

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Екатеринбург - 2018**

Работа выполнена в лаборатории иммунопатофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН (ИИФ УрО РАН)

### Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор  
заслуженный деятель науки Российской  
Федерации

Черешнева  
Маргарита Владимировна

Доктор биологических наук, доцент

Данилова Ирина Георгиевна

### Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией экспериментальной и  
клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ  
Детской гематологии, онкологии и иммунологии  
им. Д.Рогачева» Минздрава России

Козлов Иван Генрихович

Доктор медицинских наук, профессор, директор  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Институт физиологии Коми  
научного центра УрО РАН

Бойко Евгений Рафаилович

Доктор медицинских наук, доцент, директор  
научно-образовательного центра  
«Биомедицинские технологии» ФГАОУ ВО  
«Южно-Уральский государственный  
университет (национальный исследовательский  
университет)

Цейликман Ольга Борисовна

**Ведущая организация** - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (г. Иркутск).

Защита состоится «29» ноября 2018 года в 12-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН и на сайте ИИФ УрО РАН - <http://iip.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak2.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02  
на базе ИИФ УрО РАН,  
д.м.н., профессор, ЗДН РФ

И.А. Тузанкина

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Проблема лечения сердечно-сосудистых заболеваний не только не теряет, но приобретает всё большую актуальность, поскольку является причиной 12,8% всех смертей в популяции [Widimský P., 2012]. 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 [Белоусов Д.Ю., Медников О.И., 2003; Widimský P., 2012].

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 100000 [Концевая А.В. и др., 2011]. 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 % [Frangogiannis N.G., 2008], то в России доля вмешательств, выполняемых при ОКС, в среднем не превышает одной трети всех интервенционных вмешательств [Концевая А.В. и др., 2011].

Тем не менее, согласно данным популяционных исследований внутрибольничная смертность от ИМ варьирует от 6 до 14 %, а после выписки из стационара достигает 7,1 % в течение первого года, 13,6 % в течение 5 лет и 23,8 % в 10-ти летнем периоде выживания [Costa F.M., et al., 2012].

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 [Kloner R.A. et al., 2018]. При этом развитие синдрома no-reflow является независимым предиктором смерти; у пациентов с синдромом no-reflow достоверно чаще возникает застойная сердечная недостаточность и злокачественные аритмии [Morishima I., et al., 2000]. 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 [Morishima I., et al., 2000]. Именно поэтому S.H. Rezkalla и R.A. Kloner (2002, 2018), проанализировав значимость и низкую эффективность лечения феномена no-reflow, высказали мнение о том, что если предыдущие 2 десятилетия были десятилетиями реперфузии крупных эпикардальных артерий, то первые десятилетия нового тысячелетия будут десятилетиями микроциркуляторного кровотока [Rezkalla S.H., Kloner R.A., 2002; Kloner R.A. et al., 2018].

Однако ещё более проблематичным, чем лечение синдрома no-reflow, представляется лечение воспалительного процесса при ИМ, который начинает 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 [Mahaffey K.W., et al., 2003]. При этом в клинической практике практически отсутствуют методы лечения, улучшающие процессы заживления инфарктированного миокарда, 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 [Frangogiannis N.G., 2008].

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

Описанные в литературе попытки ограничить размер инфаркта путем снижения уровня супероксид-анионов (ROS) в миокарде, показывали либо частичную, либо полную неэффективность антиоксидантов для коррекции течения ИМ [Gerö D., et al., 2007]. Ингибирование ангиотензин-превращающего фермента в экспериментах, конечно, снижало диастолическое давление левого желудочка, но задерживало созревание инфарктного рубца за счёт снижения содержания коллагена [Ertl G., Frantz S., 2005], а блокада рецепторов ангиотензина II даже приводила увеличению показателей смертности [Ichiyama S., et al., 2002]. Также достаточно спорные результаты были получены при ингибировании эндотелина-1, что приводило к расширению левого желудочка сердца и снижению его систолической функции [Ertl G., Frantz S., 2005]. Низкую эффективность показало и применение человеческих моноклональных антител, ингибирующих фрагмент комплемента C5 в виде лекарственного препарата Rexelizumab, который не влиял на показатели смертности [Granger C.B., et al., 2003].

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 [Panteghini M., 2002]. Так, было показано, что ингибирование ИЛ-6, уровень которого повышается при ИМ и коррелирует с повышенной смертностью, не влияло на размер инфаркта, функцию левого желудочка и постинфарктное ремоделирование [Kaplanski G., et al., 2003]. В свою очередь, блокада ИЛ-1 вызывала снижение выраженности нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации, что приводило только к снижению количества миофибробластов и отложению коллагена в зоне инфаркта, не влияя на размеры

инфаркта [Bujak M., Frangogiannis N.G., 2007]. Экспериментальные попытки воздействовать на ход ИМ за счет блокады действия TNF- $\alpha$  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 $\beta$  [Monden Y., et al., 2007]. 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.

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. 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.

В целом, можно свидетельствовать о том, 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 [Christia P., Frangogiannis N.G., 2013]. 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.

Вышеизложенное 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.

К моменту инициации работ по поиску новых способов терапии ИМ в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН 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 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 [Чупахин О.Н., и др., 1995, 2003; Васильева Т.М., и др., 2008]. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что соединения класса 1,3,4-тиадиазинов оказывают антиагрегационное действие, [Чупахин О.Н., и др., 2013], приближаясь к таким препаратам как аспирин и клопидогрель, а наиболее активный представитель данного класса – 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид, помимо упомянутых свойств, согласно результатов скринингового фармакологического исследования, обладает сочетанием свойств адreno-, холино- и серотонино-блокаторов; по спектру обнаруженных эффектов приближаясь к атипичным мягким нейролептикам типа эглонила (сульпирида).

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-тиадиазин гидробромида.

2. Проанализировать 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 тканеспецифичных 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 были 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 УрО РАН 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 Минздрава России, д.б.н., профессором П.М. Васильевым. Часть

экспериментальных исследований 1,3,4-тиадазинов осуществлялась совместно с сотрудниками ЦКП «SPF-виварий» Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики СО РАН, д.б.н., профессором М.П. Мошкиным и Н.Б. Илларионовой. Гистологические исследования осуществлялись в Институте иммунологии и физиологии УрО 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-тиадазинов 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 замещённых 1,3,4-тиадазинов.

