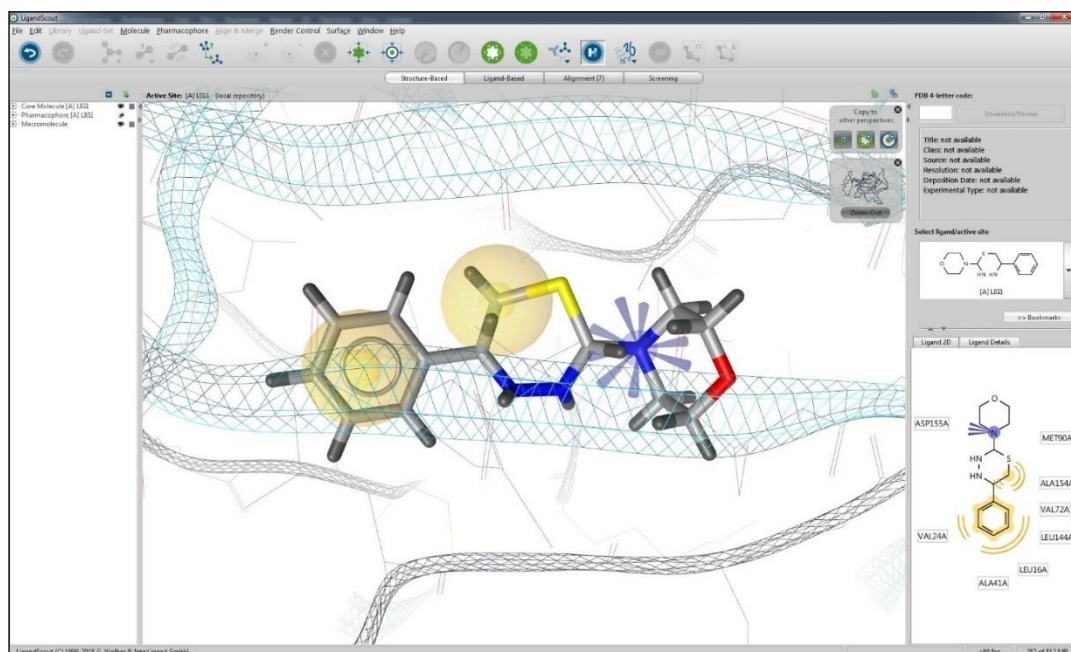


Рисунок 15 – Анализ в программе LigandScout механизма взаимодействия соединения L-17 с каталитическим сайтом JAK3 киназы

Для референсных веществ и препаратов сравнения выполнен анализ механизмов связывания только с сайтами двух целевых биомишеней. Проведен сравнительный анализ молекулярных механизмов действия на целевые биомишени соединения L-17 в сопоставлении с миратзапином, сульпиридом и двумя референсными веществами. Выработаны рекомендации по возможной модификации соединения L-17 с целью увеличения его активности в отношении двух целевых биомишеней.

2.4 – Материалы и методы, использованные в экспериментах *in vivo*

2.4.1 – Дизайн экспериментального исследования *in vivo*

Объем экспериментального исследования *in vivo* представлен в таблице 1, всего в экспериментах было задействовано 150 экспериментальных животных

Таблица 1 – Объём проведенных экспериментальных исследований *in vivo* (в ячейках представлены номера таблиц).

Этап	Разработка модели экспериментального инфаркта миокарда					Экспериментальная модель острого инфаркта миокарда							Имобилизационный стресс			
Группа	Контр	Экспериментальный инфаркт миокарда				Ложнооперированные животн			Экспериментальный инфаркт миокарда / L-17				Имобилизац ионный стресс		Имобилизацион ный стресс / L-17	
Название группы	группа А	группа В				группа С			группа D				группа F		группа G	
Сроки, сутки	1 сутки	1 сутки	5 сутки	7 сутки	14 сутки	1 сут ки	5 сутк и	7 сутки	1 сутки	5 сутки	7 сутки	14 сутки	6 часов	2 суток	6 часов	2 суток
Кол-во животн.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Гематологическое исследование																
	Т. 33												Т. 33	Т. 33	Т. 33	Т. 33
Биохимическое исследование																
АЛТ, АСТ	Т. 26	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 23, 26		Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 26	Т. 26	Т. 26		Т. 35	Т. 35	Т. 35	Т. 35
ЛДГ	Т. 26, 27, 28	Т. 23, 24, 26, 27, 28	Т. 23, 26	Т. 23, 24, 27, 28	Т. 24, 27, 28	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 26, 27, 28	Т. 26	Т. 26, 27, 28	Т. 27, 28				
КФК	Т. 26, 29, 30	Т. 23, 25, 27, 29, 30	Т. 23, 26	Т. 23, 25, 26, 29, 30	Т. 25, 29, 30	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 23, 26	Т. 26, 29, 30	Т. 26	Т. 26, 29, 30	Т. 29, 30				
Глюкоза, Кортикостерон													Т. 35	Т. 35	Т. 35	Т. 35
Иммуноферментный анализ																
IL-1, IL-6, IL-10, TNF	Т. 31	Т. 31				Т. 31			Т. 31		Т. 31					
Иммуногистохимическое исследование																
CD 95, P 53		Т. 32		Т. 32	Т. 32				Т. 32		Т. 32	Т. 32				
Морфометрическое исследование														Т. 34;	Т. 34;	Т.34;

2.4.2 – Общая характеристика лабораторных животных

В качестве экспериментальных животных использовали самцов белых беспородных крыс массой 200–250 г одного возраста. Животные содержались в условиях обычного лабораторного вивария с естественной сменой дня и ночи в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты проведены с учётом правил лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации, разработанных в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» N 86-ФЗ от 22.06.1998.

Животные имели свободный доступ к пище и воде. Чистка клеток проводилась ежедневно, один раз в неделю – дезинфекция. Температура в виварии поддерживалась в пределах 18–22°C. В клетках содержалось по 7 голов. В качестве подстилки использовался гранулированный древесный наполнитель. В опыты брали только здоровых животных, прошедших не менее чем двухнедельную акклиматизацию к лабораторным условиям. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (2000 г.).

План эксперимента был одобрен Этическим Комитетом ФГБУН ИИФ УрО РАН протокол № 157-МІ от 1 мая 2008 г.

За 15-20 минут до дачи общей анестезии выполняли премедикацию фармакологическими препаратами по общепринятой методике. Непосредственно перед введением общих анестетиков катетеризировали латеральную подкожную вену голени катетером фирмы HELMFLOT диаметром 12 G. По катетеру вводили внутривенно антигистаминные препараты (димедрол 1% в дозе 10 мг/кг), а также холинолитики (атропина сульфат 0.1% в дозе 0.05 мг/кг), разведенные 1:5 физиологическим раствором натрия хлорида 0.9%.

Для вводного наркоза животные получали препараты диазепам (0.5 мг/кг/МТ), ксилазин (2.5 мг/кг/МТ) и кетамин (5 мг/кг/МТ). Базисная анестезия

заклучалась во введении ксилазина (2.5 мг/кг/МТ/час) и кетамина (5 мг/кг/МТ/час).

Выведение животных из эксперимента осуществлялось под эфирным наркозом

2.4.3 – Используемые экспериментальные модели

В работе использовалась модель инфаркта миокарда и нервно-мышечного напряжения (иммобилизационный стресс). В целях оценки влияния объема оперативного вмешательства (при экспериментальном ИМ) была выделена группа ложнооперированных животных, которым производились те же хирургические манипуляции, за исключением этапа легирования сосуда.

Острый экспериментальный инфаркт миокарда. Создание экспериментальных моделей ИМ на лабораторных животных является одним из распространенных методов изучения патофизиологических механизмов развития этого заболевания, а также процессов, принимающих участия в регенерации сердечной мышцы.

Существует множество моделей острого ИМ в эксперименте. Однако экспериментальные модели не могут дать полной картины ИМ, так как в результате экспериментального воздействия у животных ИМ возникает на фоне полного здоровья и активности компенсаторно-приспособительных реакций. Несмотря на отсутствие «предынфарктного компонента» патогенеза ИМ при его экспериментальном моделировании, все же представляется возможным решить некоторые важные задачи этого тяжелого заболевания. В последнее время, исходя из технических и экономических соображений, значительная часть экспериментальных работ выполняется на мелких лабораторных животных, таких как мыши и крысы, и данные модели получают все большее распространение при изучении механизмов ишемического повреждения миокарда.

Однако описанная в литературе легирование передней нисходящей ветви коронарной артерии, предложенное еще в конце прошлого века (J. Porter, 1896) является до сих пор основным способом моделирования ИМ, хотя и много раз модифицированным. Принципиальное значение в данных методиках имеет определение оптимального уровня наложения лигатуры на сосуд, при этом, наименее угрожающим для возникновения фибрилляций считается легирование левой нисходящей артерии сразу после отхождения поперечной ветви [34].

Более сложными вариантами создания экспериментального ИМ можно считать двухэтапные модели [34]. В данных моделях экспериментального ИМ первый этап – подготовительный – заключается в подведении лигатуры под соответствующий сегмент коронарной артерии. Второй этап – основной – осуществляется через несколько дней в условиях закрытой грудной клетки и заключается в затягивании наложенной лигатуры. При этом уровень и степень пережатия и некоторые другие условия могут варьироваться в зависимости от задачи исследования. Недостатком данных моделей является значительная трудоемкость их выполнения и сложность применяемой хирургической техники, вследствие чего они не всегда могут применяться в лабораторных исследованиях со сравнительно большими группами мелких лабораторных животных (мышей, крыс). Особое место занимают метаболические методы воспроизведения ИМ. К ним относятся воздействия, требующие и не требующие торакотомии (Г. Селье, 1970; К. Вгунел, 1972, и др.). Сюда входят стероидно-электролитные повреждения, введение в миокард «повреждающих» растворов и т.д. [34]. Данная группа экспериментальных техник также отличается сравнительной трудоемкостью и требует подготовленного персонала. При этом, если в отношении физических методов блокады кровоснабжения миокарда можно высказать хотя бы предположительное суждение о вероятности их влияния на лимфатическое и нейрогуморальные звенья воспроизводимого состояния, то в отношении метаболических методов для такого суждения практически нет предпосылок, и их влияние в каждом конкретном варианте может оказаться специфическим [34].

При проведении же экспериментальных исследований на достаточно больших группах мелких лабораторных животных исследователи вынуждены применять в основном одноэтапные схемы создания ИМ, в основе которых лежит легирование сосуда. Наиболее удобным для экспериментатора вариантом, при этом, дающим хорошую повторяемость результатов можно считать термокоагуляцию сосудов. Данный способ обеспечивает повышение вероятности получения положительного результата при минимизации времени операции и увеличении времени самого эксперимента. При этом, данный способ не нарушает ритм работы сердца и не вызывает аритмии от воздействия электрического тока, как при электрокоагуляции. В то же время, в отличие от хирургической перевязки или пережатия артерии, данный способ отличается лучшей степенью повторяемости результатов.

Следует отметить, что у каждой модели имеются определенные недостатки: в одних случаях высокая травматичность животного, в других - высокая техническая оснащенность эксперимента и экономические затраты на его проведение. В связи с этим нами предпринята попытка создания экспериментального инфаркта миокарда в остром эксперименте на крысах с попыткой устранения всех недостатков, представленных выше. Предложенный нами метод моделирования ИМ имеет свои преимущества - это простота выполнения острого эксперимента; хорошая воспроизводимость, минимальная техническая оснащенность эксперимента.

Описание используемой модели инфаркта миокарда. Моделирование острого ИМ осуществлялось на крысах (патент на изобретение № 2407062 от 20 декабря 2010 г. «Способ моделирования инфаркта миокарда у крыс»).

В основе методики лежит способ моделирования ИМ у крыс на основе оперативного вмешательства, отличающийся тем, что последовательно производятся следующие действия: на левой половине грудной клетки рассекают кожу и обнажают мышцы; разводят грудные мышцы с обнажением реберных дуг и межреберных мышц; производят рассечение межреберных мышц в 4-5 межреберье на протяжении 1 см; визуализируют сердце; выполняют коагуляцию

на стандартной ограниченной площади веточек левой венечной артерии в ее средней или нижней трети. Коагуляцию выполняют специальным инструментом «Г»-образной формы с прижигающей поверхностью размерами 2,5х3,0 мм, позволяющим четко визуализировать сердце в момент коагуляции, инструмент разогревают на спиртовой горелке; торакотомную рану ушивают непрерывным швом атравматичной иглой; шприцом с иглой ликвидируют пневмоторакс; зашивают кожу. Данный способ обеспечивает повышение вероятности получения положительного результата при минимизации времени операции и увеличении времени самого эксперимента. При этом, данный способ не нарушает ритм работы сердца и не вызывает аритмий от воздействия электрического тока.

После моделирования инфаркта в течение 10 минут животные полностью выходили на уровень предоперационного состояния по поведенческим реакциям. Летальность не регистрировалась. При оценке поведения животных через 24 часа никаких особенностей поведенческих реакций не выявлялось: животные были активны, без задержки реагировали на светозвуковое раздражение. Симптомов дыхательной недостаточности, нарушения питания и потребления жидкости также отмечено не было. Исходя из результатов исследования, у животных с экспериментально сформированным ИМ размер анатомической зоны повреждения достоверно не различался, что указывает на стандартный уровень воздействия на коронарную артерию и одинаковый объем ишемизированного миокарда; при этом, гистоморфологическая картина подтвердила стандартное образование трансмурального инфаркта миокарда.

Конечные точки эксперимента. Согласно современным представлениям, процессы заживления при ИМ можно разделить на три фазы: фазу воспаления, пролиферации и фазу организации. При этом, длительность данных фаз у крупных млекопитающих (и человека) достаточно сильно отличается от грызунов [36, 68, 283]. Так, фаза воспаления у грызунов заканчивается на вторые сутки, в то время как у крупных млекопитающих – на четвертые, пролиферативная фаза у грызунов достигает пика на пятые сутки, в то время как

у крупных млекопитающих продолжается до 14 дней [36, 68, 283]. В соответствии с данным подходом и были выбраны основные точки выведения животных из эксперимента – на первые, пятые и седьмые сутки.

Метод верификации экспериментального инфаркта миокарда (биохимический). Известно, что сравнение ЭКГ с биохимической диагностикой при использовании в качестве «золотого стандарта» диагноз *post mortem* показало, что чувствительность и специфичность биохимических тестов в эксперименте на животных надежнее и показательнее, чем ЭКГ [261], вследствие чего биохимическая диагностика остается частью критериев ВОЗ для постановки диагноза ИМ [385]. Исходя из этого, для выявления экспериментального ИМ в работе применялись биохимическое и морфологическое исследование.

Описание оперативного вмешательства у ложнооперированных животных. У ложнооперированных животных полностью повторяли оперативное вмешательство, исключая этап термокоагуляции сосуда. Последовательно осуществляли следующие действия: на левой половине грудной клетки рассекали кожу и обнажали мышцы; разводили грудные мышцы с обнажением реберных дуг и межреберных мышц; производили рассечение межреберных мышц в 4-5 межреберье на протяжении 1 см; визуализировали сердце. После этого, торакотомную рану ушивали непрерывным швом атравматичной иглой; шприцом с иглой ликвидировали пневмоторакс и зашивали кожу.

Экспериментальная модель иммобилизационного стресса. При том, что в опытах на животных для вызова стресса используются такие воздействия как охлаждение, гипоксия, электрический ток, хирургическая травма, эмоциональные раздражения типа зритель-жертва или изъятие партнера из группы крыс, находящихся в одной клетке, иммобилизация различной продолжительности остается одним из основных методов вызова стресс-реакции [247]. В экспериментах применялась описанная R. Kvetnansky модель иммобилизационного стресса, при которой животных фиксировали на операционном столике на спине 6 часов в день [57, 247]. К основным

преимуществам данной методики относится ее низкая стоимость, повторяемость результатов, и высокая стрессорность самого фактора иммобилизации, вследствие чего иммобилизационный стресс вызывает комплексный системный ответ организма [247]. Исследование параметров морфофункционального состояния исследуемых органов, биохимический и иммуноферментный анализы осуществляли на первые и вторые сутки [247]. Выбор сроков исследования обусловлен длительностью фазы тревоги [334], а также временем острой и отдаленной реакции клеток крови на стресс [68, 70].

Поскольку для исследования адаптивных процессов животные в контрольной группе не должны были испытывать стрессорных воздействий, в качестве группы сравнения использовались интактные крысы.

Исследуемые органы-мишени при иммобилизационном стрессе и инфаркте миокарда. Для оценки влияния исследуемых соединений использовались модели экспериментального инфаркта миокарда и нервно-мышечного напряжения (иммобилизационный стресс). В экспериментах с моделью инфаркта миокарда исследованию подвергался миокард правого и левого предсердий и желудочков сердца экспериментальных животных. При выборе органов для исследования на модели иммобилизационного стресса руководствовались тем, что при стрессе наибольшие изменения отмечаются в тимусе (инволюция тимиколимфатического аппарата), надпочечниках (гипертрофия коры надпочечников), а также в желудочно-кишечном тракте (глубокие язвы желудка и двенадцатиперстной кишки).

2.4.4 – Лабораторные методы исследования

Гематологические методы исследования. Исследование гематологических показателей периферической крови. Для подтверждения развития иммобилизационного стресса образцы периферической крови экспериментальных крыс и животных группы сравнения исследовали при помощи 18-ти параметрового гематологического анализатора Celly 70 (Biocode-

Нусел, Франция). Забор крови осуществляли в специально предназначенные пластиковые пробирки, содержащие КЗ-ЭДТА в качестве антикоагулянта. Проводился автоматический подсчет следующих показателей крови: WBC – абсолютное количество лейкоцитов (103/мкл); Lym# – абсолютное количество лимфоцитов (103/мкл); Mid# – абсолютное количество средних клеток (103/мкл); Grn# – абсолютное количество гранулоцитов (103/мкл); Lym% – относительное содержание лимфоцитов (%); Mid% – относительное содержание средних клеток (%); Grn% – относительное содержание гранулоцитов (%); RBC – абсолютное количество эритроцитов (106/мкл); Hb – содержание гемоглобина (г/дл); Hct – гематокрит (%); MCV – средний объем эритроцитов (фл); MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг); MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл); RDW – распределение эритроцитов по размеру (%); Plt# – содержание тромбоцитов (103/мкл); Pct – тромбоцитрит (%); MPV – средний объем тромбоцитов (фл); PDW – распределение тромбоцитов по размеру (%).

Исследование клеток костного мозга. В рамках работы определялось общее количество миелокариоцитов во всем костном мозге бедренной кости крысы. Весь костный мозг бедренной кости с помощью резинового баллона выдували на часовое стекло. Затем его разводили 3% уксусной кислотой, доводя до объема 2 мл, после чего готовили суспензию клеток, пропуская через иглы уменьшающегося диаметра. Полученную взвесь доводили до объема 5 мл 3% уксусной кислотой. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

Для приготовления мазков костного мозга содержимое бедренной кости в смеси с физиологическим раствором наносили на предметное стекло и с помощью шлифованного стекла делали мазок. Окраску проводили по Нохту после предварительной фиксации метиловым спиртом. Подсчет миелограммы осуществляли на 400 клеток. При этом использовали номенклатуру клеток, соответствующую современной схеме кроветворения.

Гистологические и иммуногистохимические методы исследования.
Оценка показателей морфофункционального состояния сердца
проводилась с использованием разнообразных гистологических методов. Фиксацию материала осуществляли в 10% забуференном формалине. Фиксатор из тканей в дальнейшем удаляли путем отмывания в холодной проточной водопроводной воде.

Гистологическую проводку материала осуществляли при помощи автоматического тканевого процессора Leica TP1020. При этом материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, подвергали действию хлороформа с последующей пропиткой парафином. Заливку образцов органов в парафин проводили при помощи станции заливки Leica EG1160. Изготовление гистологических срезов толщиной 3 – 5 мкм осуществлялось на санном микротоме Leica SM2000R.

Гистологические и гистохимические методы окрашивания. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике с использованием станции автоматического окрашивания гистологических препаратов Leica ST5010. Данный метод окраски был использован для проведения морфоописания препаратов. Качественная оценка площади соединительнотканых структур в миокарде проводилась на препаратах, окрашенных резорцин-фуксином по Вейгерту-Ван-Гизону. Данный способ окрашивания позволяет специфически визуализировать коллагеновые и эластические волокна в ткани.

Иммуногистохимическое исследование тканей. С целью оценки интенсивности процессов апоптоза проводили иммуногистохимическое определение экспрессии белков CD95 и P53.

CD95 (CD-claster differentiation), также называемый Fas/APO-1, является 45 кДа трансмембранным белком I типа, относящимися к суперсемейству TNFR, и способным запускать в клетках процессы апоптоз после взаимодействия с его лигандом (FasL) или с агонистическими моноклональными антителами (МА) к

Fas. Fas/APO-1/CD95 относится к семейству рецепторов TNF. При этом, апоптоз, инициируемый через этот белок, называют Fas-зависимым.

P53 представляет из себя опухолевый ген-супрессор wt53, белковый продукт которого является ядерным транскрипционным фактором со многими функциями, включая блокирование прохождения клеток по клеточному циклу и индукцию апоптоза [109]. Белок p53 экспрессируется во всех клетках организма и блокирует клеточный цикл в G1-S фазе, тем самым, ингибируя дальнейшую репликацию поврежденной ДНК, которая синтезируется именно в S фазе, и создает условия для удаления поврежденного места и репарации её измененного участка. Если репарация наступает, то клетка продолжает делиться и давать генерацию здоровых клеток. Однако если репарация не наступает, то запускаются процессы апоптоза [109].

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5 – 6 мкм непрямым методом Кунса по методике Brosman. Количество клеток, экспрессирующих CD95, и P53 оценивали методом иммуногистохимии с помощью моноклональных антител CD95 Purified Mouse Anti-CD95 (6101197) фирмы «BD Transduction Laboratories» (Franklin Lakes, NJ, USA) в соответствии с рекомендациями производителя P53 Mouse Monoclonal Antibody (clone 998A2A2) фирмы Molecular Probes® (Eugene, OR, USA) в соответствии с общепринятой методикой [69].

Морфометрические методы и анализ гистологических материалов. Морфометрические исследования осуществлялись с использованием программы анализа изображений Видеотест Морфология 5.2.

Анализ гистологических препаратов. Анализ всех микропрепаратов проводили на микроскопе LeicaDM2500, соединенном с видеокамерой LeicaDFC420 и персональным компьютером. Подсчет количества клеток, измерение диаметра сосудов, осуществляли при помощи программы анализа изображений ВидеоТест Морфология 5.2. Содержание клеточных элементов определяли при увеличении объектива микроскопа в 100 раз в 20 полях зрения с последующим пересчетом на 1 мм². При определении диаметра сосудов

микроциркуляторного русла проводили анализ не менее 20 объектов на каждом препарате. На основании полученных данных производили вычисление среднеарифметических значений, которые подвергались дальнейшему статистическому анализу.

Биохимические методы исследования. Определение биохимических маркеров некроза миокарда: а) ранних (креатинкиназа) б) поздних (лактатдегидрогеназа, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза).

Идеальный биохимический маркер должен обладать наивысшей специфичностью и чувствительностью в отношении некроза миокарда, в течение короткого времени после начала симптомов ИМ достигать в крови диагностически значимого уровня, этот уровень должен сохраняться в течение многих дней. Так как маркера, полностью отвечающего всем этим требованиям, не существует [276], поэтому для диагностики ИМ рекомендуется параллельно использовать два маркера – «ранний» и «поздний». Содержание «раннего» маркера при ИМ диагностически значимо повышается в крови в первые часы заболевания, «поздний» – достигает диагностически значимого уровня только через 6–9 ч, но обладает высокой специфичностью в отношении некроза миокарда [276].

В качестве ранних маркеров некроза миокарда было выбрано определение креатинкиназы (К.Ф.2.7.3.2). В качестве поздних маркеров определяли лактатдегидрогеназу, аспартатаминотрансферазу или АСТ (К.Ф.2.6.1.1) и аланинаминотрансферазу или АЛТ (К.Ф.2.6.1.2).

Креатинкиназа (креатин-N-фосфотрансфераза) – фермент, катализирующий обратимую реакцию переноса фосфатного остатка с АТФ на креатин с образованием АДФ и креатинфосфата:



Креатинкиназа участвует в энергообеспечении клеточного метаболизма, осуществляя депонирование химической энергии в виде креатинфосфата или ресинтез АТФ для поддержания высокого отношения АТФ/АДФ. Скелетные мышцы содержат мышечную форму КФК (ММ-КФК) и менее 3% сердечной

формы (МВ-КФК). МД-КФК при ИМ появляется в сыворотке крови через 3 – 4 ч после начала симптомов и достигает диагностически значимого уровня к 4 – 6-му часу. Повышенный ее уровень сохраняется 48–72 ч. Доля МВ-КФК среди общей КФК, превышающая 5–6%, является специфичным признаком некроза миокарда [151, 389].

Определение МВ-КФК в сыворотке и плазме крови экспериментальных животных осуществляли оптимизированным кинетическим методом при помощи набора реагентов СК-НАС-03/13 фирмы «Витал Диагностика СПб». По данному методу в состав инкубационной смеси вводится глюкоза, гексокиназа, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа и НАДФ. Полученная на 1-м этапе АТФ фосфорилирует глюкозу. Образующийся на 2-м этапе глюкозо-6-фосфат восстанавливает НАДФ до НАДФН-Н⁺.

Лактатдегидрогеназа или ЛДГ (К.Ф.1.1.1.27) – фермент гликолиза, катализирующий обратимую реакцию превращения лактата в пируват. ЛДГ имеет пять изоэнзимов. В сердечной мышце содержится преимущественно изоэнзим ЛДГ-1. При ИМ концентрация ЛДГ начинает превышать нормальный уровень через 14 – 48 ч после начала симптомов, достигает максимального значения на 3 – 6-е сутки заболевания и возвращается к норме на 7 – 14-е сутки болезни [380]. Отношение ЛДГ-1/ЛДГ-2, превышающее 0,76, обладает 90% специфичностью при выявлении некроза миокарда.

Определение активности ЛДГ осуществляли с помощью диагностического набора ЛДГ-ВИТАЛ В 23.01 фирмы «Витал Диагностика СПб» для определения активности лактатдегидрогеназы в сыворотке (плазме) крови оптимизированным кинетическим методом. Метод основан на спектрофотометрическом определении количества израсходованного в ходе ферментативной реакции НАДН, учитываемого по изменению поглощения при 340 нм, соответствующего характерному пику поглощения восстановленного кофермента.

Аспаратаминотрансфераза или АСТ (L-аспартат: 2-оксоглутарат аминотрансфераза; К.Ф.2.6.1.1) катализирует обратимый перенос аминогрупп с L-аспарагиновой аминокислоты на α -кетоглутаровую кислоту.

Аланинаминотрансфераза или АЛТ (L-аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза; К.Ф.2.6.1.2) катализирует обратимый перенос аминогрупп с аминокислоты L-аланина на α -кетоглутаровую кислоту.

Активность АСТ и АЛТ растет при увеличении проницаемости мембран различных клеток или при разрушении клеток. Эти показатели не являются строго специфичными для какого-либо определенного органа, так как содержатся в различных клетках. Определяют соотношение АСТ к АЛТ (коэффициент Де Ритиса): увеличение коэффициента указывает на преимущественное повреждение миокарда, уменьшение - на повреждение печени.

Активность аминотрансфераз определяли с помощью набора для определения активностей аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы унифицированным методом Райтмана-Френкеля АЛТ 01/11 и АСТ 01/11 фирмы «Витал Диагностика СПб».

Принцип метода определения АЛТ. В результате переаминирования, происходящего под действием АЛТ, образуются пируват и глутамат. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина реакция останавливается, и в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты. Интенсивность окраски пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты и является показателем активности АЛТ.

Активность аланинаминотрансферазы:

а) L-аланин + α -кетоглутарат $\xleftarrow{\text{АлАТ}}$ пировиноградная кислота + L-глутамат

б) фотометрическое определение содержания пирувата в пробе на основе реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Принцип метода определения АСТ. В результате переаминирования, происходящего под действием АСТ, образуются оксалоацетат и глутамат. Оксалоацетат легко превращается при декарбоксилировании в пируват. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина реакция останавливается, и в щелочной среде образуется динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты,

окрашенный в красно-бурый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству образовавшегося пирувата и является показателем активности АСТ.

Активность аспаратаминотрансферазы:

а) L-аспартат + α -кетоглутарат $\xleftarrow{\text{АсАТ}}$ оксалоацетат + L-глутамат

б) фотометрическое определение содержания оксалоацетата в пробе на основе реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Определение уровня глюкозы. Глюкоза является неспецифическим показателем любой стрессовой ситуации. Глюкозооксидаза – растительный фермент, используется в качестве химического реактива для определения глюкозы и катализирует следующую реакцию:



Пероксидаза



Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли спектрофотометрически при длине волны 510 нм глюкозооксидазным методом. В ходе определения использовались стандартные наборы реактивов НОВОГЛЮК-К, М производства ЗАО «Вектор-Бест», результаты выражали в ммоль/л.

Метод заключается в том, что глюкоза окисляется кислородом при каталитическом действии фермента глюкозооксидазы с образованием пероксида водорода и глюконата. Пероксид водорода определяют спектрофотометрически по реакции окислительного азосочетания производного фенола с 4-аминофеназоном, катализируемым пероксидазой. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-56.

Определение уровня инсулина. Инсулин – гормон, вырабатываемый β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы и участвующий в регуляции метаболизма углеводов и поддержании постоянного уровня глюкозы в крови.

Уровень инсулина определяли с использованием стандартных коммерческих наборов RSHAKRIN010TR Insulin (TMB) Rat ELISA фирмы BioVendor (Чехия) методом иммуноферментного анализа.

Метод заключается в том, что исследуемые образцы культивируют в ячеистых микроплашетах, покрытых моноклональными антителами к инсулину. После двухчасовой инкубации и промывки, добавляется конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP, horse radish peroxidase) стрептавидин, и инкубируется в течении 30 минут. После последующей промывки, конъюгированный стрептавидин, остающийся в ячейках, подвергают взаимодействию с TMB в течении 30 минут; реакцию останавливают добавлением кислого раствора. Результаты абсорбции оценивают спектрофотометрически при длине волны 450 нм, при этом, оптическая плотность пропорциональна концентрации инсулина.

Уровень инсулина выражали – в мкЕд/мл.

Определение уровня кортикостерона. Уровень кортикостерона определяли с использованием стандартных коммерческих наборов производства IDS Corticosterone EIA AC-14F1 фирмы Immunodiagnostic System (IDS, Великобритания) методом иммуноферментного анализа.

Метод заключается в том, что исследуемые образцы культивируют в ячеистых микроплашетах, покрытых поликлональными антителами к кортикостерону. После инкубации и промывок, результаты абсорбции оценивают спектрофотометрически при длине волны 450 нм, при этом, оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации кортикостерона.

Уровень кортикостерона выражали в мкг%,

Определение концентрации цитокинов. Определение концентрации цитокинов: IL 1- β , TNF- α , IL-6, IL-10 в сыворотке крови определяли с помощью автоматического иммуноферментного анализатора LAZURRITE AUTOMATED ELISA SYSTEM с использованием наборов фирмы Thermo Scientific (USA). Результаты выражали в пг/мл.

Статистические методы, используемые для обработки экспериментального материала. Анализ данных выполнен в пакете

статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). Данные представлены в виде среднего арифметического (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего (m). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). При проверке статистических гипотез использовали 5% уровень значимости.

ГЛАВА 3 – МУЛЬТИТАРГЕТНОСТЬ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ L-17 ПО ДАННЫМ СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА IN SILICO

Основной целью данной части работы являлся системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида (соединения L-17).

Для достижения поставленной цели, в соответствии с дизайном исследования, были последовательно выполнены 12 основных этапов и получены следующие результаты.

3.1 – Определение *insilico* для соединения-лидера (соединения L-17) наиболее перспективных таргетных видов активности

В *таблице 2* приведены наиболее перспективные по прогнозу в PASS системные виды фармакологической активности соединения L-17, соответствующие условиям $P_a \geq 0.1$ и $P_a/P_i \geq 1.0$. По результатам прогноза в PASS, с учетом результатов экспериментального изучения фармакологических эффектов 2соединения L-17, в качестве целевых для дальнейшего анализа в программе PharmaExpert таргетных механизмов действия, были определены следующие виды активности: Anestheticgeneral, Anesthetic, Cognitiondisorderstreatment, Antiinflammatory, Phobicdisorderstreatment, Psychotropic, Immunostimulant, Antinociceptive, Cardiovascularanaleptic, Antidepressant.

По совокупности экспериментальных тестов взаимодействия, соединение L-17 проявляет себя как атипичный мягкий нейрорептик, антидепрессант и адреноблокатор, имеющий, вероятно, следующие фармакологические механизмы действия: серотонинергическое, холинергическое (блокирующее), адренергическое (блокада α_1 -адренорецепторов), дофаминергическое, ГАМК-ергическое, глутаматергическое. Отдельный анализ прогноза в PASS показал,

что соединение L-17 практически не влияет на глутаматергическую систему (в отношении глутаматных, AMPA, NMDA и каинатных рецепторов), но может иметь достаточно выраженное серотонинергическое и ГАМК-ергическое действие.

В *таблице 3* приведены наиболее вероятные, по совместным прогнозным оценкам в PASS и PharmaExpert и с учетом экспериментальных данных, таргетные виды активности, соответствующие системным фармакологическим эффектам соединения L-17 и имеющие расчетные значения $P_a/P_i \geq 1.0$. В итоге были определены следующие 15 белков-мишеней (табл. 4) для последующего анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17: серотониновый рецептор типа 3A5-HT3A, серотониновый транспортер SERT, мускариновый холинорецептор типа 1 CHRM1, дофаминовый рецептор типа 1 DRD1, дофаминовый рецептор типа 2 DRD2, дофаминовый транспортер DAT, α_1 -адренорецептор ADRA1A, норадреналиновый транспортер NET, α_1 -субъединица ГАМК-A рецептора GABRA1, β_2 -субъединица ГАМК-A рецептора GABRB2, γ_2 -субъединица ГАМК-A рецептора GABRG2, ГАМК-транспортер типа 1 GAT1, янус-тирозин киназа типа 3 JAK3, кальпаин 1 CAPN1, комплементарный фактор D (адипсин) CFD.

В *таблице 4* отражено, что ГАМК-сайт ГАМК-A рецептора образован α_1 -субъединицей GABRA1 и β_2 -субъединицей GABRB2, а бензодиазепиновый сайт ГАМК-A рецептора образован α_1 -субъединицей GABRA1 и γ_2 -субъединицей GABRG2. Данный факт учитывался при проведении докинга.

Таблица 2 – Системные виды фармакологической активности соединения L-17, перспективные по результатам прогноза в программе PASS

PASS Activity	P _a	P _i	P _a /P _i	PASS Activity	P _a	P _i	P _a /P _i
Anesthetic general	0.913	0.003	304.33	Antituberculosic	0.237	0.124	1.91
Anesthetic	0.464	0.013	35.69	Cell wall synthesis inhibitor	0.101	0.057	1.77
Cognition disorders treatment	0.489	0.018	27.17	Psychotropic	0.258	0.148	1.74
Antineoplastic (bone cancer)	0.280	0.011	25.45	Vasoprotector	0.290	0.172	1.69
Antiinflammatory	0.625	0.027	23.15	Alopecia treatment	0.306	0.193	1.59
Potassium sparing diuretic	0.509	0.045	11.31	Antiviral (Arbovirus)	0.339	0.218	1.56
Antihematotoxic	0.245	0.023	10.65	Antinephrotoxic	0.326	0.217	1.50
Ophthalmic drug	0.346	0.034	10.18	Antiviral (Influenza)	0.231	0.154	1.50
Neurodegenerativediseases treatment	0.455	0.045	10.11	Antianemic	0.128	0.086	1.49
Necroptosis inhibitor	0.120	0.012	10.00	Antihelmintic (Fasciola)	0.154	0.105	1.47
Antihelmintic (Nematodes)	0.404	0.041	9.85	Antiviral (RSV)	0.247	0.172	1.44
Phobic disorders treatment	0.703	0.075	9.37	Dementia treatment	0.268	0.191	1.40
Cardiotonic	0.379	0.044	8.61	Immunostimulant	0.191	0.137	1.39
Antineurotoxic	0.610	0.072	8.47	Antiarthritic	0.243	0.175	1.39
Antihelmintic	0.301	0.037	8.14	Antiprotozoal (Leishmania)	0.226	0.166	1.36
Antiglaucomic	0.210	0.038	5.53	Vascular dementia treatment	0.195	0.144	1.35
Antiparasitic	0.283	0.062	4.56	Antinociceptive	0.271	0.206	1.32
Antibacterial	0.286	0.065	4.40	Restless leg syndrome treatment	0.133	0.103	1.29
Skeletal muscle relaxant	0.275	0.078	3.53	Kidney function stimulant	0.307	0.244	1.26
Antifungal	0.285	0.088	3.24	Fibromyalgia syndrome treatment	0.157	0.125	1.26
Muscle relaxant	0.251	0.080	3.14	Anti-Helicobacter pylori	0.188	0.151	1.25
Antiprotozoal (Babesia)	0.150	0.050	3.00	Cardiovascular analeptic	0.170	0.141	1.21
Antimycobacterial	0.280	0.094	2.98	Antidiabetic (type 1)	0.126	0.105	1.20
Gastric antisecretory	0.207	0.070	2.96	Mood disorders treatment	0.167	0.142	1.18
Leukopoiesis inhibitor	0.297	0.108	2.75	Antidepressant	0.162	0.142	1.14
Metabolic disease treatment	0.209	0.077	2.71	Diabetic nephropathy treatment	0.172	0.151	1.14
Antiprotozoal (Trichomonas)	0.229	0.086	2.66	Eye irritation, inactive	0.169	0.149	1.13
Anticonvulsant	0.306	0.117	2.62	Antianorexic	0.145	0.132	1.10
Obsessive-compulsive disorder treatment	0.141	0.055	2.56	Antidepressant, Imipramin-like	0.122	0.112	1.09
Hematopoietic inhibitor	0.250	0.099	2.53	Antiviral (CMV)	0.199	0.185	1.08
Antineurotic	0.400	0.163	2.45	Loop diuretic	0.219	0.204	1.07
Leukopoiesis stimulant	0.323	0.153	2.11	Antiepileptic	0.151	0.143	1.06
Antiviral (Picornavirus)	0.342	0.168	2.04	Alzheimer's disease treatment	0.183	0.179	1.02
Immunomodulator	0.236	0.116	2.03	Antineoplastic enhancer	0.162	0.160	1.01
Antiprotozoal	0.203	0.102	1.99				

Таблица 3 – Таргетные виды фармакологической активности соединения L-17, перспективные по результатам прогноза в программах PASS и PharmaExpert

Effects	Activity 1	Activity 24	Activity 3	P _a	P _i	P _a /P _i
Anesthetic				0.464	0.013	35.69
	Anesthetic general			0.913	0.003	304.33
Cognition disorders treatment				0.489	0.018	27.17
	Alzheimer's disease treatment			0.183	0.179	1.02
		Calpain inhibitor		0.375	0.019	19.74
	GABA receptor agonist			0.257	0.041	6.27
	Acetylcholine agonist			0.154	0.022	7.00
	Cholinergic			0.153	0.047	3.26
Antiinflammatory				0.625	0.027	23.15
	Complement factor D inhibitor			0.430	0.106	4.06
	Janus tyrosine kinase inhibitor			0.193	0.030	6.43
Psychotropic				0.258	0.148	1.74
		GABA receptor agonist		0.257	0.041	6.27
		Phobic disorders treatment		0.703	0.075	9.37
		Benzodiazepine omega receptor agonist		0.385	0.133	2.89
		Benzodiazepine agonist		0.141	0.025	5.64
		Calpain inhibitor		0.375	0.019	19.74
		Immunostimulant		0.191	0.137	1.39
		Acetylcholine agonist		0.154	0.022	7.00
	Antiepileptic			0.151	0.143	1.06
		Neurotransmitter uptake inhibitor		0.470	.074	6.35
		GABA receptor agonist		0.257	.041	6.27
		Acetylcholine agonist		0.154	..022	7.00
		Benzodiazepine agonist		0.141	..025	5.64
		Glutamate release inhibitor		0.113	.074	1.53
		Antidepressant		0.162	.142	1.14
			GABA receptor agonist	0.257	0.041	6.27
			Benzodiazepine agonist	0.141	0.025	5.64
Antinociceptive				0.271	0.206	1.32
	Cardiovascular analeptic			0.170	0.141	1.21
		5 Hydroxytryptamine 3E antagonist		0.139	0.119	1.17
		5 Hydroxytryptamine release inhibitor		0.225	0.224	1.00
		GABA B receptor agonist		0.163	0.112	1.46
		GABA receptor agonist		0.257	0.041	6.27

Таблица 4 – Биомишени, релевантные экспериментальному и прогнозируемому спектру фармакологической активности соединения L-17

Обозначение	Ген	Международное название	Код UniProt
5-HT3A	HTR3A	5 Hydroxytryptamine receptor 3A subunit A	[P46098, 2016]
SERT	SLC6A4	Sodium-dependent serotonin transporter	[P31645, 2016]
CHRM1	CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1	[P11229, 2016]
DRD1	DRD1	D(1A) dopamine receptor	[P21728, 2016]
DRD2	DRD2	D(2) dopamine receptor	[P14416, 2016]
DAT	SLC6A3	Sodium-dependent dopamine transporter	[Q01959, 2016]
ADRA1A	ADRA1A	Alpha-1A adrenergic receptor	[P35348, 2016]
NET	SLC6A2	Sodium-dependent noradrenaline transporter	[P23975, 2016]
GABRA1	GABRA1	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	[P14867, 2016]
GABRB2	GABRB2	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2	[P47870, 2016]
GABRG2	GABRG2	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2	[P18507, 2016]
GABA-A_GABA	GABRA1GABRB2	GABA-A receptor, GABA site	[P14867, 2016], [P47870, 2016]
GABA-A_Benz	GABRA1GABRG2	GABA-A receptor, Bezodiazepine site	[P14867, 2016], [P18507, 2016]
GAT1	SLC6A1	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1	[P30531, 2016]
JAK3	JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3	[P52333, 2016]
CAPN1	CAPN1	Calpain-1 catalytic subunit	[P07384, 2016]
CFD	CFD	Complement factor D	[P00746, 2016]

3.2 – Поиск валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней и выявление их специфических сайтов связывания

Для каждого белка-мишени, релевантного спектру фармакологической активности соединения L-17, по результатам анализа информации из базы знаний UniProtKB, была выбрана наилучшая экспериментальная или теоретическая (при отсутствии экспериментальной) 3D-модель белка человека. Критерии отбора моделей приведены в главе «Материалы и методы».

Для биомишеней SERT, CHRM1, JAK3, CAPN1 и CFD в банке данных PDBe были найдены экспериментальные рентгеноструктурные модели, характеристики лучших из них приведены в *таблице 5*. Для биомишеней 5-HT3A, DRD1, DRD2, DAT, ADRA1A, NET, GABRA1, GABRB2, GABRG2 и GAT1 экспериментальных моделей найти не удалось, для них в базе данных ModBase были отобраны лучшие теоретические модели, характеристики которых приведены в *таблице 6*. Все 15 отобранных 3D-модели биомишеней представлены на *рисунке 16*.

По результатам анализа литературы во всех релевантных белках-мишенях были определены ключевые связывающие аминокислоты сайтов, перечень которых приведен в *таблице 7*.

Полностью информация о выбранных 3D-моделях релевантных биомишеней приведена в электронном приложении в папке «03 3D-Targets».

Таблица 5 – Характеристики лучших экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей биомишеней, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17

Обозначение	Длина, АА	Код PDB	Размер модели	Разрешение, Å	Цепочки	Литература
SERT	630	5I6X	76-618	3.14	A	[136]
CHRM1	460	5CXV	2-218	2.70	A	[142]
JAK3	1124	3LXL	806-1124	1.74	A	[349]
CAPN1	714	1ZCM	33-353	2.00	A	[268]
CFD	253	1DIC	26-253	1.80	A	[350]

Таблица 6 – Характеристики лучших теоретических 3D-моделей биомишеней, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17

Обозначение	Длина, АА	Код ModBase	Размер модели	Идентичность шаблона, %
5-HT3A	478	e056050ca26ea7251f01816dc9bccde8	30-474	89
DRD1	446	28b6261001683ffd97d78ffc6fd4448a	30-345	48
DRD2	443	091bc097c64a5a1726ec1a99b9228fc4	37-443	53
DAT	620	664e40366933e7b160379446201fbf4e	58-600	56
ADRA1A	466	0be8c685ba7d1551a3f2c7252e9c72c7	30-352	49
NET	617	b99b37c984483657d38cd8fe9c006809	54-597	59
GABRA1	456	b3709eea5375f1242ba57ac4b578cded	30-443	41
GABRB2	512	8e2807a55eac507927d600810aaf5386	25-338	90
GABRG2	467	b5b3593bf4fc198659b14bdfb9ee4ba4	65-465	44
GAT1	599	6ef1240e3cc222adef0ad22bb83881ae	43-576	47

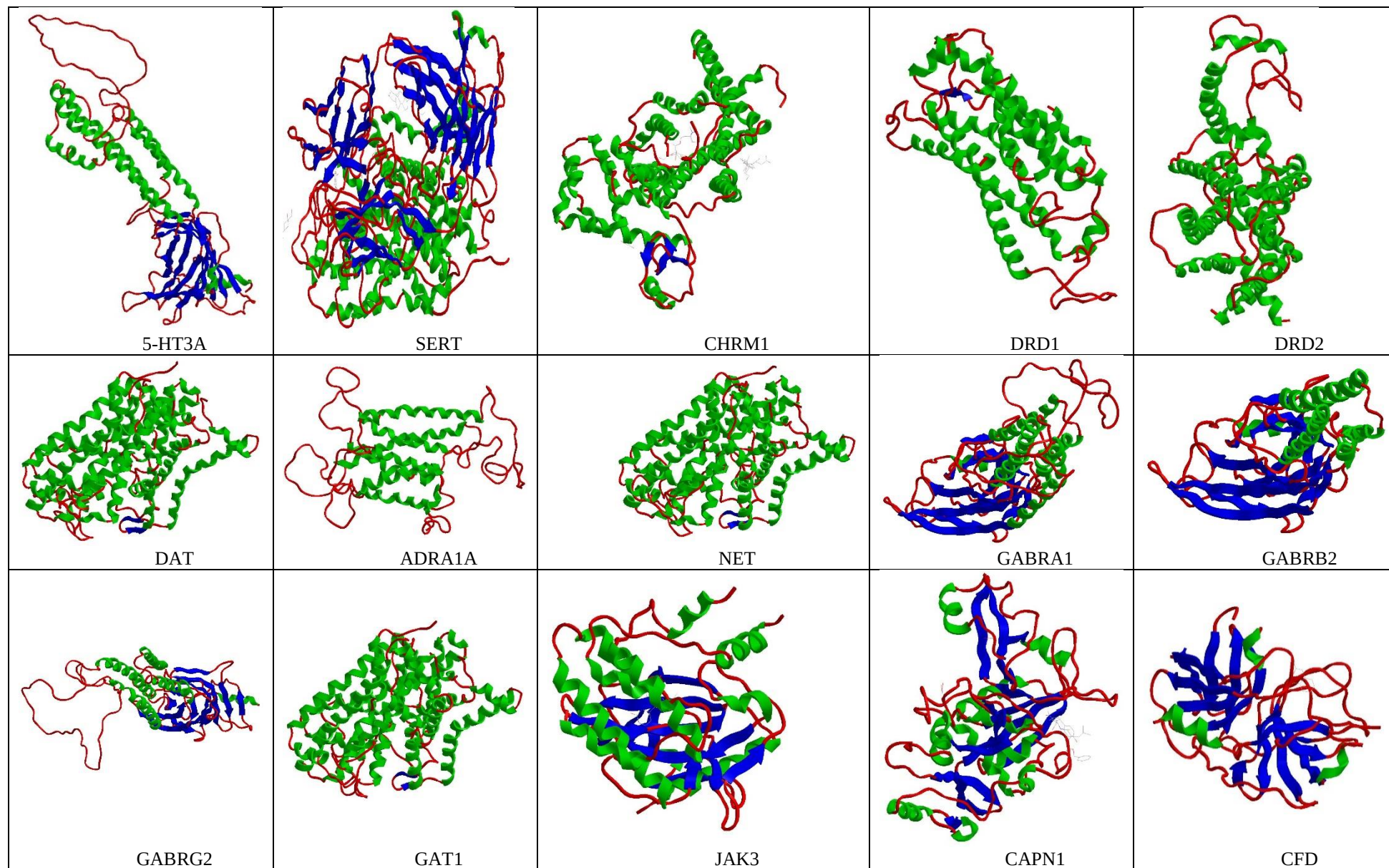


Рисунок 16 – 3D-модели биомшеней, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17.

Таблица 7 – Ключевые связывающие аминокислоты сайтов биоминералов, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17

Обозначение	Аминокислоты сайта
5-HT3A	Tyr229 Phe221 Asn123 Trp85 Trp178 Tyr148 Arg87 Gln146 Tyr138
SERT	Gly94 Ala96 Val97 Asn101 Ser336 Asn368 Leu434 Asp437 Ser438
CHRM1	Asn382 Tyr381 Thr189 Thr192 Phe197 Trp157 Cys407 Trp378 Tyr106
DRD1	Asp103 Ile104 Ser107 Thr108 Ser198 Ser199 Ser202 Trp285 Phe288 Phe289 Val317 Trp321
DRD2	Leu94 Phe110 Val111 Asp114 Val115 Cys118 Ile183 Ile184 Phe189 Phe389 Phe390 Tyr408 Tyr416
DAT	Phe76 Ala77 Asp79 Tyr156 Phe320 Ser321 Gly323 Phe326 Val328 Ser422 Gly425 Gly426
ADRA1A	Asp106 Cys110 Ser158 Ser188 Ser192 Phe 193 Trp285 Phe 312 Tyr316
NET	Phe72 Asp75 Gly149 Tyr152 Phe317 Val325 Met424
GABRA1	Phe92 Arg94 Ser96 Arg148
GABRB2	Tyr181 Thr184 Thr226 Tyr229
GABRG2	Asp114 Ile115 Phe116 Phe118 Thr120 Met169
GABA-A_GABA	(Phe92 Arg94 Ser96 Arg148) (Tyr181 Thr184 Thr226 Tyr229)
GABA-A_Benz	(Phe92 Arg94 Ser96 Arg148) (Asp114 Ile115 Phe116 Phe118 Thr120 Met169)
GAT1	Tyr60 Gly63 Leu64 Gly65 Trp68 Leu136 Tyr139 Tyr140 Ile143 Phe294 Ser295 Tyr296 Gly297 Leu300 Ser396 Asp451 Ser456
JAK3	Lys830 Leu828 Gly908 Leu905 Glu903 Leu956 Met902 Arg953 Asn954
CAPN1	Gln109 Cys115 Trp116 Thr210 Gly271 Gly208 Gly207 Gly113
CFD	Gly193 Ser195 Thr214 Ser215 Arg218 Cys191 Lys192

3.3 – Выбор референсных веществ для релевантных биомишеней, построение и оптимизация их 3D-моделей

Итоговые результаты прогноза в программе BBBPredictor 0.90 проницаемости соединения L-17 через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) приведены в *таблице 8*. Полностью графики прогноза приведены в электронном приложении в папке «04 BBB».

Таблица 8 – *Insilico* оценка проницаемости соединения L-17 через ГЭБ

Алгоритм прогноза	Дескрипторное описание	Значение оценочной функции		
		BBB+	BBB–	BBB+/BBB–
AdaBust	MACCS	0.131	0.069	1.90
AdaBust	Openbabel(FP2)	0.058	0.046	1.26
AdaBust	Molprint 2D	0.098	0.065	1.51
AdaBust	PubChem	0.076	0.070	1.09
SVM	MACCS	11.9	3.3	3.61
SVM	Openbabel(FP2)	6.3	2.7	2.33
SVM	Molprint 2D	3.7	16.6	0.22
SVM	PubChem	4.7	1.8	2.61
10% усеченное среднее				1.78

Полученные данные показывают, что соединение L-17 достаточно хорошо проникает через ГЭБ. Таким образом, при выборе референсных препаратов и соединений для отобранных релевантных биомишеней следует учитывать тот факт, что соединение L-17 может взаимодействовать как с периферическими белками-мишенями, так и с биомишенями, находящимися в центральной нервной системе. С учетом этого и в соответствии со спектром фармакологической активности соединения L-17, в качестве стандартных препаратов сравнения были выбраны мirtазапин и сульпирид, данные о которых были взяты из базы данных по известным лекарственным препаратам DrugBank.

Для релевантных белков-мишеней референсные препараты и вещества, близкие по характеру действия и по химической структуре к соединению L-17, были найдены в результате поиска в базе знаний UniProtKB, в базе данных по

известным лекарственным препаратам DrugBank и в базе данных по фармакологически релевантным белкам и их лигандам IUPHAR.

Структурные формулы препаратов сравнения и референсных препаратов и веществ приведены в Приложении 1.

Как описано в главе «Материалы и методы», с помощью программы MarvinSketch 15.6.15 и программы методами молекулярной механики и квантовой химии были построены энергетически наиболее выгодные конформеры соединения L-17, препаратов сравнения миртазапина и сульпирида и референсных веществ. Полученные 3D-модели были использованы для последующего докинга. Оптимизированные 3D-модели соединения L-17, препаратов сравнения и референсных препаратов и веществ приведены в Приложении 2.

3.4 – Проведение докинга соединения L-17, препаратов сравнения и референсных веществ в специфические сайты релевантных белков-мишеней

Докинг оптимизированных конформеров соединения L-17, препаратов сравнения и референсов в специфические сайты связывания 16 релевантных биомишеней осуществлялся с помощью программ PyRx 0.8 и AutoDockVina 1.1.1, с учетом ранее найденных данных о ключевых аминокислотах сайтов связывания и покрывающих эти сайты пространств

В *таблице 9* приведены итоговые результаты докинга соединения L-17 в виде вектора минимальных энергий докинга. Видно, что по данным молекулярного докинга, соединение L-17 обладает выраженным мультитаргетным действием. В соответствии с величинами энергии докинга, можно предположить следующее: наиболее выражены у соединения L-17 свойства холиноблокатора, что соответствует наименьшей энергии докинга в M1-холинорецептор CHRM1. Почти также выражены у соединения L-17 дофаминергические свойства, складывающиеся из активности в отношении D1 и

D2 дофаминовых рецепторов (DRD1, DRD2) и ингибирования дофаминового транспортера DAT. Следующей по значимости для соединения L-17 является α 1-адреноблокирующая активность, обусловленная умеренным действием на α 1-адренорецептор ADRA1 и выраженным влиянием на норадреналиновый транспортер NET. Умеренное серотонин-блокирующее действие соединения L-17 обусловлено, прежде всего, достаточно высокой афинностью к серотониновому транспортеру SERT; прямой антагонизм к 5-HT3A рецепторам незначителен. Выявлено возможное наличие у соединения L-17 умеренного ГАМК-ергического эффекта, обусловленного блокированием ГАМК транспортера 1 GAT1; при этом непосредственное взаимодействие с ГАМК-связывающим и бензодиазепиновым сайтами ГАМК-A рецептора незначительно. Наблюдается высокая ингибирующая активность соединения L-17 в отношении тирозин-протеин киназы JAK3. Ингибирование двух других, вовлеченных в процессы воспаления и апоптоза белков-мишеней, кальпаина 1 CALPN1 и комплиментарного фактора D (адипсина) CFD, незначительно.

Таблица 9 – Энергии докинга соединения L-17 в релевантные биомишени

Название биомишени	Обозначение	ΔE , Ккал/мол ь	$ \Delta E $, Ккал/мол ь
5-HT3A рецептор	5-HT3A	-6.6	6.6
Серотониновый транспортер	SERT	-8.1	8.1
Холинорецептор M1	CHRM1	-8.3	8.3
Дофаминовый рецептор D1	DRD1	-8.1	8.1
Дофаминовый рецептор D2	DRD2	-7.9	7.9
Дофаминовый транспортер	DAT	-7.8	7.8
α -Адренорецептор A1	ADRA1	-7.4	7.4
Норадреналиновый транспортер	NET	-8.0	8.0
ГАМК-A рецептор, гамк-связывающий сайт	GABA-A_GABA	-6.1	6.1
ГАМК-A рецептор, бензодиазепиновый сайт	GABA-A_Benz	-6.3	6.3
ГАМК-транспортер 1	GAT1	-7.4	7.4
Тирозин-протеин киназа JAK3	JAK3	-8.0	8.0
Кальпаин	CAPN1	-6.5	6.5
Комплиментарный фактор D (адипсин)	CFD	-6.0	6.0

Как было представлено ранее, молекула соединения L-17 должна хорошо проникать через гематоэнцефалический барьер. Таким образом, вышеперечисленные -ергические эффекты следует рассматривать прежде всего в контексте воздействия на биоминерацию ЦНС.

Холиноблокирующие свойства соединения L-17 опосредованы прямым действием на M1-холинорецепторы и могут обуславливать его эффективность при лечении болезни Паркинсона, либо в качестве церебрального вазодилататора, например, при ишемии головного мозга. Антагонизм к D1 и D2 дофаминовым рецепторам может быть ответственным за антипсихотическое действие, а ингибирование обратного захвата дофамина может обуславливать антидепрессантные свойства изучаемого соединения. Обращает на себя внимание необычное сочетание у соединения L-17 холиноблокирующей и дофамин антагонистической активностей, поскольку известно, что блокада M1-холинорецепторов обычно сопровождается активацией дофаминергической системы. Умеренная $\alpha 1$ -адреноблокирующая активность может детерминировать слабое гипотензивное и вазодилатирующее действие соединения L-17, что, с учетом центральной M-холинолитической активности, может быть полезно при нарушении мозгового кровообращения. Однако основное влияние на адренергическую систему оказывает ингибирование обратного захвата норадреналина, а это характерно для антидепрессантов. Серотонинергические эффекты соединения L-17 также обусловлены преимущественно ингибированием серотонинового транспортера, но не прямым антагонизмом к 5-HT₃ рецепторам.

Примечательно, что по данным докинга, для соединения L-17 характерно одновременное наличие выраженного ингибирования обратного захвата дофамина, норадреналина и серотонина, а это с высокой вероятностью свидетельствует о возможном наличии у него выраженной антидепрессантной активности. В дополнение к этому, умеренное ингибирование соединением L-17

обратного захвата ГАМК может обуславливать его анксиолитическую, противосудорожную и противоэпилептическую активности.

Полученные результаты позволяют позиционировать соединение L-17 как мультитаргетный атипичный антидепрессант и атипичный нейролептик, с преимущественно пострецепторным действием, с возможным анксиолитическим компонентом и дополнительной способностью улучшать мозговое кровообращение. Целесообразно также исследовать его применение для лечения болезни Паркинсона, как антипсихотическое средство и в качестве противосудорожного препарата, в частности, при эпилепсии.

Особый интерес вызывает выраженная способность соединения L-17 ингибировать тирозин-протеин киназу JAK3. Высокая аффинность к этой мишени свидетельствует о возможном наличии у соединения L-17 высокой иммуномодулирующей активности, противовоспалительного действия и способности воздействовать на апоптоз.

С учетом наличия у соединения L-17 психотропных, гипотензивных, вазодилиатирующих и церебропротекторных свойств, его целесообразно исследовать на возможность использования в терапии различного рода ишемических повреждений, таких, как нарушение мозгового кровообращения, инсульт, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда.

3.5 – Сравнительный анализ таргетного *in silico* спектра фармакологической активности соединения L-17

С целью детализации особенностей мультитаргетного действия соединения L-17, был выполнен анализ спектра его аффинности, в сравнении со спектрами аффинности референсных препаратов и веществ и препаратов сравнения. В *таблицах 10, 11, 12* приведены итоговые результаты докинга референсных соединений, миртазапина и сульпирида (в виде векторов минимальных энергий докинга).

Сравнение данных *таблиц 9 и 10* показывает, что по величинам энергий докинга аффинитет соединения L-17 уступает аффинитету референсных соединений в отношении почти всех мишеней. Наиболее сильные различия наблюдаются для серотонинового транспортера, холинорецептора M1, дофаминального рецептора D1, дофаминального рецептора D2 и для адипсина. Только в отношении дофаминального транспортера и α -адренорецептора A1 аффинитет соединения L-17 немного превосходит аффинитет референсов. Таким образом, в сравнении с референсными соединениями, действие соединения L-17 на рассматриваемые белки-мишени носит более мягкий характер.

При сопоставлении аффинитетов соединения L-17 (*таблица 9*) и миртазапина (*таблица 11*) были получены результаты, аналогичные предыдущему сравнению: аффинитет соединения L-17 в отношении почти всех белков-мишеней меньше, чем аффинитет миртазапина.

Наиболее сильны различия для серотонинового транспортера, холинорецептора M1, дофаминального рецептора D1, дофаминального транспортера и норадреналинового транспортера. Для дофаминального рецептора D2 аффинитет соединения L-17 немного превосходит аффинитет миртазапина, а в отношении адипсина аффинитет обоих соединений одинаков.

В отличие от двух предыдущих сравнений, в случае сопоставления соединения L-17 (*таблица 9*) и сульпирида (*таблица 12*) получаем только незначительные расхождения в аффинности. При этом аффинитет соединения L-17 несколько превышает аффинитет сульпирида в отношении пяти мишеней: дофаминального транспортера, α -адренорецептора A1, норадреналинового транспортера, ГАМК транспортера 1 и киназы JAK3.

Таким образом, спектр аффинности соединения L-17 в отношении 14 релевантных белков-мишеней похож на спектр аффинности сульпирида.

Таблица 10 – Энергии докинга референсных соединений в релевантные биомишени

Название биомишени	Обозначение биомишени	Референс	$\Delta E, \text{Ккал/моль}$	$ \Delta E , \text{Ккал/моль}$
5-HT _{3A} рецептор	5-HT _{3A}	Гранисетрон	-7.0	7.0
Серотониновый транспортер	SERT	Флуоксетин	-9.3	9.3
Холинорецептор M1	CHRM1	Бензатропин	-10.4	10.4
Дофаминовый рецептор D1	DRD1	Флупентиксол	-10.1	10.1
Дофаминовый рецептор D2	DRD2	Флупентиксол	-9.3	9.3
Дофаминовый транспортер	DAT	Метилфенидат	-7.6	7.6
A Адренорецептор A1	ADRA1	Празозин	-6.9	6.9
Норадреналиновый транспортер	NET	Атомоксетин	-8.2	8.2
ГАМК-A рецептор, гамк-связывающий сайт	GABA-A_GABA	Прогабид	-6.8	6.8
ГАМК-A рецептор, бензодиазепиновый сайт	GABA-A_Benz	Диазепам	-7.2	7.2
ГАМК-транспортер 1	GAT1	Тиагабин	-7.9	7.9
Тирозин-протеин киназа JAK3	JAK3	Тофацитиниб	-8.4	8.4
Кальпаин	CAPN1	CHEMBL1240873	-6.8	6.8
Комплиментарный фактор D (адипсин)	CFD	CHEMBL2180765	-9.3	9.3

С использованием полученных спектров энергий докинга, по формулам, приведенным в «Материалах и методах» были рассчитаны показатели относительной аффинности Aff соединения L-17, при сравнении с референсными веществами, миртазапином или сульпиридом. Результаты представлены в *таблицах 13, 15, 16*.

Таблица 11 – Энергии докинга миртазапина в релевантные биомишени

Название биомишени	Обозначение	ΔE Ккал/моль	ΔE, Ккал/моль
5-HT3A рецептор	5-HT3A	-7.4	7.4
Серотониновый транспортер	SERT	-9.3	9.3
Холинорецептор M1	CHRM1	-10.8	10.8
Дофаминовый рецептор D1	DRD1	-9.8	9.8
Дофаминовый рецептор D2	DRD2	-7.5	7.5
Дофаминовый транспортер	DAT	-9.2	9.2
α -Адренорецептор A1	ADRA1	-7.8	7.8
Норадреналиновый транспортер	NET	-9.7	9.7
ГАМК-А рецептор, гамк-связывающий сайт	GABA-A_GABA	-6.7	6.7
ГАМК-А рецептор, бензодиазепиновый сайт	GABA-A_Benz	-7.0	7.0
ГАМК-транспортер 1	GAT1	-8.4	8.4
Тирозин-протеин киназа JAK3	JAK3	-8.6	8.6
Кальпаин	CAPN1	-7.0	7.0
Комплиментарный фактор D (адипсин)	CFD	-6.0	6.0

Таблица 12 – Энергии докинга сульпирида в релевантные биомишени

Название биомишени	Обозначение	ΔE, Ккал/моль	ΔE, Ккал/моль
5-HT3A рецептор	5-HT3A	-6.9	6.9
Серотониновый транспортер	SERT	-8.1	8.1
Холинорецептор M1	CHRM1	-8.4	8.4
Дофаминовый рецептор D1	DRD1	-8.3	8.3
Дофаминовый рецептор D2	DRD2	-8.2	8.2
Дофаминовый транспортер	DAT	-7.3	7.3
α -Адренорецептор A1	ADRA1	-6.9	6.9
Норадреналиновый транспортер	NET	-7.7	7.7
ГАМК-А рецептор, гамк-связывающий сайт	GABA-A_GABA	-6.3	6.3
ГАМК-А рецептор, бензодиазепиновый сайт	GABA-A_Benz	-6.5	6.5
ГАМК-транспортер 1	GAT1	-7.3	7.3
Тирозин-протеин киназа JAK3	JAK3	-7.8	7.8
Кальпаин	CAPN1	-6.7	6.7
Комплиментарный фактор D (адипсин)	CFD	-6.2	6.2

При сравнении аффинности соединения L-17 с аффинностью референсов выяснилось, что его действие на все рассмотренные мишени не такое уж слабое (кроме CFD, для которого относительная аффинность всего 0.65). В частности, выяснилось, что ингибирование кальпаина CAPN1 сопоставимо с ингибированием JAK3 киназы, а это может быть весьма существенным для формирования у соединения L-17 иммуотропной активности, противовоспалительного действия и способности снижать апоптоз. Наименьшая относительная аффинность соединения L-17 наблюдается для комплиментарного фактора D, а наибольшая – для α -адренорецептора A1. При этом для большинства биомишеней она близка к единице. Но вариабельность относительной аффинности соединения L-17 к разным белкам в данном случае велика – максимальная разность значений *Aff* составляет 0.42.

Таблица 13 – Относительная аффинность к релевантным биомишеням соединения L-17 при сравнении с референсными соединениями

Название биомишени	pK_{L17}	Референс	pK_{Refs}	$Aff, pK_{L17} / pK_{Ref}$
5-HT3A	4.81	Гранисетрон	5.10	0.94
SERT	5.90	Флуоксетин	6.78	0.87
CHRM1	6.05	Бензатропин	7.58	0.80
DRD1	5.90	Флупентиксол	7.36	0.80
DRD2	5.76	Флупентиксол	6.78	0.85
DAT	5.69	Метилфенидат	5.54	1.03
ADRA1	5.39	Празозин	5.03	1.07
NET	5.83	Атомоксетин	5.98	0.98
GABA-A_GABA	4.45	Прогабид	4.96	0.90
GABA-A_Benz	4.59	Диазепам	5.25	0.88
GAT1	5.39	Тиагабин	5.76	0.94
JAK3	5.83	Тофацитиниб	6.12	0.95
CAPN1	4.74	ChEMBL1240873	4.96	0.96
CFD	4.37	ChEMBL2180765	6.78	0.65

При сравнении с миртазапином, наименьшая относительная аффинность соединения L-17 наблюдается для холинорецептора M1, а наибольшая – для дофаминового рецептора D2. Как и в предыдущем случае, для большинства

биомишеней она близка к единице. Однако различия в относительной аффинности соединения L-17 к разным белкам в данном случае менее контрастны, максимальное изменение величины *Aff* составляет 0.28.

Таблица 14 – Относительная аффинность к релевантным биомишеням соединения L-17 при сравнении с миртазапином

Обозначение биомишени	pK _{L17}	pK _{Mirt}	Aff, pK _{L17} / pK _{Mirt}
5-HT3A	4.81	5.39	0.89
SERT	5.90	6.78	0.87
CHRM1	6.05	7.87	0.77
DRD1	5.90	7.14	0.83
DRD2	5.76	5.47	1.05
DAT	5.69	6.71	0.85
ADRA1	5.39	5.69	0.95
NET	5.83	7.07	0.82
GABA-A_GABA	4.45	4.88	0.91
GABA-A_Benz	4.59	5.10	0.90
GAT1	5.39	6.12	0.88
JAK3	5.83	6.27	0.93
CAPN1	4.74	5.10	0.93
CFD	4.37	4.37	1.00

При сравнении с сульпиридом, относительная аффинность соединения L-17 для всех белков-мишеней близка к единице. Таким образом, по спектру аффинности в отношении рассматриваемых биомишеней эти два соединения достаточно похожи, максимальная разница между значениями *Aff* составляет 0.11.

Обобщая результаты анализа спектров относительной аффинности соединения L-17, можно утверждать, что это вещество является мягко действующим мультитаргетным фармакологически активным соединением, сопоставимым по характеру действия с сульпиридом.

Таблица 15 – Относительная аффинность к релевантным биомишеням соединения L-17, в сравнении с сульпиридом

Обозначение биомишени		pK _{L17}	pK _{Sulp}	Aff, pK _{L17} / pK _{Sulp}
5-HT _{3A} рецептор	5-HT _{3A}	4.81	5.03	0.96
Серотониновый транспортер	SERT	5.90	5.90	1.00
Холинорецептор M1	CHRM1	6.05	6.12	0.99
Дофаминовый рецептор D1	DRD1	5.90	6.05	0.98
Дофаминовый рецептор D2	DRD2	5.76	5.98	0.96
Дофаминовый транспортер	DAT	5.69	5.32	1.07
ААдренорецептор A1	ADRA1	5.39	5.03	1.07
Норадреналиновый транспортер	NET	5.83	5.61	1.04
ГАМК-А рецептор, гамк-связывающий сайт	GABA-A_GABA	4.45	4.59	0.97
ГАМК-А рецептор, бензодиазепиновый сайт	GABA-A_Benz	4.59	4.74	0.97
ГАМК-транспортер 1	GAT1	5.39	5.32	1.01
Тирозин-протеин киназа JAK3	JAK3	5.83	5.69	1.03
Кальпаин	CAPN1	4.74	4.88	0.97
Комплиментарный фактор D (адипсин)	CFD	4.37	4.52	0.97

3.6 – Сравнительный многомерный дисперсионный анализ спектров энергии докинга соединения L-17

На рисунках 17, 18, 19 и в таблице 16 приведены результаты сравнения матрицы энергий ансамблевого докинга соединения L-17 с матрицами энергий ансамблевого докинга референсных веществ, миртазапина и сульпирида, выполненные в программе Statistica 8 методом многомерного непараметрического однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистическую значимость различий вектор-средних энергий докинга оценивали по λ -критерию Уилкса в аппроксимации F-критерием Фишера.

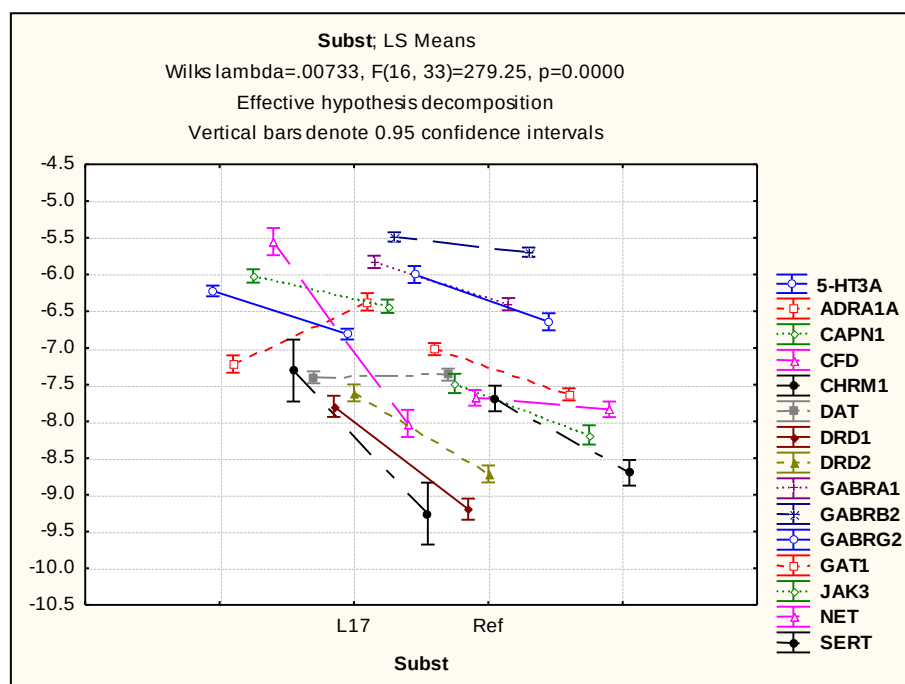


Рисунок 17 – График ANOVA анализа различий спектров энергий докинга соединения L-17 и референсных веществ

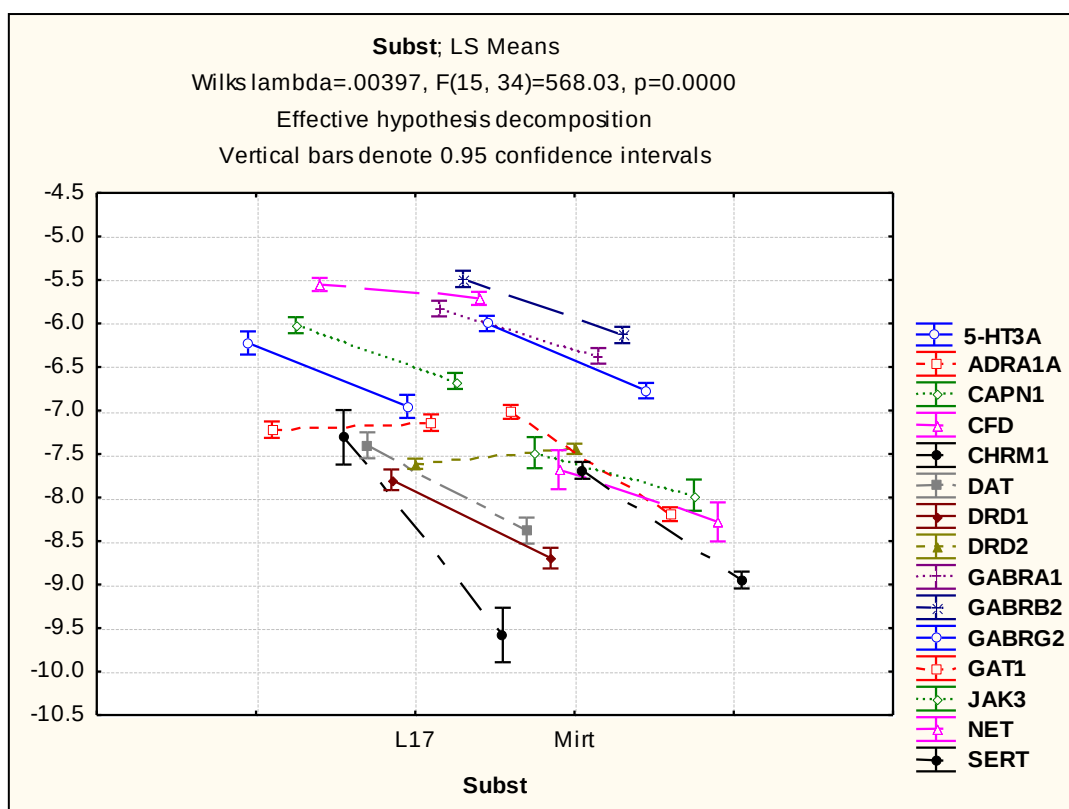


Рисунок 18 – График ANOVA анализа различий спектров энергий докинга соединения L-17 и миртазапина

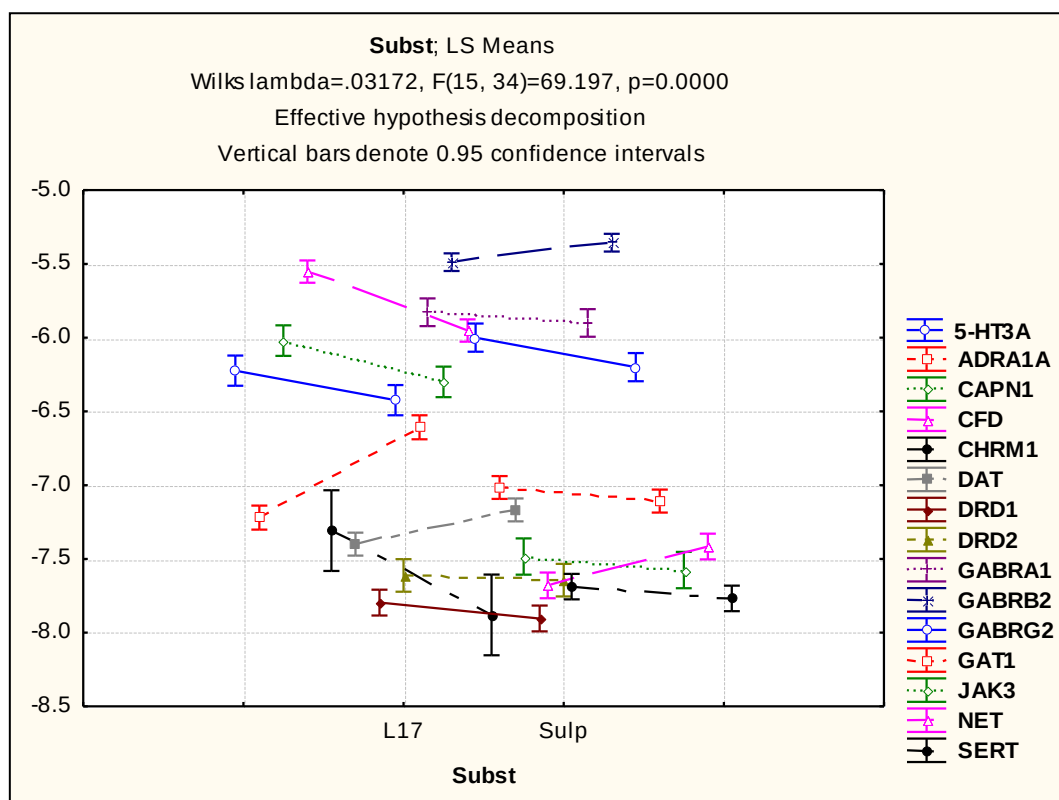


Рисунок 19 – График ANOVA анализа различий спектров энергий докинга соединения L-17 и сульпирида

Таблица 16 – Результаты сравнения методом многомерного непараметрического однофакторного дисперсионного анализа спектров энергий докинга соединения L-17, референсных соединений, сульпирида и миртазапина

Сравниваемые спектры	Критерий Уилкса λ	F-критерий Фишера	Число степеней свободы	Вероятность сходства вектор-средних
Соединение L-17 – Референсы	$7.33 \cdot 10^{-3}$	279.25	16 / 33	$< 5 \cdot 10^{-5}$
Соединение L-17 – Миртазапин	$3.97 \cdot 10^{-3}$	568.03	15 / 34	$< 5 \cdot 10^{-5}$
Соединение L-17 – Сульпирид	$3.17 \cdot 10^{-2}$	69.20	15 / 34	$< 5 \cdot 10^{-5}$

В соответствии с результатами дисперсионного анализа, спектр энергий докинга соединения L-17 высокодостоверно отличается от спектров энергий

докинга референсных веществ, миртазапина и сульпирида. При этом, больше всего соединение L-17 похож на сульпирид, а меньше всего – на миртазапин; сходство с референсами промежуточное.

Таким образом, расчетными исследованиями статистически доказано, что соединение L-17 имеет оригинальный мультитаргетный спектр фармакологической активности, по характеру действия похожий на спектр активности сульпирида.

3.7 – Формирование фокусированной библиотеки производных 1,3,4-тиадиазина, структурно сходных с соединением L-17

С целью последующего построения нейросетевых моделей мультитаргетного действия соединения L-17 и его аналогов была сформирована фокусированная библиотека производных 1,3,4-тиадиазина, структурно сходных с соединением L-17. Сначала была создана первичная база данных из 77 различных производных 1,3,4-тиадиазина. Затем для этих 77 соединений с помощью модуля TestSim 7.2 программного комплекса ИТ «Микрокосм» было рассчитано структурное сходство с соединением L-17.

Были отобраны 40 соединений, для которых QL-модифицированный коэффициент сходства Танимото к соединению L-17 был не менее 0.8. Найденные таким образом структуры составили фокусированную библиотеку производных 1,3,4-тиадиазина, структурно сходных с соединением L-17. Результаты анализа структурного сходства приведены в *таблице 17*.

Таблица 17 – Результаты анализа структурного сходства производных 1,3,4-тиадиазина к соединению L-17

ID	Шифр	T _{QL}	ID	Шифр	T _{QL}	ID	Шифр	T _{QL}	ID	Шифр	T _{QL}
<i>Структурные аналоги L-17</i>						<i>Непохожие структуры</i>					
54	L-31	0.936	7	LT-37	0.861	1	LT-1	0.797	8	LT-18	.736
55	L-19	0.936	8	LT-38	0.861	7	LT-17	0.793	9	LT-19	.736
56	H-18	0.936	7	L-91	0.859	25	LT-25	0.791	20	LT-20	.736
57	L-20	0.936	68	L-87	0.859	74	LTA-2	0.782	26	LT-26	0.735
21	LT-21	0.927	69	LT-55	0.859	71	LTG-1	0.777	27	LT-27	0.735
58	H-16	0.923	70	H-88	0.859	14	LT-14	0.757	28	LT-28	0.735
66	L-86	0.921	34	LT-34	0.844	15	LT-15	0.757	73	LTA-1	0.695
46	LT-46	0.920	35	LT-35	0.844	16	LT-16	0.757	75	LTA-3	0.691
59	H-69	0.913	36	LT-36	0.844	63	H-33	0.751	76	LTA-4	0.666
33	LT-33	0.908	39	LT-39	0.844	6	LT-6	0.748	77	LTA-5	0.620
52	LT-52	0.907	60	H-29	0.838	7	LT-7	0.748	40	LT-40	0.552
29	LT-29	0.892	30	LT-30	0.829	8	LT-8	0.748	42	LT-42	0.543
50	LT-50	0.888	31	LT-31	0.829	10	LT-10	0.746	41	LT-41	0.514
22	LT-22	0.864	32	LT-32	0.829	11	LT-11	0.746	45	LT-45	0.489
23	LT-23	0.864	61	LT-53	0.825	12	LT-12	0.746	43	LT-43	0.420
24	LT-24	0.864	2	H-42	0.825	2	LT-2	0.743	44	LT-44	0.415
47	LT-47	0.863	2	LTG-2	0.823	3	LT-3	0.743			
48	LT-48	0.863	3	LT-13	0.813	4	LT-4	0.743			
49	LT-49	0.863	5	LT-5	0.805	64	LT-54	0.739			
51	LT-51	0.863		LT-9	0.803	65	H-43	0.739			

Примечание: ID – номер записи в первичной базе данных. T_{QL} – QL-модифицированный коэффициент сходства Танимото.

3.8 – Построение и оптимизация 3D-моделей производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки

Для найденных 40 структурно сходных с соединением L-17 производных 1,3,4-тиадиазина были построены оптимальные конформации по схеме, описанной в «Материалах и методах»: методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 15.6.15 [258] с последующей оптимизацией в программе MORAC2016.

3.9 – Выполнение докинга производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки в специфические сайты релевантных белков-мишеней

Докинг 40 структурно сходных с соединением L-17 производных 1,3,4-тиадиазина в специфические сайты релевантных белков-мишеней был выполнен по схеме, описанной в «Материалах и методах» в разделе 4, с помощью программ PyRx 0.8 [312] и AutoDockVina 1.1.1 [373]. Матрица энергий ансамблевого докинга 40 структурных аналогов соединения L-17 была сформирована по минимальным значениям ΔE , найденным в результате 5-кратного докирования каждой структуры в сайт каждой биомишени. Полученная матрица в дальнейшем использовалась для нейросетевого моделирования.

3.10 – Построение нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17 и оценка их статистической значимости

В соответствии с совокупностью экспериментальных фармакологических эффектов для соединения L-17 были определены две целевых биомишени, показатели докинга в сайты которых выступали как выходные нейроны в нейросетевом моделировании – это серотониновый транспортер SERT и норадреналиновый транспортер NET. С помощью программы Statistica 8.0 для каждой целевой биомишени были рассчитаны по 500 системных нейросетевых моделей зависимостей энергии докинга в SERT или NET от энергии докинга в другие биомишени соединений, структурно сходных с веществом L-17. Из этих 1000 нейросетей были отобраны две лучших – одна для SERT и одна для NET.

Блок-схемы архитектуры двух найденных нейросетей и их основные статистические характеристики приведены на *рисунках 27 и 28*.

В *рисунках 20 и 21* приняты следующие обозначения.

MLPk-l-m – многослойный перцептрон sk входными, l скрытыми и m выходными нейронами. Передаточные функции: *Tanh* – гиперболический тангенс; *Logistic* – логистическая функция; *Exponential* – обратная экспонента; формулы приведены под соответствующими слоями нейронов. R – коэффициент корреляции; N – число наблюдений; p – статистическая достоверность модели. *Bias* – смещение. Видно, что обе модели статистически высоко достоверны, особенно модель для SERT, значимость которой составляет $p < 5 \cdot 10^{-7}$. Поэтому коэффициенты корреляции также достаточно высоки – в соответствии со значимостью, для SERT он равен $R=0.981$ и выше, чем для NET, где $R=0.814$.

На рисунках 22 и 23 приведены графики соответствия исходных и полученных в результате расчета по нейросетевым моделям энергий докинга аналогов соединения L-17 в сайты SERT и NET. Видно, что расположение исходных значений около теоретической прямой достаточно компактное, особенно в случае SERT. Таким образом, обе нейросетевых модели являются достаточно валидными и могут быть использованы для анализа особенностей мультитаргетного механизма действия соединения L-17.

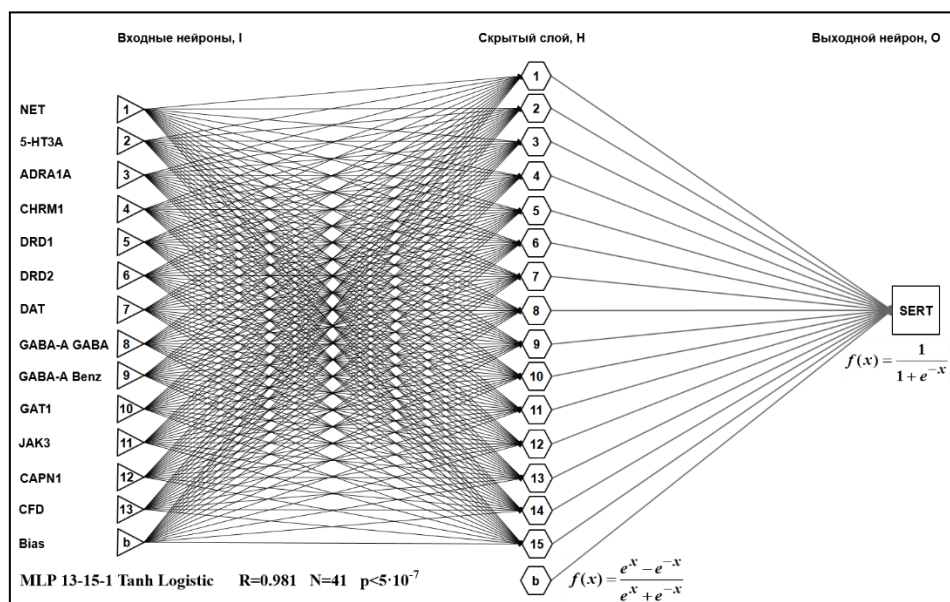


Рисунок 20 – Архитектура искусственной нейронной сети для энергии докинга структурных аналогов соединения L-17 в сайт серотонинового транспортера SERT

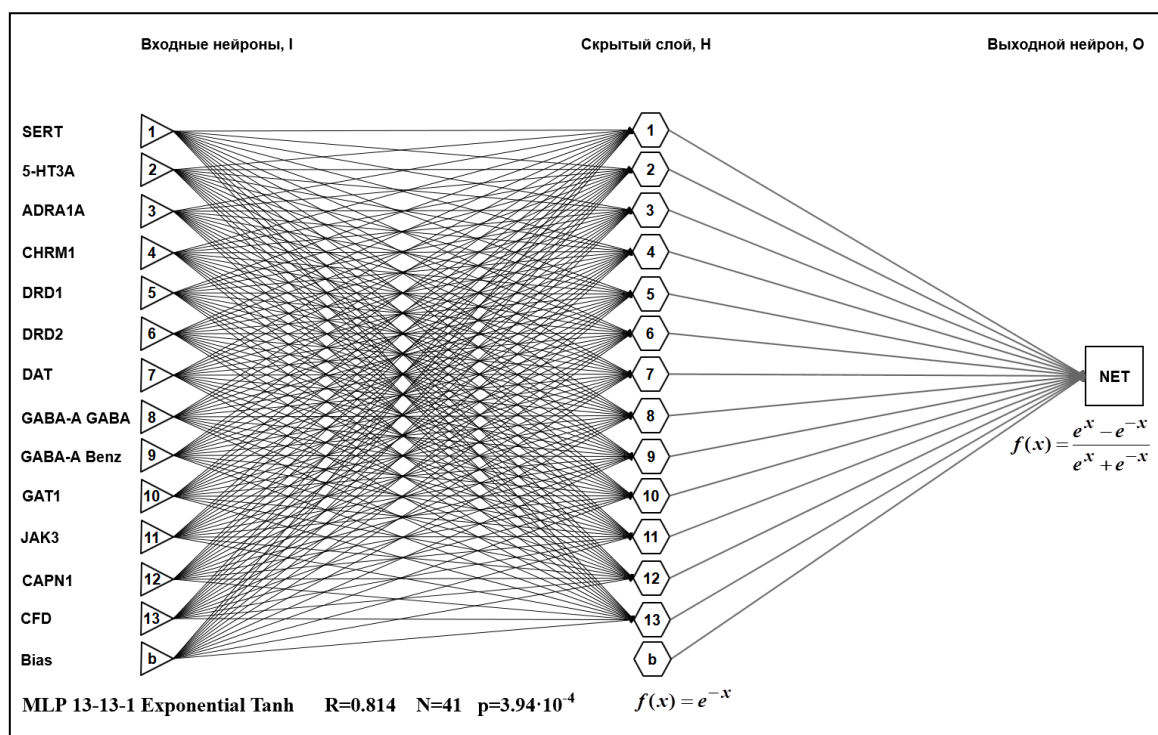


Рисунок 21 – Архитектура искусственной нейронной сети для энергии докинга структурных аналогов соединения L-17 в сайт норадреналинового транспортера NET

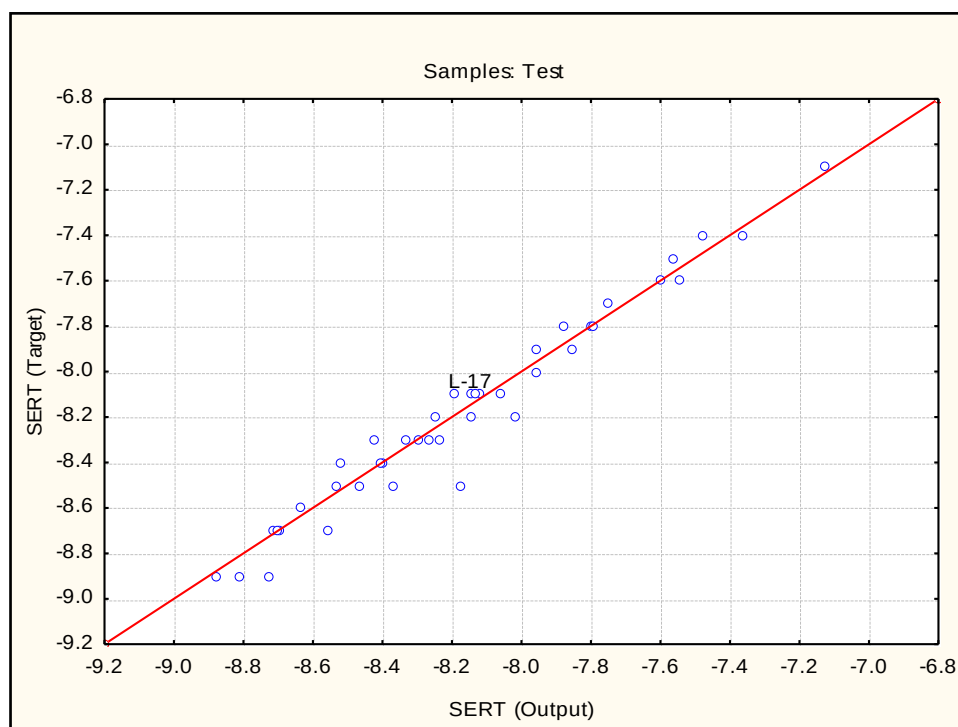


Рисунок 22 – Соответствие исходных и рассчитанных по нейросетевой модели энергий докинга аналогов соединения L-17 в сайт SERT

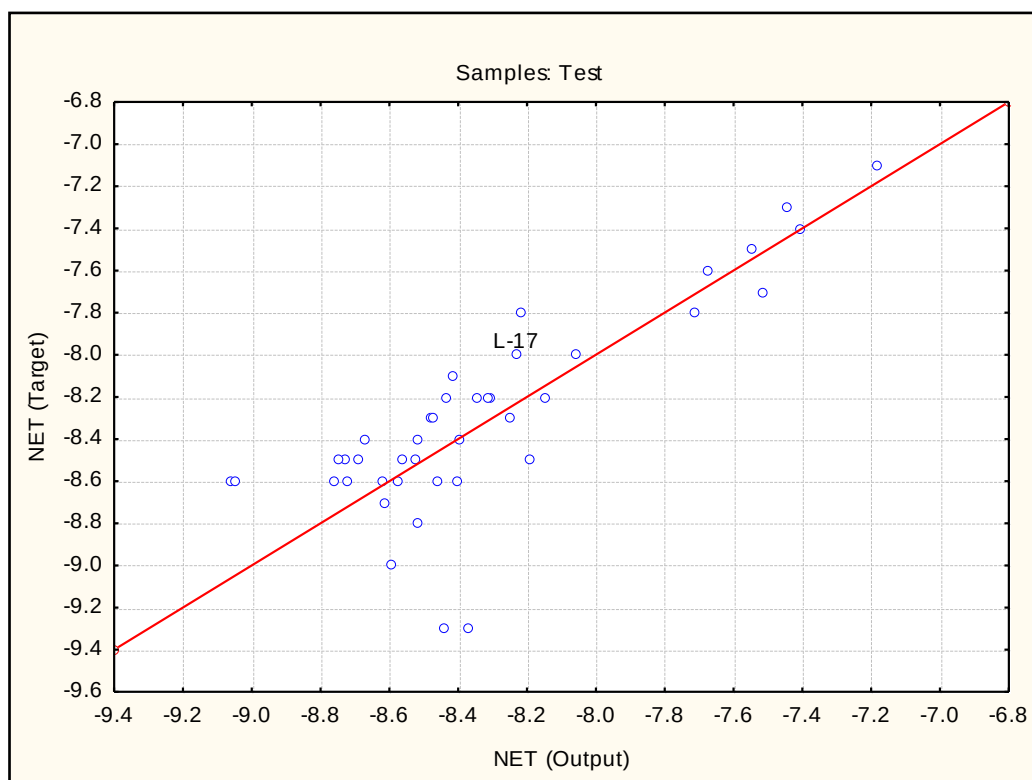


Рисунок 23 – Соответствие исходных и рассчитанных по нейросетевой модели энергий докинга аналогов соединения L-17 в сайт NET

3.11 – Анализ нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17

Результаты анализа общей сензитивности и вклада входных нейронов в сигнал выходного нейрона нейросетевой модели для серотонинового транспортера SERT приведены в *таблице 18*.

По данным табл. 18 и рис. 24, особо высокий вклад в сигнал выходного нейрона SERT обеспечивает входной нейрон JAK3, что свидетельствует о сильном влиянии активности JAK3 киназы на активность серотонинового транспортера. Далее по значимости влияния на SERT идут дофаминовый рецептор 2-го типа DRD2 и ГАМК-А рецептор (его бензодиазепиновый сайт) GABA-A_Benz. В совокупности эти три входных нейрона обеспечивают более 50% уровня сигнала выходного нейрона SERT.

Десять входных нейронов в совокупности обеспечивают более 90% уровня сигнала выходного нейрона SERT (*таблица 18*). Таким образом, на активность

SERT в контексте связывания с ним соединения L-17 практически не влияет взаимодействие соединения с серотониновым рецептором 5-HT_{3A}, α -адренорецептором A1 и с дофаминовым рецептором DRD1.

Таблица 18 – Результаты анализа общей сензитивности нейронов нейросетевой модели для SERT мультитаргетного механизма действия соединения L-17

Входной нейрон	Сензитивность отн. ед.	Вклад в сигнал выходного нейрона, %	Куммулятивный вклад в сигнал выходного нейрона, %
JAK3	11.93	28.7	28.7
DRD2	6.70	16.1	44.8
GABA-A Benz	4.46	10.7	<u>55.5</u>
NET	3.04	7.3	62.8
CFD	2.05	4.9	67.8
DAT	1.97	4.7	72.5
CAPN1	1.96	4.7	77.2
GAT1	1.84	4.4	81.6
CHRM1	1.81	4.4	86.0
GABA-A GABA	1.78	4.3	90.3
5-HT _{3A}	1.53	3.7	94.0
ADRA1A	1.42	3.4	97.4
DRD1	1.10	2.6	100.0

В соответствии с результатами докинга, активность соединения L-17 в отношении бензодиазепинового сайта ГАМК-А рецептора не очень существенна, в то время как аффинность к киназе JAK3 и к дофаминовому рецептору DRD2 велика. С учетом этого, можно с достаточно высокой вероятностью предположить, что на совокупное формирование ингибирования соединением L-17 серотонинового транспортера SERT значительное влияние оказывают ингибирующее действие на JAK3 киназу и на дофаминовый рецептор DRD2.

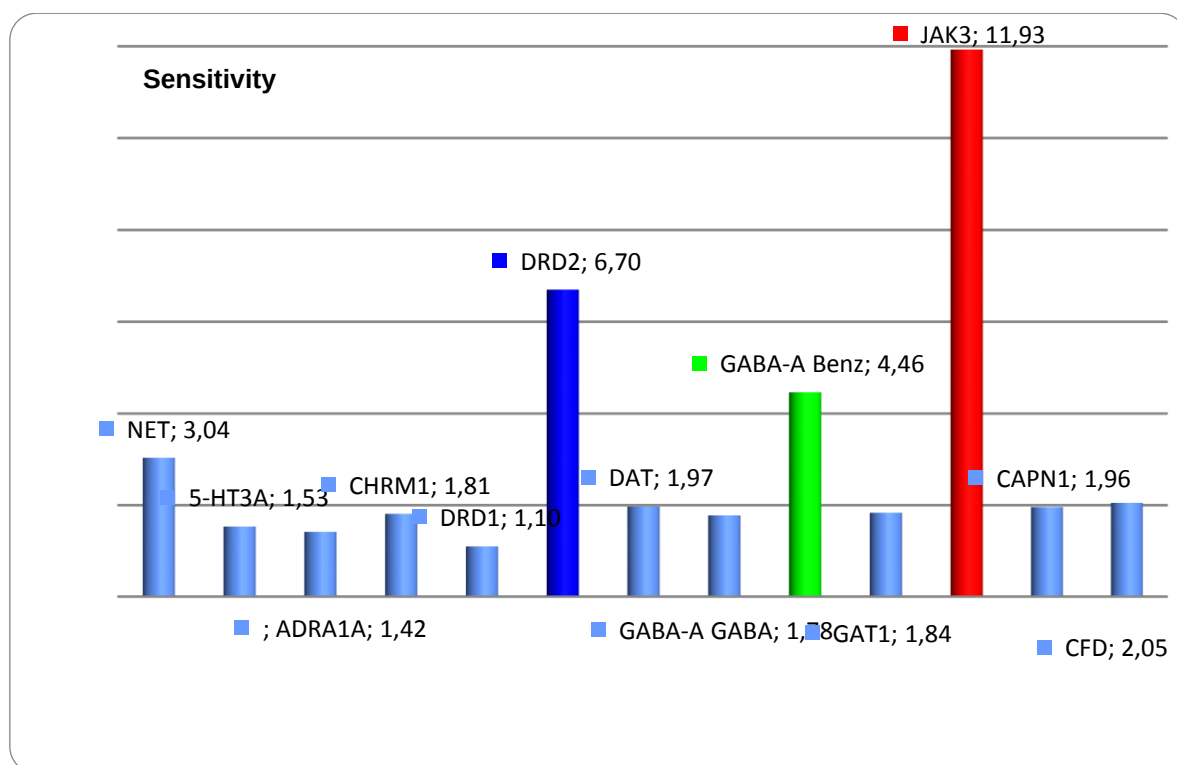


Рисунок 24 – Показатели анализа общей сензитивности входных нейронов нейросетевой модели для SERT действия соединения L-17

Примечание: 5-HT3A – 5-HT3A рецептор; SERT – серотониновый транспортер; CHRM1 – холинорецептор M1; DRD1 – дофаминовый рецептор D1; DRD2 – дофаминовый рецептор D2; DAT – дофаминовый транспортер; ADRA1A – адренорецептор A1; NET – норадреналиновый транспортер; GABA-A_GABA – ГАМК-А рецептор, гамк-связывающий сайт; GABA-A_Benz – ГАМК-А рецептор, бензодиазепиновый сайт; GAT1 – ГАМК-транспортер 1; JAK3 – тирозин-протеин киназа JAK3; CAPN1 – кальпаин; CFD – комплиментарный фактор D (адипсин).

Взаимосвязь между ингибированием обратного захвата серотонина и снижением дофаминергической передачи общеизвестна, поскольку серотонин и дофамин в ЦНС находятся в реципрокных отношениях. Данный факт подтверждает адекватность и валидность построенной нейросетевой модели.

Однако взаимосвязь между ингибирующей JAK3 киназой активностью и ингибированием серотонинового транспортера SERT в доступной литературе не описана. Было сделано предположение, что указанная связь опосредуется изменением градиента ионов натрия. Известно, что в стрессированных или ишемизированных клетках снижается pH. Внутриклеточное закисление устраняется за счет работы моновалентных катион-протонных антипортеров, в

частности, Na^+/H^+ -обменников, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов натрия. Серотониновый транспортер SERT является натрий-зависимым, поэтому его активность изменяется при изменении градиента Na^+ . Таким образом, на фоне стресса или ишемии ингибиторы провоспалительных биомешин будут опосредованно влиять на серотонинергическую систему, что может быть использовано в поиске новых лекарственных веществ полифункционального действия.

Результаты анализа общей сензитивности и вклада входных нейронов в сигнал выходного нейрона нейросетевой модели для NET приведены в *таблице 19*.

Как видно, в случае NET сколько-нибудь выраженное влияние активности отдельных биомешин на активность норадреналинового транспортера отсутствует, так как показатели чувствительности всех нейронов близки к единице. Максимальное значение чувствительности нейронов для модели NET превышает минимальное только в 1.32 раза, в то время как для модели SERT этот показатель равен 10.85 раза. Несколько более высокую сензитивность показал входной нейрон M1-холинорецептора CHRM1, но это отличие несущественно.

Более 50% уровня сигнала выходного нейрона NET обеспечивается семью входными нейронами, а 90% уровня сигнала выходного нейрона – 12 входными нейронами. Таким образом, на активность NET в контексте взаимодействия с ним соединения L-17 практически не влияет активность только одного ГАМК-А рецептора (ГАМК-связывающий сайт) GABA-A_GABA.

Следовательно, детерминация ингибирования соединением L-17 и его структурными аналогами норадреналинового транспортера NET носит совершенно мультитаргетный характер и какое-либо значительное влияние одной или нескольких биомешин здесь не наблюдается.

Таблица 19 – Результаты анализа общей сензитивности нейронов нейросетевой модели для NET мультитаргетного механизма действия соединения L-17

Входной нейрон	Сензитивность, отн. ед.	Вклад в сигнал выходного нейрона, %	Куммулятивный вклад в сигнал выходного нейрона, %
CHRM1	1.19	9.1	9.1
CAPN1	1.09	8.3	17.4
CFD	1.05	8.0	25.4
DAT	1.05	8.0	33.4
GAT1	1.02	7.8	41.2
DRD1	1.02	7.8	49.0
DRD2	1.00	7.7	56.6
5-HT3A	0.98	7.5	64.1
JAK3	0.97	7.4	71.5
SERT	0.97	7.4	78.9
ADRA1A	0.95	7.2	86.2
GABA-A Benz	0.91	6.9	93.1
GABA-A GABA	0.90	6.9	100.0

С целью уточнения характера выявленных закономерностей был проведен пошаговый анализ чувствительности входных нейронов моделей для SERT и NET, результаты которого приведены в *таблицах 20 и 21* и на *рисунках 25 и 26*.

По итогам пошагового анализа чувствительности подтвердилось значительное влияние на активность SERT киназы JAK3 и ГАМК-А рецептора (бензодиазепиновый сайт). Выявлены два дополнительных входных нейрона с существенным влиянием на выходной нейрон – дофаминовый транспортер DAT и ГАМК-транспортер GAT1. Влияние активности дофаминового рецептора DRD2 на активность серотонинового транспортера не подтверждено.

Входной нейрон	Пошаговая сензитивность, отн. ед.										Сумма
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
NET	0.18	0.05	0.09	0.22	0.35	0.47	0.57	0.65	0.70	0.72	3.55
5-HT3A	0.90	0.91	0.84	0.70	0.53	0.36	0.20	0.06	0.06	0.16	-4.28
ADRA1A	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	.00	0.02	0.05	0.08	0.12	0.08
CHRM1	0.29	0.28	0.26	0.24	0.22	0.20	0.18	0.16	0.14	0.12	2.07
DRD1	0.14	0.12	0.10	0.07	0.04	0.00	0.05	0.10	0.16	0.22	-0.05
DRD2	0.15	0.43	0.47	0.33	0.15	0.02	0.04	0.04	0.01	0.02	1.48
DAT	0.06	0.12	0.19	0.28	0.38	0.49	0.60	0.71	0.81	0.89	4.53
GABA- AGABA	0.50	0.54	0.59	0.64	0.68	0.70	0.71	0.69	0.66	0.60	-6.31
GABA- ABenz	0.80	0.15	0.38	0.37	0.15	0.86	0.59	0.39	0.25	0.15	8.08
GAT1	0.22	0.25	0.28	0.32	0.37	0.41	0.47	0.52	0.58	0.63	4.04
JAK3	0.69	0.88	0.11	0.39	0.69	0.93	0.01	0.84	0.44	0.96	13.94
CAPN1	0.05	0.15	0.23	0.29	0.32	0.32	0.31	0.27	0.23	0.18	2.36
CFD	0.01	0.00	0.02	0.06	0.10	0.1	0.21	0.27	0.33	0.39	-1.5

Таблица 21 – Анализ чувствительности нейронов нейросетевой модели для NET мультитаргетного механизма действия соединения L-17

[illegible]

Обращает на себя внимание тот факт, что три входных нейрона оказывают отрицательное влияние на сигнал выходного нейрона SERT – ГАМК-А рецептор (ГАМК-связывающий сайт) GABA-A_GABA, α -адренорецептор A1 ADR1A, серотониновый рецептор 5-HT3A.

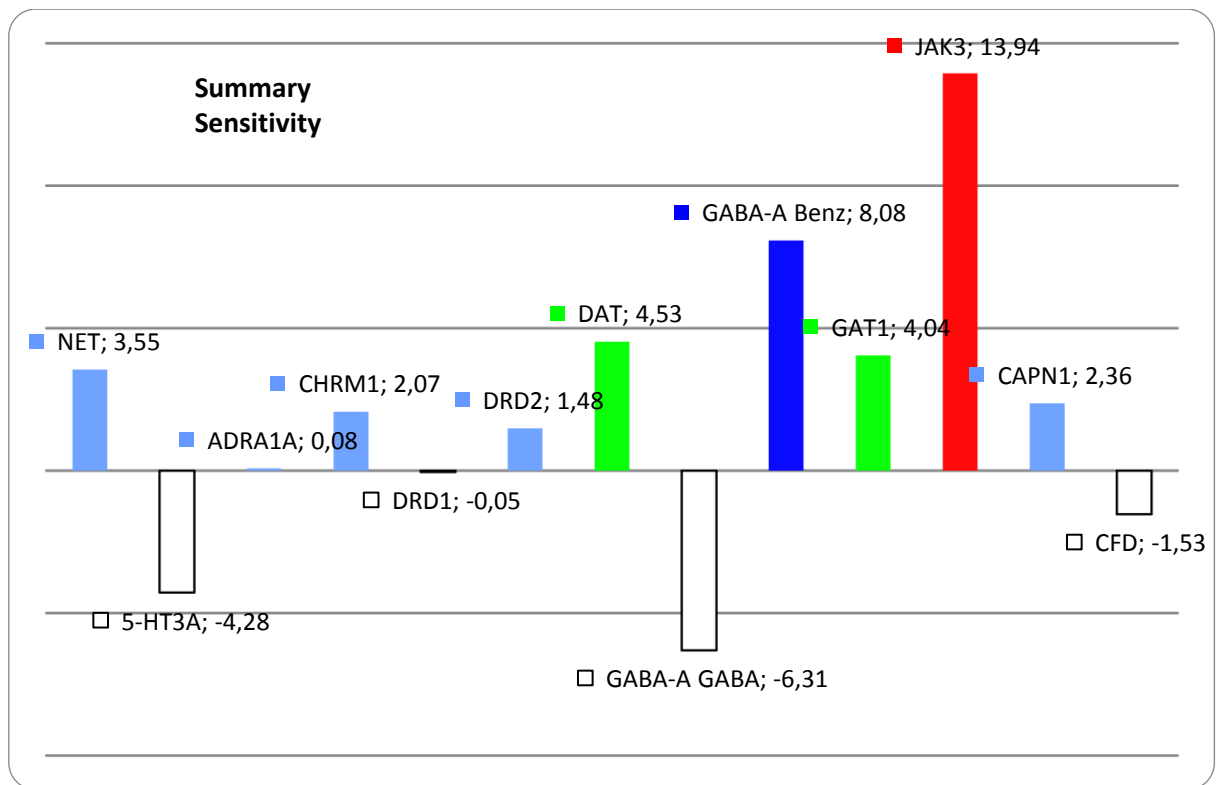


Рисунок 25 – Суммарные показатели пошагового анализа чувствительности входных нейронов нейросетевой модели для SERT действия соединения L-17

Примечание: 5-HT3A – 5-HT3A рецептор; SERT – серотониновый транспортер; CHRM1 – холинорецептор M1; DRD1 дофаминовый рецептор D1; DRD2 – дофаминовый рецептор D2; DAT – дофаминовый транспортер; ADRA1A – адренорецептор A1; NET – норадреналиновый транспортер; GABA-A_GABA – ГАМК-А рецептор, гамк-связывающий сайт; GABA-A_Benz – ГАМК-А рецептор, бензодиазепиновый сайт; GAT1 – ГАМК-транспортер 1; JAK3 – тирозин-протеин киназа JAK3; CAPN1 – кальпаин; CFD – комплиментарный фактор D (адипсин).

Пошаговый анализ чувствительности, в отличие от общего анализа чувствительности, позволил выявить неодинаковое влияние активности входных нейронов на сигнал выходного нейрона NET.