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 замещенных 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 замещенных 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 замещенных 1,3,4-тиадиазинов, проявляющееся уменьшением нейтрофильной и увеличением макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации зоны инфаркта.

Впервые подтверждена способность соединений группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов стимулировать, как внешний, так и внутренний пути

инициации апоптоза, активность которых 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 замещённых 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). 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 Института Иммунологии и Физиологии УрО РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 33 научные работы, 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 материалы 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.

**Соответствие паспорту номенклатуры специальностей.** Содержание диссертационной работы соответствует специальности 14.03.03 – патологическая физиология, биологические науки.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования. Используемое соединение.** В работе использовалось биологически активное соединение 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид (соединение L-17) из группы замещенных 1,3,4-тиадиазинов, синтезированных в ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента

России Б.Н. Ельцина» (патент РФ № 2259371 от 27 августа 2005 г., патент РФ 2456284 от 12.04.2011) [Логвинова Ю.С. и др., 2013].

**Расчетные методы *in silico*.** Компьютерный прогноз спектра биологической активности соединения L-17 осуществляли с использованием системы «PASS» (версия 10.4 Professional Extended) [Филимонов Д.А., 2006] и информационной технологии «Микрокосм» 7.1 [Васильев П.М., 2011]; анализа взаимосвязимостей различных видов биологической активности химических соединений – PharmaExpert 10.1 [Лагунин А.А., 2006]; анализа связывания лигандов с сайтами биомишеней с целью определения ключевых связывающих аминокислот – LigPlot+ 1.4.5 [Laskowski R.A., Swindells M.B., 2011]; построения методами молекулярной механики конформеров соединений – MarvinSketch 15.6.15; оптимизации методами квантовой химии конформации соединений – MORAC2016. Докинг соединения L-17 в сайты связывания различных белков мишеней: серотонинового рецептора, серотонинового транспортера, мускаринового холинорецептора типа 1, дофаминовых рецепторов 1 и 2 типа, дофаминового транспортера,  $\alpha$ 1-адренорецептор, норадреналинового транспортера, выполнялся с использованием программного пакета AutoDock Vina 1.1.1 в комплекте с дополнительными инструментами AutoDock Tools и PyMol [Trott O., Olson A.J., 2010].

**Лабораторные животные.** В качестве экспериментальных животных использовали 150 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 (Собрание законодательства Российской Федерации от 29 июня 1998 г., N 26, ст. 3006; от 13 января 2003 г. N 2 ст. 167; от 10 января 2000 г., N 2, ст. 126; от 7 января 2002 г. (Часть I), N 1, ст. 2) и положением о Министерстве здравоохранения Российской Федерации,

утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29.04.2002 N 284 (Собрание законодательства Российской Федерации, 6 мая 2002 г., N 18, ст. 1771). План исследования был одобрен Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН, протокол № 157-МІ.

**Экспериментальные модели *in vivo*.** В работе использовалась модель ИМ и нервно-мышечного напряжения (иммобилизационный стресс). Моделирование острого ИМ осуществлялось на крысах (патент на изобретение № 2407062 от 20.12.2010 г.); основные точки выведения животных из эксперимента — на первые, пятые и седьмые сутки. У ложнооперированных животных полностью повторяли оперативное вмешательство, исключая этап термокоагуляции сосуда. Также, в экспериментах *in vivo* применялась описанная R. Kvetnansky, 1970, модель иммобилизационного стресса, при которой животных фиксировали на операционном столике на спине 6 часов в день [R. Kvetnansky, 1970, 2000; Б.Г. Юшков и др, 1999]; в качестве основных точек эксперимента для проведения исследования параметров морфофункционального состояния органов-мишеней, биохимического и иммуноферментного анализов были выбраны первые и вторые сутки, что обусловлено длительностью фазы тревоги [Селье Г., 1960; Kvetnansky R., 1970], а также временем острой и отдаленной реакции клеток крови на стресс [Юшков Б.Г., и др. 1999].

**Лабораторные методы исследования.** 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-Hysel, Франция).

Оценка показателей морфофункционального состояния сердца проводилась с использованием разнообразных гистологических методов. Фиксацию материала осуществляли в 10 % забуференном формалине. Гистологическую проводку материала осуществляли при помощи автоматического тканевого процессора Leica TP1020. 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



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. Анализ гистологических препаратов осуществляли с использованием программы анализа изображений Видеотест Морфология 5.2. на микроскопе Leica DM2500, соединенном с видеокамерой Leica DFC420 и персональным компьютером.

С целью оценки интенсивности процессов апоптоза проводили иммуногистохимическое определение экспрессии белков CD95 и P53. 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 и P53 Mouse Monoclonal Antibody (clone 998A2A2) фирмы Molecular Probes® (OR, USA) в соответствии с общепринятой методикой [Эллиниди В.Н., и др., 2002].

Активность аминотрансфераз определяли с помощью набора для определения активностей унифицированным методом Райтмана-Френкеля АЛТ 01/11 и АСТ 01/11 фирмы «Витал Диагностикс СПб». 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. Определение МВ-КФК в сыворотке и плазме крови экспериментальных животных осуществляли оптимизированным кинетическим методом при помощи набора реагентов СК-НАС-03/13 фирмы «Витал Диагностикс СПб». Определение активности ЛДГ осуществляли с помощью диагностического набора ЛДГ-ВИТАЛ В 23.01 фирмы «Витал Диагностикс СПб» для определения активности лактатдегидрогеназы в сыворотке (плазме) крови оптимизированным кинетическим методом.

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

Уровень кортикостерона определяли с использованием стандартных коммерческих наборов производства IDS Corticosterone EIA AC-14F1 фирмы Immunodiagnostic System (IDS, Великобритания) методом иммуноферментного анализа [Чард Т., 1981].

Определение концентрации цитокинов: IL 1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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 исследования.** Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и ANOVA (Newman-Keuls test) с использованием табличного редактора Microsoft Excel и пакета прикладных программ «Statistika 6.0» [Гланц С., 1998] с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия соединения L-17.**

В рамках первой части анализа *in silico*, был определен спектр потенциального биологического действия и молекулярные мишени соединения L-17.