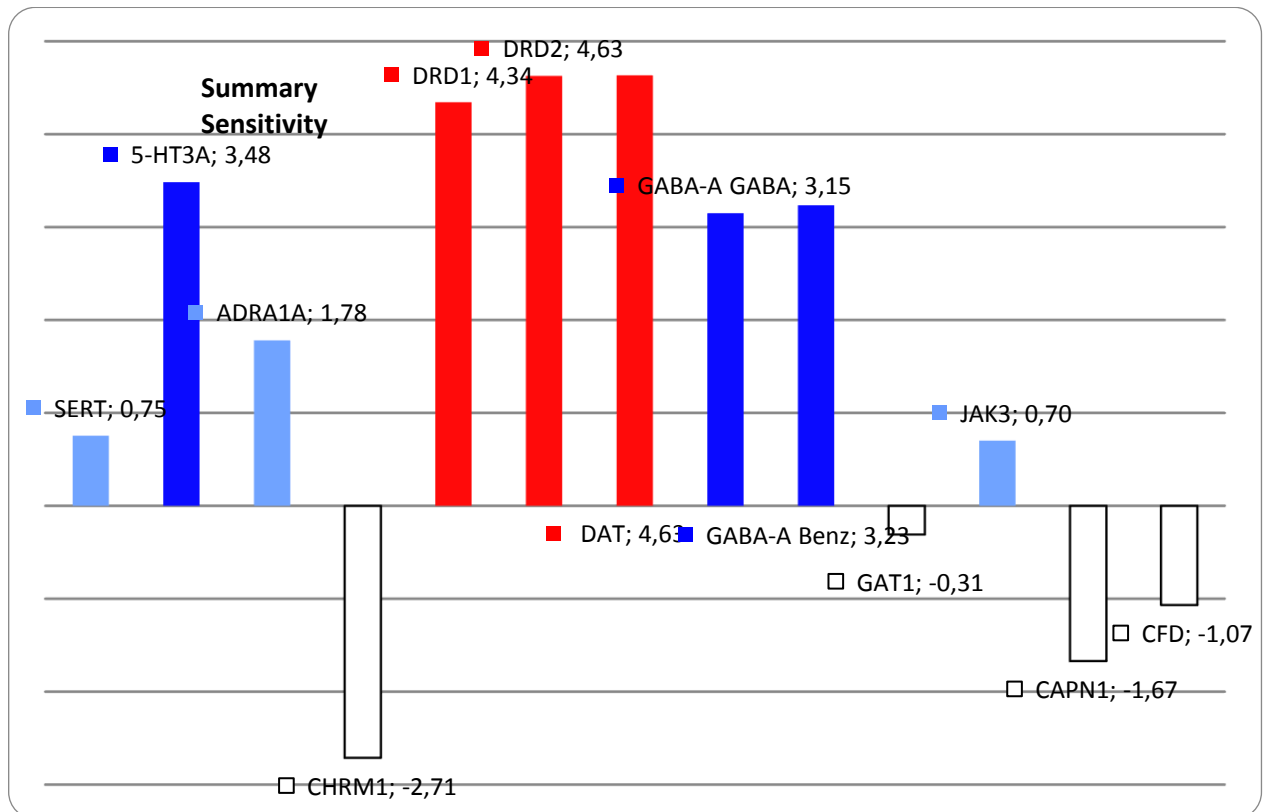


Рисунок 26 – Суммарные показатели пошагового анализа чувствительности входных нейронов нейросетевой модели для NET действия соединения L-17

Примечание: 5-HT3A – 5-HT3A рецептор; SERT – серотониновый транспортер; CHRM1 – холинорецептор M1; DRD1 – дофаминовый рецептор D1; DRD2 – дофаминовый рецептор D2; DAT – дофаминовый транспортер; ADRA1A – адренорецептор A1; NET – норадреналиновый транспортер; GABA-A_GABA – ГАМК-A рецептор, гамк-связывающий сайт; GABA-A_Benz – ГАМК-A рецептор, бензодиазепиновый сайт; GAT1 – ГАМК-транспортер 1; JAK3 – тирозин-протеин киназа JAK3; CAPN1 – кальпаин; CFD – комплиментарный фактор D (адипсин).

Наиболее сильно влияют на активность норадреналинового транспортера дофаминергические биомедицины – дофаминовые рецепторы DRD1 и DRD2, а также дофаминовый транспортер DAT. Существенно влияют на активность NET

активность ГАМК-А рецептора (оба его сайта) GABA-A_GABA и GABA-A_Benz, а также активность 5-HT3A серотонинового рецептора.

Влияние JAK3 киназы и ГАМК-транспортера GAT1 на NET незначительно. Три входных нейрона оказывают отрицательное влияние на сигнал выходного нейрона NET – M1-холинорецептора CHRM1, кальпаин CAPN1 и адипсин CFD. Сопоставление рисунков. 24-26 показывает, что друг на друга целевые мишени SERT и NET влияют незначительно, т.е. мультитаргетные механизмы действия соединения L-17 на серотониновый транспортер SERT и норадреналиновый транспортер NET различаются.

По данным *таблиц 18 и 19* выполнен ландшафтный анализ. Ландшафты показателей пошагового анализа чувствительности входных нейронов нейросетевых моделей для SERT и NET приведены на *рисунках 27 и 28*.

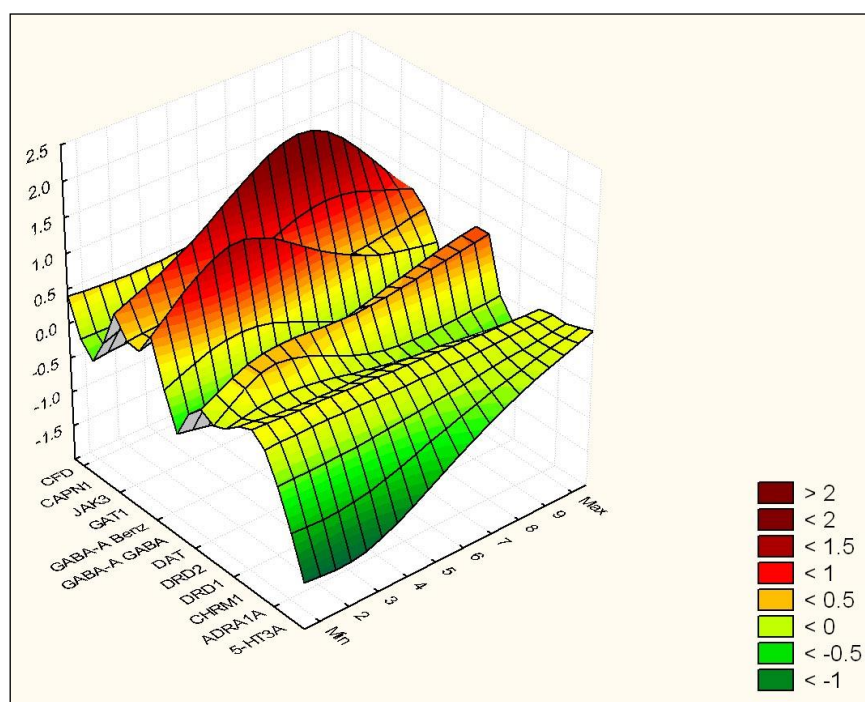
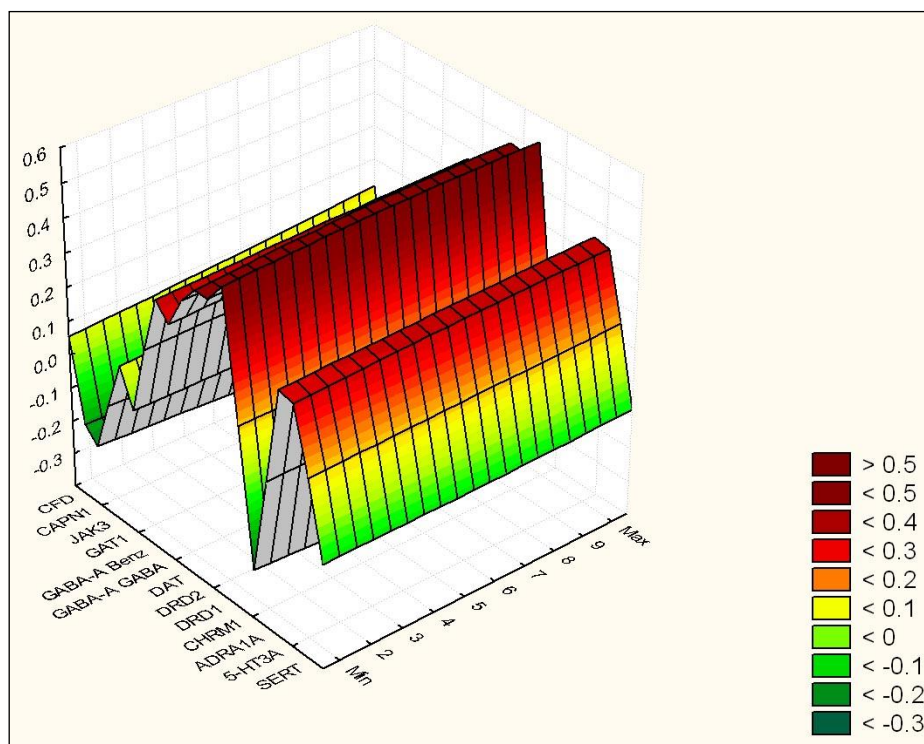


Рисунок 27 – Ландшафт показателей пошагового анализа чувствительности всех входных нейронов нейросетевой модели для SERT действия соединения L-17



**Рисунок 28 – Ландшафт показателей пошагового анализа
сензитивности всех входных нейронов нейросетевой модели для NET
действия соединения L-17**

Результаты ландшафтного анализа хорошо иллюстрируют ранее сделанный вывод о существенно различной структуре механизмов мультитаргетного действия соединения L-17 на серотониновый транспортер SERT и норадреналиновый транспортер NET. Для модели SERT целевая биомишень изменяет свою чувствительность в зависимости от уровней активации других биомишеней. Для модели NET целевая биомишень имеет постоянную чувствительность, которая не зависит от степени активации других биомишеней.

3.12. – Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ со специфическими сайтами наиболее важных биомишеней

Обобщение результатов анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17 по данным докинга и нейросетевого моделирования приведено в табл. 21 и 22. Три знака «+» соответствуют сильному влиянию; два – умеренному; один – достаточно слабому; пробел – отсутствию влияния. Оценка влияния проводилась без учета его направленности: сильное отрицательное влияние также обозначалось «+++».

В результате объединения итоговых оценок степени воздействия на биомишени соединения L-17 и его структурных аналогов, получим, что наиболее значимыми мишенями, в контексте действия соединения L-17 на серотониновый SERT и норадреналиновый NET транспортеры являются (кроме SERT и NET): тирозин-киназа JAK3, M1-холинорецептор CHRM1, дофаминальный рецептор DRD1, дофаминальный рецептор DRD2 и дофаминальный транспортер DAT.

С помощью программы LigandScout 4.0 Advanced был проведен детальный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 с указанными биомишенями, в сравнении с соответствующим референсным веществом. Результаты представлены в Приложении 3. Профили взаимодействия представлены в Приложении 4.

Молекулярные механизмы связывания с сайтами биомишеней соединения L-17, в сравнении с референсными веществами:

- 1) очень сходны для DRD1, DRD2 и DAT;
- 2) сходны для NET;
- 3) различаются для SERT, JAK3 и CHRM1.

Следовательно, по характеру молекулярного механизма связывания с биомишенями соединение L-17 более всего сходно с дофаминергическими референсными веществами.

Таблица 21 – Обобщенные результаты анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17 на серотониновый транспортер

Мишень	Докинг	Сравнение с референсами	Общая сензитивность	Пошаговая сензитивность	Итоговая оценка
NET	+++	++	+	+	++
5-HT3A		++		+	+
ADRAA	+	+++			+
CHRM1	+++				+
DRD1	+++				+
DRD2	++	+	++		+
DAT	++	+++		+	++
GABA-A_GABA		+		++	+
GABA-A_Benz		+	++	++	+
GAT1	+	++		+	+
JAK3	+++	++	+++	+++	+++
CAPN1		++			
CFD			+		

Таблица 22 – Обобщенные результаты анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17 на норадреналиновый транспортер

Мишень	Докинг	Сравнение с референсами	Общая сензитивность	Пошаговая сензитивность	Итоговая оценка
SERT	+++	+			+
5-HT3A		++		++	+
ADRA1A	+	+++			+
CHRM1	+++		++	++	++
DRD1	+++		+	+++	++
DRD2	++	+	+	+++	++
DAT	++	+++	+	+++	++
GABA-A_GABA		+		++	+
GABA-A_Benz		+		++	+
GAT1	+	++	+		+
JAK3	++	++			+
CAPN1		++	+		+
CFD			+		

Изменение спектра мультитаргетного действия соединения L-17 возможно при введении в его структуру заместителей, приводящих к образованию водородных связей. Это могут быть, например, группы $-\text{COOH}$ или $-\text{NH}_2$. Следует отметить, что при этом будут меняться все профили взаимодействия, в том числе, с дофаминовыми биомишенями. Таким образом, направленное конструирование на основе соединения L-17 соединений с более оптимальным мультитаргетным действием является достаточно сложной комплексной итеративной задачей.

Список работ, опубликованных по результатам 3-ей главы:

1. Компьютерный скрининг соединений из группы тиadiaзинов с целью выявления соединений с антистрессорным и антифобическим действием / *А.П. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Г.П. Сарапульцев, Л.П. Сидорова* // материалы XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2015. С. 225.
2. Substituted thiadiazines as potential anti-stress agents. Results of (Q)SAR prediction and experiments in vivo / *A.P. Sarapultsev, P.A. Sarapultsev, L.P. Sidorova, V.V. Poroikov, O.N. Chupakhin* // *FASEB Journal*. 2016. Т. 30, № 1(приложение). С. 938.5 (Web of Science 5.498)
3. Оценка нейролептического/антистрессорного действия соединения 117 группы замещенных тиadiaзинов по данным компьютерного моделирования и экспериментов in vivo / *А.П. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Л.П. Сидорова, Г.П. Сарапульцев, Т.А. Цейтлер* // материалы XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2016. С. 201.
4. Центральное действие замещенных тиadiaзинов / *А.П. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Л.П. Сидорова, Т.А. Цейтлер, М.А. Ранцев* // материалы XX Менделеевского съезда под эгидой Международного союза

по теоретической и прикладной химии (IUPAC) в 5-ти томах. Екатеринбург, 2016. Т. 4. С. 552.

5. Substituted thiadiazines as potential cardiovascular agents. Results of (q)sar prediction and experiments in vivo / *A.P. Sarapultsev*, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, L.P. Sidorova // 7th International Conference on Drug Discovery & Therapy, At University of Sharjah, Sharjah, UAE. February 15th - 18th, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.1.3845.2889
6. Substituted thiadiazines with the anti-stress action as a promising cardiovascular drugs / O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, *A.P. Sarapultsev*, L.P. Sidorova, T.A. Tseitler // Conference: XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry, Perugia, Italy. September 11th to 14th, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.21722.75208.

ГЛАВА 4 –КАРДИОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ L-17 НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА *IN VIVO*

4.1 – Гистологические изменения при развитии экспериментального инфаркта миокарда на фоне введения соединения L-17

4.1.1 – Гистологические изменения при развитии экспериментального инфаркта миокарда

В рамках работы было осуществлено моделирование экспериментального инфаркта на лабораторных животных (крысах). Выбор этого вида экспериментальных животных был обусловлен как приемлемыми размерами, так и тем, что крысы, в отличие от собак, способны переносить достаточно большие по размерам (более 45% желудочка) инфаркты, в то время как у собак при размере инфаркта более 30% возникают фатальные нарушения ритма [100]. Кроме того, преимуществом использования крыс в качестве лабораторных животных является то, что вследствие особенностей метаболизма, все стадии ИМ протекают у крыс в сравнительно короткие сроки и оказываются достаточно ревалентными таковым у людей: все гистологические изменения у крыс в среднем протекают в два раза быстрее, чем у людей, а значительные изменения наблюдаются уже в первые 24 часа после ИМ. В то же время, видовые особенности этих животных обусловили появление ряда признаков развившегося инфаркта. Так в соответствии с анатомическими особенностями крыс, левая коронарная артерия берет начало на границе левого предсердия и борозды легочной артерии. Проксимальные участки левой коронарной артерии располагаются, в основном, интрамиокардиально, возвращаясь на поверхность эпикарда приблизительно через 3-4 мм. При этом у крыс отсутствует настоящая огибающая артерия, в результате чего септальная артерия отходит выше места

окклюзии, и при моделировании ИМ происходит только ИМ стенки желудочка, без вовлечения межжелудочковой перегородки. Еще одной анатомической особенностью крыс является то, что, как и у людей, сеть коллатеральных сосудов у них в сердце сравнительно слабо развита, вследствие чего, при моделировании ИМ у крыс обычно возникают трансмуральные ИМ, в то время как частота субэндокардиальных ИМ не превышает 3%.

Анализ гистологических срезов миокарда интактных животных (группа А) выявил типичную картину, соответствующую гистологической норме. Миокард был представлен анастомозирующими кардиомиоцитами, в эндомизии определялись кровеносные сосуды без признаков нарушения структуры сосудистой стенки (*рисунок 29*).

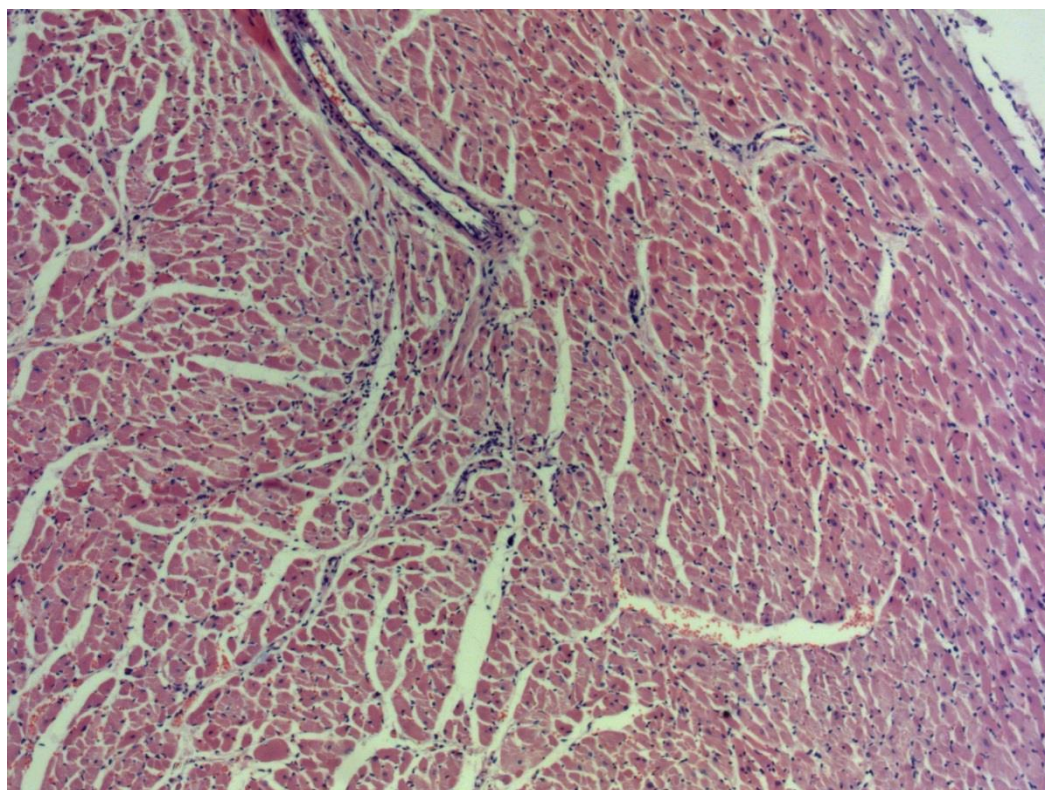


Рисунок 29 – Миокард интактного животного (группа А).

Представлен анастомозирующими кардиомиоцитами, кровеносные сосуды без признаков нарушения структуры сосудистой стенки (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На первые сутки после операции у животных с экспериментальным ИМ (группа В) зона инфаркта носила трансмуральный характер и была представлена кардиомиоцитами с явлениями кариолизиса, плазмоллизиса и плазморексиса, выявлялась умеренная диффузная инфильтрация сегментоядерными лейкоцитами без формирования демаркационной зоны. В прилежащих структурах наблюдались явления отека, полнокровия сосудов эндомизия с образованием сладж-комплексов (*рисунок 30*). Наблюдаемые в зоне деструкции полиморфноядерные лейкоциты свидетельствовали о реактивном воспалении с экссудативной реакцией. В микрососудах перифокальной зоны обнаруживались эритроцитарные «сладж-комплексы» и очаговые кровоизлияния. Значительные изменения выявлялись не только в зоне некроза, но и в участках, прилегавших к области инфаркта. В них определялась частичная атрофия миокардиоцитов, выраженная дистрофическая реакция с отёком стромы, потерей поперечной и продольной исчерченности миофибрилл (*рисунок 30*).

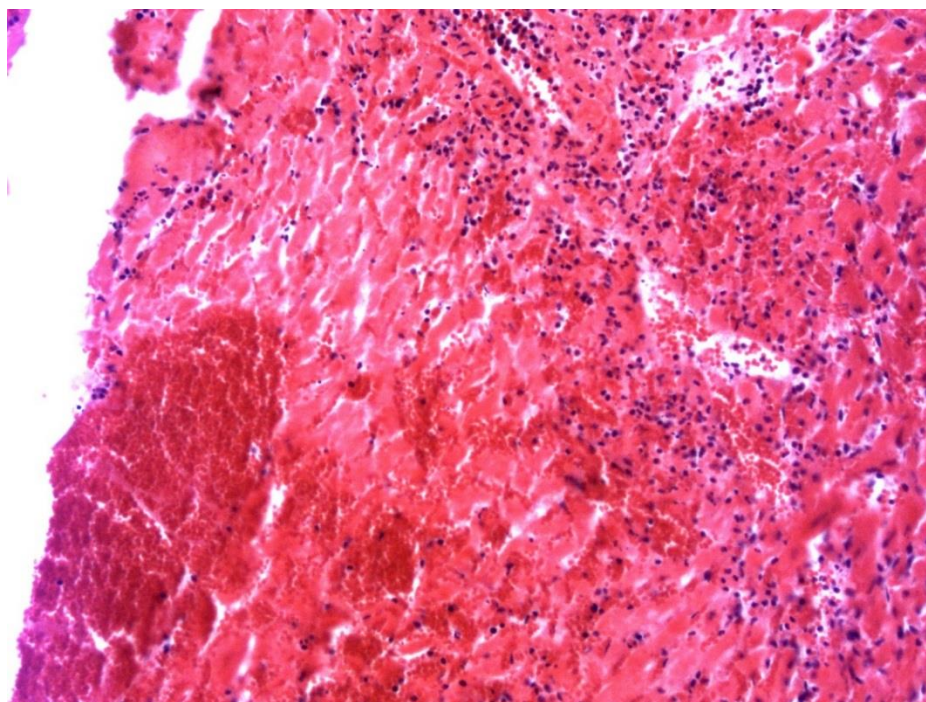


Рисунок 30 – Экспериментальный ИМ на 1 сутки эксперимента. Некроз кардиомиоцитов с умеренным лейкоцитарной инфильтрацией и участками кровоизлияния (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На пятые сутки после операции у животных группы В, зона инфаркта определялась как преимущественно трансмуральная. Некротизированные кардиомиоциты были окружены демаркационным валом, обнаруживались признаки формирования грануляционной ткани, появляются фибробласты, гемокапилляры. В прилежащих структурах обнаруживалось распространение инфильтрата по эндомизию (*рисунок 31*).

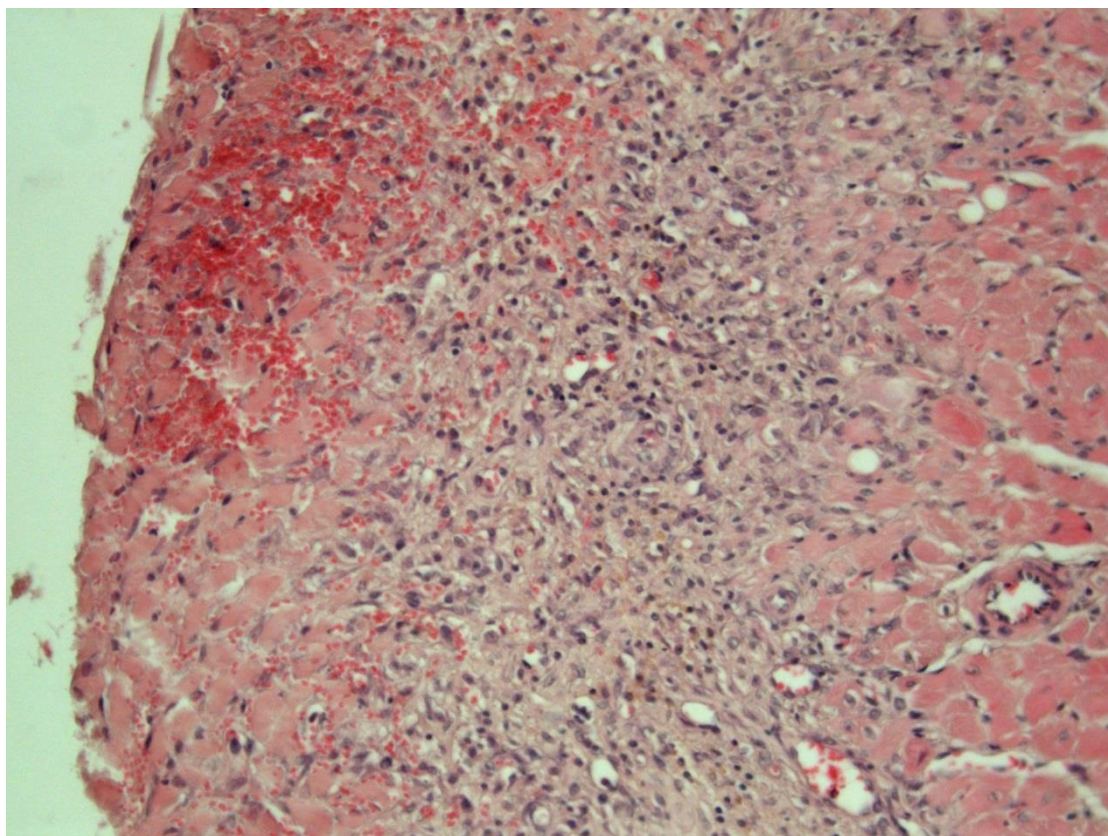


Рисунок 31 – Экспериментальный ИМ на 5 сутки эксперимента. Некротизированные кардиомиоциты окружены демаркационным валом, признаки формирования грануляционной ткани (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На седьмые сутки после операции у животных группы В, зона некроза в стенке левого желудочка в 100% случаев имела трансмуральный характер. Фиксировалось появление гистологических признаков стадии организации (формирование грануляционной ткани по краям зоны некроза с большим количеством фибробластов и макрофагов, синусоидальных гемокапилляров,

замещающих пораженный участок), но при этом сохранялась дезинтеграция мышечных клеток и инфильтрация миокарда лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами. В ряде случаев в сосудах определялось краевое стояние лейкоцитов с признаками лейкодиapedеза (*рисунок 32*).

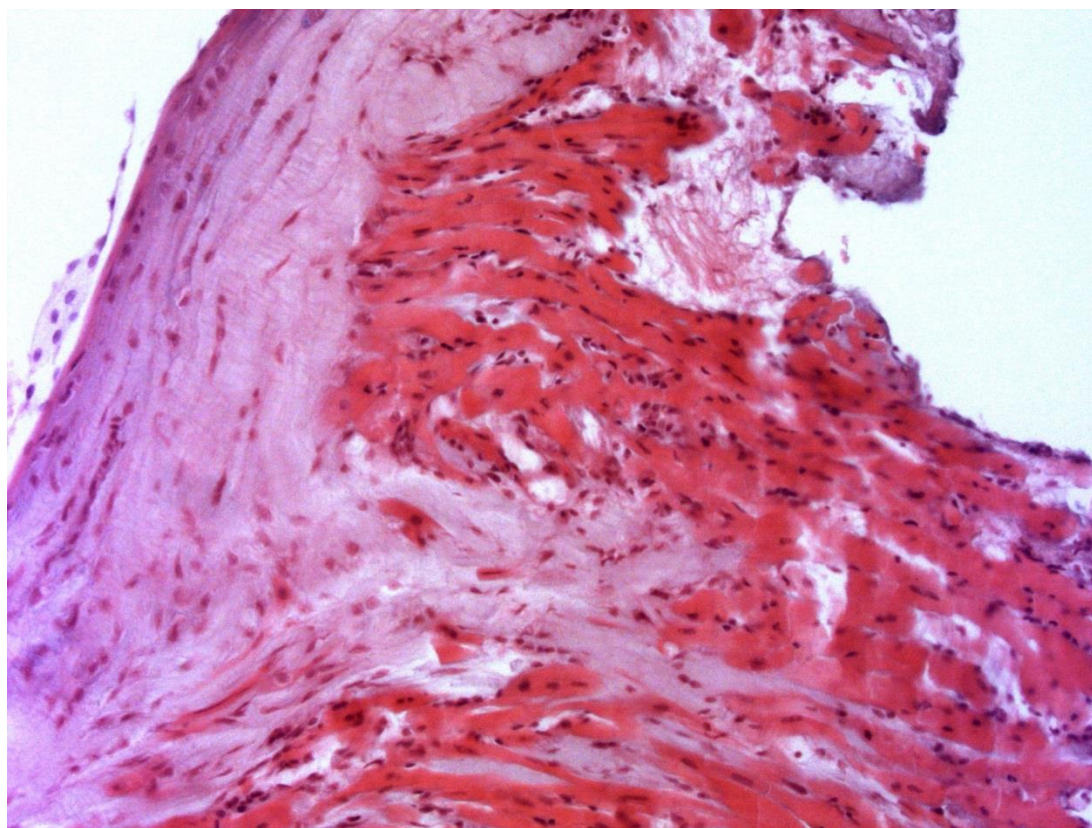


Рисунок 32– Экспериментальный ИМ на 7 сутки эксперимента. Формирование грануляционной ткани по краям зоны некроза с большим количеством фибробластов и макрофагов, синусоидальных гемокапилляров, на фоне сохранения дезинтеграции мышечных клеток и инфильтрации миокарда лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На четырнадцатые сутки экспериментального ИМ (группа В) в зоне повреждения формировались структуры грануляционной ткани с волокнистым и клеточным компонентом; краевая васкуляризация зоны повреждения. Сохранялась лимфоидная инфильтрация рубца (*рисунок 33*).

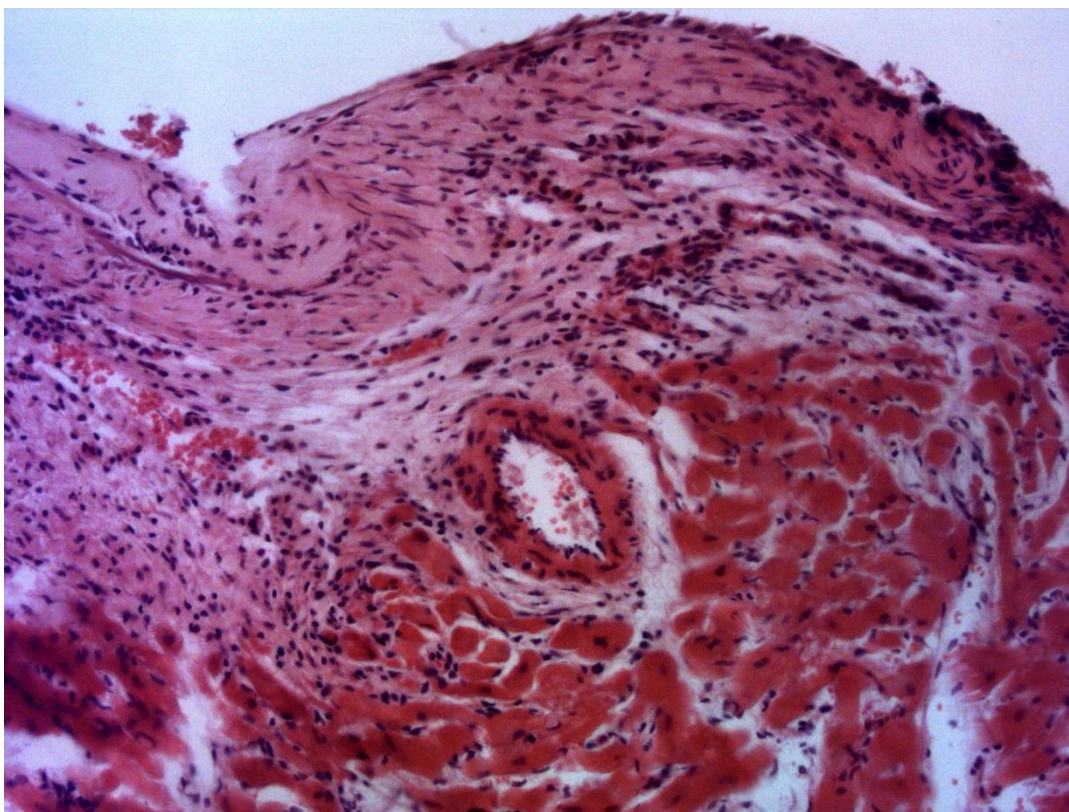


Рисунок 33— Экспериментальный ИМ на 14 сутки эксперимента. Формирование структур грануляционной ткани с волокнистым и клеточным компонентом; краевая васкуляризация зоны повреждения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

Обсуждение. Согласно полученным результатам, уже на первые сутки исследования у животных развился трансмуральный инфаркт миокарда, типичный для данного вида, определялся массивный выход лейкоцитов из сосудов и выраженная инфильтрация очага некроза с появлением кардиомиоцитов с явлениями кариолизиса, плазмолизиса и плазморексиса [34]. Наблюдаемое явление отека и полнокровия сосудов эндомизия с образованием сладж-комплексов в прилежащих структурах (*рисунок 30*), также типичны для первых суток экспериментального инфаркта, при том, что в ишемизированной зоне ветви коронарной артерии обычно находятся в спавшемся состоянии [34]. При этом, отличительной чертой гистологической картины на первые сутки инфаркта миокарда является неоднородность картины в зоне ишемии (так как не

все клетки подверглись необратимым изменениям), нечеткое отграничение участков ишемии от окружающей ткани и отсутствие демаркационного вала.

Последний, согласно литературным данным, начинает формироваться уже с третьих суток (*рисунок 31*), когда и начинается «оформление» участков инфаркта [34]. Со стороны соединительной ткани, в перинфарктной зоне, для третьих-пятых суток уже типично выявленное на гистологических препаратах, формирование грануляционной ткани, богатой фибробластами и капиллярами. При этом, для интактных отделов миокарда, на данные сроки, характерно выявленное в ходе гистологического исследования полнокровие сосудов микроциркуляторного русла и тебезиевых вен, а также распространение инфильтрата по эндомизию [34], что и обнаруживалось на гистологических препаратах. К 72 часам наблюдается практически полная замена поврежденных кардиомиоцитов клеточными элементами воспаления.

На пятые сутки после операции у животных с экспериментальным ИМ, зона инфаркта определялась как преимущественно трансмуральная. Некротизированные кардиомиоциты были окружены демаркационным валом, обнаруживались признаки формирования грануляционной ткани, появляются фибробласты, гемокапилляры. В прилежащих структурах обнаруживалось распространение инфильтрата по эндомизию (*рисунок 31*).

На седьмые сутки, зона некроза в стенке левого желудочка в 100% случаев имела трансмуральный характер [34]. На периферии инфаркта фиксировалось появление гистологических признаков стадии организации (формирование грануляционной ткани по краям зоны некроза с большим количеством фибробластов и макрофагов, синусоидальных гемокапилляров, замещающих пораженный участок), но при этом сохранялась дезинтеграция мышечных клеток и инфильтрация миокарда лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами. В примыкающих участках миокарда в части сосудов определялось краевое стояние лейкоцитов с признаками лейкодиapedеза (*рисунок 32*).

К 14 суткам, в ишемизированной зоне сохранялись очаги некроза, окруженные рубцовой тканью, а также наблюдались типичные для данных сроков признаки восстановления сосудистого русла (*рисунок 33*).

В целом, можно подчеркнуть, что примененная экспериментальная модель позволила получить типичную гистоморфологическую картину инфаркта миокарда; при этом, и сроки формирования и появления отдельных гистоморфологических признаков, и сама гистологическая картина полностью соответствовали описаниям подобных моделей, известным из литературы [34].

4.1.2 – Гистологические изменения на фоне введения соединения L-17

На первые сутки эксперимента в миокарде животных группы D (на фоне введения соединения L-17) зона инфаркта локализуется субэпикардially в стенке левого желудочка, ишемический некроз без перифокальной экссудативной реакции (*рисунок 34*).

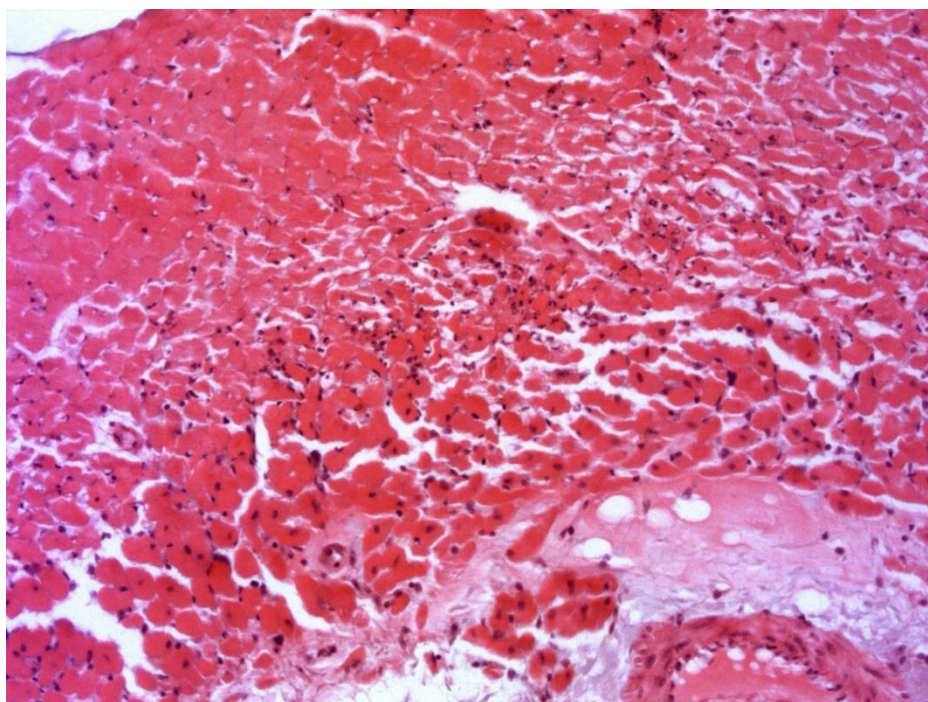


Рисунок 34 – Экспериментальный ИМ на 1 сутки эксперимента на фоне введения соединения L-17. Некроз кардиомиоцитов, без перифокальной клеточной реакции (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400).

На пятые сутки экспериментального ИМ у животных группы D (на фоне введения соединения L-17) в зоне инфаркта начинается формирование грануляционной ткани, представленной фибробластами, коллагеновыми волокнами, многочисленными синусоидальными капиллярами, при этом, вся зона рубца инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и макрофагами (рисунок 35).

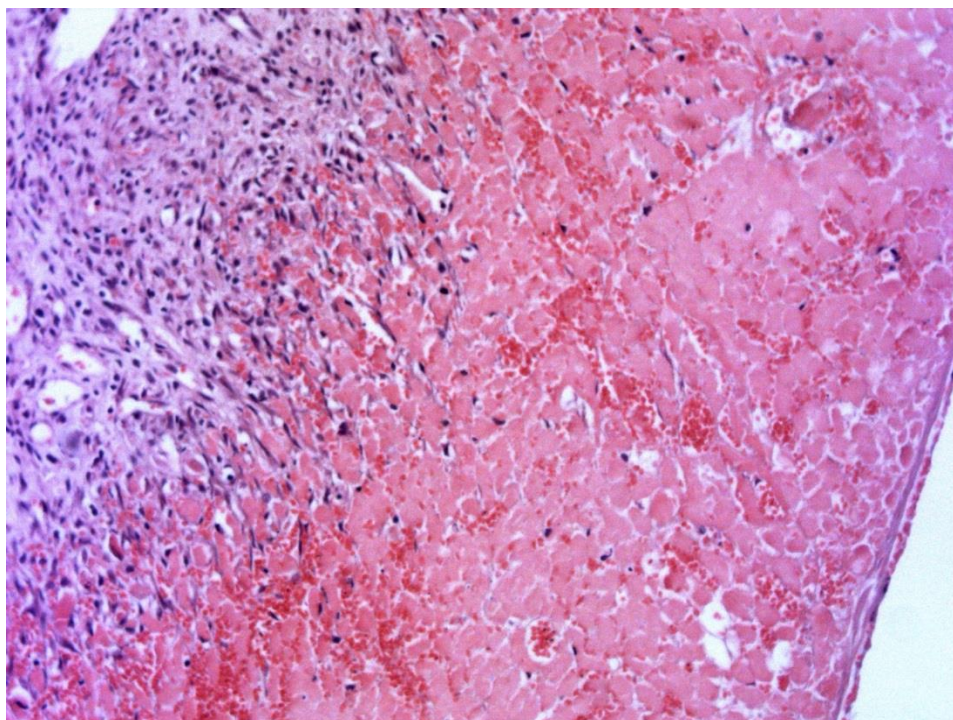


Рисунок 35 – Экспериментальный ИМ на 5 сутки эксперимента на фоне введения соединения L-17. Грануляционная ткань, представленная фибробластами, коллагеновыми волокнами, синусоидальными капиллярами. Инфильтрация лимфоцитами и макрофагами (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400).

На седьмые сутки эксперимента в миокарде животных группы D (на фоне введения соединения L-17), зона инфаркта представлена грануляциями, в которых определяется хорошо выраженный волокнистый компонент соединительной ткани, что свидетельствует о формировании рубца. При этом, зона грануляции инфильтрирована преимущественно лимфоцитами,

макрофагами и значительным количеством кардиомиоцитов. Перифокальная зона инфаркта значительно выражена (*рисунок 36*).

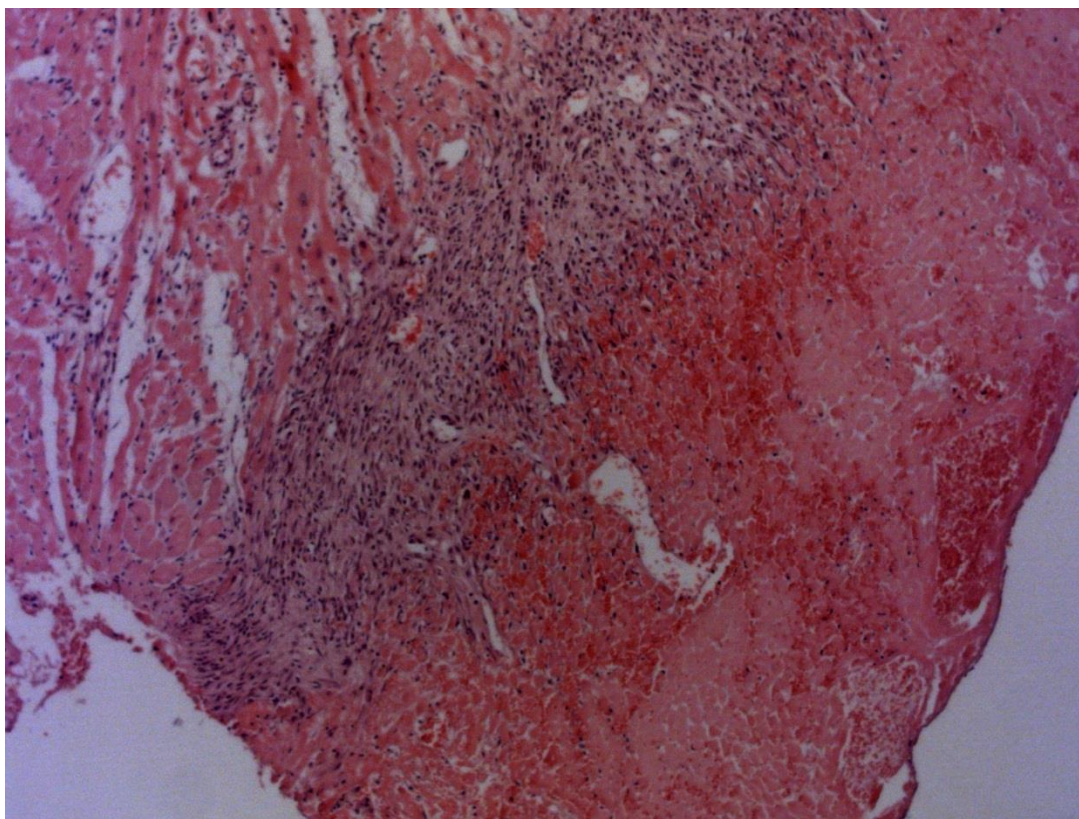


Рисунок 36 – Экспериментальный ИМ на 7 сутки эксперимента на фоне введения соединения L-17. Зона инфаркта представлена грануляциями с выраженным волокнистым компонентом соединительной ткани. Инфильтрация лимфоцитами и макрофагами (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

Обсуждение. Проведённое гистоморфологическое исследование показало, что в 1 сутки исследования у животных развивается трансмуральный ИМ, при котором происходит гибель кардиомиоцитов во всех слоях сердца: эпикарде, миокарде и эндокарде, причём, трансмуральное поражение сохраняется также на 5 и 7 сутки исследования.

Однако на фоне введения соединения L-17 принципиально изменяется как величина, так и характер воспалительной реакции при экспериментальном ИМ. Уже начиная с первых суток, ИМ располагается только субэпикардially, не

охватывая все слои сердца. Если в первые сутки развития патологического процесса при ИМ выявляется диффузная инфильтрация сегментоядерными лейкоцитами, сохраняющаяся даже на седьмые сутки инфаркта, то на фоне введения соединения L-17 на первые сутки ИМ выявляется зона повреждения без выраженной перифокальной экссудативной реакции.

Наконец, введение животным соединения L-17 приводит к более раннему и более активному репаративному процессу в зоне поражения. Так если при ИМ без лечения признаки формирования грануляционной ткани выявляются только на седьмые сутки и то лишь структурах, прилежащих к зоне некротизированных кардиомиоцитов, то при использовании соединения L-17 грануляционная ткань появляется в зоне подострого воспаления уже в пятые сутки ИМ и практически полностью замещает зону инфаркта на седьмые сутки, при этом эндотелиальные клетки капилляров появляются на пятые сутки и активно участвуют в образовании синусоидальных капилляров.

Уменьшение величины развивающегося ИМ и ускорение процессов репарации на фоне введения соединения L-17 обусловлено способностью данного соединения снижать нейтрофильную инфильтрацию и повышать лимфо-моноцитарную инфильтрацию повреждённого миокарда уже на ранних этапах развития ИМ. Действительно, основной причиной повреждения миокардиоцитов при ИМ является производство нейтрофилами цитотоксических веществ, включая активные формы кислорода, виды, протеазы и хемоаттрактанты для других клеток [186]. При этом, сериновые протеазы и эластаза нейтрофилов не только усугубляют воспалительный процесс при ишемии-реперфузии, но и активируют свертывание в системе микроциркуляции миокарда [186].

Подтверждением способности нейтрофилов усугублять течение ИМ являются и данные о том, что снижение количества нейтрофилов при инфаркте миокарда приводит к значительному уменьшению размеров инфаркта. Причём, этот эффект не зависит от того, каким путём осуществляется уменьшение

количества нейтрофилов: введением антител к нейтрофилам, и их метаболитам, или использованием специальных фильтров для нейтрофилов [270].

Но для эффективного разрешения воспаления необходима не только ликвидация гранулоцитов, но и поступление в повреждённые ткани достаточного количества одноядерных клеток (макрофагов и лимфоцитов), которые, в частности, макрофаги, способны как поглощать апоптотизированные и некротизированные клетки в поврежденной ткани, активизировать фибробласты, так и способствовать формированию грануляционной ткани и неоангиогенезу. Эффективность противовоспалительного и иммуносупрессивного действия макрофагов при ИМ повышается также за счёт стерильности воспаления, при котором отсутствуют классические маркеры макрофагов (iNOS, IFN γ , и IL-12), но повышается регуляция маркеров репарации тканей (аргиназа-1, YM1 и Trem2), а также индуцируется противовоспалительный цитокин IL-10.

В принципе данные гистоморфологического исследования показали, что соединение L-17 при экспериментальном ИМ обладает иммуномодуляторный эффект, меняя экссудативно-деструктивный тип воспаления на пролиферативно-клеточный.

Отдельного обсуждения требует объяснение способности соединения L-17 предотвращать инфарктирование субэндокардиальной зоны левого желудочка сердца, поскольку некроз миоцитов при ИМ начинается с эндокарда, распространяясь с увеличением длительности коронарной окклюзии на субэпикард. Так в эксперименте на собаках трансмуральный некроз развивался в 38 $\pm$ 4% после 40 мин ишемии, в 57 $\pm$ 7% после 3 часовой ишемии, в 71 $\pm$ 7% после 6 часовой ишемии и в 85 $\pm$ 2% после 24 часов ишемического повреждения. Эти результаты свидетельствуют о том, что ишемизированный, но жизнеспособный миокарда доступен для фармакологического или хирургического спасения, по крайней мере, в течение 3 – 6 часов после окклюзии [369].

Патофизиологический процесс, происходящий в субэндокардиальной зоне при ИМ, называется феноменом невозобновления кровотока (no-reflow), основой

которого является неадекватная перфузия миокарда без ангиографических проявлений механической закупорки сосудов [49]. Основную роль в возникновении феномена no-reflow играет микроциркуляторная дисфункция, которая возникает у значительной части больных, несмотря на агрессивное лечение тромболитиками или чрескожными методами реваскуляризации, и является неблагоприятным прогностическим фактором [110, 265].

Причиной развития феномена no-reflow являются несколько факторов. Во-первых, при глобальной ишемии кровеносные сосуды в эндокардиальной половине миокарда левого желудочка теряют способность к реперфузии из-за внесосудистого сжатия. Как показало электронно-микроскопическое исследование, через 90 мин ишемического повреждения развиваются серьезные повреждения капилляров: появляются эндотелиальные клетки с большими внутрипросветными выступами и уменьшаются пиноцитозные пузырьки. Причём, внутриклеточный отек, проявляющийся снижением эффективного диаметра капилляров, наиболее выражен в эндокарде, где дефицит перфузии наиболее выражен. Правда, некоторые исследователи утверждают, что в патогенезе субэндокардиального феномена no-reflow основную роль играют внутрисосудистые контрактуры, а не отёк [317].

Наиболее вероятной причиной коронарного спазма являются катехоламины (адреналин и норадреналин), появляющиеся на самых ранних этапах развития ИМ, причём, высокие плазменные уровни норадреналина при обширном ИМ предполагают скорее миокардиальное, чем экстрамиокардиальное происхождение плазменного уровня норадреналина [343]. При этом активация симпатoadреналовой системы способствует возникновению острого инфаркта миокарда, который, в свою очередь, приводит к активации симпатoadреналовой системы.

Под воздействием симпатической стимуляции, в свою очередь, может происходить сужение как артерий, так и артериол, причём, наибольший процент изменений диаметра наблюдается в первичных и вторичных артериолах [257]. Так, доказано, что адренергические воздействия способны вызывать более

выраженную сердечную ишемию, чем даже понижение коронарного кровотока за счёт индуцирования обструктивного коронароспазма и агрегации тромбоцитов [383]. Вторым фактором, способным вызвать феномен no-reflow, считаются внутрисосудистые тромбоцитарные или фибриновые тромбы. Подтверждением этого является то, что ингибирование циклооксигеназы, катализирующей реакцию превращения арахидоновой кислоты в простагландин H₂ (предшественник тромбоксана A₂), приводит к блокированию образования тромбов в микрососудах при ишемии. И всё-таки, по мнению целого ряда исследователей, центральную роль в развитии феномена no-reflow играют нейтрофильные лейкоциты, поскольку даже реперфузия вызывает интенсивную нейтрофильную инфильтрацию, усиливающую воспалительную реакцию при инфаркте миокарда. При этом, количество лейкоцитов в капиллярах зоны no-reflow в десять раз превышает число лейкоцитов в интактных зонах и достоверно коррелирует с выраженностью закупорки капилляров, а степень выраженности феномена no-reflow снижается при экспериментальном уменьшении количества нейтрофилов [218] или ослаблении адгезии лейкоцитов [342]. Тем более, что роль адгезии лейкоцитов при ИМ трудно переоценить, ибо само инфарктирование миокарда повышает экспрессию генов молекул адгезии (LFA-1, Mac-1, VLA-4 и ICAM-1), что способствует не только адгезии нейтрофилов и моноцитов к эндотелию, но и образованию микроагрегатов, вызывающих закупорку микрососудов [219].

Определённую роль в формировании феномена no-reflow играют и активные формы кислорода, причем, если на первом этапе одним из генераторов хемотаксиса нейтрофилов является сама ишемия, производящая активные формы кислорода, то на втором этапе в агрегированных с эндотелием нейтрофилах инициируется производство активных форм кислорода, усиливающих повреждение микрососудов [292]. Так, в условиях с низкой адгезией нейтрофилов/миоцитов производство такой реактивной формы кислорода, как H₂O₂, снижается до 5% от его производства при высокой адгезии [279].

Кроме того, активированные нейтрофилы могут выделять из азурофильных гранул миелопероксидазу, продуцирующую из перекиси водорода молекулярный кислород и эластазу, которые повреждают клеточные и тканевые структуры [18], приводя к усугублению синдрома no-reflow. Интересно, что для генерации активных форм кислорода нейтрофилами в постишемическом миокарде необходима активация комплемента, поскольку в эксперименте мощный ингибитор классических и альтернативных путей комплемента растворимый рецептор комплемента 1 (sCR1) предотвращает активацию окислительного всплеска нейтрофилов.

Способность соединения L-17, обладающего антиагрегационными свойствами [74, 75, 76, 77, 79], уменьшать нейтрофильную инфильтрацию зоны инфаркта, интенсивность воспалительной реакции (по данным определения трансаминаз) и предотвращать инфарктирование субэндокардиальной зоны левого желудочка сердца, позволяет сделать вывод о возможности соединения L-17 предотвращать развитие при ИМ феномена no-reflow. Тем более, что соединение L-17 значительно и достоверно снижает уровень провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-7 и TNF), которые способны активизировать все вышеперечисленные механизмы no-reflow. Так, воздействие IL-6 вызывает значительную дозозависимую вазоконстрикцию A2-A4 артериол, и генерирует образование в клетках активных форм кислорода, в том числе и в эндотелиоцитах [264]. Кроме того, IL-6, как и IL-1 β , может вызывать накопление H₂O₂ в митохондриях, а TNF- α может стимулировать образование активных форм кислорода в нейтрофилах. Воздействуют интерлейкины и на коагуляцию. Например, IL-1 и TNF- α вызывают *in vitro* агрегацию тромбоцитов человека, IL-1 через 24 часа от начала воздействия увеличивает продукцию и секрецию прокоагулянтов лимфоцитами, а сочетание IL-17 и TNF вызывает провоспалительные, прокоагулянтные и протромботические процессы на эндотелиальных клетках человека, причём, статины могут ингибировать провоспалительные и протромботические эффекты IL-17 и TNF- α на эндотелиальные клетки. Интерлейкины способны также стимулировать

локальный нейтрофилёз в зоне воспаления. Например, нейтрофилёз в тканях может вызывать TNF- α , продуцируемый дендритными клетками и макрофагами, и IL-1, а IL-6 может стимулировать выработку хемокинов MIP-2 и MIP-1 α , которые рекрутируют и активизируют полиморфно-ядерные лейкоциты.

Таким образом, проведённое исследование показало способность соединения L-17 предотвращать развитие феномена no-reflow при ИМ.

4.2 – Активность трансаминаз при экспериментальном инфаркте миокарда на фоне введения соединения L-17

4.2.1 – Активность трансаминаз при экспериментальном инфаркте миокарда

Несмотря на появление новых методов диагностики ИМ, определение активности ряда ферментов (биохимических маркеров ИМ) является надёжным информативным тестом, имеющим, в силу своей простоты, ряд преимуществ перед другими методами постановки диагноза. Так, биохимические маркеры обеспечивают проведение дифференциальной диагностики ИМ, коррелируют с тяжестью заболевания, и позволяют судить о его прогнозе.

При этом в настоящее время для диагностики ИМ используется комплекс ферментов, наибольшее значение из которых имеют органоспецифичные тканевые ферменты. К ним относятся аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и креатинфосфокиназа (КФК). Из перечисленных ферментов, к ранним биохимическим маркерам повреждения миокарда относится КФК, к поздним – ЛДГ, АСТ и АЛТ. В настоящем исследовании использовалось определение изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ1) и креатинфосфокиназы (КФК МВ), поскольку уровень активности этих изоферментов в миокарде выше, чем в других тканях или в сыворотке крови, а потому определение активности этих изоферментов является чувствительным, информативным тестом острого

повреждения сердца, особо специфичным для острого ИМ [242]. Повреждение миокардиоцитов приводит к увеличению активности ферментов в сыворотке крови, характеризующей степень и глубину повреждения тканей. В исследованные сроки наблюдалась характерная типичная картина изменения активности ферментов, характеризующаяся увеличением активности определяемых трансаминаз (*таблица 23*).

Показатели активности ферментов в плазме крови у ложнооперированных животных (группа С). При анализе полученных данных обращает на себя внимание то, что у ложнооперированных животных по сравнению с животными контрольной группы (группы А), определялась повышенная активность всех определяемых трансаминаз. Так, показатели активности ЛДГ увеличивались до $231,1 \pm 32,3$ U/l (у животных контрольной группы – $165,2 \pm 34,6$ U/l); показатели активности КФК МВ увеличивались до $162,3 \pm 28,0$ U/L (у животных контрольной группы – $126,8 \pm 14,6$ U/l); показатели активности АСТ на первые сутки после торакотомии повышались до $14,6 \pm 0,9$ U/l (у животных контрольной группы $11,6 \pm 0,8$ U/l); уровень активности АЛТ повышался до $13,9 \pm 0,7$ U/l (у животных контрольной группы – $10,5 \pm 0,7$ U/l);

На пятые сутки эксперимента наблюдалось снижение показателей активности исследуемых ферментов до нормы, кроме АСТ: $12,7 \pm 0,8$ U/l в группе ложнооперированных животных по сравнению с показателями контрольной группы $11,6 \pm 0,8$ U/l. Данный факт может быть обусловлен стрессорной ситуацией, связанной с хирургическим вмешательством, поскольку этот фермент (АСТ) является маркером стрессорного воздействия [39].