По результатам прогноза в PASS, с учетом результатов экспериментального изучения фармакологических эффектов соединения L-17, для анализа в программе PharmaExpert таргетных механизмов действия, был определен ряд целевых видов активности (Anesthetic general, Anesthetic, Cognition disorders treatment, Antiinflammatory, Phobic disorders treatment, Psychotropic,

Immunostimulant, Antinociceptive, Cardiovascular analeptic, Antidepressant) и 15 белков-мишеней для последующего анализа: серотониновый рецептор типа 3A 5-HT<sub>3A</sub>, серотониновый транспортер SERT, мускариновый холинорецептор типа 1 CHRМ1, дофаминовый рецептор типа 1 DRD1, дофаминовый рецептор типа 2 DRD2, дофаминовый транспортер DAT,  $\alpha$ 1-адренорецептор ADRA1A, норадреналиновый транспортер NET,  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора GABRA1,  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора GABRB2,  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора GABRG2, ГАМК-транспортер типа 1 GAT1, янус-тирозин киназа типа 3 JAK3, кальпаин 1 CAPN1, комплементарный фактор D (адипсин) CFD. Далее, для каждого белка-мишени, релевантного спектру фармакологической активности, по результатам анализа информации из базы знаний UniProtKB, была выбрана наилучшая экспериментальная или теоретическая (при отсутствии экспериментальной) 3D-модель белка человека.

Согласно проведенному в программе прогноза BBB Predictor 0.90 расчету исследуемое соединение хорошо проникает через ГЭБ, в качестве стандартных препаратов сравнения были выбраны миртазапин и сульпирид [DrugBank, 2016].

Для детального анализа предполагаемого механизма взаимодействия изученных соединений с выбранными мишенями выполнен докинг вещества в сайты связывания 16 релевантных биомишеней с помощью программ PyRx 0.8, 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.

Итоговые результаты докинга соединения L-17 в виде вектора минимальных энергий докинга приведены в *таблице 1*.

Расчетными исследованиями статистически доказано, что соединение L-17 имеет оригинальный мультитаргетный спектр фармакологической активности, по

характеру действия похожий на спектр активности сульпирида: наличие выраженного ингибирования обратного захвата дофамина, норадреналина и серотонина, свидетельствует о возможном наличии у него выраженной антидепрессантной активности. Это позволяет позиционировать соединение L-17 как мультитаргетный атипичный антидепрессант и атипичный нейролептик, с преимущественно пострецепторным действием, с возможным анксиолитическим компонентом.

**Таблица 1 – Энергии докинга соединения L-17 в релевантные биомишени**

Обозначение биомишени	$\Delta E$ , Ккал/моль	$ \Delta E $ , Ккал/моль
5-HT3A	-6.6	6.6
SERT	-8.1	8.1
CHRM1	-8.3	8.3
DRD1	-8.1	8.1
DRD2	-7.9	7.9
DAT	-7.8	7.8
ADRA1	-7.4	7.4
NET	-8.0	8.0
GABA-A_GABA	-6.1	6.1
GABA-A_Benz	-6.3	6.3
GAT1	-7.4	7.4
JAK3	-8.0	8.0
CAPN1	-6.5	6.5
CFD	-6.0	6.0

*Примечание:  $\Delta E$ —энергия связывания; 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha 1$ -адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha 1$ -субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta 2$ -субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma 2$ -субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

Сравнение энергии докинга показало, что, аффинитет соединения L-17 уступает аффинитету референсных соединений в отношении почти всех мишеней, вследствие чего его действие на рассматриваемые белки-мишени должно носить

более мягкий характер. Наименьшая относительная аффинность наблюдается для комплементарного фактора D, а наибольшая – для  $\alpha$ -адренорецептора A1 (таблица 2). Для большинства биомишеней она близка к единице.

**Таблица 2 – Относительная аффинность к релевантным биомишеням соединения L-17 при сравнении с референсными соединениями**

Обозначение биомишени	pK L17	Референс	pK Refs	Aff, pKL17/ pKRef
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
GABAA_GABA	4.45	Прогабид	4.96	0.90
GABAA_Benz	4.59	Диазепам	5.25	0.88
GAT1	5.39	Тиагабин	5.76	0.94
JAК3	5.83	Тофацитиниб	6.12	0.95
CAPN1	4.74	CHEMBL1240873	4.96	0.96
CFD	4.37	CHEMBL2180765	6.7	0.65

*Примечание: pK — константа диссоциации; 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAК3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

При сравнении с сульпиридом (таблица 3), относительная аффинность соединения L-17 для всех белков-мишеней близка к единице. По спектру аффинности в отношении рассматриваемых биомишеней эти два соединения достаточно похожи, максимальная разница между значениями *Aff* составляет 0.11.

Было показано, что соединение L-17 является мягко действующим мультитаргетным фармакологически активным соединением, сопоставимым по характеру действия с сульпиридом.

**Таблица 3 – Относительная аффинность к релевантным биомишеням 2 соединения L-17, в сравнении с сульпиридом**

Биомишень	pK L17	pK Sulp	Aff, pKL17/ pKSulp
5-HT3A	4.81	5.03	0.96
SERT	5.90	5.90	1.00
CHRM1	6.05	6.12	0.99
DRD1	5.90	6.05	0.98
DRD2	5.76	5.98	0.96
DAT	5.69	5.32	1.07
ADRA1	5.39	5.03	1.07
NET	5.83	5.61	1.04
GABA-A_GABA	4.45	4.59	0.97
GABA-A_Benz	4.59	4.74	0.97
GAT1	5.39	5.32	1.01
JAK3	5.83	5.69	1.03
CAPN1	4.74	4.88	0.97
CFD	4.37	4.52	0.97

*Примечание: pKL17 - относительная аффинность L-17 к биомишеням; pKSulp - относительная аффинность сульпирида к биомишеням; 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; 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; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

В рамках второго логического этапа исследования *in silico*, 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 ним, в которую вошло отобранные 40 соединений, для которых QL-модифицированный коэффициент

сходства Танимото был не менее 0.8. Для найденных производных были построены оптимальные конформации методами молекулярной механики и проведен докинг в специфические сайты релевантных белков-мишеней с помощью программ PyRx 0.8 и AutoDock Vina 1.1.1.

В соответствии с совокупностью экспериментальных фармакологических эффектов 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.

Результаты анализа общей сензитивности и вклада входных нейронов в сигнал выходного нейрона нейросетевой модели для серотонинового транспортера SERT приведены в *таблице 4*.

Согласно полученным данным, 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 4*).