На 7 сутки активность всех изучаемых ферментов в группе А не отличалась от показателей интактной группы животных.

Показатели активности ферментов в плазме крови у животных с экспериментальным ИМ (группа В). У животных с экспериментальным ИМ (группа В) во все исследуемые сроки уровень активности практически всех определяемых ферментов превышал соответствующие показатели как

интактных животных, так и показатели животных группы С (ложнооперированных).

Таблица 23 – Результаты биохимического исследования активности ферментов – маркеров инфаркта миокарда в крови экспериментальных животных

Время после операции, сутки	Ложнооперированные (группа С), n=5 M±m	ИМ (группа В – инфаркт миокарда), n=10, M±m
Лактатдегидрогеназа, Общая U/l (165,2±34,6)		
1 сутки	231,1±32,3*	515,8±60,1*#
5 сутки	154,7±25,9	262,3±22,1*#
7 сутки	162,2±33,6	345,5±52,9*#
7 сутки	132,1±14,4	248,1±41,5*#
Лактатдегидрогеназа, ЛДГ 1,2 U/l (165,2±34,6)		
1 сутки	231,1±32,3*	515,8±60,1*#
5 сутки	154,7±25,9	262,3±22,1*#
7 сутки	162,2±33,6	345,5±52,9*#
Креатинфосфокиназа КФК МВ U/l (165,2±34,6)		
1 сутки	231,1±32,3*	515,8±60,1*#
5 сутки	154,7±25,9	262,3±22,1*#
7 сутки	162,2±33,6	345,5±52,9*#
Креатинфосфокиназа КФК МВ мкмоль/мин/л (126,8±14,6)		
1 сутки	162,3±28,0*	175,2±9,6*
5 сутки	129,9±12,3	168,5±21,6*#
Аспартатаминотрансфераза, АСТ U/l (11,6±0,8)		
1 сутки	14,6±0,9*	24,9±2,0*#
5 сутки	12,7±0,8*	17,4±3,0*#
7 сутки	11,8±1,0	17,3±1,4*#
Аланинаминотрансфераза, АЛТ U/l (10,5±0,7)		
1 сутки	13,9±0,7*	23,7±3,7*#
5 сутки	10,7±0,8	18,7±3,31*#
7 сутки	10,9±0,8	17,5±1,6*#

Примечание: * – ($p < 0,05$) различия с интактными животными достоверны; # – ($p < 0,05$) различия с животными группы С достоверны; ($p < 0,05$).

Так, на первые сутки определялись пиковые значения показателей активности ЛДГ1-2 (515,8±60,1 U/l) и АЛТ (23,7±3,7 U/l), которые достоверно превышали показатели животных групп А и С; также наблюдалось возрастание

уровня активности АСТ до $24,9 \pm 2,0$ U/l, что в два раза выше активности фермента у интактных животных и в 1.7 раза выше активности фермента у ложнооперированных животных (группа С). Только активность КФК МВ в первые сутки на фоне экспериментального ИМ достоверно не отличалась от показателей интактных и ложнооперированных животных.

На пятые сутки экспериментального ИМ наблюдалось достоверное снижение активности показателей ЛДГ1-2 ($262,3 \pm 22,1$ U/l), АСТ ($17,4 \pm 3,0$ U/l) и АЛТ ($18,7 \pm 3,31$ U/l) по сравнению с соответствующими показателями первых суток, хотя эти показатели всё равно оставались выше показателей интактных и ложнооперированных животных. Интересно, что активность КФК МВ на пятые сутки эксперимента, даже при её снижении, оказалась выше в группе В, чем в группе С, за счёт интенсивного снижения уровня фермента в группе С ($168,5 \pm 21,6$ U/l в группе В против $129,9 \pm 12,3$ U/l в группе А).

Особо следует отметить повышение в группе В активности ЛДГ1-2 и КФК МВ на седьмые сутки экспериментального ИМ, причём, уровень КФК МВ ($248,1 \pm 41,5$ U/l) на седьмые сутки даже достоверно превышал уровень КФК МВ ($175,2 \pm 9,6$ U/l) в первые сутки ИМ.

Показатели активности ферментов в ткани сердца (миокарде) у животных с экспериментальным ИМ (группа В). Помимо рутинного определения активности ферментов в плазме крови, проводилось определение показателей их активности в тканях сердца (миокарде). Исследование проводилось на 1, 7 и 14 сутки. Активность ЛДГ в гомогенате ткани миокарда представлена в *таблице 24*. Активность КФК в гомогенате ткани миокарда представлена в *таблице 25*.

При анализе показателей активности ферментов в ткани миокарда достоверных изменений общей активности ЛДГ во все исследованные сроки после операции относительно уровня этого фермента у интактных крыс также не наблюдалось (*таблица 24*).

При анализе общей активности ЛДГ (в пересчете на грамм влажного веса ткани) установлено, что показатели у активности ферментов у животных с

экспериментальным ИМ в течение всего исследования достоверно не отличались между собой; Однако показатели активности ЛДГ 1,2 у животных с экспериментальным ИМ были достоверно ниже, чем у животных контрольной группы в первые и седьмые сутки исследования ($297,4 \pm 8,7$ мкмоль/ мин· мг белка в первые сутки ИМ и $280,6 \pm 8,5$ мкмоль/ мин· мг белка на седьмые сутки в группе В против $329,5 \pm 7,9$ мкмоль/ мин в группе А).

Таблица 24 – Активность ЛДГ у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на грамм влажного веса ткани)

Время после операции, сутки	ИМ (группа В – инфаркт миокарда), n=10, M $\pm$ m
ЛДГ общая активность, мкмоль/ мин· г белка (группа А $331,5 \pm 7,8$)	
1 сутки	$332,4 \pm 39,9$
7 сутки	$326,0 \pm 24,3$
14 сутки	$335,7 \pm 43,9$
ЛДГ 1,2, мкмоль/ мин· мг белка; % от общей активности (группа А $329,5 \pm 7,9$; 99,4%)	
1 сутки	$297,4 \pm 8,7^*$ 89,5%
7 сутки	$280,6 \pm 8,5^*$ 86,1%
14 сутки	$322,2 \pm 13,2$ 96,0%

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P < 0,05$.*

Таблица 25 – Общая активность КФК у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на грамм влажного веса ткани)

Время после операции, сутки	ИМ (группа В – инфаркт миокарда), n=10, M $\pm$ m
КФК, мкмоль/ мин· мг белка (группа А $215,5 \pm 15,7$)	
1 сутки	$458,9 \pm 31,2^*$
7 сутки	$421,5 \pm 29,1^*$
14 сутки	$425,9 \pm 26,2^*$

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P < 0,05$; # - различие средних значений с группой А достоверно при $P < 0,05$.*

Показатели общей активности КФК у крыс с ИМ (группа В) в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на грамм влажного веса ткани) достоверно

превышали показатели общей активности КФК в интактной группе с первого по четырнадцатый день исследования.

Обсуждение. Поскольку трансаминазы, даже КФК-МВ, присутствуют в скелетных мышцах, то существенное повреждение скелетных мышц может увеличить уровень этих ферментов в крови до аномальных значений [306]. Поэтому особое значение имело сопоставление уровня ферментов у оперированных животных без формирования ИМ (группа А) и у животных с моделированным ИМ (группа В).

Чувствительными тестами в диагностике инфаркта миокарда являются определение активности изоферментов КФК, АСТ и ЛДГ в сыворотке крови [5]. Так, при инфаркте миокарда активность АСТ в сыворотке крови может увеличиваться в 2–20 раз, но при стенокардии активность АСТ, как правило, остается в пределах нормы [29]. При этом особую значимость в диагностике ИМ имеет постепенное снижение уровня ферментов (АЛТ и АСТ) в динамике развития ИМ. Суммарная активность ЛДГ (5 изоэнзимов) является поздним маркером ИМ, она реагирует на повреждение позже, чем остальные ферменты. Однако изменение активности изофермента ЛДГ₁, содержащегося преимущественно в сердце, является более информативным тестом, чем определение других ферментов, ибо его уровень в крови повышается раньше, чем суммарная ЛДГ, а кроме того, может увеличиваться на фоне ее нормальных значений [56, 57]. КФК МВ является изоферментом КФК, находящимся почти исключительно в миокарде, и поэтому повышение уровня активности КФК-МВ в крови является весьма специфичным и чувствительным показателем повреждения клеточной стенки миокарда. В отличие от вышеперечисленных ферментов, более низкий уровень АЛТ, по сравнению с АСТ, является ценным диагностическим тестом при остром инфаркте миокарда, исключая патологию печени в качестве источника этих трансаминаз.

Значительное достоверное превышение показателей АСТ, АЛТ и ЛДГ_{1,2} в группе В над показателями группы А в первые сутки ИМ свидетельствует об

эффективности предложенной и использованной экспериментальной модели ИМ, поскольку исключает возможность повышения трансаминаз только за счёт проведённого операционного вмешательства. В пользу формирования типичного ИМ свидетельствует и динамика трансаминаз в группе В: достоверное снижение уровня ферментов АСТ, АЛТ и ЛДГ_{1,2} и КФК МВ на 5 сутки исследования, поскольку временное снижение уровня ферментов (АЛТ и АСТ) специфично для острого повреждения сердца, особенно острого инфаркта миокарда [5].

Особого внимания заслуживает достоверное возрастание уровня наиболее чувствительных трансаминаз ЛДГ_{1,2} и КФК МВ на 7 сутки ИМ в группе В. Такое возрастание трансаминаз от 72 часов после развития ИМ и до окончания процессов рубцевания свидетельствует о развитии рецидивирующего инфаркта миокарда [54, 56], оптимальным способом диагностики которого является определение КФК МВ [289, 290]. Возникновение рецидивирующего ИМ в первую очередь обусловлено отсутствием реперфузии при развитии ИМ и выявляется у трети больных ИМ, несмотря на проведение лечения и соблюдение режима реабилитации [47].

Анализ общей активности ЛДГ у крыс с ИМ в гомогенате ткани миокарда показал достоверное уменьшение уровня фермента на протяжении всего исследования при ИМ на первые и пятые сутки, по сравнению с контрольной группой. При этом снижение уровня ЛДГ_{1,2} в гомогенате совпадает с повышением уровня фермента в крови, что соответствует данным литературы об обратной корреляции этих показателей при ИМ [5]. Однако на седьмые сутки эксперимента у животных с ИМ наблюдается повышение соотношения уровня фермента как в крови, так и в ткани, типичное для начала ИМ. Аналогичные изменения на седьмые сутки эксперимента выявлены и для креатинфосфокиназы. Так, увеличившийся даже по сравнению с первыми сутками эксперимента уровень КФК МВ в крови, соответствует лишь недостоверно снизившемуся уровню КФК в гомогенате миокарда. Следовательно, изменения в динамике отношений уровней ЛДГ_{1,2} и КФК в

крови и в гомогенате миокарда подтверждают наличие рецидивирования ИМ у лабораторных животных.

4.2.2 – Активность трансаминаз при экспериментальном инфаркте миокарда фоне введения соединения L-17

Результаты биохимического исследования активности ферментов – маркеров инфаркта миокарда в крови экспериментальных животных группы D приведены в *таблице 26*.

Согласно полученным результатам на протяжении всего исследования уровень АСТ, АЛТ и КФК МВ у животных группы D был достоверно ниже, чем у животных группы В. Уровень ЛДГ 1,2 в первые и пятые сутки в группе D также был понижен, по сравнению с показателями животных группы В, но различия не являлись статистически достоверными; и только на седьмые сутки эксперимента уровень ЛДГ1,2 в группе D достоверно определялся как более низкий, по сравнению с показателями группы В ($229,7 \pm 60,6$ U/l в группе D против $345,5 \pm 52,9$ U/l в группе В).

При этом выраженность снижения уровня ферментов в крови у животных группы D доходила до того, что на пятые сутки уровень АЛТ оказывался даже ниже, чем у интактных животных ($6,4 \pm 1,6$ U/l в группе D против $10,5 \pm 0,7$ U/l в группе А), а уровень КФК МВ в группе D оказывался ниже уровня фермента в группе А на пятые ($103,0 \pm 12,1$ U/l в группе D против $126,8 \pm 14,6$ U/l в группе А) и седьмые сутки ($108 \pm 16,8$ U/l в группе D против $126,8 \pm 14,6$ U/l в группе А).

Помимо рутинного определения активности ферментов в плазме крови, проводилось определение показателей их активности в гомогенате миокарда. Исследование проводилось на 1, 7 и 14 сутки. Активность ЛДГ в гомогенате ткани миокарда представлена в *таблицах 27 и 28*. Активность КФК в гомогенате ткани миокарда представлена в *таблицах 29 и 30*.

При исследовании показателей активности ферментов в ткани миокарда достоверных изменений общей активности ЛДГ во все исследованные сроки

после операции относительно уровня этого фермента у интактных крыс также не наблюдалось (таблица 27).

Таблица 26 – Результаты биохимического исследования активности ферментов – маркеров инфаркта миокарда в крови экспериментальных животных, включая группу с введением соединения L-17

Время после операции, сутки	Интактные, (группа А), n=5 M±m	Ложно - оперированные (группа С), n=5 M±m	ИМ (группа В - контрольная), n=10 M±m	ИМ (группа D - введение L-17), n=15 M±m
Аспартатаминотрансфераза, АСТ U/l				
1 сутки	11,6±0,8	14,6±0,9*	24,9±2,0*#	22,7±1,3*#
5 сутки		12,7±0,8*	17,4±3,0*#	11,05±0,66\$
7 сутки		11,8±1,0	17,3±1,4*#	13,5±1,44*\$
Аланинаминотрансфераза, АЛТ U/l				
1 сутки	10,5±0,7	13,9±0,7*	23,7±3,7*#	23,8±2,3*#
5 сутки		10,7±0,8	18,7±3,31*#	6,4±1,6*#\$
7 сутки		10,9±0,8	17,5±1,6*#	10,4±0,7\$
Лактатдегидрогеназа, ЛДГ 1,2 U/l				
1 сутки	165,2±34,6	231,1±32,3*	515,8±60,1*#	403,8±38,4*#
5 сутки		154,7±25,9	262,3±22,1*#	258,1±31,6*#
7 сутки		162,2±33,6	345,5±52,9*#	229,7±60,6*#\$
Креатинфосфокиназа КФК МВ U/L				
1 сутки	126,8±14,6	162,3±28,0*	175,2±9,6*	201,1±28,5*
5 сутки		129,9±12,3	168,5±21,6*#	103,0±12,1*\$
7 сутки		132,1±14,4	248,1±41,5*#	108±16,8*\$

Примечание: * – ($p < 0,05$) различия с интактными животными достоверны; # – ($p < 0,05$) различия с животными группы С достоверны; (p < 0,05) \$ – ($p < 0,05$) различия с животными группы В достоверны.

Анализ общей активности ЛДГ у крыс группы D в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани) показал, что в первые сутки уровень ЛДГ у животных был достоверно ниже, чем у интактных животных (3,86±0,45 мкмоль/ мин· г белка в группе В и 3,83±0,10 мкмоль/ мин· г белка в группе D против 5,10±0,31 мкмоль/ мин· г белка в группе А). Более того

на седьмой день ИМ уровень ЛДГ в группе D был достоверно ниже не только с показателями в группе A ($3,31 \pm 0,28$ мкмоль/ мин· г белка в группе D против $3,73 \pm 0,375, 10 \pm 0,31$ мкмоль/ мин· г белка в группе A), но и с показателями в группе B ($3,31 \pm 0,28$ мкмоль/ мин· г белка в группе D против $4,37 \pm 0,29$ мкмоль/ мин· г белка в группе B).

Таблица 27 – Активность ЛДГ у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани)

Время после операции, сутки	Интактные, (группа A), n=5 M±m	ИМ (группа B - контрольная), n=10 M±m	ИМ (группа D - введение L-17), n=15 M±m
ЛДГ общая активность, мкмоль/ мин· г белка			
1 сутки	$5,10 \pm 0,31$	$3,86 \pm 0,45^*$	$3,83 \pm 0,10^*$
7 сутки		$4,37 \pm 0,29$	$3,73 \pm 0,37^* \#$
14 сутки		$4,08 \pm 0,54$	$4,22 \pm 0,24$
ЛДГ 1,2, мкмоль/ мин· мг белка; % от общей активности			
1 сутки	$5,06 \pm 0,31$ 99,4%	$3,45 \pm 0,11^*$ 89,4%	$3,81 \pm 0,36^*$ 99,5%
7 сутки		$3,76 \pm 0,11^*$ 86,0%	$3,31 \pm 0,28^*$ 88,7%
14 сутки		$3,92 \pm 0,17^*$ 96,1%	$3,46 \pm 0,26^*$ 82,0%

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P < 0,05$; # – ($p < 0,05$) достоверность различия средних значений между животными групп B и D.*

При определении ЛДГ 1,2 в ткани миокарда показатели в группах B и D достоверно не отличались между собой, но достоверно превышали показатели животных группы A с первого по четырнадцатый день исследования.

При анализе общей активности ЛДГ (в пересчете на грамм влажного веса ткани) установлено, что показатели в группах A, B и D в течение всего исследования достоверно не отличались между собой, но при определении ЛДГ 1,2 показатели уровня ферментов в группе B были достоверно ниже, чем в группе A в первые и седьмые сутки исследования ($297,4 \pm 8,7$ мкмоль/ мин· мг белка в первые сутки ИМ и $280,6 \pm 8,5$ мкмоль/ мин· мг белка на седьмые сутки в группе B против $329,5 \pm 7,9$ мкмоль/ мин в группе A).

Таблица 28 – Активность ЛДГ у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на грамм влажного веса ткани)

Время после операции, сутки	Интактные, (группа А), n=5 M±m	ИМ (группа В – контрольная), n=10 M±m	ИМ (группа D - введение L-17), n=15 M±m
ЛДГ общая активность, мкмоль/ мин· г белка			
1 сутки	331,5±7,8	332,4±39,9	309,2±8,1
7 сутки		326,0±24,3	348,6±35,6
14 сутки		335,7±43,9	381,0±20,7
ЛДГ 1,2, мкмоль/ мин· мг белка; % от общей активности			
1 сутки	329,5±7,9 99,4%	297,4±8,7* 89,5%	308,1±29,3 99,6%
7 сутки		280,6±8,5* 86,1%	309,8±26,2 88,9%
14 сутки		322,2±13,2 96,0%	312,5±22,0 82,0%

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P<0,05$.*

Таблица 29 – Общая активность КФК у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани)

Время после операции, сутки	Интактные, (группа А), n=5 M±m	ИМ (группа В - контрольная), n=10 M±m	ИМ (группа D - введение L-17), n=15 M±m
КФК, мкмоль/ мин· мг белка			
1 сутки	3,34±0,23	5,33±0,39*	5,10±0,38*
7 сутки		5,66±0,44*	3,46±0,30#
14 сутки		5,18±0,33*	5,18±0,28*

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P<0,05$; # - различие средних значений между животными групп В и D достоверно при $P<0,05$.*

Показатели общей активности КФК у крыс с инфарктом миокарда (группа В) в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани) достоверно превышали показатели общей активности КФК в интактной группе с первого по четырнадцатый день исследования; при этом, в группе D

достоверное повышение показателей активности КФК фиксировалось только в первый и четырнадцатый дни исследования. В то же время, на седьмые сутки исследования уровень КФК в группе D достоверно не отличался от показателей интактных животных, но был достоверно ниже, чем у животных группы В ($3,46 \pm 0,30$ мкмоль/ мин· мг белка в группе D против $5,66 \pm 0,44$ мкмоль/ мин· мг белка в группе В).

Таблица 30 – Общая активность КФК у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на грамм влажного веса ткани)

Время после операции, сутки	Интактные, (группа А), n=5 M±m	ИМ (группа В - контрольная), n=10 M±m	ИМ (группа D - введение L-17), n=15 M±m
КФК, мкмоль/ мин· мг белка			
1 сутки	$215,5 \pm 15,7$	$458,9 \pm 31,2^*$	$411,6 \pm 28,6^*$
7 сутки		$421,5 \pm 29,1^*$	$323,6 \pm 26,9^* \#$
14 сутки		$425,9 \pm 26,2^*$	$467,7 \pm 26,8^*$

*Примечание: * - различие средних значений с группой интактных животных достоверно при $P < 0,05$; # - различие средних значений с группой D достоверно при $P < 0,05$.*

Аналогичное отношение уровней КФК в группах сохранялось и при определении общей активности КФК в пересчете на грамм влажного веса ткани, при чём, как и при исследовании активности КФК в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани, уровень КФК на седьмые сутки исследования в группе D был достоверно ниже, чем в группе В ($323,6 \pm 26,9$ мкмоль/ мин· мг белка в группе D против $421,5 \pm 29,1$ мкмоль/ мин· мг белка в группе В).

Обсуждение. Отсутствие достоверной разницы в уровне ферментов в группах В и D в первые сутки формирования ИМ свидетельствовало о схожем объёме поражения миокарда у животных групп В и D при нарушении кровотока по коронарной артерии. При этом достоверно более низкий уровень ферментемии (АСТ, АЛТ и КФК МВ) в группе D по сравнению с группой В на 5

сутки исследования свидетельствовал в пользу развития меньшего по объёму очага поражения у животных на фоне введения соединения L-17. В пользу способности исследуемого соединения уменьшать величину ИМ говорил и достоверно более низкий уровень КФК в ткани миокарда в группе D по сравнению с группой В на седьмой день развития ИМ: $3,46 \pm 0,30$ мкмоль/ мин· мг белка в группе D против $5,66 \pm 0,44$ мкмоль/ мин· мг белка в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани в группе В, и $323,6 \pm 26,9$ мкмоль/ мин· мг белка в группе D против $421,5 \pm 29,1$ мкмоль/ мин· мг в пересчете на грамм влажного веса ткани в группе В. Значимость же результатов изменения КФК подтверждается тем, что согласно литературным данным уровень повышения КФК при ИМ коррелирует с данными магниторезонансной томографии [372].

Важно отметить, что определение ЛДГ 1,2 и КФК МВ в группе D (на фоне введения соединения L-17) не выявило достоверной разницы между показателями 5 и 7 суток развития ИМ (в то время как у животных группы В определялось достоверное повышение активности трансаминаз на 7 сутки), что свидетельствует в пользу способности данного препарата предотвращать развитие рецидивирующего ИМ.

Анализ общей активности ЛДГ у крыс с инфарктом миокарда в гомогенате ткани миокарда (в пересчете на миллиграмм белка гомогената ткани) показал, что на протяжении всего исследования уровень фермента при экспериментальном ИМ у животных групп В и D достоверно не отличался от показателей контрольной группы. Однако определение кардиоспецифической ЛДГ 1,2 в гомогенате ткани миокарда показало достоверное уменьшение активности данного фермента на протяжении всего исследования; при этом, достоверных отличий в показателях активности фермента между экспериментальными группами (В и D) не выявлялось.

Принципиальные различия между группами определялись только при сравнении показателей уровня фермента в крови и в гомогенате миокарда. Так, в первые сутки у животных обеих групп снижение уровня ЛДГ 1,2 в гомогенате

совпадало с повышением уровня фермента в крови, что согласуется с данными литературы об обратной корреляции этих показателей при ИМ [4]. Однако на седьмые сутки эксперимента, у животных группы D низкий уровень ЛДГ 1,2 в гомогенате миокарда соотносился со снижением активности фермента в крови, в то время у животных группы В сохранялось соотношение уровня фермента в крови и в ткани, типичное для начала ИМ. Аналогичные изменения на седьмые сутки эксперимента были выявлены и для креатинфосфокиназы. Так, у животных группы D нормальный уровень КФК в крови соответствовал нормальному уровню фермента в гомогенате миокарда, в то время как в группе В, увеличившийся даже по сравнению с первыми сутками эксперимента, уровень КФК МВ в крови сопровождался лишь несущественным снижением КФК в гомогенате миокарда. Следовательно, изменения в динамике отношений уровней ЛДГ 1,2 и КФК в крови и в гомогенате миокарда также подтверждают наличие рецидивирования ИМ у животных группы В и его отсутствие на фоне введения соединения L-17.

Таким образом, по данным динамического определения маркерных ферментов в крови и в гомогенате миокарда при экспериментальном ИМ доказано, что введение экспериментальным животным соединения L-17 уменьшает величину повреждения миокарда и предотвращает рецидивирование ИМ.

4.3 – Показатели цитокинемии при экспериментальном инфаркте миокарда на фоне введения соединения L-17

Поскольку в самом начале ишемии активируется система комплемента, вызывающая хемоаттракцию тучных клеток в зоне воспаления, а образующиеся свободные радикалы вызывают дегрануляцию тучных клеток с выделением TNF- α , который инициирует целый каскад цитокинов, то представлялось важным определить влияние введения соединения L-17 на показатели цитокинемии при экспериментальном ИМ. Результаты определения плазменной концентрации основных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6 и IL-10) представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Плазменная концентрация цитокинов, расчет индексов реактивности и коэффициента реактивности при экспериментальном инфаркте миокарда

Время после операции, сутки	Интakтныe, (группа A), n=5 M±m ПДЗ	Ложнооперированные (группа C), n=10 M±m	ИМ (группа B - контрольная), n=5 M±m	ИМ (группа D- введение L-17), n=15 M±m
1 сутки, IL-1/ ln (пг/мл)	32±6/ 3,46±0,17 20,09	92±12/ 4,52±0,18* (4,61)	259±46/ 5,55±0,17*# (12,95)	58±8/ 4,06±0,09*#\$ (2,9)
7 сутки, IL-1/ ln (пг/мл)				92±26 /4,52±0,25*\$ (4,6)
1 сутки, TNF/ ln (пг/мл)	48±28/ 3,87±0,43 29,74	168±16/ 5,12±0,09* (5,6) ИР 3	378±24/5,93±0,06*# (12,6) ИР 3	228±68/5,42±0,27*\$ (7,6) ИР 3
7 сутки, TNF/ ln (пг/мл)				364±24/5,89±0,07*#\$ (12,1) ИР 3
1 сутки, IL-6/ ln (пг/мл)	140±56/ 4,94±0,33 31,51	220±36/ 5,39±0,15* (7,1) ИР 2	320±43/5,76±0,13*# (10,32) ИР 3	68±18/ 4,21±0,24*#\$ (2,2) ИР 2
7 сутки, IL-6/ ln (пг/мл)				68±12/ 4,21±0,17*#\$ (2,2) ИР 2
1 сутки, IL-10/ ln (пг/мл)	42±22/ 3,73±0,42 5,77	52±16/ 3,95±0,26* (9,0) ИР 4	186±38/ 5,22±0,19*# (32,2) ИР 5	94±30/ 4,54±0,28#\$ (16,29) ИР 4
7 сутки, IL-10/ ln (пг/мл)				88±20/ 4,47±0,21*#\$ (15,25) ИР 3
Коэффициент реактивности (КР)		9	11	9 9
Уровень реактивности (УР)		3	4	3 3

*Примечание: Данные представлены в виде плазменной концентрации (пг/мл) и в виде натурального логарифма плазменной концентрации (пг/мл) цитокинов. * – ($p < 0,05$) различия с интактными животными достоверны; # – ($p < 0,05$) различия с животными группы В достоверны; \$ – ($p < 0,05$) различия между группами D и B достоверны. Выделено жирным: ПДЗ – предельно допустимое значение нормы, ИР – индекс реактивности. Числа вне скобок означают абсолютные значения показателей применительно к используемому методу (цитокинов – в пг/мл) в скобках – степень превышения ПДЗ (в разы). Сумма трех максимальных ИР дает значение КР.*

Согласно результатам иммуноферментного анализа, у животных группы С (ложнооперированные) к концу первых суток наблюдалось достоверное повышение уровня цитокинов по сравнению с показателями группы А. Наиболее сильно увеличивался в группе С уровень IL-1 (до 92 ± 12 пг/мл) и уровень TNF (до 168 ± 16 пг/мл).

У животных группы В (ИМ) наблюдалось достоверно повышение уровня исследуемых цитокинов по сравнению с группами С и А. Показатели ИЛ 1 в группе В (259 ± 46 пг/мл) превышали показатели группы А в 8 раз, а группы С в 2,8 раза; показатели TNF (378 ± 24 пг/мл) в 7,8 раза превышали показатели нормы (48 ± 28 пг/мл), и в 2,25 раза превышали показатели животных группы С (168 ± 16 пг/мл). Уровень IL-6 (320 ± 43 пг/мл) превышал показатели животных группы А в 2,3 раза, а показатели животных группы С в 1,5 раза. Показатели IL-10 превышали (186 ± 38 пг/мл) показатели животных группы А в 4,4 раза, а животных группы С – в 3,6 раза.

У животных с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17 (группа D) также на 1 сутки эксперимента наблюдалось повышение уровня IL-1 по сравнению с группой А (58 ± 8 пг/мл), но уровень IL-1 в группе D был достоверно ниже не только показателей животных группы С (в 4,4 раза), но и животных группы В (в 1,6 раза). Показатели TNF в группе D (228 ± 68 пг/мл) превышали показатели в группе животных группы С в 1,4 раза, и были достоверно ниже соответствующих показателей животных в группе В. Уровень IL-6 в группе D (68 ± 18 пг/мл) был достоверно ниже, чем в группах А, С и В. А уровень IL-10 (94 ± 30 пг/мл) в группе D был выше показателей животных групп А и С, однако достоверно в 2 раза ниже показателей группы В.

Несомненный интересе представляет изменения уровня интерлейкинов в динамике развития ИМ. Так в группе D на 7 сутки течения ИМ уровень IL-1 повысился, но не превышал показателей группы С в первые сутки. Уровень TNF на 7 сутки достоверно повысился до 364 ± 24 пг/мл против 228 ± 68 пг/мл, в то время как уровень IL-6 на 7 сутки достоверно не отличался от уровня в первые

сутки исследования. А уровень IL-10 на 7 сутки даже снизился по сравнению с первыми сутками (88 ± 20 пг/мл на 7 сутки против 94 ± 30 пг/мл в первые сутки).

Для объективизации представления о характере влияния выявленной гиперцитокинемии на выраженность воспалительной реакции было использовано определение значений коэффициента реактивности (КР) и уровня реактивности (УР) по Е.Ю. Гусеву с соавт. [12-15, 36]. Результаты расчёта индексов реактивности и коэффициента реактивности при экспериментальном инфаркте миокарда приведены в *таблице 31*.

Проведённые расчёты показали, что при экспериментальном ИМ (группа В), коэффициент реактивности достигает 11, что соответствует 4 уровню реактивности, являющемуся «зоной прогноза» критических осложнений, при которой может начинаться развитие системного воспаления, когда TNF- α , IL-1 β и IL-6 начинают активно продуцироваться не только кардиомиоцитами, но и клетками эндотелия, что и приводит к развитию критических осложнений [14-19]. В то время, на фоне введения соединения L-17 (группа D), коэффициент реактивности достигает только 9, что соответствует 3 уровню, типичному для гиперреактивной формы классического воспаления. При этом коэффициент и уровень реактивности у животных на фоне введения соединения L-17 не отличались от показателей в группе ложнооперированных животных.

Обсуждение результатов. Выявленная в проведённом исследовании способность соединения L-17 уменьшать уровень как провоспалительных, так и противовоспалительных интерлейкинов при ИМ, могла играть ведущую роль в уменьшении величины формирования и развитии осложнений ИМ [21, 272, 324]. Согласно литературным данным, от уровня повышения провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF) зависит величина формирующегося ИМ [39] и повышение риска последующих коронарных катастроф, а значительное повышение IL-1 β на 1-е сутки ИМ ассоциируется с высоким риском формирования ранних осложнений (кардиогенного шока, отёка лёгких, рецидива инфаркта миокарда) в ранние сроки заболевания [58]. Неслучайно, у животных, лишенных IL-1-рецепторов, уменьшаются величина инфаркта, конечно-

диастолический размер и дисфункция левого желудочка сердца и выраженность апоптоза кардиомиоцитов [92].

Роль IL-6 при ИБС также трудно переоценить, поскольку высокий уровень этого интерлейкина, даже у практически здоровых людей, свидетельствует о повышенном риске развития ИМ; согласно А.С. Тращенко, 2010, IL-6 увеличивается на 21-е и 28-е сутки у больных с осложненным инфарктом миокарда [58]. Более того, высокий уровень IL-6 у пациентов с острым коронарным синдромом повышает смертность в 3,5 раза в течение первого года после перенесения ИМ [316]. TNF-альфа также является важным медиатором повреждения миокарда при остром инфаркте миокарда; при этом заметное увеличение TNF приводит к снижению сократительной способности миокарда и коронарного кровотока и увеличению конечно-диастолического давления [220].

Необходимо отметить, что опасность при ИМ представляет не только повышение уровня провоспалительных цитокинов, но и значительное повышение уровня противовоспалительных интерлейкинов. Так, если IL-10 при оптимальном уровне ингибирует продукцию провоспалительных медиаторов макрофагами и моноцитами, индуцированных LPS и IFN γ : IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF и TNF, ингибирует выброс различных хемокинов ПМН, синтез провоспалительных цитокинов, а также циклооксигеназы-2 и простагландина E2, то высокий уровень IL-10 способен предотвращать дифференцировку моноцитов в тканевые макрофаги и дендритные клетки DC1, которые чрезвычайно важны для осуществления функции представления антигена Т-клеткам, уменьшать киллинг поглощенных макрофагами микроорганизмов и ингибировать Т-зависимую активацию В-клеток, что может стать основой развития компенсаторного противовоспалительного синдрома (CARS), приводящего к сепсису [40].

Показано, что одновременное увеличение плазменной концентрации провоспалительных (IL-6, TNF, IL-1 β , KC, MIP-2, MCP-1, и эотаксина) и противовоспалительных (IL-10, антагонист рецепторов IL-1) цитокинов служит предиктором ранней смерти в течение первых 5 дней системного воспаления, а

при ИМ с подъёмом сегмента ST, одновременное повышение уровней IL-6 и IL-10 позволяет выявлять пациентов с худшими клиническими исходами [208].

Учитывая опасность гиперцитокинемии при ИМ, несомненный интерес представляет выявленная способность соединения L-17 значительно снижать уровень интерлейкинов при экспериментальном ИМ, особенно в первые сутки развития ИМ. Так если через 24 часа после перекрытия коронарной артерии без лечения уровни интерлейкинов превышали норму для IL-1 в 8 раз, для TNF в 7,8 раз, для IL-6 в 2,5 раза и для IL-10 в 4,3 раза, то при введении L-17 уровни интерлейкинов превышали норму для IL-1 в 1,8 раза, для TNF в 4,7 раза, для IL-10 в 2,2 раза, а уровень IL-6 был даже ниже нормы в 2 раза. Потенциальная значимость подобного снижения уровней цитокинов подтверждается сравнением полученных результатов с клиническими данными, согласно которым, своевременно проведённый тромболизис на 7-ые сутки заболевания снижает медиану IL-1 β только в 1,9 раза [58], в то время как на фоне введения соединения L-17 на 7 день ИМ уровень IL-1 β не отличался от показателей ложнооперированных животных.

Очень важно, что введение соединения L-17 при экспериментальном ИМ лишь снижало уровни IL-6, TNF и IL-10, а не полностью угнетало их выделение, поскольку резкое снижение уровня этих интерлейкинов согласно литературным данным, усугубляет повреждение миокарда и ухудшает прогноз при ИМ. Так, при отсутствии IL-6 нарушается формирование воспалительного лейкоцитарного инфильтрата и его последующая трансформация в моноклеарную фазу развития воспаления [211]: под влиянием IL-6 происходит снижение индуцированного IL-1 и TNF синтеза хемокинов CXCL1, CXCL8 (IL-8) и CX3CL1, привлекающих в ткани главным образом нейтрофильные гранулоциты, и, наоборот, усиливается миграция моноцитов и различных типов лимфоцитов в повреждённые ткани; кроме того, стимулируется адгезия Т-лимфоцитов и их проникновение в ткани путём усиления экспрессии L-селектина, предотвращается апоптоз лимфоцитов и Т-лимфоцитов; и, наконец,

стимулируется апоптоз нейтрофильных гранулоцитов и ускоряется завершение фазы острого лейкоцитарного воспаления [152].

Необходимость сохранения определённого уровня TNF подтверждается тем, что при экспериментальном инфаркте миокарда у животных с «заблокированным» TNFR1/TNFR2-рецепторами наблюдалось увеличение площади поражения миокарда и количества апоптотизированных клеток [176], а введение анти-TNF антител ингибировало АТ-II стимулированную пролиферацию фибробластов при ИМ [374]. Более того, согласно мнению ряда авторов, вызванное действием TNF уменьшение сократимости миокарда при острой ишемии даже способствует выживанию миокардиоцитов при ишемии [328]. В свою очередь, экспериментальные работы на животных с искусственно вызванным «дефицитом» IL-10, показали, что недостаток этого цитокина приводил к усилению воспалительной реакции, что проявлялось повышением концентрации в плазме крови TNF- α , а также нитритов/нитратов (продуктов распада NO) и увеличением проникновения нейтрофилов через 6 часов после реперфузии, что, в последующем, привело к увеличению размеров зоны некроза и формирующегося ИМ и существенно отражалось на летальности, достигавшей 75% (при отсутствии летальных случаев в контрольной группе) [380].

В целом, исходя из полученных результатов, можно свидетельствовать, что введение соединения L-17 при экспериментальном ИМ приводило к значительному уменьшению, но не угнетению гиперцитокинемии и предотвращало развитие системного воспаления.

4.4 – Изменение активности процессов апоптоза при экспериментальном инфаркте миокарда на фоне соединения L-17

Поскольку существует два альтернативных пути активации апоптоза: внутренний или митохондриальный путь, при котором митохондрии занимают ключевую позицию в инициировании апоптоза, а в качестве критического сенсора и ключевого регулятора внутреннего механизма апоптоза выступает ген

p53; и внешний путь, который опосредуется различными рецепторами смерти на клеточной поверхности, имеющими общий внутриклеточный домен, который называется доменом смерти (deathdomain, DD-домен) и являющимися членами суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), одним из которых является FAS-(APO-1, CD95), то при исследовании проводилось определение маркеров как внешнего (CD95), так и внутреннего (P53) путей инициации апоптоза [202, 221, 240, 287].

Результаты определения маркеров внешнего (CD95) и внутреннего (P53) путей инициации апоптоза представлены в *таблице 32*.

Согласно полученным результатам достоверных изменений экспрессии маркера внешнего пути инициации апоптоза (CD95) у животных с экспериментальным ИМ (групп В) в динамике исследования с первых по четырнадцатые сутки исследования не наблюдалось.

Таблица 32 – Результаты определения маркеров внешнего (CD95) и внутреннего (P53) путей инициации апоптоза при введении L-17

Время после операции, сутки	ИМ (группа В – контрольная), n = 15	ИМ (группа D – введение L-17), n = 15
CD 95		
1 сутки	194,86 ± 35,67	301,42 ± 21,55*
7 сутки	191,78 ± 5,55	322,40 ± 41,81*
14 сутки	117,07 ± 37,61	368,16 ± 10,70*
P53		
1 сутки	158,09 ± 12,69	168,76 ± 15,04
7 сутки	161,88 ± 25,04	316,03 ± 44,70*#
14 сутки	123,71 ± 18,26	158,61 ± 14,33

*Примечание: * – ($p < 0,05$) различия достоверны между группами В и D; # – ($p < 0,05$) различия достоверны в группе D между уровнем маркера P53 на 7 сутки исследования и уровнями маркеров P53 в 1 и в 14 сутки исследования.*

При этом у животных с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17 (группа D) уже с 1 суток эксперимента определялся достоверно

более высокий уровень маркера внешнего пути инициации апоптоза (CD95), чем в группе В ($301,42 \pm 21,55$ в группе D против $194,86 \pm 35,67$ в группе В). Причём, достоверно более высокий уровень CD95 в группе D по сравнению с группой В сохранялся на всем протяжении эксперимента, с первых по четырнадцатые сутки исследования.

Достоверное изменение экспрессии маркера внутреннего апоптоза (P53) у животных с экспериментальным ИМ группы В в динамике исследования с первых по четырнадцатые сутки исследования также отсутствовало, как и изменение маркера внешнего апоптоза. В то же время у животных группы D повышение уровня маркера внутреннего апоптоза P53 было зафиксировано на 7 день исследования, при этом уровень P53 на седьмые сутки исследования был достоверно выше, чем в 1 и 14 сутки исследования ($316,03 \pm 44,70$ на 7 сутки против $168,76 \pm 15,04$ в первые сутки и $158,61 \pm 14,33$ на седьмые сутки). Кроме того уровень P53 на седьмые сутки исследования в группе D был достоверно выше, чем в группе В с первых по четырнадцатые сутки исследования.

Обсуждение. Роль апоптоза на ранних этапах развития ИМ трудно переоценить, поскольку при экспериментальной закупорке главной эпикардиальной коронарной артерии у крыс через 2 часа от начала ИМ путём апоптоза гибнет 2,8 млн. клеток и только 90 000 миоцитов гибнет путем некроза, а через 4,5 часа выявляется 6,6 млн. апоптатированных миоцитов, в то время как некроз миоцитов достигает 1,1 млн. только через день. Эта динамика развития апоптоза подтверждается и в исследованиях G. Ottaviani с коллегами, 1999, обнаружившими, что индекс апоптоза (AI) в острейшей фазе (Hyperacute) ИМ колеблется от 0,7 до 3 (в среднем 1,78), а при острой стадии инфаркта колеблется от 0,9 до 5 (в среднем 3,24) [308]; в то время как уровень факторов апоптоза Bcl-2 и Fas в миоцитах при ИМ увеличивается в 18 и 131 раз, соответственно [101].

В тоже время существуют две принципиально разные точки зрения на роль апоптоза в развитии ИМ. С одной стороны, ингибирование апоптоза может оказывать кардиопротекторное действие [108, 117, 250]. Так, применение при

экспериментальной ишемии/реперфузии ингибиторов апоптоза, таких как ингибиторы каспаз или альфа/бета- адреноблокатора карведилола, значительно уменьшало апоптоз кардиомиоцитов в зоне ишемии [126]. Аналогичные результаты были получены и при воспроизведении ишемии/реперфузии у животных с отсутствием гена апоптоза (Бах (- / -) [108].

В тоже время, ингибирование апоптоза может привести к активации другого варианта гибели клеток, такого как некроз, при котором различные цитокины, протеазы и другие цитотоксических факторы, выделяющиеся из погибших клеток, вызывают усиление и удлинение воспалительной реакции за счёт пагубного воздействия на соседние клетки. Более того, апоптоз необходим и для нормального функционирования иммунной системы, а его недостаточность может даже вызвать развитие лимфом и аутоиммунных нарушений. Также апоптоз, не вызывающий разрушения клеточной мембраны, является менее аритмогенным, чем некроз, и потому может снижать летальность при ИМ [118].

Подтверждением положительной роли апоптоза при ИМ являются данные А.П. Хлапова, 2008, основанные на результатах биопсии миокарда левого желудочка у больных ИБС, которые показали, что бах⁺- клетки и TUNEL⁺-ядра в кардиомиоцитах преобладали у пациентов с меньшим конечно-диастолическим объемом [48]. Более того, сравнение выраженности апоптоза мононуклеаров и кардиомиоцитов в группах больных ИМ с зубцом Q и без зубца Q показало, что показатели апоптоза этих клеток были выше при формировании меньших инфарктов (ИМ без зубца Q) [44].

Вот почему несомненный интерес представляет выявление повышения активности апоптоза на фоне введения соединения L-17 животным с экспериментальным ИМ. Тем более, что проведённые исследования позволяют сопоставить выраженность апоптоза с активностью трансаминаз и гистоморфологической картиной ИМ. Так, повышение активности апоптоза в группе D, достоверно превышающее уровень апоптоза в группе В, соответствовало достоверно более низким показателям активности трансаминаз на 5 и 7 сутки ИМ. При этом именно способность апоптозных клеток сохранять

целостность своих мембран, в отличие от некротических, может объяснять выявленное снижение выделения трансаминаз при ИМ [240].

И всё-таки большую значимость для уточнения роли повышения апоптоза при ИМ представляет сравнение его выраженности с гистоморфологическими изменениями. Так если в группе D, активность внешнего апоптоза в которой достоверно превышала уровень апоптоза в группе В, уже через сутки от начала ИМ в инфарктированном миокарде появлялись моноциты и лимфоциты, а также наблюдались признаки формирования грануляций, то в группе В обнаруживались лишь некротически измененные кардиомиоциты и диффузная инфильтрация сегментоядерными лейкоцитами.

Резкое уменьшение количества нейтрофилов в зоне инфарктирования при активации апоптоза и увеличение количества макрофагов может быть объяснено следующими фактами. Во-первых, тем, что источниками поступления в кровь при остром коронарном синдроме маркеров апоптоза Bcl-2 и Apo-1/Fas являются не только кардиомиоциты, но и моноциты, макрофаги, эндотелиоциты [44]. Более того, со 2-го дня ИМ апоптозу начинают подвергаться в первую очередь лейкоциты, проникшие в зону инфарктирования [321]. При этом, исходя из полученных результатов, даже экспериментальном ИМ у животных группы В степень развития некроза и апоптоза достоверно коррелирует с проникновением нейтрофилов в зону инфарктирования в первые 6 - 24 часа от начала ИМ, в то время как корреляция интенсивности процессов апоптоза с содержанием макрофагов, согласно литературе, начинает выявляться спустя только 48 часов от начала ИМ [307].

Особо следует отметить, что активация апоптоза у животных с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17 соотносится с более ранним и более выраженным поступлением макрофагов в зону инфарктирования. Это влияние активации апоптоза на макрофагальную инфильтрацию согласуется с литературными данными, согласно которым у мышей с отсутствием p53, по сравнению с мышами дикого типа, увеличивается продолжительность лейкоцитарной инфильтрации после ишемии и уменьшается количество

противовоспалительных макрофагов фенотипа M2 [286, 321]. Причина этого в том, что, по-видимому, избыточная экспрессия Fas-ассоциированного домена гибели (FADD), с одной стороны, активизирует апоптоз, а с другой стороны, приводит к дифференцировке моноцитов в макрофаги. В свою очередь, фагоцитоз апоптотических нейтрофилов макрофагами активно тормозит производство макрофагами IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF α , гранулоцитарно макрофагального колониестимулирующего фактора, а так же лейкотриена C4 и тромбоксана B2, и в то же время увеличивает производство макрофагами трансформирующего фактора роста (TGF- β 1), простагландина E2 и фактора активации тромбоцитов (PAF), который участвует в ингибировании производства провоспалительных цитокинов, причем, не вызывая воспалительной реакции при этом процессе [89]. Кроме того, трудно переоценить роль M2 макрофагов, раньше всего трансформирующихся из моноцитов при повреждении тканей, в ускорении заживления ран, поскольку IL-4 стимулирует в этих макрофагах активность аргиназы, конвертирующей аргинин в орнитин (предшественник полиаминов и коллагена), тем самым способствуя воспроизводству внеклеточной матрицы.

Особого анализа требует тот факт, что на фоне введения соединения L-17 животным с ИМ маркер внутреннего апоптоза P53, в отличие от маркера внешнего апоптоза, достоверно повысился только на 7 сутки исследования и снизился до значений, не отличающихся от ИМ без лечения, на 14 сутки исследования.

Это можно объяснить тем, что внутренний апоптоз кардиомиоцитов не активируется гипоксией, а возникает только при снижении внеклеточной pH и реоксигенации, но в нашем эксперименте реоксигенация не проводилась. Действительно, согласно данным литературы при экспериментальном ИМ без реоксигенации разница в уровне внутреннего апоптоза у мышей дикого типа (p53 + / +) и мышей с нокаутом p53 (p53 - / -) отсутствует [274]. Кроме того, избирательное выключение p53 в кардиомиоцитах не предотвращает

доксорубицин индуцированный апоптоз, а также интерстициальный периваскулярный фиброз [121].

Однако в отличие от кардиомиоцитов, внутреннему апоптозу при ИМ подвергаются макрофаги. Как показали проведённые исследования, в макрофагах в процессе их активации генерируется оксид азота (NO), приводящий к гибели макрофагов путём апоптоза, причём оксид азота инициирует именно внутренний путь апоптоза за счёт активации p53 [119]. Важно отметить, что оксид азота наделен уникальной способностью как инициировать, так и блокировать апоптоз [119]. Если низкие или физиологические концентрации NO предотвращают гибель клеток от апоптоза, то длительное перепроизводство NO действует как проапоптотический модулятор, регулирующий экспрессию p53 и активирующий каспазы путем освобождения митохондриального цитохрома C в цитозоль, изменяя экспрессию апоптозных белков, ассоциированных с семьёй Bcl -2 [286, 321]. То есть, при небольшом повреждении ДНК p53 осуществляет её репарацию, а при значительном повреждении ДНК протеин p53 инициирует процесс запрограммированной гибели клеток (апоптоз).

Объяснением того, что активация внутреннего апоптоза в проведённом эксперименте с введением L-17 выявляется только на седьмые сутки ИМ может служить исследование Suzuki H. с соавт., 1996, выявивших, что в при экспериментальном ИМ у кроликов, апоптоз кардиомиоцитов начинается с пяти часов от начала инфарктирования, а апоптоз макрофагов только со 2 – 3 суток [221].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что активизация как внешнего, так и внутреннего апоптоза на фоне введения соединения L-17 играет определённую роль в уменьшении зоны повреждения и ускорении репарации при экспериментальном ИМ.

Список работ, опубликованных по результатам 4-ой главы:

1. Лечение рецидивирующего инфаркта миокарда в эксперименте / П.А. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев, *А.П. Сарапульцев* // Уральский медицинский журнал. 2008. № 9. С. 96-99 (РИНЦ – 0,176)
2. Влияние иммуномодулятора тамерита на 4-ю фазу воспалительного синдрома при экспериментальном инфаркте миокарда / П.А. Сарапульцев, М.А. Ранцев, И.Г. Данилова, *А.П. Сарапульцев*, И.Ф. Гетте, А.Н. Дмитриев // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. Т. 25. № 2. С. 298-299 (РИНЦ – 0,156)
3. New insights in to the treatment of myocardial infarction / P. Sarapultsev, O. Chupakhin, *A. Sarapultsev*, M. Rantsev, L. Sidorova, S. Medvedeva, I. Danilova // International journal of experimental pathology. 2012. Т. 93, № 1. С. 18-23. (Web of Science 1.78)
4. Сарапульцев, П.А. Роль с-реактивного белка в острофазовом ответе при инфаркте миокарда / П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев* // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 4. С.18-24. (РИНЦ – 0,317)
5. Сарапульцев, П.А. Влияние активации процессов апоптоза на заживление после инфаркта миокарда / П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев*, Л.П. Сидорова // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014. Т. 49, № 3. С. 38-39 (РИНЦ – 0,156)
6. Modulation of inflammatory response improves myocardial infarct healing in rats / *A.P. Sarapultsev*, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, M.A. Rantsev, S.U. Medvedeva, L.P. Sidorova, M.T. Abidov, I.G. Danilova // Current pharmaceutical design. 2014. Т. 20, № 12. С. 1980-1986 (Web of Science 2.611)
7. Effect of a New Class of Compounds of the Group of Substituted 5r1, 6h2-1, 3, 4-Thiadiazine-2-Amines on the Inflammatory and Cytokine Response in Experimental Myocardial Infarction / *A.P. Sarapultsev*, O.N. Chupakhin, P.A.

- Sarapultsev, M. A. Rantsev, S.U. Medvedeva, L.P. Sidorova // *Current Vascular Pharmacology*. 2015. T. 13, № 1. С. 43-53 (Web of Science 2.391)
8. Influence of a biologically active compound from substituted thiadiazines on transaminase activity in myocardial homogenate in experimental myocardial infarction / O. Chupakhin, A. Sarapultsev, M. Cheresheva, I. Gette, L. Sidorova, I. Danilova, P. Sarapultsev // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. T. 7, № 6. С. 147-151 (Scopus)
 9. Effects of a compound from the group of substituted thiadiazines with hypothermia inducing properties on brain metabolism in rats, a study in vivo and in vitro / O.B. Shevelev, N.B. Illarionova, D.V. Petrovski, A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, M.P. Moshkin // *PloS one*. 2017. T. 12, № 7. e0180739 (Web of Science 2.806)
 10. Влияние препарата 117 на изменение физиологии воспалительной реакции при экспериментальном инфаркте миокарда / А.П. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев. // *Аллергология и иммунология*. 2008. Т. 9. № 3. С 329. (Материалы международной конференции «Физиология и патология иммунной системы». Москва, 2008)
 11. Effect of a new compounds of substituted 5R1, 6H2-1, 3, 4-thiadiazine-2-amines on the histological pictures in ligation models of experimental acute myocardial infarction and experimental acute pancreatitis in rats / A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, M.A. Rantsev, S.U. Medvedeva, I.G. Danilova // *FASEB Journal*. 2013. T. 27, № 1 (приложение). С. 650-4. (Web of Science 5.498)
 12. Effect of immune modulators on the activity of enzymes after experimental myocardial infarction / A. Sarapultsev, I. Gette, M. Abidov, P. Sarapultsev, O. Chupakhin, I. Danilova // *FASEB Journal*. 2014. T. 28, № 1 (приложение). С. 832-10. (Web of Science 5.498)
 13. Apoptosis activation under the action of immunomodulators on the course of experimental myocardial infarction / A. Sarapultsev, O. Chupakhin, P.

- Sarapultsev, L. Sidorova // FASEB Journal. 2015. Т. 29, № 1 (приложение). С. 781-5. (Web of Science 5.498)
14. Пат. 2395850. Российская Федерация, МПК G09B 23/28, А 61К 31/135, А 61Р 9/10. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс [Текст] / Сарапульцев П.А., Дмитриев А.Н., Ранцев М.А., *Сарапульцев А.П.*, Чупахин О.Н., Медведева С.Ю., Сидорова Л.П.; заявитель и патентообладатель Сарапульцев П.А., Дмитриев А.Н., Ранцев М.А., Сарапульцев А.П., Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН. - N 2008125545/14; заявл. 23.06.2008; опубл. 27.07.2010, Бюл. N 21. - 6 с.
 15. Пат. 2437165. Российская Федерация, МПК G09B 23/28, А 61К 31/502, А 61Р 9/10. Способ лечения иммунокорректорами инфаркта миокарда у крыс [Текст] / Ранцев М.А., Сарапульцев П.А., *Сарапульцев А.П.*, Данилова И.Г.; заявитель и патентообладатель Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Ранцев М.А., Сарапульцев П.А., Сарапульцев А.П., Данилова И.Г. - N 2010114905/14; заявл. 13.04.2010; опубл. 20.12.2011, Бюл. N 35. - 6 с.
 16. Пат. 2437163. Российская Федерация, МПК G09B 23/28, А 61К 31/502, А 61Р 9/10. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс [Текст] / Ранцев М.А., Сарапульцев П.А., *Сарапульцев А.П.*, Данилова И.Г.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Ранцев М.А., Сарапульцев П.А., Сарапульцев А.П., Данилова И.Г. - N 2010112007/14; заявл. 29.03.2010; опубл. 20.12.2011, Бюл. N 35. - 6 с.
 17. Сравнение эффективности влияния иммуномодуляторов «I17» и тамерита на биохимические показатели крови в динамике развития экспериментального инфаркта миокарда / П.А. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, М.А. Ранцев, *А.П. Сарапульцев* // материалы Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук» совместно с V Международным симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому

- ультразвуку, XVII ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2010. С. 235-236.
18. One-stage model of experimental myocardial infarction in rats / O.N. Chupakhin, A.P. Sarapultsev, I.G. Danilova, S.Y. Medvedeva. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*. 2011. Doi: 10.4172/2161-0681.1000101
 19. Сарапульцев А.П. Модуляция активности апоптотических процессов при экспериментальном инфаркте миокарда иммуномодуляторами разных химических групп / А.П. Сарапульцев, П.А. Сарапульцев // материалы VI Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук» совместно с X Международным симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому ультразвуку, XXII ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2015. С. 136-137.
 20. Сарапульцев А.П. Предотвращение развития синдрома no-reflow под действием соединения 117 группы замещенных тиадiazинов при экспериментальном инфаркте миокарда / А.П. Сарапульцев, П.А. Сарапульцев // материалы VI Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук» совместно с X Международным симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому ультразвуку, XXII ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2015. С. 137-138.
 21. Substituted thiadiazines as potential cardiovascular agents. Results of (q)sar prediction and experiments in vivo / A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, L.P. Sidorova // 7th International Conference on Drug Discovery & Therapy, At University of Sharjah, Sharjah, UAE. February 15th - 18th, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.1.3845.2889
 22. Substituted thiadiazines with the anti-stress action as a promising cardiovascular drugs / O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, A.P. Sarapultsev, L.P. Sidorova, T.A. Tseitler // Conference: XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry, Perugia, Italy. September 11th to 14th, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.21722.75208.

ГЛАВА 5 –СТРЕСС-ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ L-17 НА МОДЕЛИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА *IN VIVO*

Плюрипотентность действия соединения L-17 на различные патофизиологические механизмы развития экспериментального ИМ потребовала выявления такой точки воздействия соединения, которая способна оказывать полисистемное патологическое влияние на развитие и течение ИМ. Выявленный Г. Селье «неспецифический ответ организма на любое предъявленное ему требование», названный стрессом, обеспечивает «потребность осуществить приспособительные функции и тем самым восстановить нормальное состояние» [338]. Но хотя «любая нормальная деятельность... может вызвать значительный стресс, не причинив никакого вреда», «природа не всегда поступает наилучшим образом», и «под влиянием различных факторов, определяющих чувствительность организма, нормальная, хорошо переносимая степень стресса может стать болезнетворной и привести к «болезням адаптации», избирательно поражающим предрасположенную область тела. Вредоносный или неприятный стресс называют «дистресс» [96, 116, 249]. Именно дистресс угнетает иммунный ответ и может вызывать возникновение заболеваний, обусловленных нарушением иммунологических механизмов защиты [24]. При этом именно при сердечно-сосудистых заболеваниях стресс чаще всего играет важную роль в развитии различных патофизиологических процессов, оказывающих вредоносное воздействие на организм [249, 344]. Вот почему для исключения влияния дополнительных факторов воздействия, возникающих при экспериментальном ИМ, было проведено исследование влияния соединения L-17 на развитие стрессорной реакции при иммобилизационном стрессе у крыс.

5.1 – Влияние введения соединения L-17 на изменение показателей периферической крови при иммобилизационном стрессе

Результаты влияния введения соединения L-17 на изменение показателей периферической крови при иммобилизационном стрессе представлены в *таблице 33*. Со стороны эритроидного ростка кроветворения при отсутствии достоверной разницы в числе эритроцитов между группами в течение всего эксперимента, через 6 часов после начала эксперимента в группах F и G наблюдалось достоверное увеличение гемоглобина (Hb) по сравнению с группой интактных животных ($18,68 \pm 0,39$ г/дл в группе D и $18,22 \pm 0,36$ г/дл в группе F против $16,09 \pm 0,19$ г/дл в группе A), среднего содержания гемоглобина в эритроците – MCH ($18,82 \pm 0,27$ пг в группе G и $18,54 \pm 0,45$ пг в группе F против $16,63 \pm 0,20$ пг в группе A) и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах – MCHC ($37,40 \pm 0,80$ г/дл в группе G и $36,90 \pm 0,47$ г/дл в группе F против $34,12 \pm 0,41$ г/дл в группе A).

Также наблюдалось достоверное увеличение показателя гематокрита – Hct ($50,00 \pm 0,57$ % в группе G и $49,40 \pm 1,19$ % в группе F против $16,09 \pm 0,19$ % в группе A), и ширины распределения эритроцитов по объему – RDW ($16,68 \pm 0,21$ % в группе G и $16,38 \pm 0,31$ % в группе F против $15,10 \pm 0,20$ в группе A).

Со стороны тромбоцитарного звена через 6 часов от начала эксперимента в группах F и G по сравнению с группой A определялось достоверное увеличение количества как тромбоцитов – Plt ($837,20 \pm 69,7$ T/uL в группе B и $907,40 \pm 100,86$ T/uL в группе G против $648,24 \pm 25,10$ T/uL в группе A), так и тромбокрита – Pct, ($0,59 \pm 0,04$ % в группе F и $0,61 \pm 0,05$ % в группе g против $0,45 \pm 0,01$ % в группе A).

Согласно полученным данным после окончания шестичасового иммобилизационного стресса и в группе F и в группе G наблюдался выраженный достоверный лейкоцитоз ($19,90 \pm 1,28$ T/uL в группе F и $22,46 \pm 0,70$ T/uL в группе G против $10,15 \pm 0,59$ T/uL в группе A) с тенденцией к большей выраженности в группе G. При этом основную роль в увеличении числа лейкоцитов сыграл

значительный рост число гранулоцитов ($14,80 \pm 1,48$ T/uL в группе F и $18,32 \pm 0,54$ T/uL в группе G против $2,73 \pm 0,28$ T/uL в группе A).

Таблица 33 – Влияние введения соединения L-17 на изменение показателей периферической крови при иммобилизационном стрессе.

Показатель и	Интактные животные (группа A) n=5 M±m	Иммобилизационный стресс			
		Через 6 часов	Через 6 часов	Через 2 суток	Через 2 суток
		Группа F n=5 M±m	Группа G n=5 M±m	Группа F-2 n=6 M±m	Группа G-2 n=5 M±m
WBC, T/uL	$10,15 \pm 0,59$	$19,90 \pm 1,28^*$	$22,46 \pm 0,70^*$	$11,02 \pm 0,83$	$12,36 \pm 1,0$
Lym, T/uL	$7,42 \pm 0,38$	$3,64 \pm 0,30^*$	$3,64 \pm 0,32^*$	$6,23 \pm 0,54^*¥$	$6,40 \pm 0,37¥$
Mid, T/uL	$1,09 \pm 0,09$	$1,46 \pm 0,54^*$	$0,50 \pm 0,10^{*#}$	$1,31 \pm 0,19$	$3,42 \pm 1,42^{*} \$ ¥$
Grn, T/uL	$2,73 \pm 0,28$	$14,80 \pm 1,48^*$	$18,32 \pm 0,54^{*#}$	$4,99 \pm 0,55^*$	$4,34 \pm 0,70^* ¥$
Lym, %	$68,24 \pm 1,65$	$18,60 \pm 1,73^*$	$16,20 \pm 1,17^*$	$56,73 \pm 2,05^* ¥$	$52,40 \pm 1,78^* ¥$
Mid, %	$9,92 \pm 0,58$	$7,40 \pm 2,75$	$2,20 \pm 0,40^{*#}$	$9,26 \pm 0,95$	$13,20 \pm 3,39^* \$ ¥$
Grn, %	$25,10 \pm 1,21$	$62,00 \pm 11,5^*$	$81,60 \pm 0,88^{*#}$	$34,64 \pm 3,56^* ¥$	$34,40 \pm 3,91^* ¥$
RBC, T/л	$9,10 \pm 0,14$	$9,84 \pm 0,23$	$9,93 \pm 0,18$	$9,35 \pm 0,21$	$8,67 \pm 0,68$
Hb, г/дл	$16,09 \pm 0,19$	$18,22 \pm 0,36^*$	$18,68 \pm 0,39^*$	$16,02 \pm 0,95$	$16,62 \pm 0,55$
Hct, %	$42,84 \pm 0,39$	$49,40 \pm 1,19^*$	$50,00 \pm 0,57^*$	$44,28 \pm 0,73$	$45,76 \pm 1,28^*$
MCV, фл	$50,06 \pm 0,61$	$50,24 \pm 1,02$	$50,40 \pm 0,60$	$46,7 \pm 0,41$	$49,44 \pm 0,52$
MCH, пг	$16,63 \pm 0,20$	$18,54 \pm 0,45^*$	$18,82 \pm 0,27^*$	$16,6 \pm 0,5$	$17,96 \pm 0,19 \$$
MCHC, г/дл	$34,12 \pm 0,41$	$36,90 \pm 0,47^*$	$37,40 \pm 0,80^*$	$36,61 \pm 0,32^*$	$36,28 \pm 0,22^*$
RDW, %	$15,10 \pm 0,20$	$16,38 \pm 0,31^*$	$16,68 \pm 0,21^*$	$16,09 \pm 0,15^*$	$17,14 \pm 0,32^*$
Plt, T/uL	$648,24 \pm 25,10$	$837,20 \pm 69,7^*$	$907,40 \pm 100,86^*$	$631,05 \pm 17,44$	$726,40 \pm 57,77$
Pct, %	$0,45 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,04^*$	$0,61 \pm 0,05^*$	$0,38 \pm 0,01^*$	$0,40 \pm 0,08^*$
MPV, фл	$6,76 \pm 0,09$	$7,08 \pm 0,20$	$6,90 \pm 0,11$	$6,32 \pm 0,13$	$6,76 \pm 0,08$
PDW, %	$11,56 \pm 0,10$	$11,78 \pm 0,26$	$11,64 \pm 0,11$	$11,5 \pm 0,19$	$11,68 \pm 0,12$

Примечание: * – достоверные различия от группы A ($p < 0,05$); # – достоверные различия между группами F и G; \$ – достоверные различия между группами F-2 и G-2 ($p < 0,05$); ¥ – достоверные различия групп F-2 и G-2 от групп F и G.

В то время как число лимфоцитов в периферической крови достоверно уменьшилось как в группе F, так и в группе G ($3,64 \pm 0,30$ T/uL в группе F и $3,64 \pm 0,32$ T/uL в группе G против $7,42 \pm 0,38$ T/uL в группе A).

Особо обращает на себя внимание изменение числа клеток в смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (Mid), основную часть которой представляют моноциты. Если уровень Mid в группе F достоверно увеличился по сравнению с группой A ($1,46 \pm 0,54$ T/uL в группе F против $1,09 \pm 0,09$ T/uL в группе A), то в группе G уровень Mid оказался достоверно ниже, чем в группах A и F ($0,50 \pm 0,10$ T/uL в группе G против $1,46 \pm 0,54$ T/uL в группе F и $1,09 \pm 0,09$ T/uL в группе A).

Через 2 суток после начала эксперимента общее число лейкоцитов в группах F-2 и G-2 в периферической крови снизилось и перестало достоверно отличаться от числа лейкоцитов в группе интактных животных. При этом число гранулоцитов спустя 2 суток от начала эксперимента также достоверно снизилось по сравнению с показателями через 6 часов после начала эксперимента, но оставалось достоверно выше, чем в интактной группе. А вот число лимфоцитов через 2 суток от начала эксперимента достоверно повысилось как в группе F-2, так и в группе G-2, став достоверно выше, чем после 6 часов от начала эксперимента ($6,40 \pm 0,37$ T/uL в группе F-2 против $3,64 \pm 0,32$ T/uL в группе F и $6,23 \pm 0,54$ T/uL в группе G-2 против $3,64 \pm 0,32$ T/uL в группе D-1).

Особый интерес представляет изменение числа Mid через 2 суток от начала эксперимента в группе G-2. В этой группе число средних клеток увеличилось и стало достоверно больше числа Mid в группах A, F и G ($3,42 \pm 1,42$ T/uL в группе G-2 против $1,09 \pm 0,09$ T/uL в группе A, $1,46 \pm 0,54$ T/uL в группе F и $0,50 \pm 0,10$ T/uL в группе G). В принципе, изменения данных процентного отношения клеток периферической крови при иммобилизационном стрессе не противоречат данным количественного определения белых кровяных телец.

5.2 – Влияние соединения L-17 на морфометрические показатели островкового аппарата поджелудочной железы при иммобилизационном стрессе

Изменения островкового аппарата поджелудочной железы при иммобилизационном стрессе на фоне введения соединения L-17 представлены в *таблице 34*.

Согласно результатам морфометрического исследования, после 6 часовой иммобилизации у животных группы G определялась тенденция к увеличению средней площади панкреатического островка по сравнению с группой A; Однако только спустя 2 суток от начала эксперимента средняя площадь панкреатического островка в группе с введением соединения L-17 достоверно превышала среднюю площадь панкреатического островка в группе интактных животных ($10\,725,79 \pm 1\,223,58$ мкм² в группе G-2 против $6\,887,46 \pm 1\,219,04$ мкм² в группе A). При этом у животных групп F и F-2 средняя площадь панкреатических островков в течение эксперимента достоверно не отличалась от показателей группы A.

Плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток в 1 мм² панкреатического островка в группах F и G имела тенденцию к увеличению по сравнению с группой A, но через 24 часа после начала эксперимента уменьшение плотности распределения инсулинпродуцирующих клеток в 1 мм² панкреатического островка в группе B2 привело к тому, что плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток в 1 мм² в группе G-2 стала достоверно выше, чем в группе F-2 ($4\,442,39 \pm 243,69$ клеток в 1 мм² в группе G-2 против $3\,509,54 \pm 246,31$ клеток в 1 мм² в группе F-2).

Таблица 34 – Результаты морфометрического исследования островкового аппарата поджелудочной железы

Показатели	Интактные животные Группа А n=5 M±m	Иммобилизационный стресс			
		Через 6 часов	Через 6 часов	Через 2 суток	Через 2 суток
		Группа F n=5 M±m	Группа G n=5 M±m	Группа F-2 n=6 M±m	Группа G-2 n=5 M±m
Средняя площадь панкреатического островка (мкм ²)	6 887,46 ± 1 219,04	6 714,38 ± 1 486,71	8 075,05 ± 1 034,92	7 394,78 ± 1 347,04	10 725,79 ± 1 223,58*#
Плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток в 1мм ² панкреатического островка	3 942,13 ± 137,16	4 564,24 ± 373,53	4 582,25 ± 282,22	3509,54 ± 246,31	4 442,39 ± 243,69#

*Примечание: * – различия по сравнению с группой А статистически значимы ($p < 0,05$); # – различия между группами F-2 и G-2 статистически значимы ($p < 0,05$).*

5.3 – Влияние соединения L-17 на изменение биохимических показателей крови животных при иммобилизационном стрессе

Результаты биохимического исследования представлены в *таблице 35*. Через 6 часов от начала эксперимента возникло достоверное повышение уровня глюкозы по сравнению с интактными животными как в группе без введения соединения L-17, так и в группе с введением соединения L-17, но при этом уровень глюкозы в группе G был достоверно ниже, чем в группе F ($8,2 \pm 0,6$ ммоль/л в группе D против $9,8 \pm 0,2$ ммоль/л в группе B). Через 48 часов уровень глюкозы достоверно не снизился по сравнению с показателями, полученными

через 6 часов от начала эксперимента, но исчезла достоверная разница между группами F и G.

Таблица 35 – Биохимические показатели в плазме крови крыс при иммобилизационном стрессе

Показатели	Интактные животные	Иммобилизационный стресс			
		Через 6 часов	Через 6 часов	Через 2 суток	Через 2 суток
	Группа А n=5 M±m	Группа F n=5 M±m	Группа G n=5 M±m	Группа F-2 n=6 M±m	Группа G-2 n=5 M±m
Глюкоза, ммоль/л	5,1±0,5	9,8±0,2*	8,2±0,6*#	8,9±0,3*	8,6±0,5*
Кортикостерон, нг/л	36,5±8,8	33,1±14,8	40,3±6,2	83,6±5,4*	79,2±10,4*
АСТ, U/l	12,7±1,7	22,8±1,0*	23,6±2,5*	25,6±1,5*	24,1±1,5*
АЛТ, U/l	10,5±0,7	12,1±1,7	12,5±1,8	12,9±3,4	14,5±1,8
АСТ/АЛТ	1,22±0,24	1,88±0,20	1,90±0,15	1,98±0,20*	1,70±0,23

*Примечание: * – различия по сравнению с группой А статистически значимы ($p<0,05$); # – различия между группами F и G статистически значимы ($p<0,05$).*

Уровень кортикостерона достоверно повысился по сравнению с показателями интактной группы только через 24 часа после начала эксперимента, причём, достоверная разница между показателями в группах F и G отсутствовала. Особого внимания обращает на себя достоверное увеличение АСТ, выявленное как через 6, так и через 24 часа после начала эксперимента, при этом отсутствовала достоверная разница между группами с введением и без введения соединения L-17; в то время как уровень АЛТ имел только тенденцию к повышению по сравнению с показателями интактных животных.

5.4 – Влияние соединения L-17 на изменение гистологической картины надпочечников и тимуса при иммобилизационном стрессе

5.4.1 – Влияние соединения L-17 на гистологическую картину тимуса при иммобилизационном стрессе

Для сравнения с изменениями тимуса под влиянием стресса на *рисунке 37* приводится гистологическая картина тимуса у интактных животных (группа А).

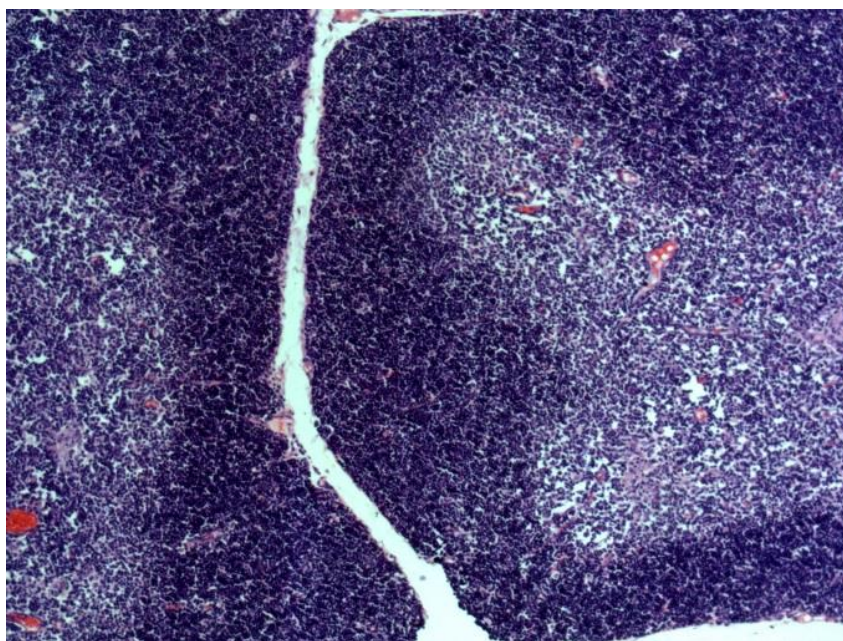


Рисунок 37 – Интактные животные. Тимус. Структура соответствует гистологической норме (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

Результаты влияния введения соединения L-17 на изменение гистологической картины тимуса при иммобилизационном стрессе через 6 часов от начала эксперимента. На *рисунке 38* отображена картина тимуса у животных группы F через 6 часов после начала эксперимента. При гистологическом исследовании животных группы F после 6 часовой иммобилизации определялись полнокровие и капилляростаз в сосудах мозгового вещества. На *рисунке 39* отображена картина тимуса у животных группы G через 6 часов после начала эксперимента на фоне введения соединения L-17. При гистологическом исследовании животных группы G через 6 часов от начала эксперимента на фоне

введения соединения L-17 выявлялось полнокровие сосудов мозгового слоя, но, при этом, также отмечалось увеличение толщины коркового слоя, а в мозговом слое – значительное количество лимфоидных элементов.

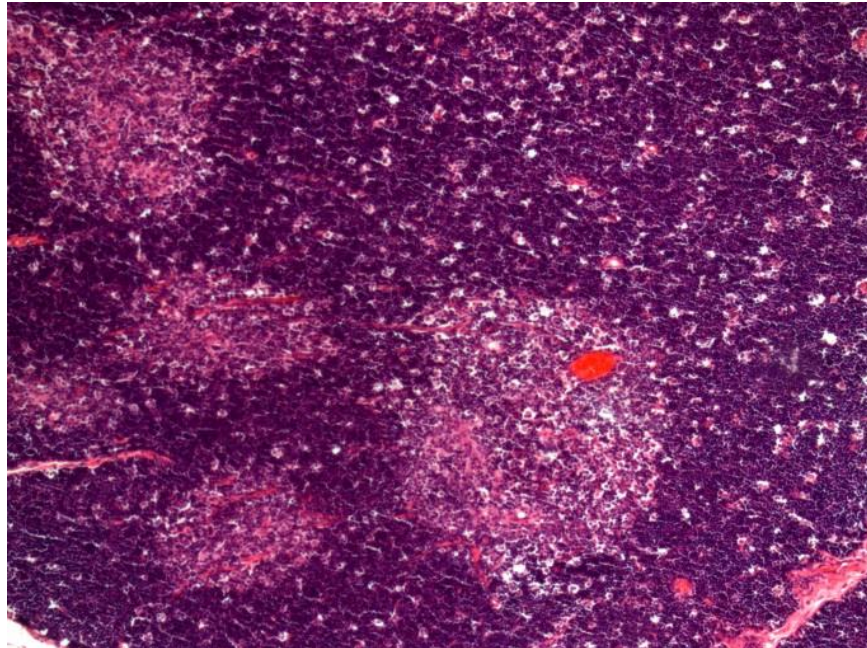


Рисунок 38 – Тимус. Группа F. Полнокровие и капилляростаз в сосудах мозгового вещества (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

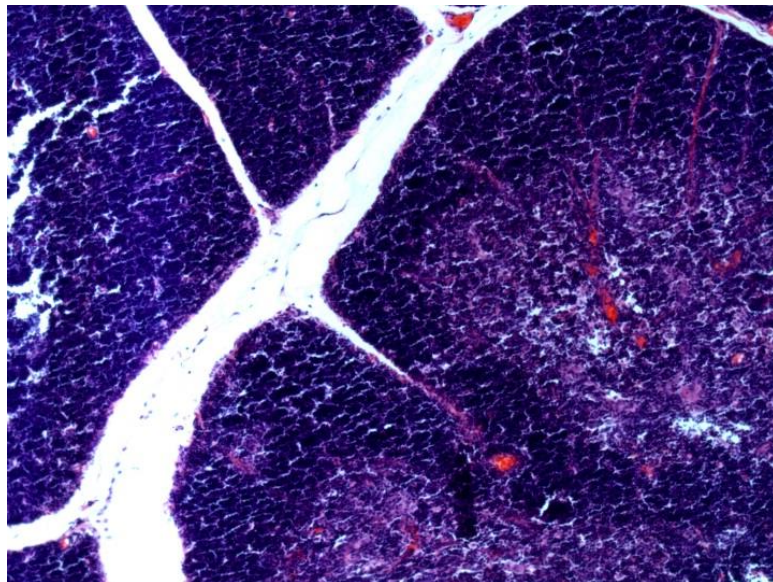


Рисунок 39 – Тимус. Группа G. Полнокровие сосудов мозгового слоя (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На *рисунке 40* отображена картина тимуса через 2 суток после начала эксперимента.

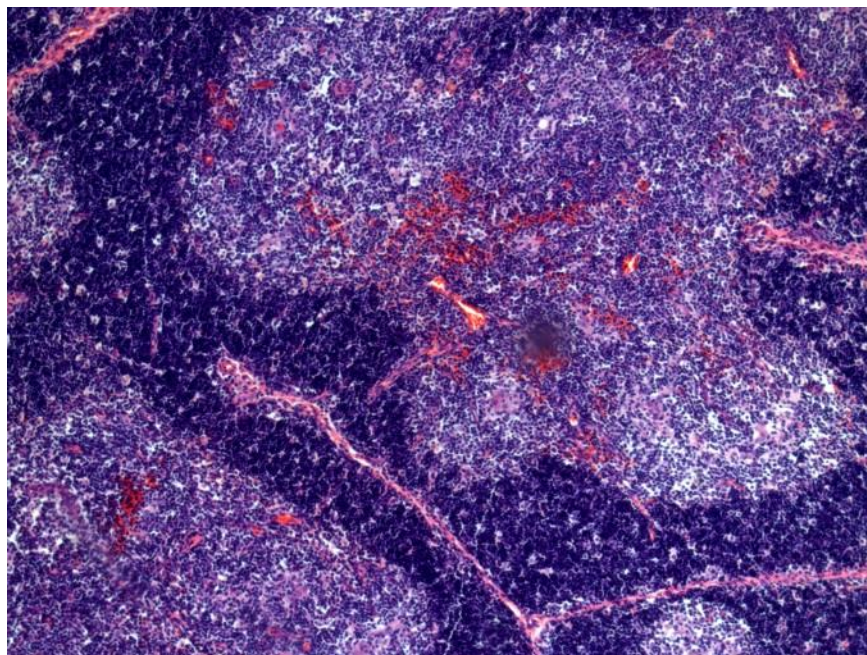


Рисунок 40 – Тимус. Группа F. Стертость границ между корковым и мозговым веществом в дольках, истончение коркового слоя, расширение мозгового вещества, оголение стромы (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы F через 2 суток от начала эксперимента наблюдалась стертость границ между корковым и мозговым веществом в дольках, истончение коркового слоя, расширение мозгового вещества, фиксировалось уменьшение объема лимфоидной ткани (числа лимфоидных фолликулов в белой пульпе и их размеров) и оголение стромы на фоне выраженного отека, что свидетельствовало об угнетении процессов лимфопоэза.

На *рисунке 41* отображена картина тимуса через 2 суток после начала эксперимента на фоне введения соединения L-17.

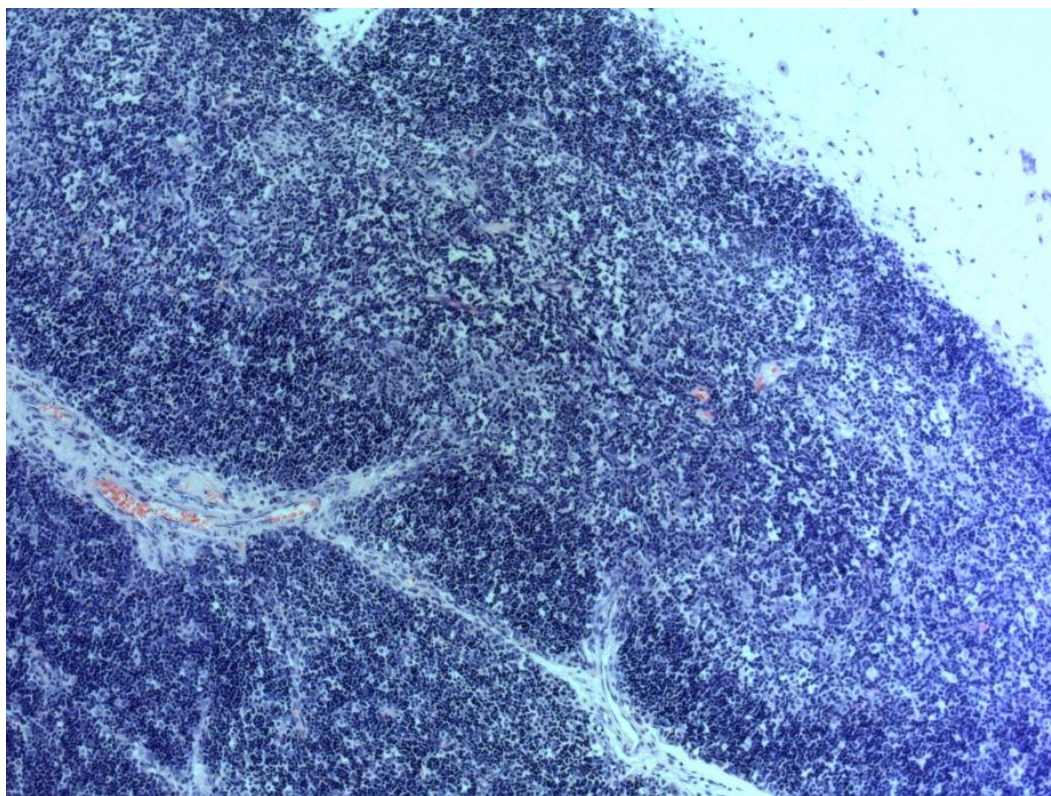


Рисунок 41 – Тимус. Группа G-2. Стертость границ коркового и мозгового вещества; лимфоидные элементы в значительном количестве (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы D через 2 суток от начала эксперимента, на фоне введения соединения L-17, наблюдалась стертость границ коркового и мозгового вещества; лимфоидные элементы обнаруживались в значительном количестве в мозговом веществе долек, что свидетельствовало о наблюдаемом усилении процессов лимфопоэза.

5.4.2 – Результаты влияния соединения L-17 на гистологическую картину надпочечников при иммобилизационном стрессе

Для сравнения с изменениями надпочечников под влиянием стресса на *рисунке 42* приводится гистологическая картина надпочечников у интактных животных.

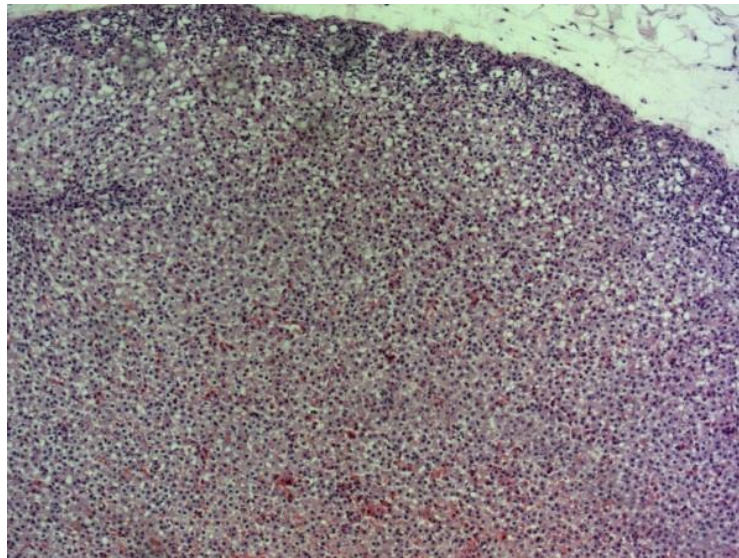


Рисунок 42 – Надпочечники. Интактные животные. Структура надпочечников соответствует гистологической норме (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

На *рисунке 43* отображена гистологическая картина надпочечников через 6 часов после начала эксперимента.

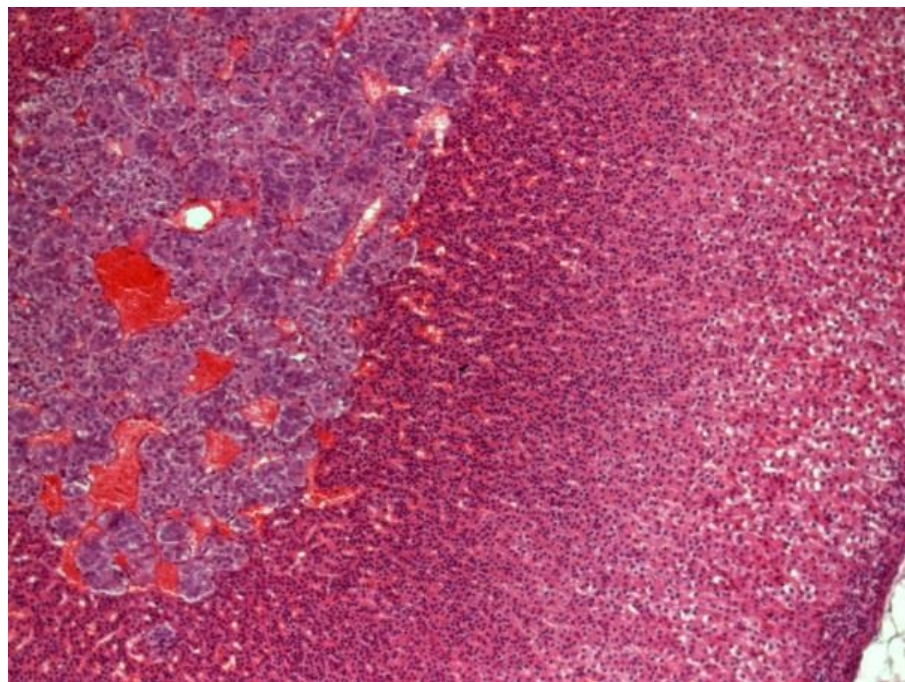


Рисунок 43 – Надпочечники. Группа F. Диффузное полнокровие капилляров стромы с образованием сладж-комплексов (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы F после 6 часовой иммобилизации в надпочечниках выявлялись клетки без структурных изменений, капилляры стромы с диффузным полнокровием и образованием сладж-комплексов.

На *рисунке 44* отображена гистологическая картина надпочечников через 6 часов после начала эксперимента на фоне введения соединения L-17.

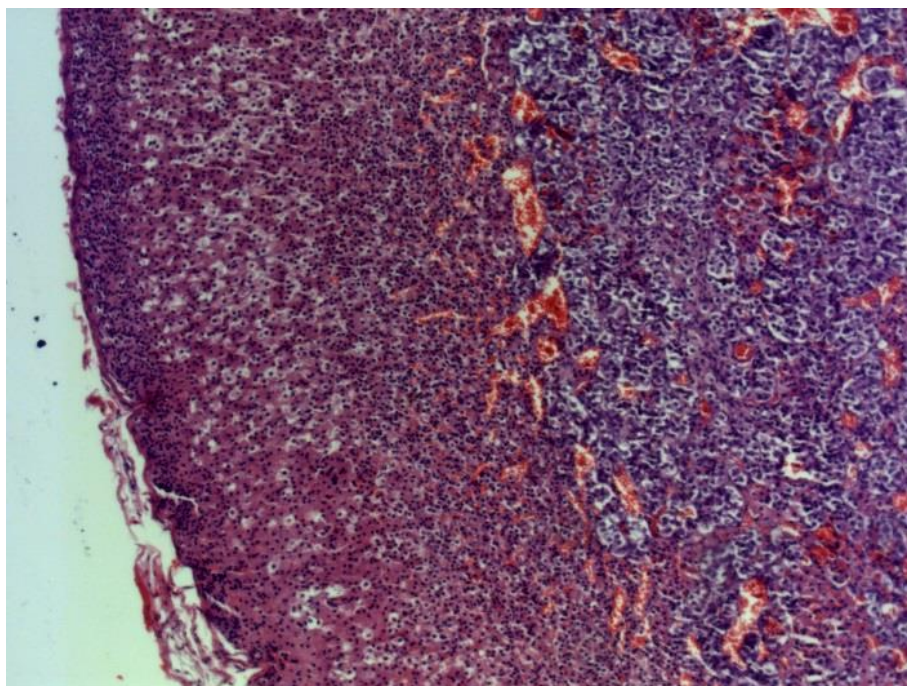


Рисунок 44 – Надпочечники. Группа G. Полнокровие сосудов мозгового слоя (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы G после 6 часовой иммобилизации на фоне введения соединения L-17 в надпочечниках определялось полнокровие сосудов мозгового слоя, в корковом слое структурных изменений не наблюдалось.

На *рисунке 53* отображена гистологическая картина надпочечников через 2 суток после начала эксперимента.

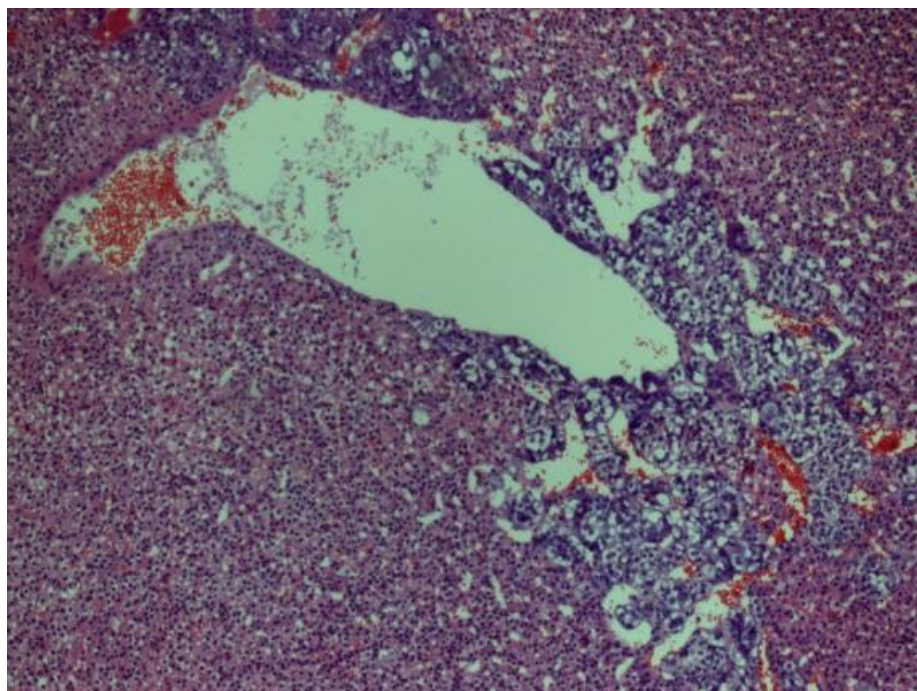


Рисунок 45 – Надпочечники. Группа F-2. Сосуды мозгового слоя расширены, полнокровны, с признаками тромбообразования; диффузное полнокровие капилляров, очаговая дистрофия клеток в мозговом слое и истертость слоев в корковом веществе органа (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы F-2 суток от начала эксперимента в надпочечниках сосуды мозгового слоя расширены, полнокровны, в части из них определяются признаки тромбообразования; на границе коркового и мозгового слоя обнаруживается диффузное полнокровие капилляров, выявлялась очаговая дистрофия клеток с вакуолизацией цитоплазмы в мозговом слое и истертость слоев в корковом веществе органа.

На *рисунке 46* отображена гистологическая картина надпочечников через 2 суток после начала эксперимента на фоне введения соединения L-17 (группа G-2).

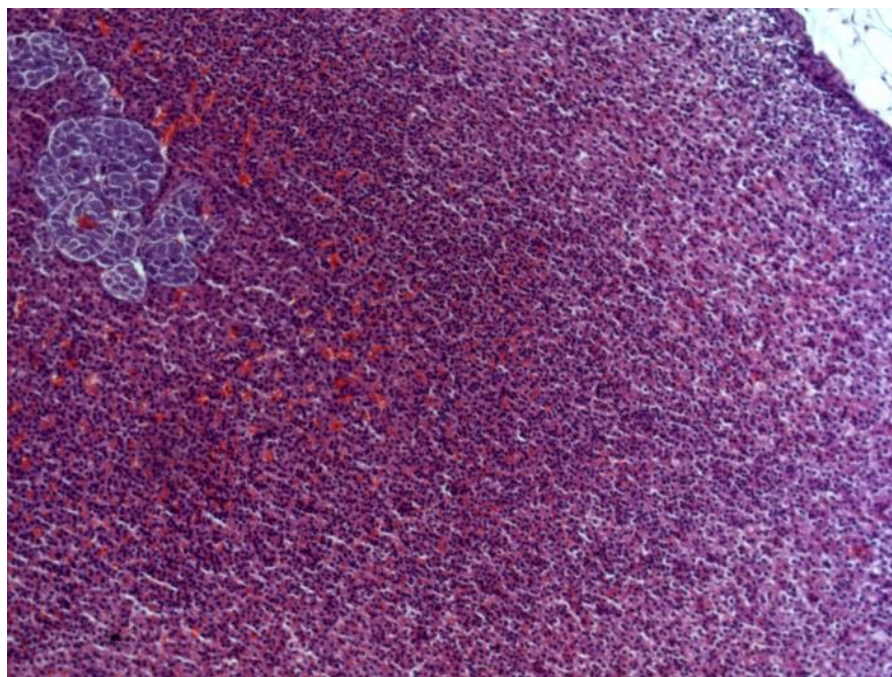


Рисунок 46 – Надпочечники. Иммобилизационный стресс через 2 суток после начала эксперимента на фоне введения соединения L-17 (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200).

При гистологическом исследовании животных группы G-2 в надпочечниках в мозговом слое определяется очаговое полнокровие сосудов стромы, корковый слой не был изменен.

Обсуждение. При анализе изменения показателей периферической крови, обращает на себя внимание появление через 6 часов после начала эксперимента в группах F и G достоверного увеличения гемоглобина (Hb) по сравнению с группой интактных животных. Эта реакция может быть объяснена тем, что стресс приводит к увеличению выделения адреналина и норадреналина, способных вызывать изменения в экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом, что в свою очередь может вызывать увеличение внутрисосудистого гемолиза и уровня плазменного свободного гемоглобина [96, 116].

Отсутствие при этом снижения числа эритроцитов может быть объяснено тем, что острая стрессорная анемия вызывает физиологическую реакцию, которая включает быстрое развитие новых эритроцитов (стрессорный

эритропозз), причём при стрессе скорость эритропозза увеличивается, а спектр мишеней-предшественников эритропоэтина шире и включает быструю мобилизацию и дифференцировку эритроидных клеток-предшественников в селезенке и печени [177]. Причём индукторами эритропозза могут становиться даже моноциты, дифференцирующиеся в макрофаги в течение примерно 2 дней.

Достоверное увеличение числа тромбоцитов (PLT) и их доли в объёме цельной крови (PCT) в группах F и G через 6 часов от начала эксперимента, то есть во время стрессорного увеличения катехоламинов в крови, обусловлено действием гиперкатехоламинемии на тромбоциты, поскольку к настоящему времени доказано, что адреналин и норадреналин иницируют агрегацию тромбоцитов путем взаимодействия с рецепторами на их поверхности [171, 207].

Достоверное увеличение числа лейкоцитов через 6 часов от начала эксперимента, в свою очередь, обусловлено резким увеличением числа нейтрофилов, которые в группе G, например, составляли $81,60 \pm 0,88\%$ всех лейкоцитов при $25,10 \pm 1,21\%$ нейтрофилов у интактных животных. Причиной столь выраженной нейтрофилии могло быть увеличение выделения кортикостероидов и катехоламинов при стрессе. Показано, что, в то время как катехоламины вызывают только сдвиг клеток из маргинального в циркулирующий пул и, действуя через β_2 -рецепторы на нейтрофилах, тормозят адгезию последних [114], то кортикостероиды увеличивают размер обоих пулов, а также ингибируют миграцию нейтрофилов в ткани [66, 281, 348]. Однако учитывая отсутствие достоверного повышения уровня кортикостерона через 6 часов от начала эксперимента, возможно, основную роль в появлении нейтрофилии играли все-таки катехоламины, вызывающие мобилизацию нейтрофилов из маргинального пула в лёгких [246].

Внимание также заслуживает и изменение числа клеток смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов (Mid), в основном состоящей из моноцитов на фоне введения соединения L-17, заключающееся в достоверном уменьшении числа клеток Mid в группе G по сравнению группами F и A, и достоверном увеличении числа клеток Mid в группе G-2 по сравнению с группами F, F-22, G и A.

Учитывая, что как глюкокортикоиды, так и высокие дозы катехоламинов способны стимулировать апоптоз моноцитов, можно было бы предположить, что уменьшение числа клеток Mid в группе G обусловлено влиянием соединения L-17 на активность апоптоза [127]. Однако уровень кортикостерона через 6 часов от начала эксперимента в группах F и G достоверно не отличался от уровня кортикостерона у интактных животных, а через 48 часов, несмотря на достоверное повышение уровня кортикостерона, число клеток Mid на фоне введения соединения L-17 стало достоверно выше не только числа клеток Mid в группе интактных животных, но и показателей группы F-2. А, следовательно, влияние уровня кортикостерона не могло привести к уменьшению числа Mid клеток через 6 часов от начала эксперимента.

В тоже время данные проведённого исследования о влиянии соединения L-17 на развитие ИМ, выявившие увеличение числа моноцитов/макрофагов в зоне повреждения уже на раннем этапе развития ИМ, заставляют предположить, что уменьшение числа моноцитов в крови через 6 часов от начала иммобилизационного стресса было обусловлено усилением миграции этих клеток в зоны повреждения. Причём, основной зоной повреждения в этом случае являлся миокард животных, находящихся в состоянии тяжёлого стресса, что согласуется с данными литературы, согласно которым при иммобилизационном стрессе у крыс возникает стрессорная кардиопатия, способная вызвать у стрессочувствительных животных ИМ [55] и привести к гибели животных [8].

Подтверждением наличия подобного поражения сердца в проведённом исследовании является то, что через 2 суток от начала эксперимента уровень АСТ в группе D-2 достоверно не отличался от уровня АСТ через 24 часа от начала ИМ ($25,6 \pm 1,5 \text{ U/l}$ при иммобилизационном стрессе и $24,9 \pm 2,0 \text{ U/l}$ при ИМ).

Несомненную значимость в развитии проявлений дистресса играет влияние продуктов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси на эндокринную часть поджелудочной железы: согласно литературным данным в острую фазу стресса подавление секреции инсулина чётко коррелирует с повышением концентрации адреналина плазмы, а блокада α -рецепторов

поджелудочной железы катехоламинами приводит к прекращению инсулиногенеза [10]. Глюкокортикоиды, в свою очередь, уменьшают толерантность к глюкозе за счет повышения продукции глюкозы в печени и нарушения периферической утилизации глюкозы, снижают чувствительность к инсулину и скорость отклика на действие инсулина в периферических тканях, увеличивают глюконеогенез и напрямую воздействуют на выработку инсулина, действуя через рецепторы в ядрах и цитоплазме бета-клеток островков поджелудочной железы [212]. Однако несмотря на то, что увеличение базовых уровней кортикостерона, которое сохраняется вплоть до 7-го дня после окончания стресса, должно было приводить к снижению уровня глюкозы за счёт действия отдельных механизмов инсулинорезистентности [172].

В принципе, вне зависимости от механизма возникновения, стрессорная гипергликемия является отличительным клиническим признаком опасного заболевания. Особое значение гипергликемия имеет при патологии сердца, и даже была определена в качестве независимого фактора риска развития ИБС, коррелирующим с плохим прогнозом после острого ИМ [104]. Опасность гипергликемии определяется как ее влиянием на уровень провоспалительных цитокинов, снижением защитных эффектов ишемического preconditionирования и индукцией апоптоза кардиомиоцитов, так и воздействием на структуру последних в виде индукции дегенерации миофибрилл [172].

Подтверждением развития дистресса при проведённой иммобилизации являлось повышение уровня глюкозы в крови через 6 и 48 часов после начала эксперимента, но у животных на фоне введения соединения L-17, уровень глюкозы в крови через 6 часов был достоверно ниже, чем у животных контрольной группы ($8,2 \pm 0,6$ ммоль/л в группе G против $9,8 \pm 0,2$ ммоль/л в группе F), это соотношение сохранялось и через 48 часов от начала эксперимента. Исходя из этого, можно предполагать наличие антистрессорного (а следовательно, и кардиопротективного) эффекта соединения L-17, который нивелировал ожидаемое стрессорное повышение глюкозы.

Однако ещё большее значение, чем уровень глюкозы, может иметь гипоинсулинемия, так как именно инсулин нивелирует повреждение миокарда при ишемии/реперфузии за счет снижения выраженности окислительного стресса, повышает уровень эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), препятствующей спазму гладких мышц и агрегации тромбоцитов и нормализует маркер NO-зависимого оксидативного стресса – нитротирозин, а блокада рецепторов к инсулину ведет к снижению цикла трикарбоновых кислот и окислительного потенциала жирных кислот с развитием митохондриальной дисфункции [229]. Также инсулин снижает выработку провоспалительных цитокинов [231], ингибирует адгезию полиморфноядерных лейкоцитов и эндотелиальных клеток [229]. Все это ведет к тому, что уменьшается размер ИМ, снижается активность КФК и ЛДГ и апоптоза кардиомиоцитов, уменьшается дилатацию левого желудочка и увеличивается фракцию сердечного выброса [230].

Исходя из этого, было осуществлено гистоморфологическое исследование ткани поджелудочной железы экспериментальных животных и установлено, что через 6 часов от начала эксперимента средняя площадь панкреатического островка и плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток в группах А, F и G достоверно не отличались друг от друга. Этот факт соответствует данным о том, что в первые сутки никаких существенных изменений в островках поджелудочной железы не наблюдается [165]. Однако уже через 48 часов средняя площадь панкреатического островка и плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток у животных на фоне введения соединения L-17, были достоверно больше, чем у животных контрольной группы (с экспериментальным ИМ) и это при том, что при стрессе без лечения увеличение островкового аппарата начинается только с 15 дня после развития стресса [165], что подтверждает способность соединения L-17 уменьшать отрицательное воздействие стресса на систему производства инсулина в поджелудочной железе.

Однако наибольшую значимость в подтверждении антистрессорного эффекта имеет доказательство эффективности воздействия соединения L-17 на

состояние тимуса, так как именно для тяжёлого стресса типично клеточное опустошение тимуса, происходящее под влиянием кортикостероидов, способных сокращать численности тимоцитов, уменьшать число зародышевых центров, а при высоких дозах – даже уничтожать тимоциты и ретикулярные клетки. Именно изменение тимуса является одним из трёх универсальных проявлений стресса по Селье: уменьшение тимуса, увеличение коры надпочечников и появление кровоизлияний и даже язв в слизистой желудочно-кишечного тракта [61, 334].

Согласно полученным результатам, иммобилизационный стресс вызвал через 2 суток уменьшение объема лимфоидной ткани (числа лимфоидных фолликулов в белой пульпе и их размеров) и оголение стромы на фоне выраженного отека, что свидетельствовало об угнетении процессов лимфопоэза и подтверждало тяжесть вызываемого стресса. В тоже время введение соединения L-17 предотвращало опустошение тимуса и усиливало в нём процесс лимфопоэза. Данный эффект в виде предотвращения опустошения тимуса позволяет предположить наличие различий в популяции лимфоцитов крови групп F-2 и G-2 через 2 суток после стресса. Дело в том, что стресс вызывает как апоптоз Т-timoцитов, наиболее чувствительных к глюкокортикоидам, так и клеточное опустошение органа за счёт малых тимоцитов [8, 61], причём, в этом случае в кровотоке поступают клетки, не завершившие «нормальную» дифференциацию в органе [23, 24, 60]. Именно поэтому, несмотря на статистически недостоверную разницу в содержании лимфоцитов в крови в группах F-2 и G-2 ($6,23 \pm 0,54$ T/uL в группе F-2 и $6,40 \pm 0,37$ T/uL в группе G-2), можно предполагать, что качественный состав лимфоцитов в группе F-2, должен быть хуже, чем в группе G-2 (на фоне введения соединения L-17), в котором опустошения тимуса не наблюдалось.

Описанный антистрессорный эффект соединения L-17 также может объяснить и снижение выраженности воспалительной реакции при экспериментальном ИМ. Механизмы влияния острого и хронического стрессов на выраженность воспалительной реакции обусловлены тем, что острый стресс,

в том числе и иммобилизационный, вызывает секрецию кортикотропин-рилизинг-гормона и индуцирует экспрессию мРНК IL-1 в гипоталамусе, что в дальнейшем ведет к активации тучных клеток [193]. Тучные клетки, в свою очередь, являются основным источником не только гистамина, но и цитокинов, таких как TNF- α [3, 63, 113], который может выходить в межклеточное пространство при дегрануляции последних и становится посредником в инициации провоспалительного каскада [205, 210, 318]. При этом именно в сердце имеется большое количество тучных клеток, которые подвергаются дегрануляции при стрессе [87], вследствие чего снижение выраженности стрессорной реакции на фоне введения соединения L-17 у животных с экспериментальным ИМ может снижать выраженность воспалительной реакции в миокарде.

Список работ, опубликованных по результатам 5-ой главы:

1. Сарапульцев, П.А. Стресс и иммунная система / П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев* // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13, № 4. С. 5-10. (РИНЦ – 0,0317)
2. The impact of immunomodulator compound from the group of substituted thiadiazines on the course of stress reaction / P.A. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, S.U. Medvedeva, E.A. Mukhlynina, S.A. Brilliant, L.P. Sidorova, I.G. Danilova, *A.P. Sarapultsev* // International immunopharmacology. 2015. Т. 25, № 2. С. 440-449. (Web of Science 2.956)
3. Sarapultsev, P.A. Stress cardiomyopathy: Is it limited to Takotsubo syndrome? Problems of definition / P.A. Sarapultsev, *A.P. Sarapultsev* // International Journal of Cardiology. 2016. № 221. С. 698-718 (Web of Science 6.189)
4. The impact of immune modulators from the group of substituted thiadiazines on the severity of stress reaction / *A. Sarapultsev*, O. Chupakhin, P. Sarapultsev, E.

- Mukhlynina, G. Sarapultsev, S. Medvedeva, I. Danilova // FASEB Journal. 2015. Т. 28, № 1 (приложение). С. 1054-7 (Web of Science 5.498)
5. Substituted thiadiazines as potential anti-stress agents. Results of (Q)SAR prediction and experiments in vivo / *A.P. Sarapultsev*, P.A. Sarapultsev, L.P. Sidorova, V.V. Poroikov, O.N. Chupakhin // FASEB Journal. 2016. Т. 30, № 1(приложение). С. 938.5 (Web of Science 5.498)
 6. Компьютерный скрининг соединений из группы тиадиазинов с целью выявления соединений с антистрессорным и антифобическим действием / *А.П. Сарапульцев*, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Г.П. Сарапульцев, Л.П. Сидорова // материалы XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2015. С. 225.
 7. Оценка нейролептического/антистрессорного действия соединения 117 группы замещенных тиадиазинов по данным компьютерного моделирования и экспериментов in vivo / *А.П. Сарапульцев*, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Л.П. Сидорова, Г.П. Сарапульцев, Т.А. Цейтлер // материалы XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2016. С. 201.
 8. Центральное действие замещенных тиадиазинов / *А.П. Сарапульцев*, О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, Л.П. Сидорова, Т.А. Цейтлер, М.А. Ранцев // материалы XX Менделеевского съезда под эгидой Международного союза по теоретической и прикладной химии (IUPAC) в 5-ти томах. Екатеринбург, 2016. Т. 4. С. 552.
 9. Substituted thiadiazines with the anti-stress action as a promising cardiovascular drugs / O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, *A.P. Sarapultsev*, L.P. Sidorova, T.A. Tseitler // Conference: XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry, Perugia, Italy. September 11th to 14th, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.21722.75208.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начиная с начала XX столетия, частота развития ИМ неуклонно нарастает в развитых странах Европы и Америки, при этом внутрибольничная смертность варьирует от 6 до 14 %, кроме того, около трети больных умирают в течение первого года после ИМ, а ещё у 18% развивается повторный ИМ.

Приведённые данные свидетельствуют о недостаточной эффективности лекарственной терапии при ИМ, которая, в настоящее время, стандартна и однотипна, как в России, так и во всех развитых странах. При этом одной из причин неэффективности терапии является то, что большинство препаратов, применяемых при лечении ИМ (таких, как нитроглицерин или каптоприл), оказывают своё действие только за счёт уменьшения сердечной преднагрузки и постнагрузки, то есть за счёт биофизического, а не противовоспалительного/антистрессорного действия, и потому не улучшают процессы заживления инфарктированного миокарда.

Однако необходимо отметить, что практически все попытки локального воздействия при ИМ на отдельные механизмы воспалительной реакции показали свою неэффективность либо уже на стадии эксперимента, либо при попытках внедрить их в клиническую практику, что объясняется целым рядом факторов. Во-первых, сложность клинического сценария не может быть адекватно смоделирована в экспериментальных исследованиях, поскольку не учитывает влияния множества факторов, таких как возраст, пол, наличие сопутствующих заболеваний (диабет, ожирение и гиперлипидемия), сроков реперфузии и генетических вариаций у пациентов. Во-вторых, воспалительный каскад основан на сложной сети молекулярных посредников с плеiotропными эффектами, зависящими от временных переменных, вследствие чего любое вмешательство, даже вызывающее ослабление ранних проявлений воспалительного повреждения, может привести к ухудшению заживления. Так, в клинической практике одновременное применение нескольких препаратов, действующих на

различные механизмы формирования воспаления, может усугубить нарушения сердечной деятельности. В свою очередь, воздействие на отдельные факторы и посредники воспалительной реакции, имеют крайне ограниченное влияние на течение и исход заболевания.

Именно поэтому выявление новых соединений, способных комплексно воздействовать на воспалительный и стрессорные процессы при ИМ, является весьма актуальным и востребованным, как с теоретической, так и с практической точек зрения.

К моменту инициации работ по поиску новых способов терапии ИМ в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук и Уральском Федеральном Университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина под руководством академика О.Н. Чупахина был проведен цикл исследований, направленный на постановку синтеза и биологическую оценку ряда перспективных соединений класса 1,3,4-тиадиазинов. Данные исследования показали, что соединения класса 1,3,4-тиадиазинов обладают широким спектром биологической активности [17, 35, 78], и проявляют целый ряд эффектов, потенциально применимых в кардиологии, которые включают в себя как центральное действие на ЦНС, так и действие на свертывающую систему крови [74, 75, 77, 79].

В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что данные соединения оказывали антиагрегационное действие, ингибируя агрегацию, индуцированную как АДФ, так и арахидоновой кислотой, то есть имели сходство с действием аспирина и клопидогреля [77, 79].

В тоже время согласно результатам скринингового фармакологического исследования, основанного на методике дифференцировки групп препаратов по тестам первичного отбора [32], соединение L-17 группы 1,3,4-тиадиазинов обладало сочетанием свойств адreno -, холино - и серотонино - блокаторов; при этом, по спектру обнаруженных эффектов соединение L17 приближалось к атипичным мягким нейролептикам типа эглонила (сульпирида),

антидепрессантам типа амитриптилина и альфа-адреноблокаторам типа пирроксана.