Таким образом, на активность SERT в контексте связывания с ним вещества 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид практически не влияет взаимодействие 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид с серотониновым рецептором 5-HT<sub>3A</sub>, α-адренорецептором A<sub>1</sub> и с дофаминовым рецептором DRD1.

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. 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.

**Таблица 4 – Результаты анализа общей сензитивности нейронов нейросетевой модели для SERT мультитаргетного механизма действия соединения L-17**

Входной нейрон	Сензитивность, относительные единицы.	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	55.5
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-HT3A	1.53	3.7	94.0
ADRA1A	1.42	3.4	97.4
DRD1	1.10	2.6	100.0

*Примечание: 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*



Результаты анализа общей сензитивности и вклада входных нейронов в сигнал выходного нейрона нейросетевой модели для NET приведены в *таблице 5*.

В соответствии с полученными результатами (*таблица 5*), в случае NET сколько-нибудь выраженное влияние активности отдельных биомишеней на активность норадреналинового транспортера отсутствует, так как показатели чувствительности всех нейронов близки к единице.

**Таблица 5 - Результаты анализа общей сензитивности нейронов нейросетевой модели для NET мультитаргетного механизма действия соединения L-17**

Входной нейрон	Сензитивность, относительные единицы	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

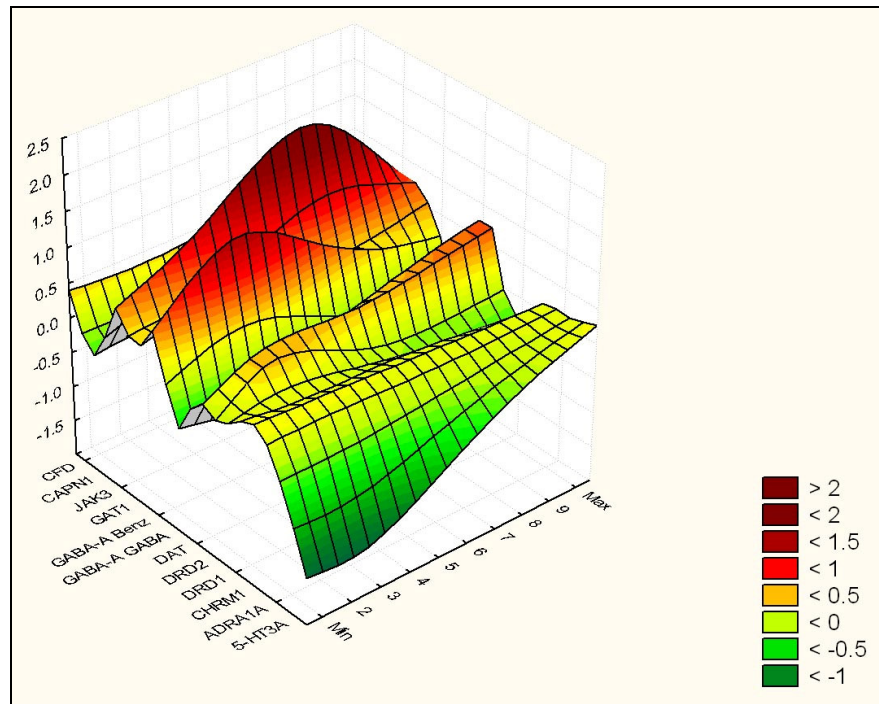
*Примечание: 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

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 чувствительность показал входной нейрон M1-холинорецептора CHRМ1, 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 биомишеней здесь не наблюдается.

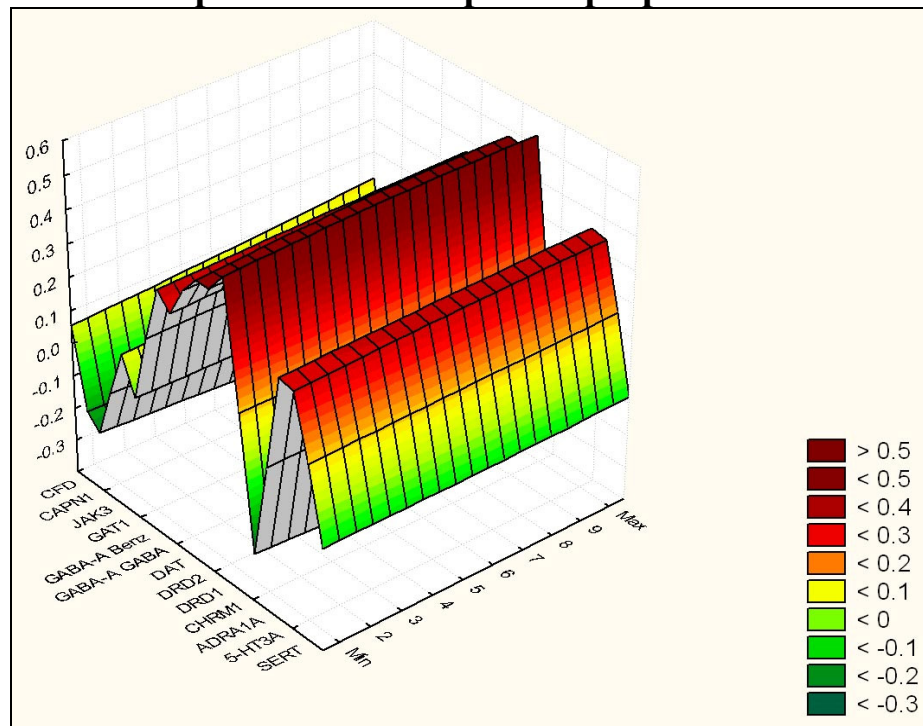
С целью уточнения характера выявленных закономерностей был проведен пошаговый анализ чувствительности входных нейронов моделей для SERT и NET. По итогам пошагового анализа чувствительности подтвердилось значительное влияние на активность SERT киназы JAK3 и ГАМК-А рецептора (бензодиазепиновый сайт). Выявлены 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.

Впоследствии, результаты ландшафтного анализа, подтвердили 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, в то время как для модели NET целевая биомишень имеет постоянную чувствительность, которая не зависит от степени активации других биомишеней.

Ландшафты показателей пошагового анализа чувствительности входных нейронов нейросетевых моделей для SERT и NET представлены на рисунках 1 и 2.