Исходя из этого, на начальных стадиях эксперимента ожидался результат, аналогичный применению таких лекарственных средств как ацетилсалициловая кислота, клопидогрель и сульпирид. При этом, основываясь на данных ряда исследований (FRISC, COMMIT), в которых оценивался клинический эффект от применения антиагрегантов, ожидался умеренно-положительный эффект, в виде снижения смертности в пределах 10% или 20% (если основываться на результатах ISIS-2. Также по аналогии с результатами CLARITY-TIMI28, в котором оценивались терапевтические эффекты клопидогреля, можно было ожидать снижение частоты рецидивирования ИМ. В тоже время, результаты исследования CHARISMA, в котором оценивался риск наступления сердечно-сосудистой смерти при комбинированной антитромбоцитарной терапии, и который оказался достоверно выше, чем при монотерапии аспирином (3,9% против 2,2%) могло быть предвестником отрицательных результатов.

В свою очередь, данные фармакологического исследования, согласно которым исследуемые соединения схожи с такими атипичными нейрорептиками, как сульпирид, не позволяли сделать четкий прогноз действия исследуемых соединений при ИМ, так как данные о влиянии приема антидепрессантов и нейрорептиков как на течение уже развившегося ИМ, так и на возможность его развития, в силу целого ряда причин, в том числе и различного подхода к методологической части исследований, достаточно противоречивы. Так, согласно результатам исследования MIND-IT, в котором приняло участие 2177 пациентов с ИМ, принимавших антидепрессанты, последние не оказывали существенного эффекта ни на течение депрессии, ни на возникновение сердечно-сосудистых событий, хотя последующий анализ данного исследования и показал, что смертность принимавших антидепрессанты больных (миртазапин, циталопрам) была существенно ниже, чем у тех, кто их не принимал, несмотря на показания. Схожие данные были получены и в более позднем исследовании. Однако имеются и работы, в которых показано, что антидепрессанты могут

усиливать риск развития ССЗ, в том числе и ИМ. Например, согласно одной из последних работ, S-T. Lin, 2014, в которой были проанализированы данные о 56910 пациентах с психическими нарушениями, госпитализированных с подозрениями на ИМ, прием антидепрессантов ассоциировался с более высоким риском развития ИМ, причем, возрастал в случае высокой дозы и/или кратковременного применения последних [102, 273]. По мнению авторов, причиной увеличения риска развития ИМ являлась возможная блокада D3 рецепторов; однако четких механизмов, объясняющих данный эффект, описано не было [102, 273].

Таким образом доступные в литературе сведения о возможных эффектах таких препаратов как сульпирид на течение ИБС и ИМ не позволили сформировать однозначной полноценной картины. Подобная неоднозначность литературных данных и наши предварительные исследования влияния замещенных 1,3,4-тиадиазинов при экспериментальном ИМ, выявившие качественные отличия от результатов использования антиагрегантов при ИМ: существенное изменение характера развившегося поражения, ускорение репаративных процессов и снижение показателей смертности, потребовала расширение плана исследований.

Проведённые исследования включали в себя системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия соединения L-17, а также проведение экспериментов *in vivo* на моделях иммобилизационного стресса и экспериментального ИМ.

По результатам прогноза в программе PASS на основании результатов экспериментального изучения фармакологических эффектов L-17, в качестве целевых для дальнейшего анализа в программе PharmaExpert таргетных механизмов действия, были определены следующие виды активности: Anesthetic general, Anesthetic, Cognition disorders treatment, Antiinflammatory, Phobic disorders treatment, Psychotropic, Immunostimulant, Antinociceptive, Cardiovascular analeptic, Antidepressant. При этом по совокупности экспериментальных тестов взаимодействия, соединение L-17 проявило себя как атипичный мягкий

нейролептик, антидепрессант и адrenoблокатор, имеющий, вероятно, следующие фармакологические механизмы действия: серотонинергическое, холинергическое, адренергическое, дофаминергическое, ГАМК-ергическое, глутаматергическое.

В дальнейшем был проведен поиск валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней и выявление их специфических сайтов связывания; в соответствии со спектром фармакологической активности соединения L-17, в качестве стандартных препаратов сравнения были выбраны мirtазапин и сульпирид.

Для более детального анализа предполагаемого механизма взаимодействия изученных соединений с выбранными мишенями был выполнен докинг вещества в сайты связывания 16 релевантных биомишеней с помощью программ PyRx 0.8. В результате обобщения всех данных *in silico* анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17 выявлено семь наиболее важных биомишеней, определяющих фармакологические эффекты L-17: серотониновый транспортер SERT, норадреналиновый транспортер NET, тирозин-киназа JAK3, M1-холинорецептор CHRM1, дофаминовые рецепторы DRD1 и DRD2, дофаминовый транспортер DAT. При докировании соединения L-17 было показано, что у исследуемого соединения наиболее выражены были свойства холиноблокатора, что соответствовало наименьшей энергии докинга в M1-холинорецептор CHRM1, и дофаминергические свойства, складывающиеся из активности в отношении D1 и D2 дофаминовых рецепторов (DRD1, DRD2) и ингибирования дофаминового транспортера DAT; умеренное серотонин-блокирующее действие было обусловлено, прежде всего, достаточно высокой аффинностью к серотониновому транспортеру SERT. Полученные данные позволили позиционировать соединение L-17 как мультитаргетный атипичный антидепрессант и атипичный нейролептик, с преимущественно пострецепторным действием, с возможным анксиолитическим компонентом [7].

Наконец, с целью детализации особенностей мультитаргетного действия соединения L-17, был выполнен анализ спектра его аффинности, в сравнении со

спектрами аффинности референсных препаратов (миртазапина и сульпирида), и, в последующем, сравнительный многомерный дисперсионный анализ спектров энергии докинга. Согласно полученным результатам спектр энергий докинга соединения L-17 высокодостоверно отличался от спектров энергий докинга референсных веществ (миртазапина и сульпирида). При этом больше всего, исследуемое соединение было похоже на сульпирид, а меньше всего – на миртазапин [7].

В целом, расчетными исследованиями было статистически доказано: соединение L-17 имеет оригинальный мультитаргетный спектр фармакологической активности, по характеру действия похожий на спектр активности сульпирида.

Схожий по свойствам с исследуемым соединением сульпирид относится к группе замещенных 2-метоксибензамидов, которая формирует отдельный класс фармакологических препаратов, используемых в качестве антипсихотических, антиэмитических (противорвотных), антидиспептических и прокинетических лекарственных средств, повышающих эвакуаторную активность желудка. Все препараты этой группы обладают сходным фармакологическим действием – селективной блокадой дофаминовых рецепторов D2-группы (D2, D3 и D4). Для представителей класса бензамидов характерно двойственное действие: в низких дозах (например, 50–200 мг сульпирида в сутки) препараты демонстрируют преимущественно антиэметический, антидиспептический и прокинетический эффекты, в то время как более высокие дозы (для сульпирида и амисульпирида: 300–800 мг в сутки), предположительно увеличивающие уровень проникновения через гематоэнцефалический барьер, приводят к более выраженной блокаде постсинаптических рецепторов D2-типа, что проявляется в отчётливом антипсихотическом действии и оказывает эффективное воздействие на продуктивную психотическую симптоматику.

Кроме того, по данным литературы, препараты, действующие на допаминергическую систему (включая сульпирид), оказывают эффект как при остром стрессе, так и при экспериментальном ИМ. Так, при иммобилизационном

стрессе, сульпирид в низкой дозе (10 мг/кг) вызывает увеличение площади эрозии, в то время как в дозе 50 мг/кг – уменьшение площади, а также снижает уровень кортикостерона в плазме, что свидетельствует о меньшей выраженности стрессорной реакции на фоне его приема. В то же время, по данным А. Benelli, 2000, длительное (на протяжении 21 дней до начала эксперимента) введение даже низких (4 мг/кг) доз сульпирида оказывает положительный эффект [253]. Интересно, что сульпирид, согласно К. Nomura, 1995, влияет на стресс-обусловленное язвообразование только на моделях с выраженной компонентой психического, а не физического стресса (водно-иммерсионная и индометациновая модели), что предполагает наличие центрального действия вещества [351]. В тоже время согласно В.Г. Подсеваткину с соавт., 2015, стресс-протекторный эффект сульпирида в виде монотерапии является недостаточно полным: степень изменения поведенческих реакций грызунов уменьшается в виде снижения показателя тревожности – аутогруминга, но восстановления двигательных и познавательных-исследовательских функций не наблюдается, что связано с побочным седативным эффектом данного препарата [45].

Что касается влияния сульпирида на ИБС и ИМ в доступной литературе имеется лишь небольшое количество исследований. Так, в работе S. Tagliavini, 1992, описаны эффекты введения сульпирида (6-25 micrograms/kg) при экспериментальном ИМ, который моделировался путем наложения постоянной лигатуры на левую нисходящую коронарную артерию, а также на модели ишемии-реперфузии [164]. Согласно полученным результатам, введение сульпирида дозо-зависимо снижало размеры формирующегося инфаркта и частоту возникновения желудочковых нарушений ритма, и, как следствие, и летальность экспериментальных животных на ранних сроках эксперимента. В клинической работе Ю.В. Широких с соавт., 2007 рассматривалось влияние сульпирида на течение кардиологического синдрома Х [67]. В ходе исследования было установлено, что у пациентов, получавших в комплексной терапии сульпирид, отмечалось уменьшение количества приступов стенокардии, их тяжести и длительности, в более ранние сроки было достигнуто купирование

болевого синдрома. Сульпирид также оказывал благоприятное воздействие на психоневрологический статус пациентов, что проявлялось купированием тревожно-депрессивных проявлений заболевания [67]. Интересны также результаты исследования С.Р. Абсеитовой, 2009, показавшие, что на фоне терапии сульпиридом у больных с ИМ отмечалось не только улучшение психического состояния с достоверным снижением уровня тревоги, но и уменьшение частоты и степени выраженности сердечно-болевого синдрома, а также снижение потребности в приеме нитроглицерина [1].

Исходя из данных вышеприведенных исследований и наличия сходства сульпирида и соединения L-17 по данным анализа спектров аффинности, можно предположить, что соединение L-17 будет снижать выраженность стрессорной реакции и улучшать течение стрессорной ИБС и ИМ.

Результаты экспериментального исследования. Иммобилизационный стресс. Отмеченная плюрипотентность свойств соединения L-17 и данные предшествовавших исследований, а также анализа *in silico*, позволили предположить наличие первичного патофизиологического воздействия, которое вызывало бы включение частных механизмов, и стало бы основной точкой приложения действия исследуемого соединения при ИМ. В качестве такого первичного патофизиологического механизма было предположено воздействие, являющееся неспецифическим ответом организма на любое предъявленное ему требование, но достигающее болезнетворной степени с избирательным поражением отдельной области тела – дистресс.

В качестве экспериментальной модели была выбрана модель нервно-мышечного напряжения – иммобилизационного стресса. При этом необходимо отметить, что именно при сердечно-сосудистых заболеваниях стресс чаще всего играет одну из основных ролей в развитии различных патологических процессов, оказывающих вредоносное воздействие на организм. Выделение сердца как основного объекта поражения при стрессе хорошо описано в литературе, а подтверждением наличия подобного поражения сердца в проведенном исследовании явилось то, что согласно данным биохимического исследования

при иммобилизационном стрессе уровень АСТ был достоверно выше, чем в контрольной группе, и даже не отличался от уровня АСТ через 24 часа от начала экспериментального ИМ ($25,6 \pm 1,5$ U/l при иммобилизационном стрессе и $24,9 \pm 2,0$ U/l при ИМ).

Анализ результатов гематологического исследования, в свою очередь, выявил достоверное уменьшение числа клеток Mid (смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов) у животных опытной группы (на фоне соединения L-17) по сравнению как с показателями интактной группы, так и с показателями контрольной группы. При этом уменьшение числа клеток Mid нельзя было объяснить влиянием повышенного уровня кортикостерона, так как у животных экспериментальных групп уровень кортикостерона через 6 часов от начала эксперимента в группах достоверно не отличался от уровня кортикостерона у интактных животных, а через 48 часов, несмотря на достоверное повышение уровня кортикостерона, число клеток Mid у животных опытной группы стало достоверно выше не только числа клеток Mid в группе интактных животных, но и в контрольной группе.

В то же время, увеличение числа моноцитов/макрофагов в зоне повреждения уже на раннем этапе развития ИМ на фоне введения соединения L-17 (описанные ниже), позволяли предположить, что уменьшение числа моноцитов в крови через 6 часов от начала иммобилизационного стресса было обусловлено усилением миграции этих клеток в зоны повреждения. Подобное поступление моноцитов в зону стрессорного повреждения имеет большое значение для ускоренной его ликвидации, тем более, что катехоламины, выделяемые при стрессе, способствуют активации именно M2-подобного фенотипа макрофагов, способных уменьшать производство воспалительных медиаторов и ускорять регенерацию.

Особо обращает на себя внимание то, что у животных на фоне введения соединения L-17, уровень глюкозы в крови через 6 часов был достоверно ниже, чем у животных, не получавших лечения ($8,2 \pm 0,6$ ммоль/л в группе D против $9,8 \pm 0,2$ ммоль/л в группе B), и это соотношение сохранялось и через 48 часов от

начала эксперимента. Значимость этого факта объясняется тем, что в развитии проявлений дистресса важную роль играет влияние гипоталамо-гипофизарной оси на эндокринную часть поджелудочной железы, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови. Гипергликемия, в свою очередь, активирует окислительный стресс, индуцирует апоптоз клеток миокарда и повышает концентрации провоспалительных цитокинов, в том числе и вследствие прямого влияния на дифференцировку макрофагов в сторону провоспалительного фенотипа M1. Все это неизбежно приводит к тому, что гипергликемия, как было показано в клинических исследованиях, коррелирует с плохим прогнозом при остром ИМ даже при отсутствии развившегося диабета.

Учитывая, что стресс вызывает гипoinsулинемию, а одной из основных причин гипoinsулинемии при иммобилизационном стрессе является дегенерация и апоптоз бета-клеток в островках Лангерганса, было проведено исследование влияния соединения L-17 на изменение средней площади панкреатических островков и плотности распределения инсулинпродуцирующих клеток при иммобилизационном стрессе.

Было установлено, что через 6 часов от начала эксперимента средняя площадь панкреатических островков и плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток у животных на фоне введения соединения L-17 и без него, достоверно не отличались от показателей интактной группы. Этот факт соответствовал данным о том, что в первые сутки после начала стресса никаких существенных изменений в островках поджелудочной железы не наблюдается. Однако уже через 48 часов средняя площадь панкреатических островков и плотность распределения инсулинпродуцирующих клеток у животных на фоне введения соединения L-17, были достоверно больше, у животных контрольной группы, и это при том, что по данным литературы, при стрессе, как увеличение островкового аппарата, так и увеличение выхода инсулина начинается лишь с 15 суток после начала развития стресса, что позволяет судить о том, введение соединения L-17 уменьшает отрицательное воздействие стресса на систему производства инсулина в поджелудочной железе.

Важно отметить, что гипоинсулинемия оказывает выраженное патологическое влияние на миокард, поскольку инсулин снижает уровень окислительного стресса, выработку провоспалительных цитокинов и ингибирует адгезию полиморфноядерных лейкоцитов (PMN), что снижает степень повреждения при ишемии, и уменьшает размеры ИМ в эксперименте.

Учитывая способность стрессорного действия кортикостероидов даже при относительно низких дозах сокращать численности тимоцитов, уменьшать число зародышевых центров, а при высоких дозах – уничтожать все тимоциты и ретикулярные клетки, было проведено сравнение изменений тимуса при иммобилизационном стрессе с введением соединения L-17 и без лечения. Согласно полученным результатам в контрольной группе иммобилизационный стресс вызвал через 2 суток от начала эксперимента уменьшение объема лимфоидной ткани (числа лимфоидных фолликулов в белой пульпе и их размеров) и оголение стромы на фоне выраженного отека, что свидетельствовало об угнетении процессов лимфопоэза и подтверждало тяжесть вызываемого стресса. В то же время, введение соединения L-17 предотвращало опустошение тимуса и усиливало в нём процесс лимфопоэза.

Интересно, что обнаружение способности соединения L-17 предотвращать стрессорное опустошение тимуса позволяет предположить также наличие различий в популяциях лимфоцитов, определяемых через 48 часов от начала эксперимента, в крови у животных с введением соединения L-17 и без введения. Дело в том, что стресс вызывает не только глюкокортикоид-индуцированный апоптоз тимоцитов, но и клеточное опустошение органа за счёт малых тимоцитов, причём, в кровотоке поступают клетки, не завершившие «нормальную» дифференциацию в органе. Поэтому, несмотря на статистически недостоверную разницу в содержании лимфоцитов в крови у животных опытной и контрольной группы, качественный состав лимфоцитов у животных контрольной группы, должен быть хуже, чем у животных на фоне введения соединения L-17, способного предотвращать опустошение тимуса.

В целом, можно констатировать, что в ходе исследования было зафиксировано благоприятное действие соединения L-17 на течение стрессорной реакции, которое проявлялось уменьшением стресс-опосредованного снижения производства инсулина в поджелудочной железе, предотвращением развития стрессорной гипергликемии и опустошения тимуса, что схоже с описанными эффектами сульпирида (за исключением влияния на уровень кортикостерона).

Инфаркт миокарда. На финальном этапе исследования было проведено моделирование ИМ у лабораторных животных и оценено влияние соединения L-17 на его течение. Моделирование ИМ осуществлялось в соответствии с модификацией лигационной модели (Способ моделирования инфаркта миокарда у крыс, патент на изобретение № 2407062 от 20 декабря 2010 г.). Оценка влияния соединения L-17 на течение ИМ осуществлялась на основе данных гистологического, биохимического и иммуногистохимического исследований [64].

Согласно данным гистологического исследования, на фоне введения соединения L-17 уже на первые сутки экспериментального ИМ наблюдались существенные изменения в ходе течения патологического процесса. Так, в то время как у животных контрольной группы (животные с экспериментальным ИМ) развивался трансмуральный ИМ, типичный для данного вида, при котором наблюдалась гибель кардиомиоцитов во всех слоях сердца: эпикарде, миокарде и эндокарде, то у животных опытной группы (животные с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17), ИМ располагается только субэпикардially, не охватывая все слои сердца.

Принципиально отличалась и гистологическая картина зоны инфаркта на фоне введения соединения L-17: уже в первые сутки ИМ в зоне повреждения появлялись лимфоциты и макрофаги, сохранявшиеся и на седьмые сутки от начала развития ИМ. В принципе наблюдаемое уменьшение количества нейтрофилов фоне введения соединения L-17 могло обуславливать уменьшение глубины поражения и интенсивности воспалительной реакции при экспериментальном ИМ, так как основными причинами последней при ИМ

являются, среди прочих факторов, именно прямое повреждение миокардиоцитов цитотоксическими веществами (активные формы кислорода, протеазы и хемоаттрактанты), производимыми нейтрофилами, и активизация свертывания в системе микроциркуляции миокарда, вызываемая сериновыми протеазами и эластазой нейтрофилов. Именно поэтому снижение количества нейтрофилов при ИМ приводит к значительному уменьшению размеров инфаркта.

Также на фоне введения соединения L-17 наблюдалось раннее поступление в повреждённые ткани одноядерных клеток (макрофагов и лимфоцитов), необходимых для эффективного разрешения воспаления; в том числе и за счет поглощения апоптированных и некротизированных клеток, и активации фибробластов, что способствует формированию грануляционной ткани и неоангиогенезу. Вследствие этого, в то время как в контрольной группе признаки формирования грануляционной ткани выявлялись только на пятые сутки, и то лишь в структурах, прилежащих к зоне некротизированных кардиомиоцитов, у животных опытной группы грануляционная ткань появлялась в зоне подострого воспаления уже в первые сутки ИМ и практически полностью замещала зону инфаркта на пятые сутки; причём, эндотелиальные клетки капилляров участвовали в образовании синусоидальных капилляров уже на пятые сутки эксперимента. Наблюдаемая гистологическая картина свидетельствовала о том, что введение соединения L-17 при экспериментальном ИМ, уменьшая поступление в зону воспаления нейтрофилов и увеличивая поступление макрофагов, проявляет иммуномодуляторный эффект, меняя экссудативно-деструктивный тип воспаления на пролиферативно-клеточный.

Биохимическое исследование активности ферментов – маркеров ИМ в крови экспериментальных животных показало, что на протяжении всего эксперимента, активность АСТ, АЛТ и КФК МВ у животных опытной группы на фоне введения соединения L-17 была достоверно ниже, чем у животных контрольной группы. Более того, на 5 сутки эксперимента, активность АЛТ была даже ниже, а КФК МВ – достоверно не отличалась от показателей интактных животных. При этом, у животных контрольной группы фиксировался подъём

уровня КФК МВ на 7 сутки исследования, с превышением показателя первых суток, в то время как у животных опытной группы показатели КФК МВ на 7 сутки исследования не отличались от нормы. Учитывая же, что активность сывороточной КФК у больных инфарктом миокарда является наиболее чувствительным методом диагностики ИМ, то ее повторное повышение в контрольной группе может быть расценено, как рецидивирование ИМ.

В ходе эксперимента, помимо рутинного определения активности ферментов в плазме крови, проводилось определение их активности в гомогенате миокарда. Исследование проводилось на 1, 7 и 14 сутки. Интересно, что только сравнение активности ЛДГ 1,2 и КФК в крови и в гомогенате миокарда выявило принципиальные различия между животными опытной и контрольной групп. Так, если в первые сутки в обеих группах снижение активности ЛДГ 1,2 в гомогенате совпадало с повышением ее в крови, что типично для начала ИМ, то на седьмые сутки эксперимента у животных опытной группы, низкая активность ЛДГ 1,2 в гомогенате миокарда соответствовала снижению активности в крови, что исключало повторное инфарцирование; в то время как у животных контрольной группы повторное повышение показателей ЛДГ 1,2 в крови на 7 сутки эксперимента соответствовало низким показателям фермента в гомогенате миокарда, что подтверждало наличие рецидивирования ИМ. Аналогичные изменения на седьмые сутки эксперимента были выявлены и для КФК: у животных опытной группы активность КФК в крови соответствовала нормальным показателями в гомогенате миокарда, в то время как у животных контрольной группы, увеличившаяся даже по сравнению с первыми сутками эксперимента, активность КФК МВ в крови не сопровождалась изменением активности КФК в гомогенате. Таким образом, динамическое сравнение показателей активности ЛДГ 1,2 и КФК в крови и в гомогенате миокарда выявило способность соединения L-17 предотвращать рецидивирование ИМ.

Значимость гиперцитокинемии при ИМ не вызывает сомнения, поскольку ее выраженность зависит как величина формирующегося ИМ [58, 59], так и вероятность возникновения осложнений [233]: значительное повышение IL-1 в

1-е сутки ассоциируется с высоким риском формирования ранних осложнений ИМ (кардиогенного шока, отёка лёгких, рецидива), TNF – снижением сократительной способности миокарда и коронарного кровотока, и увеличением конечно-диастолического давления, а IL-6 – увеличением частоты осложнений и повышенной в 3,5 раза смертностью. Вследствие этого, в рамках работы было проведено определение основных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6 и IL-10) при ИМ [62].

Согласно полученным результатам через 24 часа у животных контрольной группы (с экспериментальным ИМ) уровни цитокинов превышали норму для IL-1 в 8 раз, для TNF в 7,8 раз, для IL-6 в 2,5 раза и для IL-10 в 4,3 раза; при этом, они были достоверно выше, чем у ложнооперированных животных. В то же время у животных опытной группы повышение уровня цитокинов было значительно ниже: IL-1 был повышен в 1,8 раза, TNF – в 4,7 раза, IL-10 – в 2,2 раза, а уровень IL-6 был ниже нормы в 2 раза. В тоже время, соединение L-17 не полностью подавляло выработку интерлейкинов при ИМ, а лишь снижало их уровень до оптимального осуществления воспалительной реакции. Это представляется очень важным, так как сильное снижение уровня цитокинов ухудшает течение патологического процесса: так, при блокаде IL-6 нарушается формирование воспалительного лейкоцитарного инфильтрата и затрудняется последующая макрофагальная инфильтрация, при блокаде рецепторов TNFR1/TNFR2 фиксируется увеличение площади поражения миокарда и количества апоптотизированных клеток, а при дефиците IL-10 повышается уровень TNF- α , увеличивается площадь поражения, и, как следствие, летальность.

Учитывая возможность развития системного воспаления при ИМ и для объективизации представлении о характере влияния выявленной гиперцитокинемии на выраженность воспалительной реакции [62], было использовано определение значений коэффициента реактивности (КР) и уровня реактивности (УР) по Е.Ю. Гусеву с соавт. [13-16, 391]. Проведённые расчёты показали, что у животных контрольной группы коэффициент реактивности достигал 11, что соответствовало 4 уровню реактивности, являющемуся «зоной

прогноза» критических осложнений, при которой может начинаться развитие системного воспаления, когда $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и IL-6 начинают активно продуцироваться не только кардиомиоцитами, но и клетками эндотелия, что и приводит к развитию критических осложнений. При этом на фоне введения соединения L-17 коэффициент реактивности достигал только 9, что соответствовало 3 уровню, типичному для гиперреактивной формы классического воспаления, и не отличалось от показателей ложнооперированных животных.

Исходя из описанной картины, одним из основных эффектов введения соединения L-17 являлось отсутствие рецидивирования ИМ, что было подтверждено с помощью данных биохимического и гистологического исследований. Схожий эффект выявляется и у клопидогреля, который также способен предотвращать рецидивирование ИМ. Возникновение описанного эффекта и отсутствие субэндокардиального повреждения при введении соединения L-17 может объясняться, в первую очередь, его влиянием на состояние микроциркуляции, обусловленное снижением уровня циркулирующих цитокинов в первые сутки, выполняющих триггерную роль для процессов внутрисосудистого свертывания, вазоконстрикции артериол, развитии нейтрофилёза и усилении агрегации тромбоцитов.

Снижение размеров некроза при экспериментальном ИМ, косвенно оцененное по активности АСТ, позволило предположить возможность изменения активности апоптоза кардиомиоцитов. В последующем проведённое исследование показало, что на фоне введения соединения L-17 уровень внешнего апоптоза (по данным определения CD 95) был достоверно выше, чем у животных контрольной группы на всем протяжении эксперимента, а уровень внутреннего апоптоза (по данным определения P53) – выше на 7 сутки исследования. При этом то, что достоверно более высокие показатели активности апоптоза на фоне введения соединения L-17, по сравнению с показателями контрольной группы, соответствовали достоверно более низким показателям АСТ, свидетельствовали

о том, введение исследуемого соединения приводит к уменьшению гибели клеток путем некроза.

В целом, описанные эффекты, по-видимому, объясняются особенностями мультитаргетности действия исследуемого соединения, и его способностью взаимодействовать с различными видами рецепторов, что было доказано в блоке *in silico*. Согласно проведенным расчетам наиболее выражены были свойства холиноблокатора, что соответствовало наименьшей энергии докинга в M1-холинорецептор CHRM1, и дофаминергические свойства, складывающиеся из активности в отношении D1 и D2 дофаминовых рецепторов (DRD1, DRD2) и ингибирования дофаминового транспортера DAT. Следующей по значимости активностью для соединения L-17 являлась $\alpha 1$ -адреноблокирующая активность, обусловленная умеренным действием на $\alpha 1$ -адренорецептор ADRA1 и выраженным влиянием на норадреналиновый транспортер NET. В свою очередь, умеренное серотонин-блокирующее действие было обусловлено достаточно высокой афинностью к серотониновому транспортеру SERT (при том, что прямой антагонизм к 5-HT3A рецепторам был незначителен).

Учитывая доказанную мультитаргетность действия соединения L-17, имеет смысл рассмотреть возможные патогенетические механизмы возникновения и развития ИМ, и какой эффект может оказывать воздействие на отдельные типы рецепторов для этой патологии.

Если говорить о холинергической системе, стимулятором мускариновых рецепторов является ацетилхолин (ACh), который может оказывать влияние на течение воспалительной реакции, в том числе и при ИМ, хотя в литературе одновременно существуют принципиально различные представления о влиянии ACh на течение воспаления. Так, стимуляция блуждающего нерва, вызывающая выброс ACh может предотвращать пагубное действие цитокинемии при экспериментальном сепсисе, эндотоксемии, ишемии/реперфузии, геморрагическом шоке, артрите и других заболеваниях. В то же время, по данным других исследователей, ацетилхолин индуцирует высвобождение провоспалительных цитокинов, а также может индуцировать хемотаксическую

активность эозинофилов, моноцитов и нейтрофилов, что, вероятно, объясняется холинергической индукцией высвобождения лейкотриена B₄ и IL-8 [271]. Это подтверждается и в экспериментах, в которых применение антагонистов мускариновых рецепторов длительного действия (LAMA) приводит к подавлению интенсивности воспалительного процесса (за счет ингибирования хемотаксиса и миграции нейтрофилов, и снижения выброса цитокинов, таких как IL-6, TNF- α и лейкотриена LTB₄. Введение в экспериментах атропина также приводило к ингибированию антителообразования и пролиферативных реакций Т-клеток, подавляло хемотаксис лейкоцитов в отношении нейтрофильных и моноцитарных/лимфоцитарных хемоаттрактантов, тем самым, снижая лейкоцитарную инфильтрацию и повреждение тканей.

Особый интерес представляет роль мускариновых рецепторов в ответе организма на стресс. Согласно М.Е. Rhodes, 2008, у животных с дефицитом M1 рецепторов, наблюдается более слабая активация надпочечниково-адреналовой оси в ответ на стресс, что приводит к меньшей выраженности гормонального ответа (кортикостерон) [300]. Подобные же результаты давало и предварительное ингибирование холинергической системы в экспериментах, что приводило к снижению выраженности стрессорных язв.

Двойственное влияние ACh способен оказывать в случае ишемии: с одной стороны, он стимулирует через производство NO эндогенные защитные механизмы, а с другой стороны, на фоне эндотелиальной дисфункции, вызывает спазм коронарных артерий. Более того, согласно литературе эндотелиальная функция заметно ухудшается ещё в острой фазе острого коронарного синдрома без подъёма сегмента ST, а снижение вазодилаторного ответа на АСН является независимым предиктором плохого прогноза. Свой вклад в увеличение смертности и ухудшение прогноза при ИМ может вносить и увеличение частоты развития аритмий, обусловленное усилением чувствительности мускариновых рецепторов в удаленных неповреждённых областях левого желудочка.

Допамин способен модулировать иммунный ответ, действуя как через центральные, так и через периферические рецепторы; как напрямую, через ЦНС,

модулируя активность нейронов, так и косвенно, через посредников в виде эффекторов иммунной системы. В частности, у мышей введение допамина ингибирует инфильтрацию моноцитов и оказывает стабилизирующее воздействие на артериальное давление [157].

Однако единых представлений о влиянии допамина и/или блокады рецепторов D нет, так как большая часть эффектов допамина является дозозависимой и/или зависит от первоначального функционального состояния клеток иммунной системы, а также от типа допаминовых рецепторов. Согласно S. Puri, 1994, эффект от блокады допаминовых рецепторов является дозозависимым – введение селективного антагониста D2/D3 рецепторов (сульпирида) в дозе 10 мг/кг или обратного агониста допаминовых рецепторов (галоперидола) увеличивает уровень кортикостерона в плазме и утяжеляет язвенное поражение желудка при иммобилизации, а введение сульпирида в дозе 50 мг/кг – снижает тяжесть стрессорного поражения слизистой [322]. В дальнейшем стресс-протективное влияние от введения сульпирида в высоких (до 60 мг/кг) дозах было показано и другими исследователями.

Функциональное состояние организма также влияет на эффект от активации/блокады рецепторов, и при сильном стрессе, высокий уровень циркулирующих глюкокортикоидов приводит к тому, что допамин действует как мощный супрессор нейронов вследствие взаимодействия с D2 рецепторами. При этом описанное ингибирующее действие дофамина является суммированием противоположных влияний двух подтипов рецепторов, так, введение агонистов D2R, либо антагонистов D1R уменьшает активность нейронов, а введение антагонистов D2R, либо агонистов D1R – увеличивает. При этом функциональное состояние организма влияет не только на ответ, обусловленный активацией/блокадой рецепторов в ЦНС, но и в периферических тканях--так, на фоне SIRS допамин индуцирует апоптоз PMN; неактивированные макрофаги на фоне введения допамина вырабатывают IL-6 и CCL2, а активированные – увеличивают продукцию IL-6, CCL2, CXCL8 и IL-10, и снижают выработку TNF- α .

Сами же периферические допаминовые рецепторы, в свою очередь, вследствие своей активации/блокады опосредуют возникновение целого ряда эффектов со стороны иммунной системы в виде изменения активности Т-лимфоцитов, PMN и макрофагов. Так, допамин является одним из основных регуляторов Т-клеток и способен активировать Т-лимфоциты, стимулировать высвобождение цитокинов и экспрессию поверхностных интегринов последними, а также влиять на адгезию уже активированных клеток [155, 299]. Дозазависимым является воздействие допамина на макрофаги: низкие концентрации допамина уменьшают апоптоз мононуклеаров крови, а высокие – увеличивают. Также дозо-зависимо действует допамин и на тромбоциты – в то время как низкие концентрации допамина только повышают чувствительность клеток к агрегирующим факторам, высокие концентрации вызывают развитие первичного агрегационного ответа, а сверхвысокие концентрации могут приводить к вторичной отсроченной агрегации. То есть, в принципе, антагонисты рецепторов допамина подавляют врожденные и адаптивные иммунные ответы, обеспечивая тем самым основу для их использования в борьбе с воспалительными заболеваниями.

Периферические рецепторы к допамину определяются и в миокарде: D1, D2 и D4 рецепторы D1 располагаются, преимущественно в эпикарде), что также может приводить к появлению эффектов при их активации/блокаде. Согласно экспериментам S. Tagliavini, 1992, поставленным на моделях ишемии с постоянной лигатурой левой передней нисходящей коронарной артерии и ишемии/реперфузии, внутривенная (iv) инъекция I-сульпирида (6-25 мкг/кг), в зависимости от дозы, снижала размеры ИМ, уменьшала частоту и тяжесть нарушений ритма и приводила к снижению летальности на ранней стадии ишемии (первые 30 мин после коронарного лигирования), что позволяет предположить, что эндогенный допамин может оказывать вредное действие в таких условиях [164]. Особый интерес представляет исследование A. Lazou, 2003, вновь показавшее дозозависимый характер действия допамина: эксперименты, в которых использовалась низкая концентрация дофамина (1

мкМ), не приводили к появлению признаков защиты ишемического миокарда, а введение дофамина в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ приводило к значительному улучшению функционального восстановления, а также к уменьшению размера инфаркта [156]. При этом описанные кардиопротективные эффекты дофамина, были опосредованы активацией альфа-1 адренорецепторов, а не прямым действием на D-рецепторы в кардиомиоцитах, так как, D1/D2 антагонист галоперидол не оказывает никакого эффекта на выраженность данных эффектов, а альфа-1 адреноблокатор празозин – полностью их подавляет.

Однако в литературе отсутствует единство взглядов касательно наличия/отсутствия кардиопротективного эффекта при активации допаминовых рецепторов. Согласно D. Gerö, 2007, агонисты допаминовых рецепторов (D1) обладают цитопротективным эффектом, Однако по другим данным, активация данных рецепторов влечет за собой усиление гибели кардиомиоцитов вследствие апоптоза при ишемии/реперфузии в экспериментах *in vitro*, в то время как активация рецепторов D2 – оказывать кардиопротективное действие и подавлять апоптоз кардиомиоцитов [284].

Известно, что действие дофамина может отразиться и на коронарном кровотоке, так как допамин и его агонисты в малых дозах, действуя через D1 рецепторы, вызывают вазодилатацию сосудов (в том числе и коронарных) и ингибируют выброс норадреналина (за счет активации пресинаптических D2 рецепторов). В более высоких дозах допамин селективно активирует альфа-1 и альфа-2 адренорецепторы, что может привести даже к системной вазоконстрикции, затрагивающей как легочные, так и коронарные артерии.

Спектр биологических эффектов серотонина, а также активации/блокады его рецепторов очень широк, при этом, существуют две формы триптофановой гидроксилазы: периферическая и центральная, что является доказательством наличия как центрального, так и периферического источников серотонина в организме. В центральной нервной системе серотонин способен, как экзогенно, так и эндогенно ингибировать высвобождения норадреналина (NE) из гиппокампа с помощью 5-HT₃-рецепторов. Также описаны двойные связи между

уровнями цитокинов, концентрацией серотонина и активностью его транспортера SERT. Показано, что IL-1 β является мощным регулятором экспрессии генов серотонинового транспортера – под его действием наблюдается увеличение экспрессии последних. Подобная активация SERT под действием IL-1 приводит к уменьшению синаптической доступности 5-HT и увеличивает риск возникновения депрессивных и стрессорных расстройств ЦНС. В то же время, описаны и обратные связи между активностью SERT и уровнем циркулирующих цитокинов – так, терапия антидепрессантами, действующими на SERT, ведет к снижению уровня циркулирующих цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и, возможно, TNF- α , информация по которому противоречива [200, 245].

На периферии наиболее активно обмен серотонина (и активность SERT) фиксируется в тромбоцитах, которые его накапливают и выделяют при дегрануляции, и являются основным его поставщиком вне сосудистой сети легких. Серотонин, секретируемый тромбоцитами, индуцирует агрегацию тромбоцитов и коронарную вазоконстрикцию. Даже несмотря на то, что сам серотонин является лишь слабым агонистом тромбоцитов, он заметно усиливает реакции тромбоцитов перед другими агонистами. Роль серотонина в повышении свёртываемости крови при ИБС подтверждается тем, что селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (SSRIs), снижая содержание серотонина в тромбоцитах, уменьшают частоту рецидивирования ИМ у пациентов, страдающих постинфарктной депрессией. Кроме того, SSRIs ингибируют образование тромбоцитарных тромбов *in vitro*, что указывает на их прямой антитромботический или профибринолитический эффект. Действительно согласно данным клинических исследований, прием SSRIs ослабляет активацию тромбоцитов за счет истощения запасов серотонина и может снизить риск ИМ.

Помимо тромбоцитов, мРНК и белки триптофановой гидроксилазы обнаруживаются и в миокарде, причем, синтез серотонина выявляется как в неонатальных, так и во взрослых кардиомиоцитах, что позволяет рассматривать последние как еще один периферический источник серотонина.

Активация различных типов рецепторов приводит к появлению разного ответа: так, основной исходный ответ сердца на серотонин представляет собой кратковременную брадикардию, опосредованную через рефлекс Безольда-Яриша и инициированную стимуляцией рецепторов 5-HT₃, присутствующих в вагусных афферентных нейронах сердца. Однако как только эта брадикардия подавляется, серотонин индуцирует сердечную стимуляцию. У нескольких видов животных (в том числе и людей), коронарная вазодилатация вызывается активацией 5-HT₁ рецепторов, однако, их активация вместе с 5-HT₂-рецепторами вызывает уже сужение сосудов. При этом, повышенная экспрессия 5-HT_{1B} в гладких мышцах артерий и последующая активацией PLA₂ приводит к сосудистой дисфункции, что наблюдается после сердечно-легочного шунтирования.

Наконец, стоит обратить внимание на то, что LL генотип гена SERT (SLC6A4), который экспрессируется в мозге и клетках крови, является фактором риска ИМ, спровоцированного депрессией, что говорит о большом вкладе серотонинергической системы в патогенез заболевания.

Адренергическая система оказывает не меньшее влияние на сердечно-сосудистую систему, так как ее избыточная активация как раз и определяется на фоне таких заболеваний, как ИМ и стрессорная кардиомиопатия. При этом согласно данным клинических исследований у пациентов с ИМ избыток норадреналина ассоциируется с повышенным риском развития в последующем сердечной недостаточности. Токсические эффекты экзогенного норадреналина, опосредуемые радикалами супероксидного аниона, также как и у серотонина, являются дозо-зависимыми, и индуцируют увеличение давления левого желудочка, уменьшение относительного коронарного потока с одновременным увеличением размеров ИМ.

Необходимо отметить, что во время ишемии миокарда усиление тяжести повреждения может быть обусловлено не только чрезмерной симпатической стимуляцией сердца вследствие избыточного количества катехоламинов, но и сочетанием последней с повышенной чувствительностью миоцитов к

адренергическим стимулам. Так, в начале ИМ повышаются концентрации норадреналина и адреналина в плазме, что отражает увеличение активности всей симпатической нервной системы, а не изменения локальной активности. При этом в случае неосложненного ИМ их концентрации всего в пять раз превышают нормальные уровни, и нет убедительных данных о том, что это вызывает значительное ухудшение функции миокарда во время ишемического процесса. Более важным в данном случае является рефлекторное увеличение активности сердечного симпатического нерва, вызванное болью, беспокойством и падением сердечного выброса или артериальным давлением, которое сопровождается локальным экзоцитозным высвобождением норадреналина из симпатических нервных окончаний сердца. Однако при длительности ишемии более 10 минут, миокард больше не защищен от избыточной адренергической стимуляции, и механизмы локального метаболического высвобождения катехоламинов начинают играть все более важную функцию. При этом, данный релиз не зависит от центральной симпатической активации и внеклеточного кальция, и через 30 минут после начала ишемии высвобождение внеклеточного норадреналина превышает в 100-1000 раз его нормальную концентрацию в плазме. Подобные концентрации могут вызывать некроз даже здорового миокарда и играют важную роль в патогенезе фибрилляции желудочков в ранней ишемии.

Кроме прямого воздействия на ишемию миокарда симпатическая нервная система способна воздействовать и на течение воспалительных процессов при ИМ. Через адренергические рецепторы норадреналин регулирует активность иммунных клеток, что часто связано с изменением уровня экспрессии генов цитокинов и антител. Так, симпатическая активность повышает уровни TNF, IL-6 и ядерного фактора NF- κ B. При этом NF- κ B, играет центральную роль в развитии воспалительного процесса путем дальнейшей регуляции генов, кодирующих не только провоспалительные цитокины, но молекулы адгезии, такие как E-селектин, VCAM-1 и ICAM-1, хемокины, факторы роста, и индуцируемые ферменты, такие как циклооксигеназа-2 (COX2) и индуцируемая синтаза оксида азота (ИНОС). Кроме того, активированный NF- κ B повышает

экспрессию MMP-1, -3 и -9, которые способствуют разрушению внеклеточного матрикса в гладкомышечной оболочке сосудов миокарда.

В свою очередь, после ИМ в симпатической иннервации сердца происходят региональные изменения, включающие потерю поглощения норадреналина и истощение норадреналиновых нейронов, что сопровождается увеличением концентрации катехоламинов; показана даже возможность локального выделения катехоламинов из симпатических эфферентных нейронов сердца у пациентов с тако-цубоподобной дисфункцией.

В целом, роль симпатической нервной системы в развитии ИМ подтверждается эффективностью лечения ИМ блокаторами адренорецепторов (в основном, бета-блокаторами), так как, по мнению ряда авторов, использование только альфа-блокаторов может даже повышать риск развития ИМ у пациентов со стенокардией. Бета-адренергические блокаторы также эффективны для снижения заболеваемости и смертности при СН. Интересно, что величина прогностической выгоды предотвращения общей смертности при использовании бета-блокаторов очень похожа, как для общей смертности при ишемической, так и при не ишемической сердечной недостаточности.

Как известно, приблизительно 80-90% норадреналина, высвобождаемого в мозге или в периферических тканях, снова поглощается с помощью норэпинефринового транспортёра (NET). При этом вопрос терапевтического применения ингибиторов обратного захвата норадреналина [SNRI] достаточно сложен. Дело в том, что передозировка NET ингибиторов сама способна вызывать развитие стрессорной кардиомиопатии. Так, описано несколько случаев развития Тако-Tsubo кардиомиопатии у пациентов после передозировки SNRI. Более того, показано, что ингибирование обратного захвата норадреналина в ранний период реперфузии после ишемии миокарда может оказывать неблагоприятное воздействие – так, использование трициклических антидепрессантов связано с высоким риском развития острого ИМ. Однако в литературе имеются данные, что ингибитор NET дезипрамин дозозависимо

уменьшает размер инфаркта и подавляет постишемическое высвобождение норадреналина, что требует дальнейшего изучения этого вопроса.

Особый интерес представляет влияние катехоламинов на агрегацию тромбоцитов. Дело в том, что один адреналин не вызывает изменений морфологии, обмена веществ и функции интактных тромбоцитов, однако потенцирует биохимические и агрегационные реакции, индуцируемые другими агонистами тромбоцитов. Так, одновременное действие серотонина и адреналина вызывает синергический эффект на уровне трансдукции сигнала тромбоцитами.

Таким образом, все три описанные системы (дофаминергическая, серотонинергическая и адреналовая) оказывают существенный вклад в патогенез ИМ, вследствие чего комплексное воздействие на них приводит к существенным изменениям в ходе патологического процесса. Описанные в работе кардиопротективные эффекты от введения соединения L-17 как раз и определялись воздействием на все три системы.

Мультитаргетность действия исследуемого соединения проявлялась как в виде воздействия на проявления стрессорной реакции, так и на течение ИМ (*рисунки 47*).

На фоне введения соединения L-17 происходило увеличение стресс-резистивности нейронов (действие через D2 рецепторы) [129], и снижение уровня стрессорной цитокинемии (с критических, по Е Гусеву, значений, характерных для развившегося ИМ) [12-16], что опосредовалась через SERT [200, 245] и центральные M1 рецепторы [131]; и сопровождалось снижением стрессорного гормонального ответа вследствие блокады M1 рецепторов [131, 306], стресс-опосредованного снижения производства инсулина в поджелудочной железе и развития стрессорной гипергликемии за счет действия на дофаминовую систему [253, 322]. Снижение же реакции периферических органов (тимус, надпочечники) при стрессе происходило за счет действия через NET, M1 и D2 рецепторы [288].

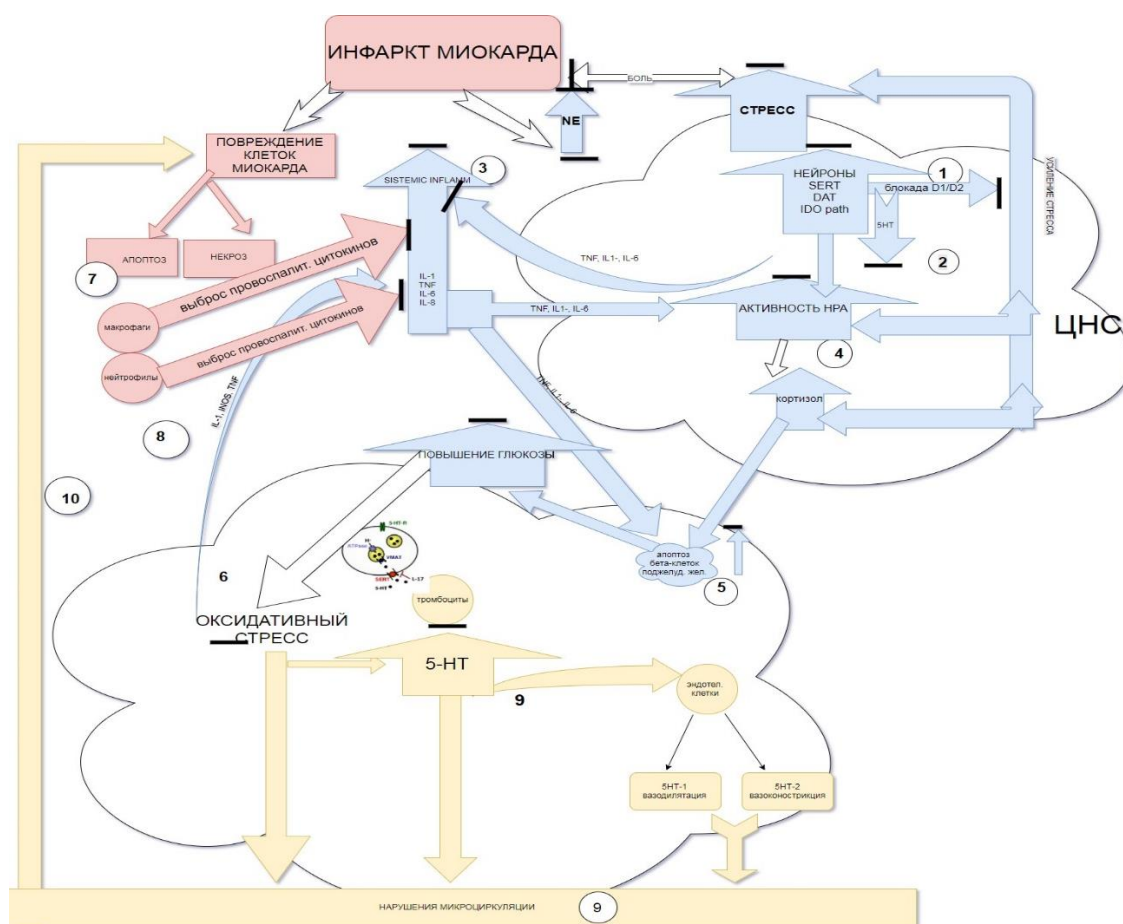


Рисунок 47 – Иммунопатофизиологические механизмы стресс-лимитирующего действия производных 1,3,4-тиадиазинов при инфаркте миокарда на примере соединения L-17.

Примечание. Синим цветом выделены основные механизмы воздействия на стрессорную реакцию, красным – на повреждение тканей, желтым – на нарушения микроциркуляции. Системные эффекты: 1) увеличение стресс-резистивности нейронов – через D2 рецепторы, 2) увеличение синаптической доступности 5-НТ – через SERT и M1 рецепторы, 3) снижение уровня стрессорной цитокинемии – через NET, M1 и D2 рецепторы, 4) снижение стрессорного гормонального ответа и чувствительности гипоталамико-адренальной системы – через блокаду M1 рецепторов, 5) уменьшение снижения производства инсулина и предотвращение развития стрессорной гипергликемии – через допаминовые рецепторы, 6) снижение уровня глюкозы в крови на фоне блокады M-холинорецепторов, ведет к меньшей выраженности оксидативного стресса в тканях. Локальные эффекты: 6) снижение выраженности оксидативного стресса, подавление интенсивности воспалительного процесса за счет ингибирования хемотаксиса и миграции лейкоцитов – через блокаду мускариновых рецепторов, 7) усиление процессов апоптоза, увеличение макрофагальной инфильтрации, снижение выделения макрофагами провоспалительных цитокинов – через блокаду D рецепторов, 9) снижение активации и агрегации тромбоцитов, предотвращающие развитие нарушений микроциркуляторного русла и, как следствие, вторичного повреждения тканей миокарда (10) – через синергическую блокаду серотонинергической и адренергической систем.

В миокарде исследуемое соединение, действуя через D рецепторы, усиливало процессы апоптоза, и увеличивало макрофагальную инфильтрацию [131, 157], снижая выброс последними и лимфоцитами провоспалительных цитокинов. Блокада же мускариновых рецепторов вела к подавлению интенсивности местного воспалительного процесса за счет ингибирования хемотаксиса и миграции лейкоцитов [251, 252], тем самым снижая лейкоцитарную инфильтрацию и повреждение тканей [293, 325]. Синергический эффект блокады серотонинергической и адренергической систем на активацию и агрегацию тромбоцитов, вкупе с блокадой холинорецепторов [86, 144, 259], позволял предотвратить развитие нарушений микроциркуляторного русла, которые вносят существенный вклад в рецидивирование ИМ.

Вследствие этого у животных с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17 отмечалась описанная картина, которая характеризовалась меньшей выраженностью цитокинемии и стрессорного повышения глюкозы, более слабо выраженной инволюцией органов-мишеней, в миокарде – меньшими размерами ИМ, и снижением частоты его рецидивирования на фоне смены типа воспаления на продуктивное [164].

Таким образом, проведённое исследование доказало способность соединения L-17 оказывать кардиопротективное действие при ИМ, что проявлялось в виде снижения его размеров (формирования только субэпикардального инфаркта) и предотвращении рецидивирования за счет воздействия на выраженность стрессорной реакции, вызываемой патологическим процессом.

ВЫВОДЫ

1. Биологически активные соединения группы 1,3,4-тиадиазинов обладают выраженным мультитаргетным действием; спектр аффинности соединения в отношении 14 релевантных белков-мишеней тождественен спектру аффинности сульпирида, аффинитет превышает аффинитет сульпирида в отношении пяти мишеней: дофаминового транспортера, α -адренорецептора A1, норадреналинового транспортера, ГАМК транспортера 1 и киназы JAK3.

2. Биологические активные соединения группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов уменьшают выраженность дистресса в экспериментальной модели нервно-мышечного напряжения *in vivo*, что проявляется снижением уровня стрессорной гипергликемии, предотвращением угнетения лимфопоэза в ткани тимуса и появления структурных изменений в корковом слое надпочечников, увеличением средней площади панкреатических островков и плотности распределения инсулинпродуцирующих клеток в 1мм² панкреатического островка.

3. Биологически активные соединения группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов оказывают выраженное изменение патоморфологических характеристик в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo*, проявляющееся в виде снижения его размеров (формировании только субэпикардального инфаркта), изменения клеточной реакции в зоне повреждения, характеризующейся снижением содержания нейтрофилов и увеличению макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации, и ускорения темпов репарации.

4. Биологически активные соединения группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo* уменьшают степень некротизации кардиомиоцитов по данным определения сердечных трансаминаз (АСТ, АЛТ, ЛДГ 1,2 и КФК МВ) и предотвращают рецидивирование инфаркта миокарда, что подтверждается низким уровнем ЛДГ 1,2 и КФК МВ как в плазме, так и в гомогенате миокарда на седьмые сутки эксперимента.

5. Биологически активные соединения группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo* снижают уровни IL-1, IL-6, TNF- α и IL-10, предотвращая развитие системного воспаления.

6. Биологически активные соединения группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo* увеличивают активность апоптоза кардиомиоцитов, предотвращая некротическую гибель клеток.

7. Выраженная CHRM1, SERT, NET и D1/D2-ингибирующая активность, характерная для биологически активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов, обуславливает кардиопротективный эффект в экспериментальной модели инфаркта миокарда *in vivo* за счет снижения выраженности стрессорной реакции, вызываемой патологическим процессом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Эффективность антидепрессорного и антистрессорного воздействия 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида (соединение L-17) при лечении ишемического повреждения миокарда позволяет рекомендовать его для лечения различного рода ишемических повреждений, таких, как нарушение мозгового кровообращения.

2. Способность соединения L-17 из группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов препятствовать развитию трансмурального ИМ и ускорять регенерацию миокарда делает целесообразным проведение полномасштабных исследований и направленного синтеза химических соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов с целью выявления соединений, обладающих выраженной CHRM1, SERT, NET и D1/D2-ингибирующей активностью для использования последних в качестве базиса для создания принципиально нового класса лекарственных средств с кардиопротективными свойствами.

3. Эффективность одновременного антидепрессантного и нейролептического воздействия на стрессорное повреждение миокарда позволяет рекомендовать совместное использование лекарственных средств с подобными свойствами при тяжелых стрессорных повреждениях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ	гемато-энцефалический барьер
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМ	инфаркт миокарда
КР	коэффициент реактивности
КФК МВ	креатинфосфокиназа
ЛДГ	лактатдегидрогеназа,
УР	уровень реактивности
5-HT3A	серотониновый рецептор типа 3A
ADRA1A	$\alpha 1$ -адренорецептор
Aff	аффиность
AMPA рецептор	ионотропный рецептор глутамата
CAPN1	кальпаин 1
CD95	трансмембранный белок I типа, передающий цитотоксический сигнал при связывании со специфическими антителами
CFD	комплементарный фактор D (адипсин).
CHRM1	мускариновый холинорецептор типа 1
DAT	дофаминовый транспортер
DRD1	дофаминовый рецептор типа 1
DRD2	дофаминовый рецептор типа 2
GABRA1	$\alpha 1$ -субъединица ГАМК-A рецептора
GABRB2	$\beta 2$ -субъединица ГАМК-A рецептора
GABRG2 –	$\gamma 2$ -субъединица ГАМК-A рецептора
GAT1	ГАМК-транспортер типа 1
Gm	гранулоциты
Hb	гемоглобин
Hct	гематокрит
IL-10	интерлейкин-10
IL-1	интерлейкин-1
IL-6	интерлейкин-6
JAK3 –	янус-тирозин киназа типа 3
Lym	лимфоциты
MCHC	средняя концентрация гемоглобина в эритроците
MCH	среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCV	средний объем эритроцитов
Mid	средние клетки (моноциты, макрофаги)
MPV	средний объем тромбоцитов
NET	норадреналиновый транспортер

NMDA	рецептор – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA).
P53	транскрипционный фактор p53, регулирующий клеточный цикл.
Pa	вероятность наличия активности
Pct	тромбоцит
PDW	относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, показатель гетерогенности тромбоцитов
Pi	вероятность отсутствия активности
pK	константа диссоциации
Plt	тромбоциты
RBC	эритроциты
RDW	ширина распределения эритроцитов по объему, показатель гетерогенности тромбоцитов
SERT	серотониновый транспортер
TNF	фактор некроза опухоли
WBC	лейкоциты

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абсеитова, С.Р. Сравнительная эффективность различных вариантов психофармакотерапии у больных с острым инфарктом миокарда и невротическими тревожно-депрессивными расстройствами. / С.Р. Абсеитова // Психические расстройства в общей медицине. – 2009. – № 4. – С. 26–29.
2. Аренс, Х. Многомерный дисперсионный анализ / Х. Аренс, Ю. Лейтер. – Москва: Финансы и статистика, 1985. – 230 с.
3. Арташян, О.С. Морфологические аспекты участия тучных клеток в формировании общего адаптационного синдрома / О.С. Арташян, Б.Г. Юшков, Ю.С. Храмцова // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15,– № 3–1. – С. 22–25.
4. Безуглая, Е.П. Методологический подход к фармацевтической разработке лекарственных препаратов и ее стандартизация / Е.П. Безуглая, Н.А. Ляпунов, В.А. Бовтенко // Промышленное обозрение. – 2008. – № 6.– С. 11.
5. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – Москва: Медицина, 2007. – 704 с.
6. Васильев, П.М. Консенсусный подход к поиску *insilico* противодиабетических соединений // Мишень-ориентированный поиск антидиабетических средств / П.М. Васильев, А.А. Спасов, А.Н. Кочетков, и др; ВолгГМУ, Волгоград, 2016. – 232 с.
7. Васильевич, Я.Д. Атипичные антипсихотические препаратов группы замещённых бензамидов: тиаприд, сульпирид и амисульприд. Особенности фармакологического действия и клинического применения / Я.Д. Васильевич // Социальная и клиническая психиатрия. – 2015. – Т. 25,– № 3. – С. 25-32.