**Рисунок 1 – Ландшафт показателей пошагового анализа чувствительности всех входных нейронов нейросетевой модели действия соединения L-17 для серотонинового транспортера**



**Рисунок 2 – Ландшафт показателей пошагового анализа чувствительности всех входных нейронов нейросетевой модели действия соединения L-17 для норадреналинового транспортера**

В результате обобщения всех данных *in silico* анализа мультитаргетного механизма действия соединения L-17 (таблицы 6 и 7) было выявлено семь наиболее важных биомишеней, определяющих его фармакологические эффекты: серотониновый транспортер SERT, норадреналиновый транспортер NET, тирозин-киназа JAK3, M1-холинорецептор CHRМ1, дофаминовые рецепторы DRD1 и DRD2, дофаминовый транспортер DAT.

**Таблица 6 – Мультитаргетный механизм действия соединения L-17 на серотониновый транспортер**

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

*Примечание: +++—сильное влияние; ++—умеренное; +— слабое; - – отсутствие влияния. Оценка влияния проводилась без учета его направленности: сильное отрицательное влияние также обозначалось «+++»; 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRМ1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

Исходя из полученных результатов анализа *in silico*, можно сделать вывод о том, что вещество L-17 является мягко действующим мультитаргетным

атипичным антидепрессантом и атипичным нейролептиком, сопоставимым по характеру действия с сульпиридом.

**Таблица 7 – Мультитаргетный механизм 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			+		

*Примечание: +++—сильное влияние; ++—умеренное; +— слабое; - – отсутствие влияния. Оценка влияния проводилась без учета его направленности: сильное отрицательное влияние также обозначалось «+++»; 5-HT3A - серотониновый рецептор типа 3A; SERT - серотониновый транспортер; CHRM1 - мускариновый холинорецептор типа 1, DRD1 - дофаминовый рецептор типа 1; DRD2 - дофаминовый рецептор типа 2; DAT - дофаминовый транспортер; ADRA1A -  $\alpha$ 1-адренорецептор; NET - норадреналиновый транспортер; GABRA1 -  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRB2 -  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GABRG2 -  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора; GAT1 - ГАМК-транспортер типа 1; JAK3 - янус-тирозин киназа типа 3; CAPN1 - кальпаин 1; CFD - комплементарный фактор D (адипсин).*

В свою очередь, по данным литературы, препараты, действующие на допаминергическую систему (включая сульпирид), оказывают эффект как при остром стрессе, так и при экспериментальном ИМ. При иммобилизационном стрессе у экспериментальных животных 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 [Puri S., 1994; Benell A., et al., 2000; Rasheed N., et al., 2010].

При ИБС и ИМ, согласно S. Tagliavini, 1992, введение сульпирида дозозависимо снижает размеры формирующегося инфаркта и летальность экспериментальных животных на ранних сроках эксперимента. Введение сульпирида в рамках комплексной терапии кардиологического синдрома Х оказывает благоприятное воздействие, а, согласно С.Р. Абсеитовой, 2009, на фоне терапии сульпиридом у больных с ИМ отмечается 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.

Таким образом, исходя из данных вышеприведенных исследований и наличия сходства сульпирида и соединения L-17 по данным анализа спектров аффинности, можно предположить, что введение последнего будет снижать выраженность стрессорной реакции и улучшать течение стрессорной ишемии и ИМ.

**Влияние соединения L-17 на течение экспериментального иммобилизационного стресса.** Вышеприведенные данные послужили основой для проведения исследования *in vivo* на лабораторных животных с применением экспериментальных моделей иммобилизационного стресса и ИМ. В свою очередь, именно при сердечно-сосудистых заболеваниях стресс чаще всего играет одну из основных ролей в развитии различных патологических процессов, оказывающих вредоносное воздействие на организм [Esch T., et al., 2002; Steptoe A., 2012], а выделение сердца как основного объекта поражения при стрессе описано в литературе [Судаков К.В., 1981; Виноградов В.В., 2007]; при том, что подтверждением наличия подобного поражения сердца в проведённом исследовании являлось достоверное повышение уровня АСТ при иммобилизационном стрессе, превышающее значения контрольной группы и не

отличающееся от уровней 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).

Гематологическое исследование выявило достоверное уменьшение числа клеток Mid (смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов) у животных опытной группы (на фоне введения соединения L-17) по сравнению как с показателями интактной группы, так и с показателями контрольной группы. Подобное 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. 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 [Grailer J., 2013].

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.

Учитывая, что одной из основных причин гипoinsулинемии при иммобилизационном стрессе является дегенерация и апоптоз бета-клеток в островках Лангерганса [Mona A.A., 2012], было проведено исследование влияния соединения L-17 на изменение средней площади панкреатических островков и плотности распределения инсулинпродуцирующих клеток при иммобилизационном стрессе. 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 животных интактной группы. Этот факт соответствовал данным о том, что в первые сутки после начала стресса никаких существенных изменений в островках

поджелудочной железы не наблюдается [Zardooz H., 2012]. 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 при стрессе, как увеличение островкового аппарата, так и увеличение выхода инсулина начинается лишь с 15 суток после начала развития стресса [Zardooz H., 2012]. Это позволяет судить о том, введение соединения L-17 уменьшает отрицательное воздействие стресса на систему производства инсулина в поджелудочной железе.

Учитывая способность стрессорного действия кортикостероидов даже при относительно низких дозах сокращать численность тимоцитов [Ghoneum M.H., 1986], уменьшать число зародышевых центров, а при высоких дозах — уничтожать все тимоциты и ретикулярные клетки [Ghoneum M.H., 1986, Selye H., 1937], было проведено сравнение изменений тимуса при иммобилизационном стрессе на фоне введения соединения L-17 и без него. Установлено, что у животных контрольной группы иммобилизационный стресс вызывает через 2 суток от начала эксперимента уменьшение объема лимфоидной ткани и оголение стромы на фоне выраженного отека, что свидетельствует об угнетении процессов лимфопоэза и подтверждало тяжесть вызываемого стресса. В то же время введение соединения L-17 предотвращает опустошение тимуса и усиливает в нём процесс лимфопоэза.

Таким образом, в ходе исследования зафиксировано благоприятное действие соединения L-17 на течение стрессорной реакции, которое проявляется 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) [Puri S., et al., 1994; Benelli A., et al., 2000; Desai J.K., Parmar, N.S., 1994; Rasheed N., et al., 2010].

**Влияние соединения L-17 на течение экспериментального инфаркта миокарда.** Моделирование ИМ осуществлялось в соответствии с модификацией



лигационной модели (Патент 2407062. РФ). Оценка влияния соединения L-17 осуществлялась на основе данных гистологического, биохимического и иммуногистохимического исследований.

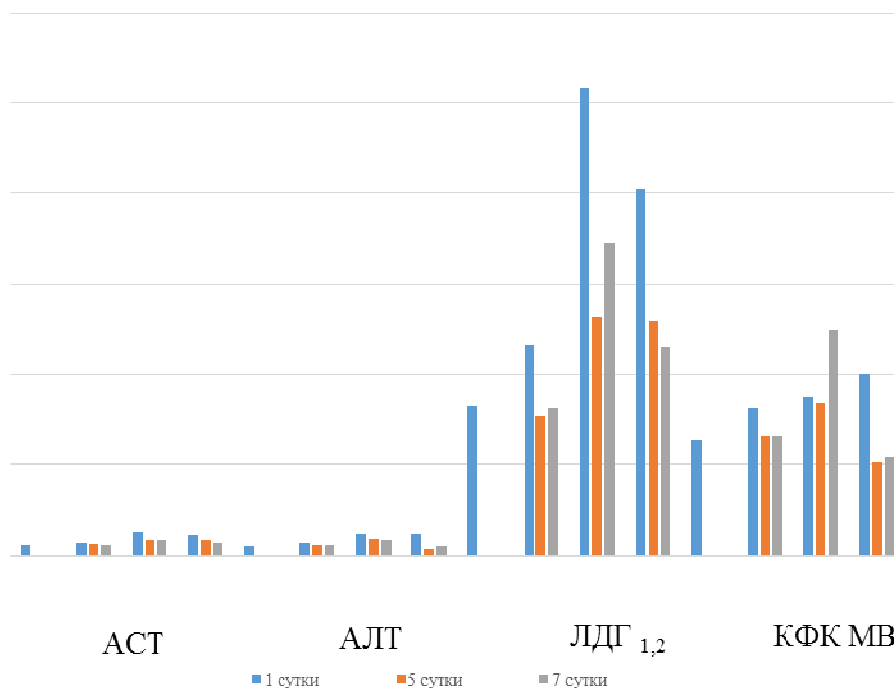
Согласно данным гистологического исследования на фоне введения соединения L-17 уже на первые сутки ИМ наблюдались существенные изменения в ходе течения патологического процесса. Так, в то время как у животных контрольной группы (животные с ИМ) развивался трансмуральный ИМ, типичный для данного вида [Cooper C.J., 1995], при котором наблюдалась гибель кардиомиоцитов во всех слоях сердца: эпикарде, миокарде и эндокарде, то у животных опытной группы ИМ располагался только субэпикардially, не охватывая все слои сердца.

Принципиально отличалась и гистологическая картина зоны инфаркта на фоне введения соединения L-17: 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 выявлялась 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, при ИМ признаки формирования грануляционной ткани выявляются только на седьмые сутки и то лишь в структурах, прилежащих к зоне некротизированных кардиомиоцитов, а на фоне введения 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. Наблюдаемое уменьшение количества нейтрофилов может обуславливать уменьшение глубины поражения и интенсивности воспалительной реакции при экспериментальном ИМ [Litt M.R., et al., 1989].

На фоне введения соединения L-17 наблюдалось раннее поступление в повреждённые ткани одноядерных клеток (макрофагов и лимфоцитов), необходимых для эффективного разрешения воспаления [Serhan C.N., et al., 2007]; в том числе и за счет поглощения апоптированных и некротизированных клеток, и активации фибробластов, что способствует формированию грануляционной ткани и неоангиогенезу [Dobaczewski M., et al., 2010].

Таким образом, наблюдаемая гистологическая картина свидетельствует о том, что введение соединения L-17 при 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 (*рисунок 3*) показало, что на протяжении всего времени 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.



**Рисунок 3 – Активность тканеспецифичных ферментов (U/l) в крови экспериментальных животных**

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 [А.И. Грицюк, 1985], то ее повторное повышение в контрольной группе может быть расценено, как рецидивирование ИМ [Сыркин А.Л., 1998].

Помимо рутинного определения активности ферментов в плазме крови, проводилось определение их активности в гомогенате миокарда. Исследование проводилось на 1, 7 и 14 сутки. Сравнение активности ЛДГ 1,2 и КФК в крови и в гомогенате миокарда выявило принципиальные различия между животными опытной и контрольной групп. В первые сутки в обеих группах наблюдаемое снижение активности ЛДГ 1,2 в гомогенате совпадало с повышением ее в крови, что типично для начала ИМ. На седьмые сутки 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 соответствовало низким показателям фермента в гомогенате миокарда, что подтверждало рецидивирование ИМ. Аналогичные изменения на седьмые сутки эксперимента 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.

Так как клиническая значимость гиперцитокинемии при ИМ не вызывает сомнения, поскольку от ее выраженности зависит как величина формирующегося ИМ, так и вероятность возникновения осложнений [Лапшина Л.А., и др., 2005; Танчу Ч.Ж.К., 2003], было проведено определение основных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов: TNF, IL-1, IL-6 и IL-10. Установлено, что через 24 часа у животных контрольной группы (с экспериментальным ИМ) уровни интерлейкинов превышали норму для IL-1 в 8 раз, TNF – в 7,8 раз, IL-6 – в 2,5 раза, 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 интерлейкинов 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.

Учитывая возможность развития системного воспаления при ИМ и 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 и др., 2008. Проведённые расчёты показали, что у животных контрольной группы КР достигал 11, что соответствовало 4 уровню реактивности, являющемуся «зоной прогноза» критических осложнений, при которой может начинаться развитие системного воспаления, когда TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 начинают активно продуцироваться не только кардиомиоцитами, но и клетками эндотелия, что и приводит к развитию критических осложнений [Гусев Е.Ю., и др., 2008]. При этом на фоне введения соединения L-17 КР достигал только 9, что соответствовало 3 уровню, типичному для гиперреактивной формы классического воспаления, и не отличалось от показателей ложнооперированных животных.