8. Виноградов, В.В. Стресс и патология: монография / В.В. Виноградов. – Минск: Белорусская наука, 2007. – 351 с.
9. Виртуальный скрининг в библиотеках коммерчески доступных органических соединений потенциальных средств для профилактики ВИЧ-инфекции / А.А. Лагунин, Д.А. Филимонов, Т.А. Глориозова, и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 7. – С. 3–21.
10. Влияние α -адреноблокаторов на уровень гликемии и инсулинемии при экспериментальном гипертиреозе / М.В. Журова, М.З. Юрченко, В.В. Полтораки, и др. // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 1981. – № 5, – С. 39–42.
11. Григорьев, В.Ю. Рекуррентная модель острой токсичности в гомологических рядах органических соединений / В.Ю. Григорьев, О.А. Раевский // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 7. – С. 28–33.
12. Гусев, Е. Ю. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев, Л.Н. Юрченко // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 9–21.
13. Гусев, Е.Ю. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 2. Эволюционные аспекты / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 1 – С. 3–14.
14. Гусев, Е.Ю. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 3. Предпосылки несиндромального подхода / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 3. – С. 3–14.
15. Гусев, Е.Ю. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 4. Динамика процесса / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев //

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2014. – № 4. – С. 4–16.

16. Гусев, Е.Ю. Цитокиновый ответ и другие отличительные особенности критических фаз системного воспаления при сепсисе / Е.Ю. Гусев, Н.В. Зотова, М.А. Лазарева // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 2 – С. 173–182.

17. Данилова, И.Г. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекции соединением ряда 1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой / И.Г. Данилова, В.В. Емельянов, И.Ф. Гетте, и др. // Медицинская иммунология – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 35–44.

18. Долгушин, И.И. Секреторные продукты нейтрофилов и иммунный ответ / И.И. Долгушин, А.В. Зурочка, А.В. Власов // Иммунология. – 1990. – Т. 11, № 3. – С. 35–37.

19. Дорофеев, В.И. Фармацевтическая промышленность России в условиях переходного периода / В.И. Дорофеев. – Москва.: Медицина., 2003. – 128 с.

20. Ефремушкин, Г.Г. Клинико-иммунологическая характеристика больных инфарктом миокарда: дис. док. мед. наук / Г.Г. Ефремушкин. Новосибирск, 1986. 227 с.

21. Зефирова, О.Н. Медицинская химия (medicinal chemistry). I. Краткий исторический очерк, определения и цели / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефирова // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2000. – Т. 41, № 1. – С. 43–47.

22. Зефирова, О.Н. О преподавании предмета “Медицинская химия” в Московском университете / О.Н. Зефирова, Е.Д. Матвеева, Н.С. Зефирова // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2002. – Т. 43, № 4. – С. 212–220.

23. Зимин, Ю. И. Увеличение эмиграции клеток из тимуса крыс в начальный период стресс-реакции / Ю. И. Зимин // Известия АН СССР – 1973. – Т. 32. – С. 517–525.
24. Зимин, Ю.И. Иммуитет и стресс / Ю.И. Зимин // Итоги науки и техники. – 1978. – Т. 8. – С. 173–198.
25. Иванов, С.М. Компьютерная оценка механизмов побочного действия лекарственных веществ на сердечно-сосудистую систему: дисс. ... канд. биол. Наук : 03.01.09 / С.М. Иванов. Науч-исслед. ин-т биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича – ФГБНУ. Москва, - 2014.- 199 с.
26. Ивашкевич, О.А. Современные методы поиска новых лекарственных средств / О.А. Ивашкевич // Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География. – 2012. – № 1. – С. 7–15.
27. Козлов, И.Г. Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета / И.Г. Козлов, Т.М. Андропова // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14, № 4. – С. 254–259.
28. Колмогоров, А.Н. О представлении непрерывных функций нескольких переменных в виде суперпозиции непрерывных функций одного переменного / А.Н. Колмогоров // Докл. АН СССР– 1958. – Т. 114, № 5. – С. 953–956.
29. Комаров, Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Москва: Джангар, 2001. – 216 с.
30. Компьютерное моделирование проницаемости физиологически активных веществ через гематоэнцефалический барьер / О.А. Раевский и др. // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, №. 2. – С. 161–181.
31. Компьютерный поиск молекулярных механизмов ulcerогенного действия нестероидных противовоспалительных средств /

С.М. Иванов, А.А. Лагунин, А.В. Захаров, и др. // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, № 1. – С. 7–16.

32. Лаврецкая, Э.Ф. Фармакологическая регуляция психических процессов / Э.Ф. Лаврецкая – Москва: Наука, 1985. – 280 с.

33. Лин, А.А. Фармацевтический рынок: производство лекарственных средств в России / А.А. Лин, Б.И. Соколов, Д.М. Слепнев // Проблемы современной экономики. – 2013. – Т. 1. – С. 191–195.

34. Мамедов, Я.Д. Инфаркт миокарда (Лимфатическая система сердца, патофизиология и патофизиологические основы лечения) / Я. Д. Мамедов. – Москва: Медицина, 1989. – 222 с.

35. Межвидовые особенности активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени млекопитающих до и после воздействия производных 1,3,4-Тиадиазина в условиях *in vitro* / Н.Ж. Алисултанова, Н.А. Вахнина, В.Д. Шадрина, и др. // Медицинский Академический Журнал. – 2016. – № 4. – С. 43–44.

36. Методология изучения системного воспаления / Е.Ю. Гусев, Л.Н. Юрченко, В.А. Черешнев, и др. // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 15–23.

37. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н. Д. Бунатян. – Москва.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

38. Муравьев, И.А. Технология лекарств / И. А. Муравьев – Москва.: Рипол Классик, 1980. – 706 с.

39. Нотова, С.В. Оценка влияния пищевого стресса на психофизиологические и метаболические показатели / С.В. Нотова, Х.А. Дускаева, С.В. Мирошников // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 10 (146). – С. 54–57.

40. Останин, А.А. Иммунологические маркеры основных синдромов системного воспаления у больных с хирургической инфекцией

/ А.А. Останин, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела // Российский иммунологический журнал. – 2000. – Т. 5, № 3. – С. 289–300.

41. Патент на изобретение 2395850 РФ. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс / П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев, и др.; патентообладатель Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, опубл. 27.07.2010 // Бюл., 2010. - N 21. - 6 с.

42. Патент на изобретение 2437163. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, А.П. Сарапульцев, и др.; патентообладатель Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, опубл. 20.12.2011 // Бюл., 2011. - N 35. - 6 с.

43. Патент на изобретение 2437165 РФ. Способ лечения иммунокорректорами инфаркта миокарда у крыс / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, А.П. Сарапульцев, и др.; патентообладатель Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, опубл. 20.12.2011 // Бюл., 2010. - N 35. - 6 с.

44. Петрищев, Н.Н. Содержание sVCAM-1 и уровень циркулирующих CD105-«позитивных» моноклеаров периферической крови при остром коронарном синдроме в сочетании с гипертонической болезнью / Н.Н. Петрищев, Л.В. Васина // Артериальная гипертензия. – 2010. – Т. 16, № 6. – С. 604–607.

45. Подсеваткин, В.Г. Исследование влияния комплексной терапии с использованием антиоксиданта, иммунокорректора, гипербарической оксигенации на динамику основных психопатологических симптомов при органическом поражении головного мозга / В.Г. Подсеваткин, С.В. Кирюхина, С.В. Подсеваткина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 395-398.

46. Раевский, О.А. Моделирование соотношений «структура-свойства» / О.А. Раевский – Москва: Добросвет, 2015. – 288 с.

47. Рецидив инфаркта миокарда и время суток / О.К. Рыбак, М.Е. Раковский, Н.П. Иванникова, и др. // Российский кардиологический журнал. – 2003. – № 1. – С. 5–8.
48. Роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического ремоделирования миокарда / А.П. Хлапов, Ю.Ю. Вечерский, Н. В. Рязанцева, и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 33–37.
49. Сайфутдинов, Р.Г. Феномен «no-reflow»: клинические аспекты неудачи реперфузии / Р.Г. Сайфутдинов // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 3. – С. 391–396.
50. Сарапульцев, П.А. Принципиальные основы объективизации диагноза ИЦД по кардиальному типу / П.А. Сарапульцев, Е.А. Баландина, Л.А. Сарапульцева – Екатеринбург: БМ, 1992. – 64 с.
51. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011618547. ИТ «Микрокосм» / П.М. Васильев, А.Н. Кочетков (Россия). – № 201616643; заявл. 02.09.2011; зарег. 31.10.2011; опубл. 20.03.2012, Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. БД. ТИМС», № 1(78), 2012, С. 209.
52. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15.09.2006 / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков, Т.А. Глориозова, и др. – Москва: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, 2006.
53. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ Pharma Expert № 2006613590 от 16.10.2006 / А.А. Лагунин, В.В. Поройков, Д.А. Филимонов, и др. – Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, 2006.
54. Снежицкий, В.А. Изменения в терминологии и новое определение инфаркта миокарда / В.А. Снежицкий // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2008. – № 1 (21). – С. 116–117.

55. Судаков, К.В. Системные основы эмоционального стресса / К.В. Судаков, П.Е. Умрюхин. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 112с.
56. Сыркин, А.Л. Инфаркт миокарда / А.Л. Сыркин. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2000. – 464с.
57. Титов, В.Н. Лактатдегидрогеназа в диагностике инфаркта миокарда: диагностические и методические аспекты / В.Н. Титов, В.А. Амелюшкина, Т.И. Коткина, и др. // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 31–41.
58. Тращенко, А.С. Клинико-иммунологические особенности течения инфаркта миокарда с зубцом Q : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.05 / А.С. Тращенко. – Кемерово, 2010. – 116 с.
59. Уровни цитокинов и нейрогормонов при постинфарктном кардиосклерозе в зависимости от локализации перенесенного инфаркта миокарда / Л.А. Лапшина, Н.П. Копица, П.Г. Кравчун, и др. // Український кардіологічний журнал. – 2005. – Т. 5. – С. 27–32.
60. Хаитов, Р.М. Изменение иммунитета при хирургических вмешательствах / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Анналы хирургической гепатологии. – 1998. – Т. 3, № 2. – С. 100–110.
61. Черешнев В.А. Строение тимуса нелинейных белых крыс при остром стрессе / В.А. Черешнев // Морфология. – 2014. – Т. 145, № 3. – С. 175–176.
62. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 361–368.
63. Черешнев, В.А. Иммунофизиология / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков, В.Г. Климин. – Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2002. – 285 с.
64. Шилов, А.М. Инфаркт миокарда: патофизиологические и клинические аспекты / А.М. Шилов – Москва: Миклош, 2009. – 164 с.

65. Шилов, Г.Н. Основы разработки новых лекарственных средств / Г.Н. Шилов, А.И. Хоменко, В.В. Евстигнеев // Медицинские новости. – 2009. – № 2. – С. 23–28.
66. Шилов, Ю.И. Адренергические механизмы регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови крыс при стрессе и введении гидрокортизона / Ю.И. Шилов, Е.Г. Орлова, Д.В. Ланин // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2004. – № 3. – С. 8–13.
67. Широких, Ю.В. Диагностика и интенсивная терапия кардиологического синдрома Х / Ю.В. Широких, С.И. Кузнецов, Н.В. Шаповалова // Общая реаниматология. – 2007. – Т. III, № 4. – С. 83–87.
68. Экспериментальные модели в патологии: монография / В.А. Черешнев, Ю.И. Шилов, М.В. Черешнева, и др. – Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2014. – 324 с.
69. Эллиниди, В.Н. Практическая иммуногистохимия: методич. рекомендации / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникиева, Н.А. Максимова. – Санкт-Петербург, 2002. с.1-36.
70. Юшков, Б.Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин. – Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 1999. – 200 с.
71. [Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty] / A. Domínguez Rodríguez, P. Abreu González, M.J. García González, et al. // Rev Esp Cardiol. – 2005. – Vol. 58, № 6. – P. 626–630.
72. [Inflammation in acute coronary syndromes: mechanisms and clinical implications] / D.J. Angiolillo, L.M. Biasucci, G. Liuzzo, et al. // Rev Esp Cardiol. – 2004. – Vol. 57, № 5. – P. 433–446.
73. Социально-экономический ущерб от острого коронарного синдрома в Российской Федерации / А.В. Концевая, А.М. Калинина, И.Е.

Колтунов, и др. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. 158–166.

74. Антиагрегационное действие 2-циклоалкиламино-5-фенил-1,3,4-6Н (С 2 Н 5)-тиадиазинов в экспериментах *in vitro* / Ю.С. Логвинова, Т.М. Васильева, В.А. Макаров, и др. // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58, № 2. – С. 37–40.

75. Влияние новых производных 1,3,4-тиадиазина на агрегационную активность тромбоцитов / Т.М. Васильева, В.А. Макаров, О.Н. Чупахин, и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 5. – С. 27-30.

76. Влияние новых производных 1,3,4-тиадиазина на агрегационную активность тромбоцитов / В.А. Макаров [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – № 5. – С. 27–30.

77. Влияние новых соединений класса 1,3,4-тиадиазинов на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *ex vivo* / Ю.С. Логвинова, Т.М. Васильева, В.А. Макаров, и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 8. – С. 21–25.

78. 2-тиоморфолино-5-арил-6Н-1,3,4-тиадазин гидробромиды и их способность к ингибированию неферментативного гликозилирования белков / Л.П. Сидорова, Т.А. Цейтлер, В.В. Емельянов, и др. // Химико-Фармацевтический Журнал. – 2017. – Т. 51, № 1. – С. 11–14.

79. Васильева, Т.М. Антиагрегационные свойства соединений класса 1, 3,4-тиадиазина / Т.М. Васильева, В.А. Макаров, Л.П. Сидорова, и др. // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, № 4. – С. 12–14.

80. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 / B.N. Cronstein, S.C. Kimmel, R.I. Levin, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1992. – Vol. 89, № 21. – P. 9991–9995.

81. A prospective study of job strain and coronary heart disease in US women / S. Lee, G. Colditz, L. Berkman, et al. // *Int J Epidemiol* – 2002. – Vol. 31, № 6. – P. 1147–1153.
82. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin; the Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes (Euro Heart Survey ACS) / D. Hasdai, S. Behar, L. Wallentin, et al. // *Eur. Heart J.* – 2002. – Vol. 23, № 15. – P. 1190–1201.
83. Activation of CD4⁺ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice / U. Hofmann, N. Beyersdorf, J. Weirather, et al. // *Circulation*. – 2012. – Vol. 125, № 13, – P. 1652–1663.
84. Acute coronary syndromes in Europe: 1-year costs and outcomes / M.J. Taylor, P.A. Scuffham, P.L. McCollam, et al. // *Curr Med Res Opin.* – 2007. – Vol. 23, № 3. – P. 495–503.
85. Acute effects of nitrates on exercise testing in patients with syndrome X. Clinical and pathophysiological implications / G.A. Lanza, A. Manzoli, E. Bia, et al. // *Circulation* – 1994. – Vol. 90, № 6. – P. 2695–2700.
86. Acute myocardial infarction with normal coronary arteries associated with acetylcholine-induced vasoconstriction in the absence of a positive ergonovine test / C.B. Treasure, J.A. Vita, D.A. Cox, et al. // *American Journal of Cardiology*. – 1990. – Vol. 65. – № 3, – P. 255–257.
87. Acute stress induces cardiac mast cell activation and histamine release, effects that are increased in Apolipoprotein E knockout mice / M. Huang, X. Pang, R. Letourneau, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55, № 1. – P. 150–160.
88. Adding heparin to aspirin reduces the incidence of myocardial infarction and death in patients with unstable angina. A meta-analysis / A. Oler, M.A. Whooley, J. Oler, et al. // *JAMA*. – 1996. – Vol. 276, № 10. – P. 811–815.

89. Aderem, A. Mechanisms of phagocytosis in macrophages / A. Aderem, D.M. Underhill // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 593–623.
90. Age-associated impairment in TNF-alpha cardioprotection from myocardial infarction / D. Cai, M. Xaymardan, J.M. Holm, et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 2. – P. 463-469.
91. Aging impairs the beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor on post-myocardial infarction remodeling / S. Lehrke [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99. – P. 553–560.
92. Alterations in the Interleukin-1/Interleukin-1 Receptor Antagonist Balance Modulate Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in the Mouse / A. Abbate, F.N. Salloum, B.W. Van Tassell, et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 11. – P. 6-11.
93. Altman, R. Papel de los antiinflamatorios en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos. De la ateroinflamación a la aterotrombosis / R. Altman, A. Scazzioti // *Rev Esp Cardiol.* – 2003. – Vol. 56, № 01. – P. 9–15.
94. Amano, Y. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability / Y. Amano, S.W. Lee, A.C. Allison // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 43, № 2. – P. 176–182.
95. An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion / M. Arai, D.J. Lefer, T. So, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1996. – Vol. 27, № 5. – P. 1278–1285.
96. Andriichuk, A. Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise / A. Andriichuk, H. Tkachenko, I. Tkachova // *Journal of Equine Veterinary Science.* – 2016. – Vol. 36. – P. 32–43.
97. Angina pectoris and myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease: practical considerations for diagnostic tests:

[электр. ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746648> (дата обращения: 05.01.2018).

98. Angina pectoris and myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease: practical considerations for diagnostic tests / F. Radico, V. Cicchitti, M. Zimarino, et al. // JACC Cardiovasc Interv. – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 453–463.
99. Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction / I. Morishima, T. Sone, K. Okumura, et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2000. – Vol. 36, № 4. – P. 1202–1209.
100. Animal models of myocardial and vascular injury / A.M. Abarbanell, J L. Herrmann, B.R. Weil, et al. // J. Surg. Res. – 2010. – Vol. 162, № 2. – P. 239–249.
101. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats / J. Kajstura, W. Cheng, K. Reiss, et al. // Lab. Invest. – 1996. – Vol. 74, № 1. – P. 86–107.
102. Association between antipsychotic use and risk of acute myocardial infarction: a nationwide case-crossover study / S.-T. Lin, C.-C. Chen, H.-Y. Tsang, et al. // Circulation – 2014. – Vol. 130, № 3. – P. 235–243.
103. Association of depression with reduced heart rate variability in coronary artery disease / R.M. Carney, R.D. Saunders, K.E. Freedland, et al. // Am. J. Cardiol. – 1995. – Vol. 76, № 8. – P. 562–564.
104. Asymptomatic hyperglycaemia and major ischaemic heart disease events in Britain / I.J. Perry, S.G. Wannamethee, P.H. Whincup, et al. // J Epidemiol Community Health. – 1994. – T. 48, № 6. – P. 538–542.
105. Augmentation of glucocorticoid action on human monocytes by interleukin-4 / P.H. Hart, G.A. Whitty, D.R. Burgess, et al. // Lymphokine Res. – 1990. – Vol. 9, № 2. – P. 147–153.

106. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury by inhibition of protease-activated receptor-1 and apoptosis / Q. Zhou, C. Duan, Q. Jia, et al. // *Chin. J. Integr. Med.* – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 116–122.
107. Barnes, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms / P.J. Barnes // *Clin. Sci.* – 1998. – Vol. 94, № 6. – P 557–572.
108. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice / E. Hochhauser, S. Kivity, D. Offen, et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 6. – P. 2351-2359.
109. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage / A. Beham [et al.] // *Oncogene.* – 1997. – Vol. 15. – P. 2767–2772.
110. Beltrame, J.F. Coronary microvascular dysfunction in acute ST elevation myocardial infarction / J.F. Beltrame // *Coron. Artery Dis.* – 2017. – Vol. 28. № 1, – P. 3–4.
111. Benefical Effect of Neutrophil Elastase Inhibitor on Renal Warm Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat / T. Hayama, M. Matsuyama, K. Funao, et al. // *Transplantation Proceedings.* – 2006. – Vol. 38, № 7. – P. 2201–2202.
112. Benjamin, S.B. The relationship between esophageal motility disorders and microvascular angina / S.B. Benjamin // *Med. Clin. North Am.* – 1991. – Vol. 75, № 5. – P. 1135–1142.
113. Bissonnette, E.Y. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release from mast cells by the anti-inflammatory drugs, sodium cromoglycate and nedocromil sodium. / E.Y. Bissonnette, J.A. Enciso, A.D. Befus // *Clin Exp Immunol.* – 1995. – Vol. 102, № 1. – P. 78–84.
114. Bolton, P.B. Salmeterol reduces early- and late-phase plasma leakage and leukocyte adhesion in rat airways. / P.B. Bolton, P. Lefevre, D.M. McDonald // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1997. – Vol. 155, № 4. – P. 1428–1435.
115. Bond, M. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts / M. Bond, A.H. Baker, A.C. Newby // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 264, № 2. – P. 561–567.

116. Bonilla, J.F. Sports as a cause of oxidative stress and hemolysis. / J.F. Bonilla, R. Narváez, L. Chuaire // Colombia Médica. – 2005. – Vol. 36, № 4. – P. 275–280.
117. Bravo-San Pedro, J.M. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease / J.M. Bravo-San Pedro, G. Kroemer, L. Galluzzi // Circ. Res. – 2017. – Vol. 120, № 11. – P. 1812–1824.
118. Brömme, H.J. Apoptosis in the heart: when and why? / H.J. Brömme, J. Holtz // Mol. Cell. Biochem. – 1996. – Vol. 163–164. – P. 261–275.
119. Brüne, B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis / B. Brüne, A. von Knethen, K.B. Sandau // Cell Death Differ. – 1999. – Vol. 6, № 10. – P. 969–975.
120. Bujak, M. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling / M. Bujak, N.G. Frangogiannis // Cardiovasc. Res. – 2007. – Vol. 74, № 2. – P. 184–195.
121. Cardiomyocyte Specific Ablation of p53 Is Not Sufficient to Block Doxorubicin Induced Cardiac Fibrosis and Associated Cytoskeletal Changes / T. Feridooni, A. Hotchkiss, S. Remley-Carr, et al. // PLOS ONE. – 2011. – Vol. 6, № 7, – P. 22-80.
122. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016 / N. Townsend, L. Wilson, P. Bhatnagar, et al. // Eur. Heart J. – 2016. – Vol. 37, № 42. – P. 3232–3245.
123. Cardiovascular Events during World Cup Soccer / U. Wilbert-Lampen, D. Leistner, S. Greven, et al. // New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 358, № 5, – P. 475–483.
124. Carney, R.M. Depression and coronary heart disease / R.M. Carney, K.E. Freedland // Nat Rev Cardiol. – 2017. – Vol. 14, № 3. – P. 145–155.
125. Carney, R.M. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease / R.M. Carney, K.E. Freedland // Biol. Psychiatry. – 2003. – Vol. 54, № 3. – P. 241–247.

126. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo / T.A. Holly, A. Drincic, Y. Byun, et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol. 31, № 9, – P. 1709–1715.
127. Catecholamines in a macrophage cell line / S.W. Brown, R.T. Meyers, K.M. Brennan, et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2003. – Vol. 135, № 1–2. – P. 47–55.
128. Chapter 12. Consensus Drug Design Using IT Microcosm / P.M. Vassiliev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov et al. - Dordrecht: Springer, 2014. – P. 369–431.
129. Chen, S. Dopamine Inhibits Mitochondrial Motility in Hippocampal Neurons / S. Chen, G.C. Owens, D.B. Edelman // *PLOS ONE.* – 2008. – Vol. 3, № 7. – P. 28-34.
130. Chilian, W.M. Functional distribution of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the coronary microcirculation / W.M. Chilian // *Circulation* – 1991. – Vol. 84, № 5. – P. 2108–2122.
131. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion / T.R. Bernik, S.G. Friedman, M. Ochani, et al. // *Journal of Vascular Surgery.* – 2002. – Vol. 36, № 6. – P. 1231–1236.
132. Christia, P. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction / P. Christia, N.G. Frangogiannis // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 43, № 9. – P. 986–995.
133. Clinical outcome after acute coronary syndrome in Japanese patients: an observational cohort study / M. Nakamura, T. Yamashita, J. Yajima, et al. // *J Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, № 1. – P. 69–76.
134. Code, S. Motivation, cognitions and traits: predicting occupational health, well-being and performance / S. Code, J. Langan-Fox. // *Stress and health.* – 2001. – Vol. 17, №. 3. – P. 159-174.
135. Cohen, J.J. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death / J.J. Cohen, R.C. Duke // *J. Immunol.* – 1984. – Vol. 132, № 1. – P. 38–42.

136. Coleman, J.A. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter / J.A. Coleman, E.M. Green, E. Gouaux // *Nature*. – 2016. – Vol. 532, № 7599. – P. 334–339.
137. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling / D. Fraccarollo, P. Galuppo, J. Bauersachs, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 54, № 3. – P. 559–567.
138. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells / T. Khreiss, L. József, L. A. Potempa, et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 2016–2022.
139. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury / A.J. Palazzo, S.P. Jones, D.C. Anderson, et al. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 275, № 5 Pt 2. – P. 1865-1872.
140. Crea, F. Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment / F. Crea, P. Libby // *Circulation* – 2017. – Vol. 136, № 12. – P. 1155–1166.
141. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction / M. Griselli, J. Herbert, W.L. Hutchinson, et al. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190, № 12. – P. 1733–1740.
142. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors / D.M. Thal, B. Sun, D. Feng, et al. // *Nature*. – 2016. – Vol. 531, № 7594. – P. 325–340.
143. Cummings, T.G. Chapter 2. A Cybernetic Framework for Studying Occupational Stress / T.G. Cummings, C.L. Cooper // *From Stress to Wellbeing*. London: Palgrave Macmillan, 2013. – Vol. 1. – P. 24-26.
144. De Clerck, D. The synergistic effect of serotonin and epinephrine on the human platelet at the level of signal transduction / D. de Clerck // *FEBS Letters*. – 1987. – Volume 219, № 2. – P. 283–288.

145. Deficiency of beta1 integrins results in increased myocardial dysfunction after myocardial infarction / P. Krishnamurthy, V. Subramanian, M. Singh, et al. // Heart – 2006. – Vol. 92, № 9, – P. 1309–1315.
146. Depression in patients with coronary artery disease / M.B. Gonzalez, T.B. Snyderman, J.T. Colket, et al. // Depression– 1996. – Vol. 4. – P. 57–62.
147. Depression in patients with coronary heart disease. A 12-month follow-up / M. Hance, R.M. Carney, K.E. Freedland, et al. // Gen Hosp Psychiatry – 1996. – Vol. 18, № 1. – P. 61–65.
148. Depression increases sympathetic activity and exacerbates myocardial remodeling after myocardial infarction: evidence from an animal experiment / S. Shi, J. Liang, T. Liu, et al. // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. 101-734.
149. Depressive symptoms and health-related quality of life: the Heart and Soul Study / B. Ruo, J.S. Rumsfeld, M.A. Hlatky, et al. // JAMA. – 2003. – Vol. 290, № 2. – P. 215–221.
150. Di Masi, J.A. The cost of biopharmaceutical R&D: is biotech different? / J.A. DiMasi, H.G. Grabowski // Manage. Decis. Econ. – 2007. – Vol. 28, № 4–5. – P. 469–479.
151. Diagnostic changes creatine kinase isoforms early after the onset of acute myocardial infarction / A.S. Jaffe, H. Serota, A. Grace, et al. // Circulation. – 1986. – Vol. 74. – P. 105–109.
152. Differential Regulation of Neutrophil-Activating Chemokines by IL-6 and Its Soluble Receptor Isoforms / R. M. McLoughlin, S. M. Hurst, M. A. Nowell, et al. // The Journal of Immunology. – 2004. – Vol. 172, № 9. – P. 5676–5683.
153. Diurnal, weekly and seasonal variation of sudden death. Population-based analysis of 24,061 consecutive cases / H.R. Arntz, S.N. Willich, C. Schreiber, et al. // Eur. Heart J. – 2000. – Vol. 21, № 4. – P. 315–320.
154. Dobaczewski, M. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling / M. Dobaczewski, W. Chen, N.G. Frangogiannis // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2011. – Vol. 51, № 4. – P. 600–606.

155. Dopamine induces neutrophil apoptosis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism / S. Sookhai, J. H. Wang, M. McCourt, et al. // *Surgery*. – 1999. – Vol. 126, № 2. – P. 314–322.
156. Dopamine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via activation of alpha1-adrenoceptors in the isolated rat heart / A. Lazou, T. Markou, M. Zioga, et al. // *Physiol Res* – 2006. – Vol. 55, № 1. – P. 1–8.
157. Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation / S. Hoeger, U. Gottmann, Z. Liu, et al. // *Transpl. Int.* – 2007. – Vol. 20, № 9. – P. 790–799.
158. DrugBank: офиц. сайт University of Alberta (Edmonton, Canada): [электр. ресурс]. URL: <https://www.drugbank.ca/> (дата обращения 01.11.2016).
159. Effect of escitalopram on mental stress-induced myocardial ischemia: results of the REMIT trial / W. Jiang, E.J. Velazquez, M. Kuchibhatla, et al. // *JAMA* – 2013. – Vol. 309, № 20. – P. 2139–2149.
160. Effect of interleukin-6 inhibition on coronary microvascular and endothelial function in myocardial infarction / E. Holte, O. Kleveland, T. Ueland, et al. // *Heart* – 2017. – Vol. 103, № 19. – P. 1521–1527.
161. Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial / K.W. Mahaffey, C.B. Granger, J.C. Nicolau, et al. // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108. – P. 1176–1183.
162. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study / S. Yusuf, S. Hawken, S. Ounpuu, et al. // *Lancet* – 2004. – Vol. 364, № 9438. – P. 937–952.
163. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus / S.M. Haffner,

- A.S. Greenberg, W.M. Weston, et al. // *Circulation* – 2002. – Vol. 106, № 6. – P. 679–684.
164. Effect of sulpiride on ischemia- and reperfusion-induced heart damage, in rats / S. Tagliavini, A. Forgione, C. Bazzani, et al. // *Riv Eur Sci Med Farmacol.* – 1992. – Vol. 14, № 6. – P. 411–415.
 165. Effects of acute and chronic psychological stress on isolated islets' insulin release / H. Zardooz, S. Zahediasl, F. Rostamkhani, et al. // *EXCLI J.* – 2012. – Vol. 11. – P. 163–175.
 166. Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction / C.M. Yu, G.L. Tipoe, K. Wing-Hon Lai, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – Vol. 38, № 4. – P. 1207–1215.
 167. Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells / C.L. Klein, F. Bittinger, C.C. Skarke, et al. // *Pathobiology* – 1995. – Vol. 63, № 4. – P. 204–212.
 168. Effects of environmental stress following myocardial infarction on behavioral measures and heart failure progression: The influence of isolated and group housing conditions / W.J. Kop, T.F. Galvao, S.J. Synowski, et al. // *Physiol. Behav.* – 2015. – Vol. 152, № Pt A. – P. 168–174.
 169. Effects of exercise and stress management training on markers of cardiovascular risk in patients with ischemic heart disease: a randomized controlled trial / J.A. Blumenthal, A. Sherwood, M.A. Babyak, et al. // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293, № 13. – P. 1626–1634.
 170. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb / A. Madej, B. Okopien, J. Kowalski, et al. // *Int J Clin Pharmacol Ther* – 1998. – Vol. 36, № 6. – P. 345–349.

171. Effects of mental and physical stress on platelet function in patients with stable angina pectoris and healthy controls / N.H. Wallen, C. Held, N. Rehnqvist, et al. // *European heart journal*. – 1997. – Vol. 18, № 5. – P. 807–815.
172. Effects of morning cortisol elevation on insulin secretion and glucose regulation in humans / L. Plat, M.M. Byrne, J. Sturis, et al. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270, № 1 Pt 1. – P. 36-42.
173. Effects of nitroglycerin on the coronary microcirculation in normal and ischemic myocardium / H. Kanatsuka, C.L. Eastham, M.L. Marcus, et al. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 19, № 5. – P. 755–763.
174. Effects of superoxide dismutase on reperfusion arrhythmias and left ventricular function in patients undergoing thrombolysis for anterior wall acute myocardial infarction / Y. Murohara, Y. Yui, R. Hattori, et al. // *Am. J. Cardiol.* – 1991. – Vol. 67, № 8. – P. 765–767.
175. Elenkov, I.J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance / I.J. Elenkov // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1024. – P. 138–146c.
176. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction / K. M. Kurrelmeyer, L.H. Michael, G. Baumgarten, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 10. – P. 5456–5461.
177. Endothelial function and hemodynamic responses during mental stress / A. Sherwood, K. Johnson, J.A. Blumenthal, et al. // *Psychosom Med.* – 1999. – Vol. 61, № 3. – P. 365–370.
178. Enhancing Cardiac Rehabilitation With Stress Management Training: A Randomized, Clinical Efficacy Trial / J.A. Blumenthal, A. Sherwood, P.J. Smith, et al. // *Circulation.* – 2016. – Vol. 133, № 14. – P. 1341–1350.
179. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent / F. Lanza, A. Beretz, A. Stierlé, et al. // *Am. J. Physiol.* – 1988. – Vol. 255, № 6 Pt 2. – P. 1276-1288.

180. Ertl, G. Wound model of myocardial infarction / G. Ertl, S. Frantz // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2005. – Vol. 288, № 3. – P. 981–983.
181. ETA-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat / B.K. Podesser, D.A. Siwik, F.R. Eberli, et al. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2001. – Vol. 280. – Pp. 984–991.
182. Evaluation of Chronic Physical and Psychological Stress Induction on Cardiac Ischemia / Reperfusion Injuries in Isolated Male Rat Heart: The Role of Sympathetic Nervous System / K. Rakhshan, A. Imani, M. Faghihi, et al. // Acta Med Iran. – 2015. – Vol. 53, № 8. – P. 482–490.
183. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart / J. Leor, L. Rozen, A. Zuloff-Shani, et al. // Circulation – 2006. – Vol. 114, № 1 Suppl. – P. 94-100.
184. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts / M. Dobaczewski, M. Bujak, P. Zymek, et al. // Cell Tissue Res. – 2006. – Vol. 324, № 3, – P. 475–488.
185. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs / A. Uraizee, K.A. Reimer, C.E. Murry, et al. //Circulation. – 1987. – Vol. 75. – P. 1237–1248.
186. Frangogiannis, N.G. The immune system and cardiac repair / N.G. Frangogiannis // Pharmacol. Res. – 2008. – Vol. 58, № 2. – P. 88–111.
187. Frangogiannis, N.G. The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium / N.G. Frangogiannis // J Thorac Dis. – 2017. – Vol. 9, Suppl 1. – S52–S63.
188. Frasure-Smith, N. Recent evidence linking coronary heart disease and depression / N. Frasure-Smith, F. Lesperance // Can J Psychiatry. – 2006. – Vol. 51, № 12.– P. 730-7.
189. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice / T. Kempf, A. Zarbock, C. Widera, et al. // Nat. Med. – 2011. – Vol. 17, № 5. – P. 581–588.

190. Giacomotto, J. High-throughput screening and small animal models, where are we? / J. Giacomotto, L. Ségalat // *Br J Pharmacol.* – 2010. – Vol. 160, № 2. – P. 204–216.
191. Gill R. Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats / R. Gill, J.A. Kemp, C. Sabin, et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2004. – Vol. 24, № 11. – P. 1214–1218.
192. Gilsbach, R. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? / R. Gilsbach, L. Hein // *Br J Pharmacol.* – 2012. – Vol. 165, № 1. – P. 90–102.
193. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction / A.S. Mihailidou, T.Y. Loan Le, M. Mardini, et al. // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 54, № 6. – P. 1306–1312.
194. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration / H.-Y. Lim, N. Müller, M.J. Herold, et al. // *Immunology* – 2007. – Vol. 122, № 1. – P. 47–53.
195. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta / M. Schmidt, H.G. Pauels, N. Lügering, A. Lügering, et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163, № 6. – P. 3484–3490.
196. Glucocorticoids Modulate Th1 and Th2 Responses in Asthmatic Mouse Models by Inhibition of Notch1 Signaling / C. Hu, Z. Li, J. Feng, et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2018. – Vol. 175, № 1–2, – P. 44–52.
197. Gordon, J.W. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B / J.W. Gordon, J.A. Shaw, L.A. Kirshenbaum // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 108, № 9. – P. 1122–1132.
198. Grippo, A.J. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression / A.J. Grippo, J.A. Moffitt, A.K. Johnson // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, № 5. – P. 1333–1341.
199. Gu, Y. Influence of salbutamol and isoproterenol on the production of TNF and reactive oxygen species by bovine alveolar macrophages and calcitriol

- differentiated HL-60 cells / Y. Gu, A. Seidel // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* – 1996. – Vol. 18. № 1.
200. Hannestad, J. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis / J. Hannestad, N. DellaGioia, M. Bloch // *Neuropsychopharmacology.* – 2011. – Vol. 36, № 12. – P. 2452–2459.
 201. Hansch, C. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure / C. Hansch, T. Fujita // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – Vol. 86, № 8. – P. 1616–1626.
 202. Harris, S.L. The p53 pathway: positive and negative feedback loops / S.L. Harris, A.J. Levine // *Oncogene.* – 2005. – Vol. 24, № 17, – P. 2899–2908.
 203. Heart health when life is satisfying: evidence from the Whitehall II cohort study / J.K. Boehm, C. Peterson, M. Kivimaki, et al. // *European heart journal.* – 2011. – Vol. 32, № 21. – P. 2672–2677.
 204. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study / S. Kinlay, G.G. Schwartz, A.G. Olsson, et al. // *Circulation* – 2003. – Vol. 108, № 13. – P. 1560–1566.
 205. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells / N.G. Frangogiannis, A.R. Burns, L.H. Michael, et al. // *Histochem. J.* – 1999. – Vol. 31, № 4. – P. 221–229.
 206. Histologic evidence for small-vessel coronary artery disease in patients with angina pectoris and patent large coronary arteries / M. Mosseri, R. Yarom, M. S. Gotsman, et al. // *Circulation* – 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 964–972.
 207. Hjelm Dahl, P. Effects of stress and beta-blockade on platelet function / P. Hjelm Dahl, P.T. Larsson, N.H. Wallén // *Circulation.* – 1991. – Vol. 84, № 6. Suppl – VI44-61.
 208. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute

- myocardial infarction / E. Ammirati, C.V. Cannistraci, N.A. Cristell, et al. // *Circ. Res.* – 2012. – Vol. 111, № 10. – P. 1336–1348.
209. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. / M. Jung, Y. Ma, R.P. Iyer, et al. // *Basic Res Cardiol.* – 2017. – Vol. 112, № 3. – P. 33–33.
210. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury / N.G. Frangogiannis, L.H. Mendoza, M.L. Lindsey, et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165, № 5. – P. 2798–2808.
211. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation / G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, et al. // *Trends Immunol.* – 2003. – Vol. 24, № 1. – P. 25–29.
212. Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic beta-cells of the rat / B. Fischer, U. Rausch, P. Wollny, et al. // *Endocrinology.* – 1990. – Vol. 126, № 5. – P. 2635–2641.
213. Immunosuppressive Therapy for the Prevention of Restenosis after Coronary Artery Stent Implantation (IMPRESS Study) / F. Versaci, A. Gaspardone, F. Tomai, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2002. – Vol. 40, № 11. – P. 1935–1942.
214. Impact of ESC/ACCF/AHA/WHF universal definition of myocardial infarction on mortality at 10 years / F.M. Costa, J. Ferreira, C. Aguiar, et al. // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, № 20. – P. 2544–2550.
215. Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress / T. Ravingerová, I. Bernátová, J. Matejíková, et al. // *Exp Clin Cardiol.* – 2011. – Vol. 16, № 3. – e23-29c.
216. Impaired forearm vasodilator reserve in patients with microvascular angina. Evidence of a generalized disorder of vascular function? / F.L. Sax, R.O. Cannon, C. Hanson, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1987. – Vol. 317, № 22. – P. 1366–1370.

217. Impaired Host Defense, Hematopoiesis, Granulomatous Inflammation and Type 1–Type 2 Cytokine Balance in Mice Lacking CC Chemokine Receptor 1 / J.L. Gao, T.A. Wynn, Y. Chang, et al. // *J Exp Med.* – 1997. – Vol. 185, № 11. – P. 1959–1968.
218. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging / S. R. Meisel, H. Shapiro, J. Radnay, et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 1998. – Vol. 31. – P. 120–125.
219. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease / A. Mazzone, S. De Servi, G. Ricevuti, et al. // *Circulation* – 1993. – Vol. 88, № 2. – P. 358–363.
220. Increased myocardial tumor necrosis factor- α in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury / M.D. Meldrum, J.C. Cleveland, B.S. Cain, et al. // *The Annals of thoracic surgery.* – 1998. – Vol. 65, № 2. – P. 439–443.
221. Induction of apoptosis in myocardial infarction and its possible relationship to nitric oxide synthase in macrophages / H. Suzuki, S.M. Wildhirt, R.R. Dudek, et al. // *Tissue Cell.* – 1996. – Vol. 28, № 1. – P. 89–97.
222. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury / G.L. Kukiela, C.W. Smith, A.M. Manning, et al. // *Circulation* – 1995. – Vol. 92, № 7. – P. 1866–1875.
223. Infiltration of polymorphonuclear cells into the post-ischaemic myocardium is dependent on $\beta 2$ and $\alpha 4$ integrins / J.F. Légaré, A. Oxner, O. Heimrath, et al. // *International Journal of Experimental Pathology.* – 2007. – Vol. 88, № 4. – P. 291–300.
224. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities / S.-B. Ong, S. Hernández-Reséndiz, G.E. Crespo-Avilan, et al. // *Pharmacol. Ther.* – 2018. – Vol. 186. – P. 73–87.

225. Inflammatory response to mental stress and mental stress induced myocardial ischemia / M. Hammadah, S. Sullivan, B. Pearce, et al. // *Brain Behav. Immun.* – 2018. – Vol. 68. – P. 90–97.
226. Inhibition of cortisol production with metyrapone prevents mental stress-induced endothelial dysfunction and baroreflex impairment / A.J.M. Broadley, A. Korszun, E. Abdelaal, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 344–350.
227. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice / E. Kanters, M. Pasparakis, M.J.J. Gijbels, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112, № 8. – P. 1176–1185.
228. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction / M. Ikeuchi, H. Tsutsui, T. Shiomi, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 64, № 3. – P. 526–535.
229. Insulin inhibits leukocyte-endothelium adherence via an Akt-NO-dependent mechanism in myocardial ischemia/reperfusion / J. Li, F. Wu, H. Zhang, et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 512–519.
230. Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function / W. Xing, W. Yan, F. Fu, et al. // *Apoptosis.* – 2009. – Vol. 14, № 9. – P. 1050–1060.
231. Insulin inhibits tumor necrosis factor-alpha induction in myocardial ischemia/reperfusion: role of Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation / J. Li, H. Zhang, F. Wu, et al. // *Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 36, № 5. – P. 1551–1558.
232. Inte:ligand: офиц. сайт компании Inte:Ligand GmbH: [электр. ресурс]. URL: <http://www.inteligand.com/> (дата обращения 21.12.2016).
233. Interleukin-1 trap attenuates cardiac remodeling after experimental acute myocardial infarction in mice / B.W. van Tassell, A. Varma, F.N/ Salloum, et al. // *Journal of cardiovascular pharmacology.* – 2010. – Vol. 55, – №2. – P. 117–122.

234. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction / J.S. Burchfield, M. Iwasaki, M. Koyanagi, et al. // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103, № 2. – P. 203–211.
235. Interleukin-10 Is Not a Critical Regulator of Infarct Healing and Left Ventricular Remodeling / P. Zymek, D.-Y. Nah, M. Bujak, et al. // *Cardiovasc Res.* – 2007. – Vol. 74, № 2. – P. 313–322.
236. Internalization of Tissue Factor-Rich Microvesicles by Platelets Occurs Independently of GPIIb-IIIa, and Involves CD36 Receptor, Serotonin Transporter and Cytoskeletal Assembly / I. Lopez-Vilchez, M. Diaz-Ricart, A.M. Galan, et al. // *J. Cell. Biochem.* – 2016. – Vol. 117, № 2. – P. 448–457.
237. Intra-coronary administration of tacrolimus markedly attenuates infarct size and preserves heart function in porcine myocardial infarction / S. Chua, S. Leu, J.-J. Sheu, et al. // *J Inflamm (Lond)*. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 21c.
238. Ischemic, hemodynamic, and neurohormonal responses to mental and exercise stress. Experience from the Psychophysiological Investigations of Myocardial Ischemia Study (PIMI) / A.D. Goldberg, L.C. Becker, R. Bonsall, et al. // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94, № 10. – P. 2402–2409.
239. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: офиц. сайт the International Union of Basic and Clinical Pharmacology: [электр. ресурс]. URL: <http://www.guidetopharmacology.org/> (дата обращения 01.11.2016).
240. James, T.N. Apoptosis in cardiac disease / T.N. James // *Am. J. Med.* – 1999. – Vol. 107, № 6. – P. 606–620.
241. Jurewicz, W.A. Tacrolimus versus cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation / W.A. Jurewicz // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2003. – Vol. 18 Suppl 1. – P. 7-11.
242. Karras, D.J. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction / D.J. Karras, D.L. Kane // *Emerg. Med. Clin. North Am.* – 2001. – Vol. 19, № 2. – P. 321–337.
243. Kikuchi-Ueda, T. Priming effects of tumor necrosis factor- α on production of reactive oxygen species during *Toxoplasma gondii* stimulation and receptor

- gene expression in differentiated HL-60 cells / T. Kikuchi-Ueda, T. Ubagai, Y. Ono // *J. Infect. Chemother.* – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 1053–1064.
244. Kloner, R.A. No-Reflow Phenomenon. A New Target for Therapy of Acute Myocardial Infarction Independent of Myocardial Infarct Size / R.A. Kloner, W. Dai, S.L. Hale // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2018. – Vol. 23, № 3. – P. 273–276.
245. Komori, T. The significance of proinflammatory cytokines and Th1/ Th2 balance in depression and action of antidepressants / T. Komori // *Neuropsychiatry* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 57–60.
246. Kuebler, W.M. The marginated pool / W.M. Kuebler, A.E. Goetz // *Eur Surg Res* – 2002. – Vol. 34, № 1–2. – P. 92–100.
247. Kvetnansky, R. Immobilization stress / R. Kvetnansky, R. McCarty // *Encyclopedia of stress.* – 2000. – Vol. 2. – P. 503–506.
248. Laskowski, R.A. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery / R.A. Laskowski, M.B. Swindells // *J Chem Inf Model* – 2011. – Vol. 51, № 10. – P. 2778–2786.
249. Le Fevre, M. Eustress, distress, and interpretation in occupational stress / M. Le Fevre, J. Matheny, G.S. Kolt // *Journal of Managerial psychology.* – 2003. – Vol. 18, – №. 7. – C. 726-744.
250. Lee, Y. Role of apoptosis in cardiovascular disease / Y. Lee, A.B. Gustafsson // *Apoptosis* – 2009. – Vol. 14, № 4. – P. 536–548.
251. Long acting muscarinic antagonists for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current and developing drugs / M. A. Mastrodicasa, C. A. Droege, A. M. Mulhall, et al. // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2017. – Vol. 26, № 2. – P. 161–174.
252. Long-acting muscarinic receptor antagonists for the treatment of chronic airway diseases / K. Alagha, A. Palot, T. Sofalvi, et al. // *Ther Adv Chronic Dis.* – 2014. – Vol. 5, № 2. – P. 85–98.

253. L-sulpiride, at antidepressant dosage, prevents conditioned-fear stress-induced gastric lesions in rats / A. Benelli, A. De Pol, R. Poggioli, et al. // *Pharmacol. Res.* – 2000. – Vol. 42, № 2. – P. 157–160.
254. Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice / M.J. van Amerongen, M.C. Harmsen, N. van Rooijen, et al. // *Am J Pathol.* – 2007. – Vol. 170, № 3. – P. 818–829.
255. Magazzini L. Market Structure, Malerba, F. The evolution of the pharmaceutical industry / F. Malerba, L. Orsenigo // *Business History* – 2015. – Vol. 57, № 5. – P. 664–687.
256. Mancuso, F. Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively inhibited by dexamethasone in the hamster post-capillary venule. Involvement of endogenous lipocortin 1 / F. Mancuso, R.J. Flower, M. Perretti // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155, № 1. – P. 377–386.
257. Marshall, J.M. The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat / J.M. Marshall // *J. Physiol. (Lond.)* – 1982. – Vol. 332. – P. 169–186.
258. MarvinSketch: офиц. сайт компании ChemAxon Kft: [электр. ресурс]. URL: <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/> (дата обращения 18.11.2016).
259. Maurer-Spurej, E. Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection / E. Maurer-Spurej // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 2. – P. 159–170.
260. Mayr, L.M. Novel trends in high-throughput screening / L.M. Mayr, D. Bojanic // *Curr Opin Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9, № 5. – P. 580–588.
261. McQueen, M. Assessment of the accuracy of serial electrocardiography in the diagnosis of acute myocardial infarction / M. McQueen, D. Holder, N. El-Maraghi // *Am Heart J.* – 1983. – Vol. 105. – P. 258–261.
262. Mechanisms of angina pectoris in syndrome X / A. Maseri, F. Crea, J. C. Kaski, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1991. – Vol. 17, № 2. – P. 499–506.

263. Mental stress-induced myocardial ischaemia / S.S. Arri, M. Ryan, S.R. Redwood, et al. // *Heart*. – 2016. – Vol. 102, № 6. – P. 472–80.
264. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis / J.Y. Sung, J.H. Hong, H.S. Kang, et al. // *Immunopharmacology*. – 2000. – Vol. 47, № 1. – P. 35–44.
265. Michaels, A.D. Microvascular dysfunction in acute myocardial infarction: focus on the roles of platelet and inflammatory mediators in the no-reflow phenomenon / A.D. Michaels, C.M. Gibson, H.V. Barron // *Am. J. Cardiol*. – 2000. – Vol. 85, № 5A. – P. 50–60.
266. ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models: офиц. сайт University of California San Francisco (USA): [электр. ресурс]. URL: <https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi> (дата обращения 01.11.2016).
267. Molecular docking and structure-based drug design strategies / L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, et al. // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 7, – P. 13384–13421.
268. Molecular mode of action of a covalently inhibiting peptidomimetic on the human calpain protease core / Q. Li, R.P. Hanzlik, R.F. Weaver, et al. // *Biochemistry* – 2006. – Vol. 45, № 3. – P. 701–708.
269. МОРАС: офиц. сайт J.J.P. Stewart, Stewart Computational Chemistry: [электр. ресурс]. URL: <http://openморас.net> (дата обращения 21.11.2016).
270. Mulvihill, N.T. Inflammation in acute coronary syndromes / N.T. Mulvihill, J.B. Foley // *Heart*. – 2002. – Vol. 87, № 3. – P. 201–204.
271. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients / M. Profita, R.D. Giorgi, A. Sala, et al. // *Allergy*. – 2005. – Vol. 60, № 11, – P. 1361–1369.
272. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction / J.S. Alpert, K. Thygesen, E. Antman, et al // *J Am Coll Cardiol*. – 2000. – Vol. 36, № 3 – P. 959–969.

273. Myocardial infarction risk and antipsychotics use revisited: a meta-analysis of 10 observational studies / K.-L. Huang, C.-J. Fang, C.-C. Hsuet al. // J. Psychopharmacol. (Oxford) – 2017. – Vol. 31, № 12. – P. 1544–1555.
274. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. / S. Bialik, D.L. Geenen, I.E. Sasson, et al. // J Clin Invest. – 1997. – Vol. 100, № 6. – P. 1363–1372.
275. Nasal vaccination with troponin reduces troponin specific T-cell responses and improves heart function in myocardial ischemia-reperfusion injury / D. Frenkel, A.S. Pachori, L. Zhang, et al. // Int. Immunol. – 2009. – Vol. 21, № 7. – P. 817–829.
276. National Academy of Clinical Biochemistry standards of laboratory practice: recommendation for the use of cardiac marker in coronary artery disease / A. Wu, F.S. Apple, W.B. Gibler, et al. // Clin Chem. – 1999. – Vol. 45. – P. 1104–1121.
277. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress / I.S. Wittstein, D.R. Thiemann, J.A.C. Lima, et al. // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352, № 6, – P. 539–548.
278. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling / M.W. Hwang, A. Matsumori, Y. Furukawa, et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2001. – Vol. 38, № 5. – P. 1546–1553.
279. Neutrophil adherence to isolated adult canine myocytes. Evidence for a CD18-dependent mechanism. / M.L. Entman, K. Youker, S.B. Shappell, et al. // J Clin Invest. – 1990. – Vol. 85, № 5. – P. 1497–1506.
280. Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver / Y. Yamaguchi, E. Akizuki, O. Ichiguchi, et al. // Gastroenterology. – 1997. – Vol. 112, № 2. – P. 551–560.
281. Neutrophil kinetics in health and disease / C. Summers, S.M. Rankin, A.M. Condliffe, et al. // Trends Immunol. – 2010. – Vol. 31, № 8. – P. 318–324.

282. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis / C. Stehlik, R. de Martin, I. Kumabashiri, et al. // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 188, № 1. – P. 211–216.
283. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction / O. Dewald, G. Ren, G.D. Duerr, et al. // Am. J. Pathol. – 2004. – Vol. 164, № 2. – P. 665–677.
284. Oxidant-induced cardiomyocyte injury: identification of the cytoprotective effect of a dopamine 1 receptor agonist using a cell-based high-throughput assay / D. Gerö, K. Módis, N. Nagy, et al. // Int. J. Mol. Med. – 2007. – Vol. 20, № 5. – P. 749–761.
285. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct / V.M. Costa, R. Silva, L M. Ferreira, et al. // Chem. Res. Toxicol. – 2007. – Vol. 20, № 8. – P. 1183–1191.
286. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m) / A. Takahashi, A. Masuda, M. Sun, et al. // Brain Res. Bull. – 2004. – Vol. 62, № 6. – P. 497–504.
287. p53 is renoprotective after ischemic kidney injury by reducing inflammation / T.A. Sutton, T. Hato, E. Mai, et al. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 113–124.
288. Padgett, D.A. How stress influences the immune response / D.A. Padgett, R. Glaser // Trends Immunol. – 2003. – Vol. 24, № 8. – P. 444–448.
289. Panteghini, M. Activity of serum aspartate aminotransferase isoenzymes in patients with acute myocardial infarction / M. Panteghini, F. Pagani, C. Cuccia // Clin. Chem. – 1987. – Vol. 33, № 1. – P. 67–71.
290. Panteghini, M. Acute Coronary Syndrome: Biochemical Strategies in the Troponin Era / M. Panteghini // CHEST – 2002. – Vol. 122, № 4. – P. 1428–1435.