Исходя из вышеизложенного, одним из основных эффектов введения соединения L-17 является отсутствие рецидивирования ИМ, что подтверждается данными биохимического и гистологического исследований. 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 1 сутки, выполняющих триггерную роль для процессов внутрисосудистого свертывания [Ерьюхин И.А., Шляпников С.А., 1997; Витковский Ю.А., 1999]. Именно гиперцитокинемия способна вызывать дозозависимую вазоконстрикцию А2-А4 артериол [Baudry N., et al., 1996], стимулировать локальный нейтрофилёз и агрегацию тромбоцитов [Bar J., et al., 1997], а также активизировать прокоагулянтные и протромботические процессы на эндотелиальных клетках [A. Hot, et al., 2012].

Снижение размеров некроза при экспериментальном ИМ, косвенно оцененное по активности АСТ, позволяет предположить возможность изменения активности апоптоза кардиомиоцитов. В последующем, проведённое исследование показало, что на фоне введения соединения L-17 уровень апоптоза, активируемого по внешнему пути (по данным определения CD 95) был достоверно выше, чем у животных контрольной группы на всем протяжении эксперимента, а уровень апоптической гибели клеток, активируемой по внутреннему пути (по данным определения P53) – выше на 7 сутки исследования. Более высокие показатели активности апоптоза на фоне введения соединения L-17, по сравнению с показателями контрольной группы, соответствовали достоверно более низким показателям АСТ, что свидетельствует о том, введение исследуемого соединения приводит к уменьшению гибели клеток путем некроза.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

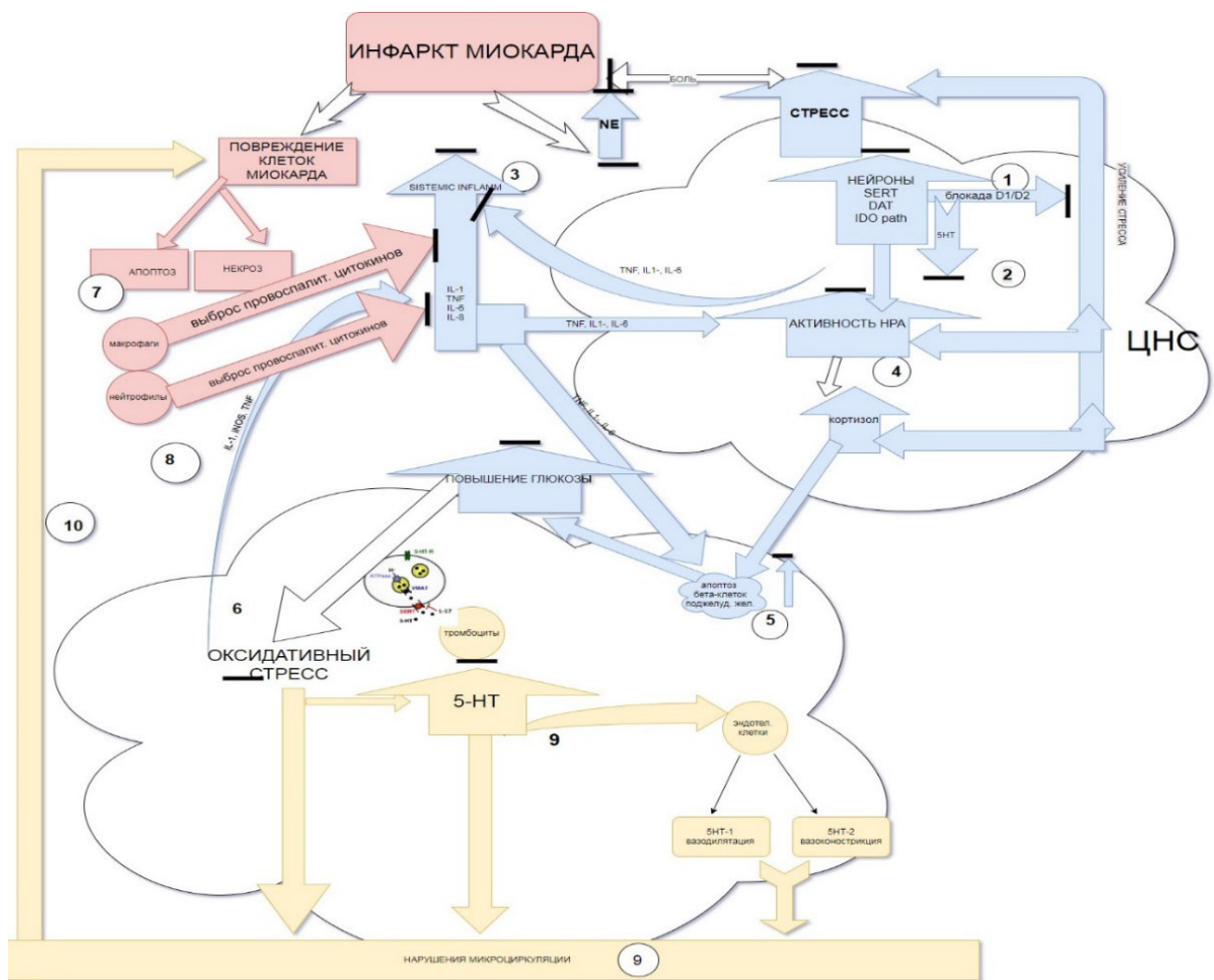
Выявленные кардиопротективные эффекты соединения L-17 объясняются особенностями мультитаргетности его действия: способностью взаимодействовать с различного видами рецепторов и белками-транспортерами дофаминергической, серотонинергической, и ацетилхолинергической систем. А так как активность данных систем оказывают существенный вклад в патогенез ИМ, то комплексное воздействие на них приводит к существенным изменениям в ходе патологического процесса и определяет возникновение описанных кардиопротективных эффектов.

Мультитаргетность действия исследуемого соединения проявляется как в виде воздействия на проявления стрессорной реакции, так и на течение ИМ (рисунок 4).