291. Participation of caspase-3-like protease in necrotic cell death of myocardium during ischemia-reperfusion injury in rat hearts / Y. Naka, Y. Sawa, M. Nishimura, et al. // *Circulation J.* – 2003. – Vol. 67, № 3. – P. 248–252.
292. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil / C.R. Welbourn, G. Goldman, I.S. Paterson, et al. // *Br J Surg.* – 1991. – Vol. 78, № 6. – P. 651–655.
293. Pavlov, V.A. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation / V.A. Pavlov, K.J. Tracey // *Nat. Neurosci.* – 2017. – Vol. 20, № 2. – P. 156–166.
294. Pedersen, B.K. Characterization of the in vitro effects of glucocorticosteroids on NK cell activity / B.K. Pedersen, J.M. Beyer // *Allergy.* – 1986. – Vol. 41, № 3. – P. 220–224.
295. Penninx, B.W.J.H. Depression and cardiovascular disease: Epidemiological evidence on their linking mechanisms / B.W.J.H. Penninx // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2017. – Vol. 74. – P. 277–286.
296. PerkinElmer/Chemistry: офиц. сайт компании PerkinElmer, Inc: [электр. ресурс]. URL: <http://www.cambridgesoft.com/> (дата обращения 01.11.2016).
297. Pexelizumab in ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis on 15,196 patients / L. Testa, W.J. Van Gaal, R. Bhindi, et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2008. – Vol. 136, № 4. – P. 884–893.
298. Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial / C.B. Granger, K.W. Mahaffey, W.D. Weaver, et al. // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108, № 10. – P. 1184–1190.
299. Pinoli, M. Dopaminergic Regulation of Innate Immunity: a Review / M. Pinoli, F. Marino, M. Cosentino // *J Neuroimmune Pharmacol.* – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. 602–623.

300. Pituitary–Adrenal Responses to Oxotremorine and Acute Stress in Male and Female M1 Muscarinic Receptor Knockout Mice: Comparisons to M2 Muscarinic Receptor Knockout Mice / M.E. Rhodes, R.T. Rubin, J.M. McKlveen, et al. // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2008. – Vol. 20, № 5. – P. 617–625.
301. Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men / P.M. Ridker, N. Rifai, M.J. Stampfer, et al. // *Circulation*. – 2000. – Vol. 101, № 15. – P. 1767–1772.
302. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction / G. Montalescot, P. Barragan, O. Wittenberg, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344, № 25. – P. 1895–1903.
303. Poitras, V.J. The impact of acute mental stress on vascular endothelial function: evidence, mechanisms and importance / V.J. Poitras, K.E. Pyke // *Int J Psychophysiol.* – 2013. – Vol. 88, № 2. – P. 124–135.
304. Praag, H.M. van Can stress cause depression? / H.M. van Praag // *World J. Biol. Psychiatry*. – 2005. – Vol. 6, Suppl 2. – P. 5–22.
305. Prediction of multiple organ dysfunction syndrome complicating acute myocardial infarction on the basis of comorbidities on admission / Y. Liu, X. Gu, F. Huang, et al. // *Coron. Artery Dis.* – 2016. – Vol. 27, № 5. – P. 391–397.
306. Prognostic value of troponin and creatine kinase muscle and brain isoenzyme measurement after noncardiac surgery: a systematic review and meta-analysis / M. Levy, D. Heels-Ansdell, R. Hiralal, et al. // *Anesthesiology* – 2011. – Vol. 114, № 4. – P. 796–806.
307. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion / Z.Q. Zhao, D.A. Velez, N.P. Wang, et al. // *Apoptosis*. – 2001. – Vol. 6, № 4. – P. 279–290.
308. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis in hyperacute and acute myocardial infarction / G. Ottaviani, A.M. Lavezzi, L. Rossi, et al. // *Eur J Histochem.* – 1999. – Vol. 43, № 1. – P. 7–14.

309. Prospective randomized trial of corticosteroids for the prevention of restenosis after intracoronary stent implantation / C.W. Lee, J.K. Chae, H.Y. Lim, et al. // *Am. Heart J.* – 1999. – Vol. 138, № 1 Pt 1. – P. 60–63.
310. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women / P.M. Ridker, J.E. Buring, J. Shih, et al. // *Circulation* – 1998. – Vol. 98, № 8. – P. 731–733.
311. Psychosocial job characteristics and risk of mortality in a Japanese community-based working population: the Jichi Medical School Cohort Study / A. Tsutsumi, K. Kayaba, K. Hirokawa, et al. // *Soc Sci Med.* – 2006. – Vol. 63, № 5. – P. 1276–1288.
312. PyRx - Virtual Screening Tool: офиц. сайт Source Forge: [электр. ресурс]. URL: <https://sourceforge.net/projects/pyrx/> (дата обращения 18.11.2016).
313. Quatrini, L. Disarming the Killers: Brain Strikes on NK Cells / L. Quatrini, S. Ugolini // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46, № 3. – P. 340–342.
314. Recent updates on Computer-aided drug discovery: Time for a Paradigm Shift / T. Usha, D. Shanmugarajan, A.K. Goyal, et al. // *Curr Top Med Chem* – 2018.
315. Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells / A.C. Liberman, M.L. Budziński, C. Sokn, et al. // *Front. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 9.
316. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy / E. Lindmark, E. Diderholm, et al. // *JAMA* – 2001. – Vol. 286, № 17 – P. 2107–2113.
317. Relative roles of edema versus contracture in the myocardial postischemic “no-reflow” phenomenon / B.Y. Lee, G.J. Wilson, R.J. Domenech, et al. // *Journal of Surgical Research* – 1980. – Vol. 29, № 1. – P. 50–61.
318. Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial

- Ischemia/Reperfusion / N.G. Frangogiannis, M.L. Lindsey, L.H. Michael, et al. // *Circulation* – 1998. – Vol. 98, № 7. – P. 699–710.
319. Rezkalla, S.H. No-Reflow Phenomenon / S.H. Rezkalla, R.A. Kloner // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105, № 5. – P. 656–662.
320. Rickard, A.J. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease / A.J. Rickard, M.J. Young // *J. Mol. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 42, № 6. – P. 449–459.
321. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction / G. Takemura, M. Ohno, Y. Hayakawa, et al. // *Circ. Res.* – 1998. – Vol. 82, № 11. – P. 1130–1138.
322. Role of dopaminergic mechanisms in the regulation of stress responses in experimental animals / S. Puri, A. Ray, A. K. Chakravarti, et al. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1994. – Vol. 48, № 1. – P. 53–56.
323. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction / M. Fuchs, A. Hilfiker, K. Kaminski, [et al.] // *Faseb J.* – 2003. – Vol. 17. – P. 2118–2120.
324. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs / K.M. Mullane, N. Read, J.A. Salmon, et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1984. – Vol. 228, № 2. – P. 510–522.
325. Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses / S. Razani-Boroujerdi, M. Behl, F.F. Hahn, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2008. – Vol. 194, № 1–2. – P. 83–88.
326. Role of serotonin in arteriolar thrombosis and secondary vasospasm / L. Drouet, C. Bal Dit Sollier, S. Ruton, et al. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 16 Suppl 3. – P. 49–53.
327. Roy, B. Dual mode of catecholamine action on splenic macrophage phagocytosis in wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis* / B. Roy, U. Rai // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 136, № 2. – P. 180–191.

328. Sack, M.N. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia – an anti-apoptotic perspective / M.N. Sack, R.M. Smith, L.H. Opie // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – Vol. 45, № 3. – P. 688–695.
329. Safety and effectiveness of celecoxib in patients with refractory unstable angina not suitable for revascularization / L.M. Biasucci, G. Liuzzo, A. Porto, et al. // *European Heart Journal.* – 2003. – Vol. 5 Supplement 2, № 24. – P. 618.
330. Salivary cortisol responses to mental stress are associated with coronary artery calcification in healthy men and women / M. Hamer, K. O'Donnell, A. Lahiri, et al. // *Eur. Heart J.* – 2010. – Vol. 31, № 4. – P. 424–429.
331. Scheuer, D.A. Chronic corticosterone treatment increases myocardial infarct size in rats with ischemia-reperfusion injury / D.A. Scheuer, S.W. Mifflin // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, № 6 Pt 2. – P. 2017–2024.
332. Scheuer, D.A. Repeated intermittent stress exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury / D.A. Scheuer, S.W. Mifflin // *Am J Physiol.* – 1998. – Vol. 274, – No. 2. R470–R475.
333. Seasonal variations in cardiovascular disease / S. Stewart, A.K. Keates, A. Redfern, et al. // *Nat Rev Cardiol.* – 2017. – Vol. 14, № 11. – P. 654–664.
334. Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents / H. Selye // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* – 1998. – Vol. 10, № 2. – P. 230–231.
335. Selye, H. *Stress without Distress* / H. Selye. – New York: Signet, 1975. – 951 P.
336. Selye, H. *Studies on adaptation* / H. Selye // *Endocrinology.* – 1937. – Vol. 21, № 2. – P. 169–188.
337. Selye, H. The evolution of the stress concept / H. Selye // *Am. Sci.* – 1973. – Vol. 61, № 6. – P. 692–699.
338. Selye, H. *The Stress of Life* / H. Selye. – New York: McGraw-Hill Education, 1978. – 2 ed. – 516 P.
339. Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina / A.H. Glassman, C.M. O'Connor, R.M. Califf, et al. // *JAMA.* – 2002. – Vol. 288, № 6. – P. 701–709.

340. Sex-dependent effects of chronic psychosocial stress on myocardial sensitivity to ischemic injury / B.R. Rorabaugh, A. Krivenko, E.D. Eisenmann, et al. // *Stress*. – 2015. – Vol. 18, № 6. – P. 645–653.
341. Shepherd, J.T. Mechanisms responsible for coronary vasospasm / J.T. Shepherd, P.M. Vanhoutte // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1986. – Vol. 8, № 1 Suppl A. – 50A–54A.
342. Sheridan, F.M. Leukocyte Adhesion to the Coronary Microvasculature During Ischemia and Reperfusion in an In Vivo Canine Model / F.M. Sheridan, P.G. Cole, D. Ramage // *Circulation*. – 1996. – Vol. 93, № 10. – P. 1784–1787.
343. Slavíková, J. Plasma catecholamines and ischemic heart disease / J. Slavíková, J. Kuncová, O. Topolcan // *Clin Cardiol.* – 2007. – Vol. 30, № 7. – P. 326–330.
344. Socolovsky, M. Molecular insights into stress erythropoiesis / M. Socolovsky // *Curr. Opin. Hematol.* – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 215–224.
345. Statistica: офиц. сайт компании [Электр. ресурс]. URL: <http://statistica.io/> (дата обращения 02.12.2016).
346. Steptoe, A. Stress and cardiovascular disease / A. Steptoe, M. Kivimäki // *Nat Rev Cardiol.* – 2012. – Vol. 9, № 6. – P. 360–370. 995.
347. Steroid administration after myocardial infarction promotes early infarct expansion. A study in the rat / J.A. Mannisi, H.F. Weisman, D.E. Bush, et al. // *J. Clin. Invest.* – 1987. – Vol. 79, № 5. – P. 1431–1439.
348. Strike, P.C. Systematic review of mental stress-induced myocardial ischaemia / P.C. Strike, A. Steptoe // *Eur. Heart J.* – 2003. – Vol. 24, № 8. – P. 690–703.
349. Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6 / J.E. Chrencik, A. Patny, I K. Leung, et al. // *J. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 400, № 3. – P. 413–433. 272.

350. Structure of 3,4-dichloroisocoumarin-inhibited factor D / L.B. Cole, J.M. Kilpatrick, N. Chu, et al. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1998. – Vol. 54, № 5. – P. 711–717.
351. Sulpiride specifically attenuates psychological stress-induced gastric lesions in rodents / K. Nomura, N. Maeda, K. Kuratani, et al., // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 68, № 1. – P. 33–39.
352. Sun, Y. Infarct scar: a dynamic tissue / Y. Sun, K.T. Weber // *Cardiovascular research.* – 2000. – Vol. 46, № 2. – P. 250–256.
353. Syrjälä, H. Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction / H. Syrjälä, H.M. Surcel, J. Ilonen // *Clin. Exp. Immunol.* – 1991. – Vol. 83, № 2. – P. 326–328.
354. Systemic inflammatory response syndrome after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock / S. Kohsaka, V. Menon, A.M. Lowe, et al. // *Arch. Intern. Med.* – 2005. – Vol. 165, № 14. – P. 1643–1650.
355. Targeted deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction / S. Ichihara, T. Senbonmatsu, E. Price, et al. // *Circulation* – 2002. – Vol. 106, № 17. – P. 2244–2249.
356. Task Force Members 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology / G. Montalescot, U. Sechtem, J.L. Zamorano et al. // *Eur. Heart J.* – 2013. – Vol. 34, № 38. – P. 2949–3003.
357. Temporal changes in myocardial infarction incidence rates are associated with periods of perceived psychosocial stress: A SWEDEHEART national registry study / J. Wallert, C. Held, G. Madison, et al. // *Am. Heart J.* – 2017. – Vol. 191. – P. 12–20.
358. The alpha 2-adrenergic receptor antagonist yohimbine inhibits epinephrine-induced platelet aggregation in healthy subjects / I. Berlin, B. Crespo-Laumonier, A. Cournot, et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 1991. – Vol. 49, № 4. – P. 362–369.

359. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars / I.E. Willems, M.G. Havenith, J.G. De Mey, et al. // *Am. J. Pathol.* – 1994. – Vol. 145, № 4. – P. 868–875.
360. The association between cortisol response to mental stress and high-sensitivity cardiac troponin T plasma concentration in healthy adults / A.I. Lazzarino, M. Hamer, D. Gaze, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2013. – Vol. 62, № 18. – P. 1694–1701.
361. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study / D.P. Faxon, R.J. Gibbons, N.A.F. Chronos, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2002. – Vol. 40, № 7. – P. 1199–1204.
362. The effects of apoptosis vulnerability markers on the myocardium in depression after myocardial infarction / Y. Wang, X. Liu, D. Zhang, et al. // *BMC Med.* – 2013. – Vol. 11. – P. 32.
363. The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression / Y. Wang, H. Zhang, F. Chai, et al. // *BMC Psychiatry.* – 2014. – Vol. 14. – P. 349.
364. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014 / P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, J. Williams, et al. // *Heart.* – 2015. – Vol. 101, № 15. – P. 1182–1189.
365. The role of PPARs in atherosclerosis / C. Duval, G. Chinetti, F. Trottein, et al. // *Trends Mol Med.* – 2002. – Vol. 8, № 9. – P. 422–430.
366. The role of psychosocial stress at work for the development of cardiovascular diseases: a systematic review / E.M. Backé, A. Seidler, U. Latza, et al. // *Int Arch Occup Environ Health.* – 2012. – Vol. 85, № 1. – P. 67–79.
367. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system / I.J. Elenkov, R.L. Wilder, G.P. Chrousos, et al. // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 595–638.

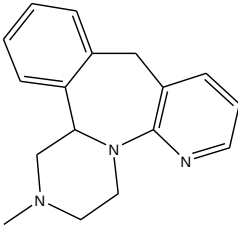
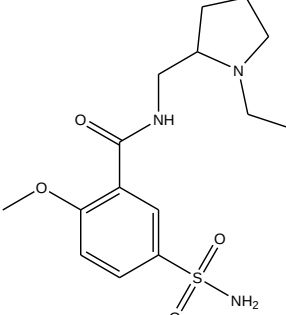
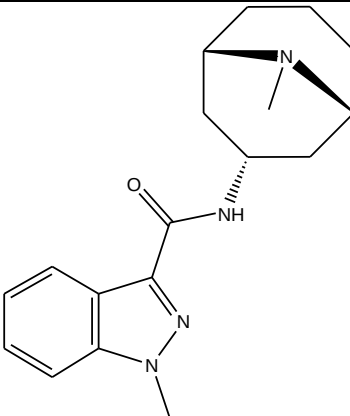
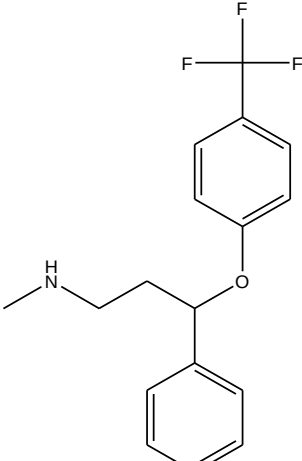
368. The systemic inflammatory response syndrome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction / S. van Diepen, J.P. Vavalle, L.K. Newby, et al. // *Crit. Care Med.* – 2013. – Vol. 41, № 9. – P. 2080–2087.
369. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs / K.A. Reimer, J.E. Lowe, M.M. Rasmussen, et al. // *Circulation.* – 1977. – Vol. 56, № 5. – P. 786–794.
370. Third universal definition of myocardial infarction / K. Thygesen, J.S. Alpert, A.S. Jaffe, et al. // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, № 20. – P. 2551–2567.
371. Translational overview of cytokine inhibition in acute myocardial infarction and chronic heart failure / M.H.T. Hartman, H.E. Groot, I.M. Leach, et al. // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2018.
372. Troponin elevation after percutaneous coronary intervention directly represents the extent of irreversible myocardial injury: insights from cardiovascular magnetic resonance imaging / J.B. Selvanayagam, I. Porto, K. Channon, et al. // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111, № 8. – P. 1027–1032.
373. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A.J. Olson // *J Comput Chem.* – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 455–461.
374. Tumor necrosis factor- α at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts / M. Jacobs, S. Staufenberger, U. Gergs, et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol. 11. – P. 1949–1959.
375. Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction / Y. Monden, T. Kubota, T. Inoue, et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 1. – P. 743–753.
376. Two alternative job stress models and the risk of coronary heart disease. / H. Bosma, R. Peter, J. Siegrist, et al // *Am J Public Health.* – 1998. – Vol. 88, № 1. – P. 68–74.

377. UniProtKB: офиц. сайт UniProt Consortium (Switzerland, UK, USA). [Электр. ресурс]. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/> (дата обращения 01.11.2016).
378. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both / M.A. Pfeffer, J.J.V. McMurray, E.J. Velazquez, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349, № 20. – P. 1893–1906.
379. Vannella, K.M. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages / K.M. Vannella, T.A. Wynn // *Annual Review of Physiology.* – 2017. – Vol. 79, № 1. – P. 593–617.
380. Vasudevan, G. Lactic dehydrogenase isoenzyme determination in the diagnosis of acute myocardial infarction / G. Vasudevan, D. Mercer, M. Varat // *Circulation.* – 1978. – Vol. 57. – P. 1055–1067.
381. Velázquez de Campos, O. Evidencias para el uso combinado de meloxicam – esomeprazol / O. Velázquez de Campos // *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* – 2017. – Vol. 36. – № 1.
382. Ventricular remodeling after myocardial infarction and effects of ACE inhibition on hemodynamics and scar formation in SHR / T. Zdrojewski, P. Gaudron, P. Whittaker, et al. // *Cardiovascular Pathology.* – 2002. – Vol. 11, № 2. – P. 88–93.
383. Waldenström, A.P. A possible role of noradrenaline in the development of myocardial infarction: an experimental study in the isolated rat heart / A.P. Waldenström, A.C. Hjalmarson, L. Thornell // *Am. Heart J.* – 1978. – Vol. 95, № 1. – P. 43–51.
384. Wallach, I. A structure-based approach for mapping adverse drug reactions to the perturbation of underlying biological pathways / I. Wallach, N. Jaitly, R. Lilien // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5, № 8. – P. 12-63.
385. WHO Working group on establishment of ischaemic heart disease registers / Report of fifth working group. – Copenhagen: World Health Organisation, 1972. – Vol. 821, № 5. – P. 821–826.

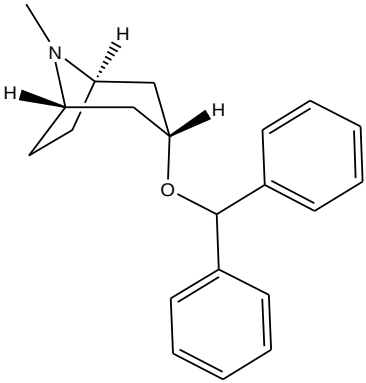
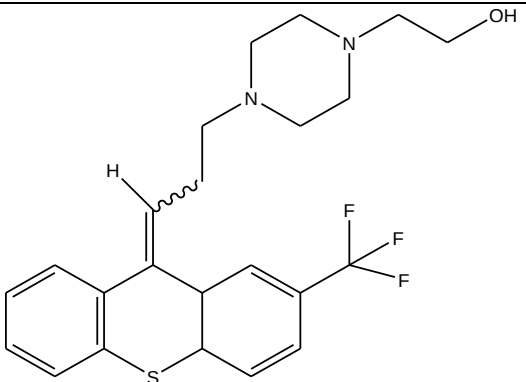
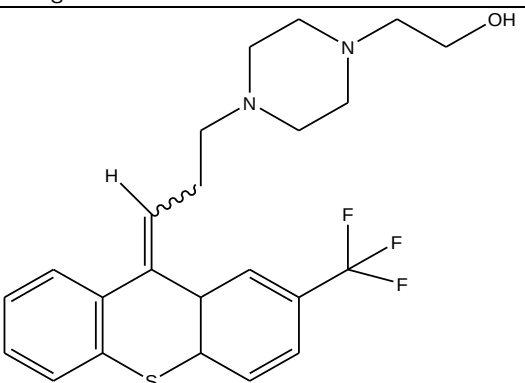
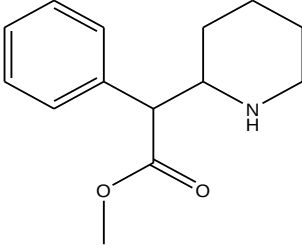
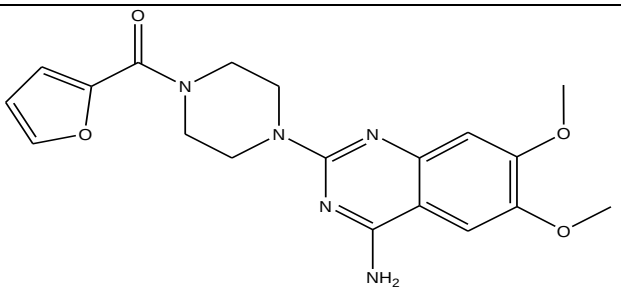
386. Widimský, P. Summary of the 2012 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevations. Prepared by the Czech Society of Cardiology / P. Widimský, P. Kala, R. Rokyta // *Cor et Vasa*. – 2012. – Vol. 54, № 5. – P. 273–289.
387. Wiholm, C. The impact of stress management on computer-related skin problems / C. Wiholm, B. Arnetz, M. Berg // *Stress and Health*. – 2000. – Vol. 16, № 5. – P. 279-285.
388. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision / S. Mendis, K. Thygesen, K. Kuulasmaa, et al. // *Int J Epidemiol*. – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 139–146.
389. Wu, A.H.B. Is there a continual role for serum creatine kinase and myoglobin testing in the era of high sensitivity troponin assays? / A.H.B. Wu // *Frontiers in Laboratory Medicine*. – 2018.
390. Yang, Z. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia / reperfusion injury / Z. Yang, B. Zingarelli, C. Szabo // *Circulation*. – 2000. – Vol. 9. – P. 1019–1026.
391. Zotova, N.V. Systemic Inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process / N.V. Zotova, V.A. Chereshev, E.Y. Gusev // *Plos One*. – 2016. – Vol. 11, № 5. – e0155138c.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Препараты сравнения и референсные препараты и вещества

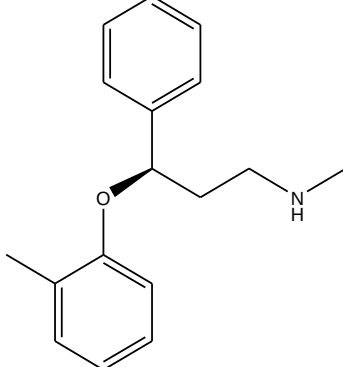
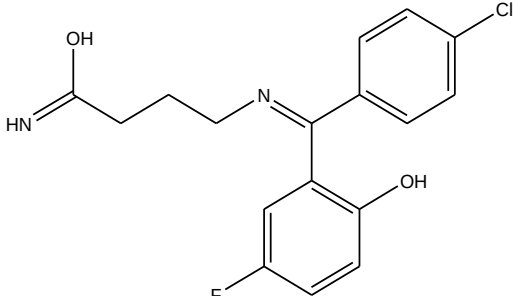
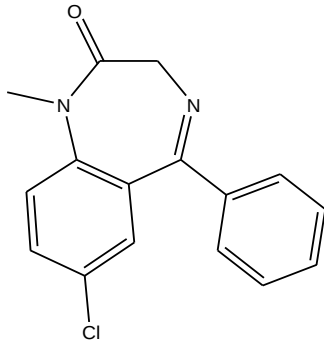
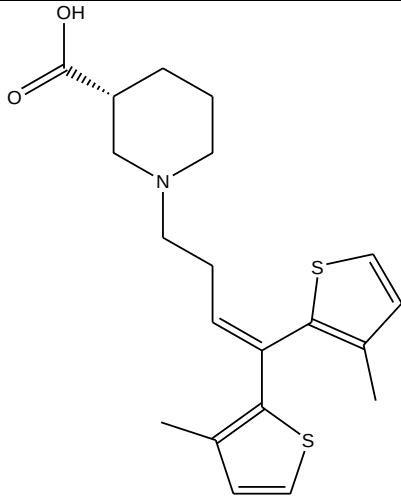
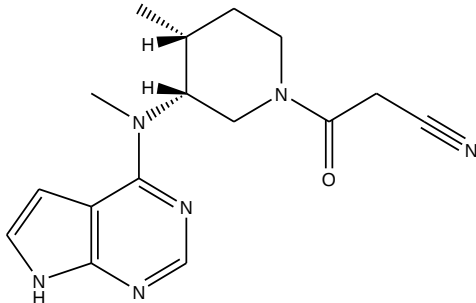
Название	Мишень	Свойства	Структурная формула
Миртазапин	—	Препарат сравнения	
Сульпирид	—	Препарат сравнения	
Гранисетрон	5-HT3A	Селективный антагонист 5-HT3 рецепторов	
Флуоксетин	SERT	Селективный ингибитор обратного захвата серотонина	

Продолжение приложения 1.

Препараты сравнения и референсные препараты и вещества			
Бензатропин	CHRM1	Селективный антагонист М-холинорецепторов	
Флупентиксол	DRD1	Антагонист D1 и D2 дофаминовых рецепторов	
Флупентиксол	DRD2	Антагонист D1 и D2 дофаминовых рецепторов	
Метилфенидат	DAT	Селективный ингибитор обратного захвата дофамина	
Празозин	ADRA1A	Селективный антагонист α1-адренорецепторов	

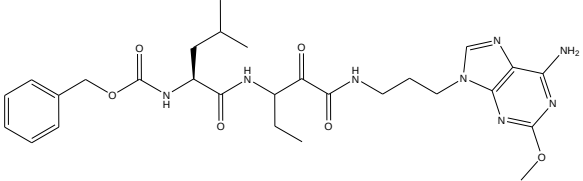
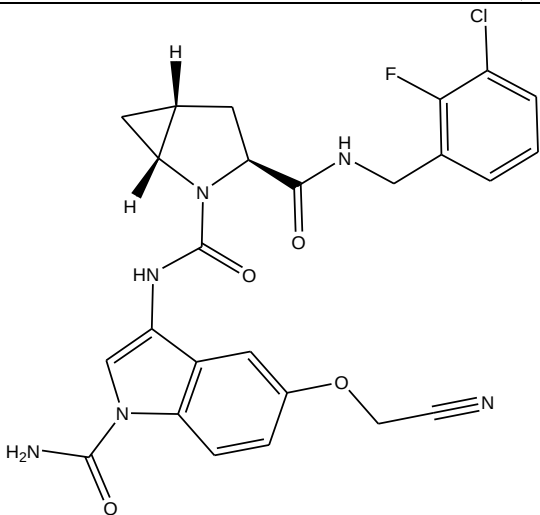
Продолжение приложения 1.

Препараты сравнения и референсные препараты и вещества

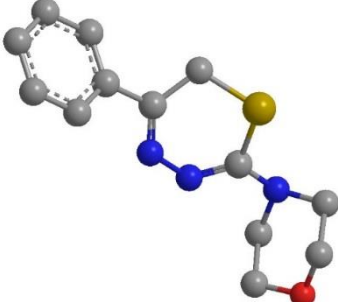
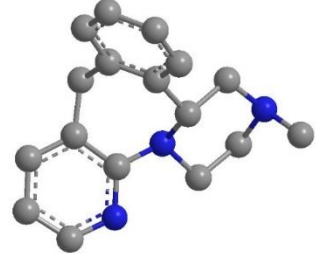
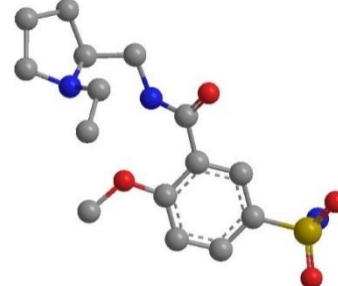
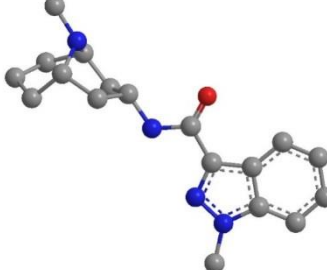
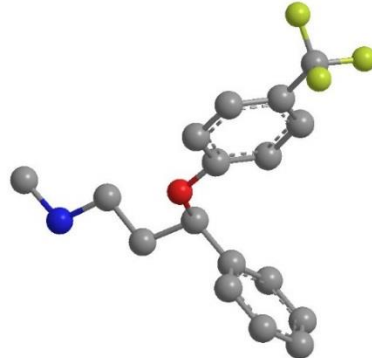
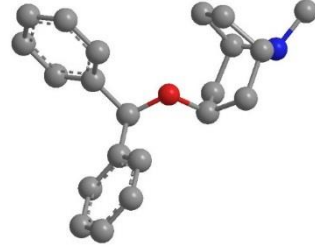
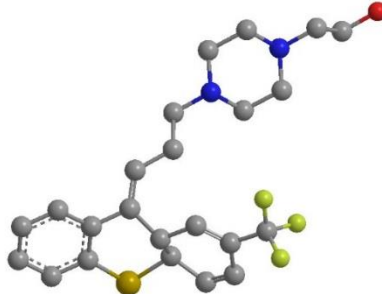
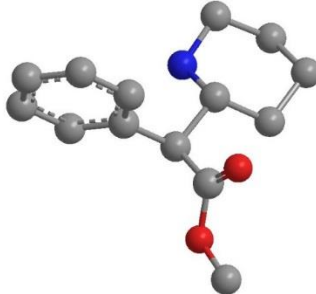
Атомоксетин	NET	Селективный ингибитор обратного захвата норадреналина	
Прогабид	GABRA1 GABRB2	Селективный агонист ГАМК-сайта ГАМК _A рецептора	
Диазепам	GABRA1 GABRG2	Селективный агонист бензодиазепинового сайта ГАМК _A рецептора	
Тиагабин	GAT1	Селективный ингибитор обратного захвата ГАМК	
Тофаситиниб	JAK3	Ингибитор JAK3 киназы	

Продолжение приложения 1.

Препараты сравнения и референсные препараты и вещества

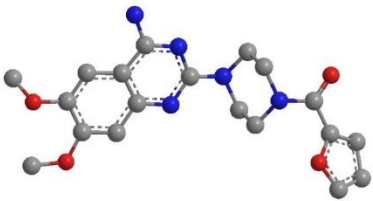
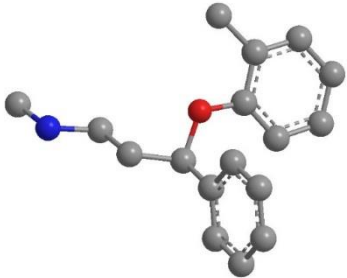
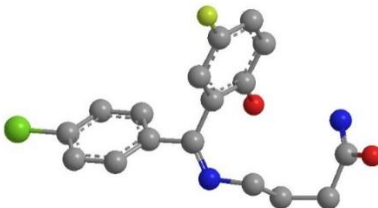
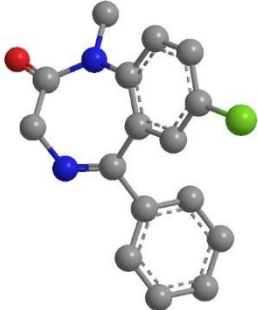
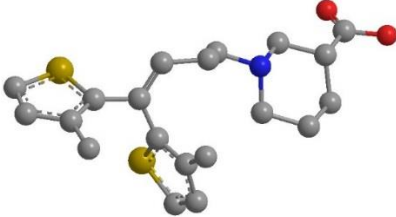
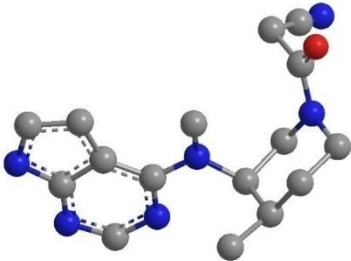
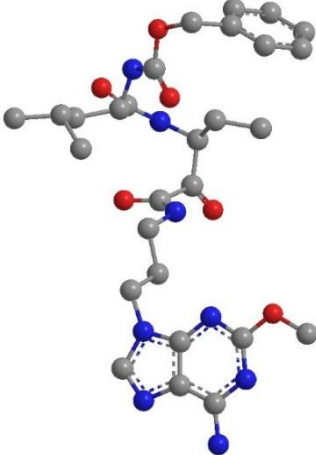
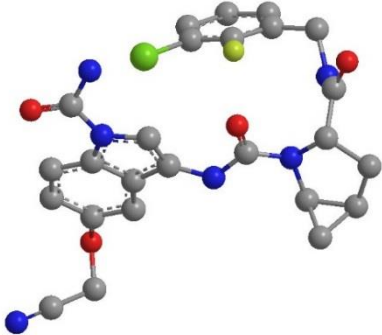
CHEMBL12408 73	CAPN1	Ингибитор кальпаина	
CHEMBL21807 65	CFD	Ингибитор адипсина	

3D-модели соединения L-17, препаратов сравнения и референсных препаратов и веществ

			
2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид	Миртазапин	Сульпирид	Гранисетрон
			
Флуоксетин	Бензатропин	Флупентиксол	Метилфенидат

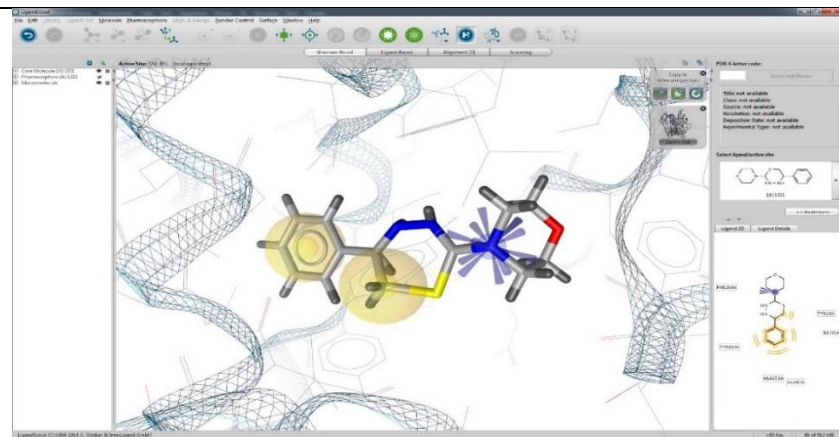
Продолжение приложения 2.

3D-модели соединения L-17, препаратов сравнения и референсных препаратов и веществ

			
Празозин	Атомоксетин	Прогабид	Диазепам
			
Тиагабин	Тофаситиниб	CHEMBL1240873	CHEMBL2180765

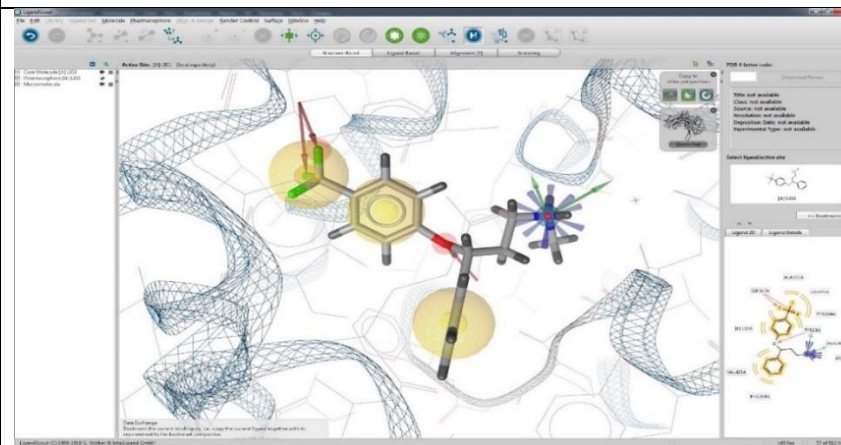
Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ с наиболее важными биомишенями

Соединение L-17 в сайте серотонинового транспортера SERT



Два гидрофобных взаимодействия и одно электростатическое с положительно заряженной группой

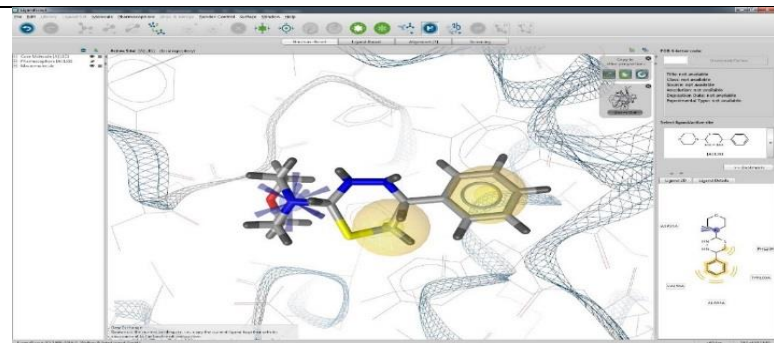
Флуоксетин в сайте серотонинового транспортера SERT



Три гидрофобных взаимодействия, одно электростатическое с положительно заряженной группой, пять водородных связей – три с Н-акцепторными группами, две с Н-донорными группами

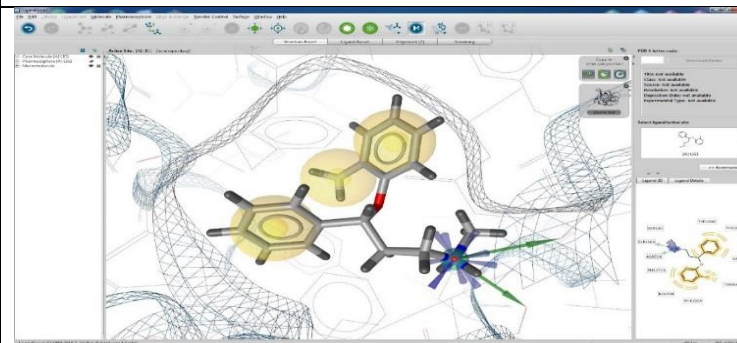
Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ с наиболее важными биомишенями

Соединение L-17 в сайте норадреналинового транспортера NET



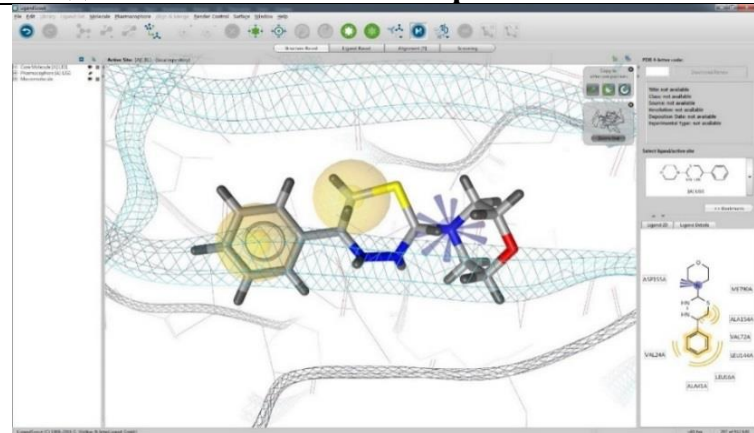
Два гидрофобных взаимодействия и одно электростатическое с положительно заряженной группой

Атомоксетин в сайте норадреналинового транспортера NET



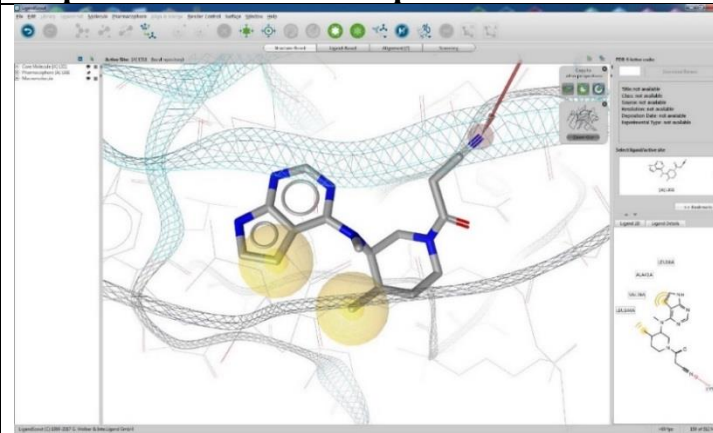
Три гидрофобных взаимодействия, одно электростатическое с положительно заряженной группой, две водородных связи с Н-донорными группами

Соединение L-17 в сайте тирозин-киназы JAK3



Два гидрофобных взаимодействия и одно электростатическое с положительно заряженной группой

Тофаситиниб в сайте тирозин-киназы JAK3

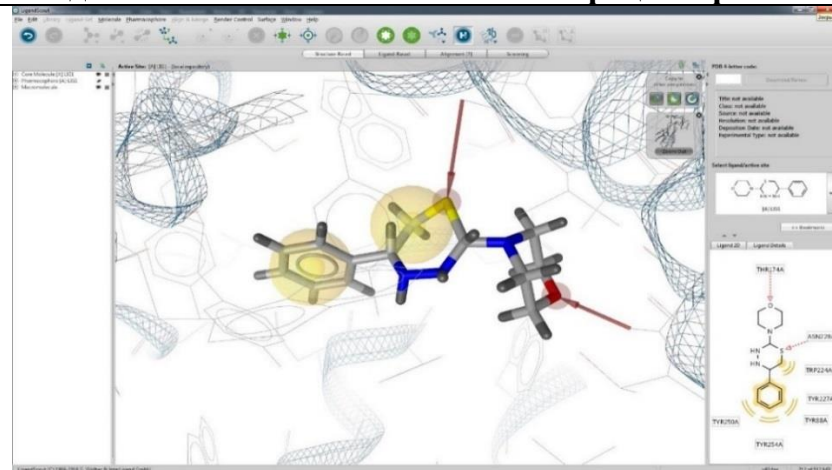


Два гидрофобных взаимодействия и одна водородная связь с Н-акцепторной группой

Продолжение приложения 3.

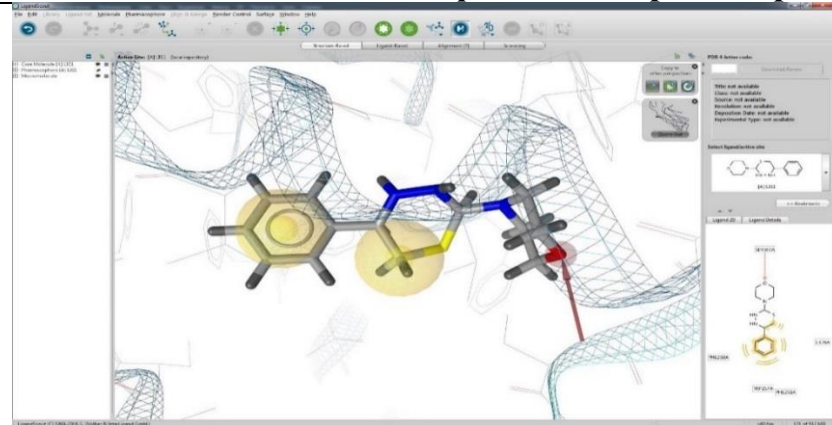
Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ с наиболее важными биомишенями

Соединение L-17 в сайте M1-холинорецептора CHRM1



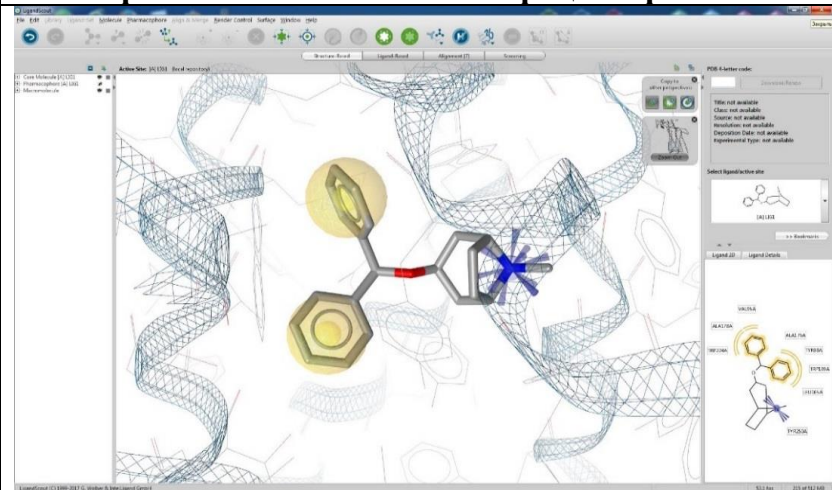
Два гидрофобных взаимодействия и две водородных связи с Н-акцепторными группами

Соединение L-17 в сайте дофаминового рецептора DRD1



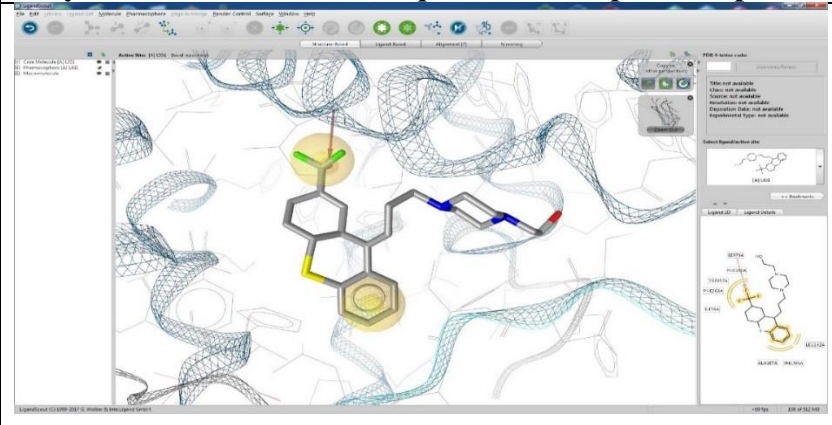
Два гидрофобных взаимодействия и одна водородная связь с Н-акцепторной группой

Бензатропин в сайте M1-холинорецептора CHRM1



Два гидрофобных взаимодействия и одно электростатическое с положительно заряженной группой

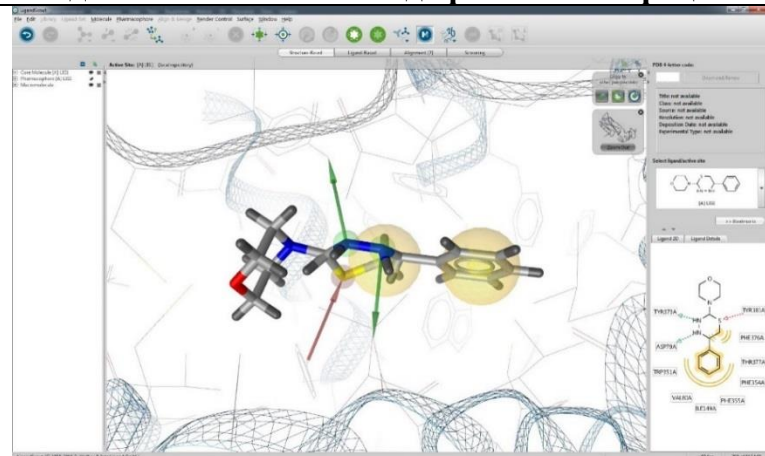
Флупентиксол в сайте дофаминового рецептора DRD1



Два гидрофобных взаимодействия и одна водородная связь с Н-акцепторной группой

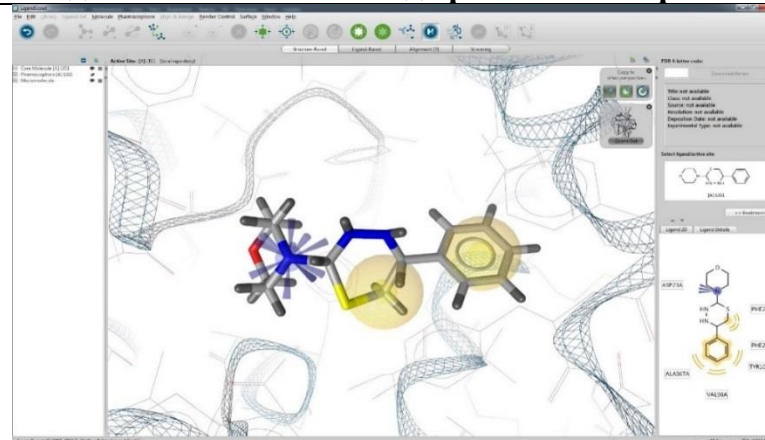
Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ с наиболее важными биомишенями

Соединение L-17 в сайте дофаминового рецептора DRD2



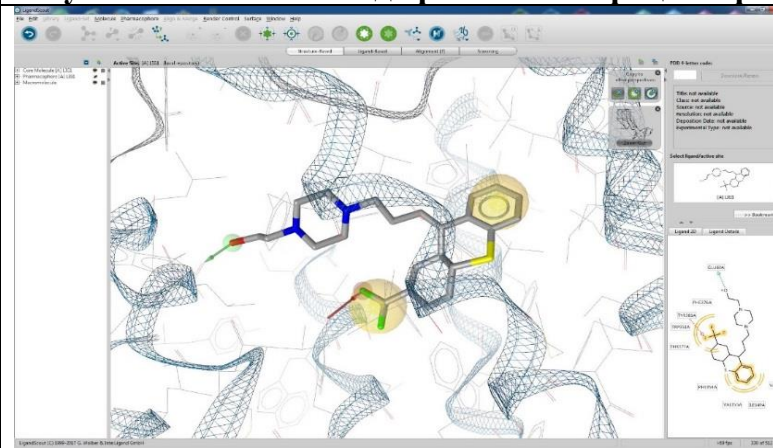
Два гидрофобных взаимодействия и три водородных связи – одна с Н-акцепторной группой, две с Н-донорными группами

Соединение L-17 в сайте дофаминового транспортера DAT



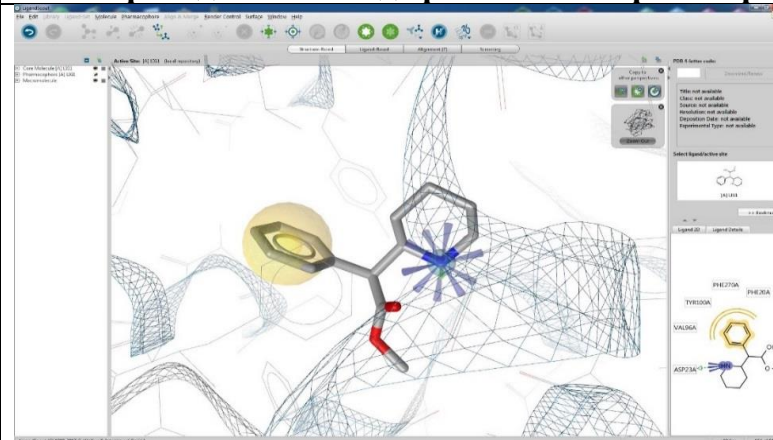
Два гидрофобных взаимодействия и одно электростатическое с положительно заряженной группой

Флупентиксол в сайте дофаминового рецептора DRD2



Два гидрофобных взаимодействия и две водородных связи – одна с Н-акцепторной группой, одна с Н-донорной группой

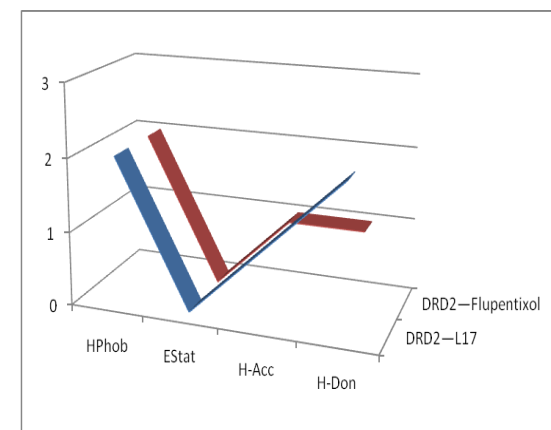
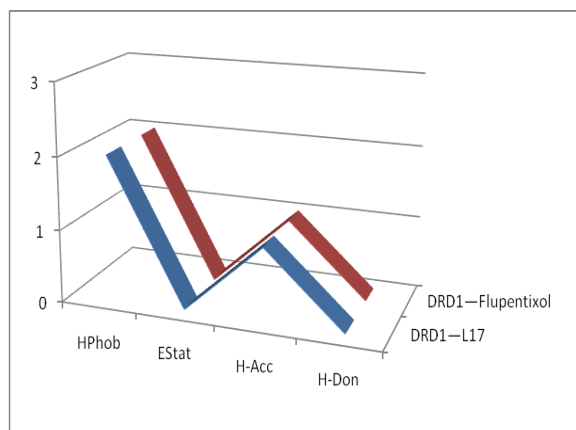
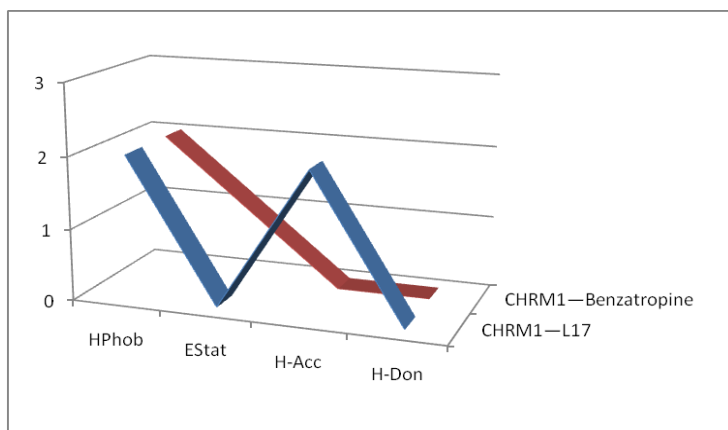
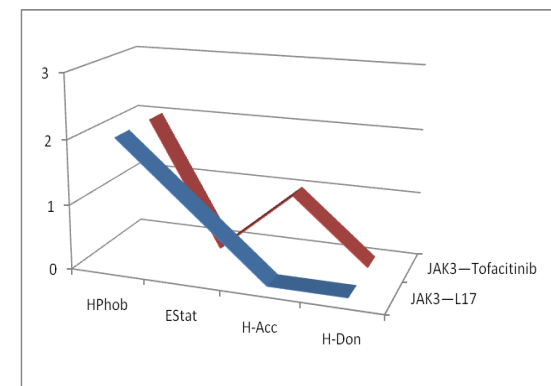
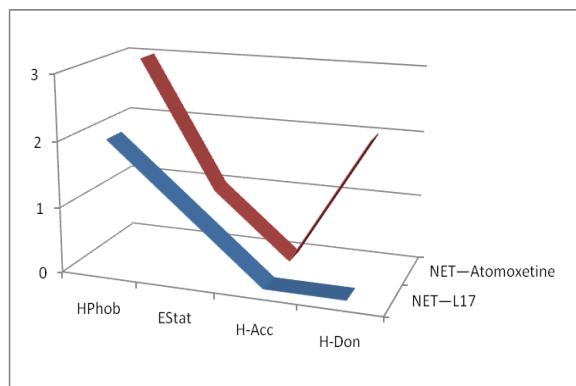
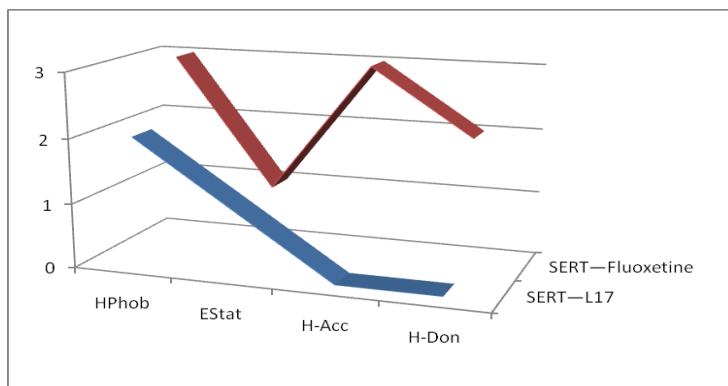
Метилфенидат в сайте дофаминового транспортера DAT



Одно гидрофобное взаимодействие и одно электростатическое с положительно заряженной группой

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Профили взаимодействия соединения L-17 и рефересных веществ с сайтами наиболее важных биомишеней:
HPhob – число гидрофобных взаимодействий; **EStat** – число электростатических взаимодействий; **H Acc** – число водородных связей с H-акцепторной группой; **H Don** – число водородных связей с H-донорной группой



Продолжение приложения 4.

Профили взаимодействия соединения L-17 и рефересных веществ с сайтами наиболее важных биомшеней: HPhob – число гидрофобных взаимодействий; EStat – число электростатических взаимодействий; H Acc – число водородных связей с Н-акцепторной группой; H Don – число водородных связей с Н-донорной группой