На фоне введения соединения L-17 происходит увеличение стресс-резистивности нейронов (действие через D2 рецепторы) [Chen S., et al, 2008], и

снижение уровня стрессорной цитокинемии (с критических, по Е. Гусеву, значений, характерных для развившегося ИМ) [Гусев Е.Ю., 2008], что опосредуется через SERT [Hannestad J., et al., 2011] и центральные M1 рецепторы [Bernik T.R., et al., 2002]; и сопровождается снижением стрессорного гормонального ответа вследствие блокады M1 рецепторов [Rhodes, et al., 2008], стресс-опосредованного снижения производства инсулина в поджелудочной железе и развития стрессорной гипергликемии за счет действия на дофаминовую систему [Puri S., 1994.; Benelli A., et al., 2000]. Снижение же реакции периферических органов (тимус, надпочечники) при стрессе происходит за счет действия через NET, M1 и D2 рецепторы [Sarkar C., et al., 2006; Nomura J., et al., 2003]. В миокарде исследуемое соединение, действуя через D рецепторы, усиливает процессы апоптоза и увеличивает макрофагальную инфильтрацию [Gottmann U., 2007], снижая выброс последними и лимфоцитами провоспалительных цитокинов. Блокада мускариновых рецепторов ведет к подавлению интенсивности местного воспалительного процесса за счет ингибирования хемотаксиса и миграции лейкоцитов [Alagha, K., et al., 2014], тем самым снижая лейкоцитарную инфильтрацию и повреждение тканей [Razani-Boroujerdi S., et al., 2008]. Синергический эффект блокады серотонинергической [Maurer-Spurej E., 2005; Schlienger R.G., Meier C.R., 2003] и адренергической [de Clerck D., 1987] систем на активацию и агрегацию тромбоцитов, вкупе с блокадой холинорецепторов [B. Charles, C.V. Treasure, et al., 1990], позволяет 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 отмечается картина, которая характеризуется меньшей выраженностью цитокинемии и стрессорного повышения глюкозы, более слабо выраженной инволюцией органов-мишеней, в миокарде – меньшими размерами ИМ [Tagliavini S., et al., 1992] и снижением частоты его рецидивирования на фоне смены типа воспаления на продуктивное. В итоге, проведенное исследование доказало способность соединения L-17 оказывать кардиопротективное действие при ИМ, что проявлялось в виде снижения его размеров (формировании только субэпикардального инфаркта) и предотвращении рецидивирования за счет воздействия на выраженность стрессорной реакции, вызываемой патологическим процессом.

Результаты исследования действия соединения L-17 с выраженной SERT, NET и D1/D2-ингибирующей активностью, проявляющего на моделях *in vivo* выраженные противоишемические и антистрессорные свойства, делают перспективным его использование в качестве основы при создании нового кардиопротекторного средства для ограничения ишемического повреждения миокарда и профилактики осложнений.



**Рисунок 4 – 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 гипофизарно-адреналовой 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.*

## 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,  $\alpha$ -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  $1\text{мм}^2$  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 тканеспецифичных ферментов (АСТ, АЛТ, ЛДГ1,2 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-а 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-тиадазин гидробромида (соединение L-17) при лечении ишемического повреждении миокарда позволяет рекомендовать его для лечения различного рода ишемических повреждений, таких, как нарушение мозгового кровообращения.

2. Способность соединения L-17 из группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов препятствовать развитию трансмурального ИМ и ускорять регенерацию миокарда делает целесообразным проведение полномасштабных исследований и направленного синтеза химических соединений группы замещённых 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в электронных базах данных Scopus и Web of Science

1. 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 (ИФ РИНЦ – 0,156).

2. Сарапульцев, П.А. Стресс и иммунная система / П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев* // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13, № 4. С. 5-10. (ИФ РИНЦ – 0,0317).

3. Влияние соединения из группы замещенных 5R1,6R2-1,3,4-тиадиазин-2-аминов на течение системного воспаления / П.А. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, *А.П. Сарапульцев*, М.А. Ранцев, С.Ю. Медведева, Л.П. Сидорова, И.Г. Данилова // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 13, № 3. С. 40-44 (ИФ РИНЦ – 0,317).

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 (ИФ РИНЦ – 0,317).

5. 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 (ИФ РИНЦ – 0,176).

6. 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. Т. 12, № 7. e0180739 (IF WoS 2.806).

7. Pharmacologic Evaluation of Antidepressant Activity and Synthesis of 2-Morpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine Hydrobromide / *A.P. Sarapultsev*,

O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, L.P. Sidorova, T.A. Tseitler // *Pharmaceuticals*. 2016. T.2, № 9. C. 27 (WoS, Scopus).

8. 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. C. 698-718 (IF WoS 6.189).

9. 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. C. 43-53 (IF WoS 2.391).

10. 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. C. 147-151 (Scopus).

11. 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. T. 25, № 2. C. 440-449. (IF WoS 2.956).

12. 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. T. 20, № 12. C. 1980-1986 (IF WoS 2.611).

13. 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. T. 93, № 1. C. 18-23 (IF WoS 1.78).

**Тезисы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ**

14. Влияние препарата 117 на изменение физиологии воспалительной реакции при экспериментальном инфаркте миокарда / **А.П. Сарapultцев**, О.Н. Чупахин, П.А. Сарapultцев, 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).

15. 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 (прил.). С. 938.5 (IF WoS 5.498)

16. 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 (прил.). С. 781-5. (IF WoS 5.498).

17. 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 (прил.). С. 1054-1057 (IF WoS 5.498).

18. 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. Т. 28, № 1 (прил.). С. 832-10. (IF WoS 5.498).

19. 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. Т. 27, № 1 (прил.). С. 650-654. ( IF WoS 5.498).

#### **Патенты на изобретение**

20. Патент 2437163. Российская Федерация, МПК G09В 23/28, А 61К 31/502, А 61Р 9/10. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев*, И.Г. Данилова; заявитель и патентообладатель Учреждение РАН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, А.П. Сарапульцев, И.Г. Данилова – N 2010112007/14; заявл. 29.03.2010; опубл. 20.12.2011 // Бюл. 2012. N 35. – 6 с.

21. Патент 2437165. Российская Федерация, МПК G09В 23/28, А 61К 31/502, А 61Р 9/10. Способ лечения иммунокорректорами инфаркта миокарда у крыс / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, *А.П. Сарапульцев*, И.Г. Данилова; заявитель и патентообладатель Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, М.А. Ранцев, П.А.

Сарапульцев, А.П. Сарапульцев, И.Г. Данилова – N 2010114905/14; заявл. 13.04.2010; опубл. 20.12.2011 // Бюл. 2011. N 35. – 6 с.

22. Патент 2395850. Российская Федерация, МПК G09B 23/28, A 61K 31/135, A 61P 9/10. Способ лечения экспериментального инфаркта миокарда у крыс / П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев, **А.П. Сарапульцев**, О.Н. Чупахин, С.Ю. Медведева, Л.П. Сидорова; заявитель и патентообладатель П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев, А.П. Сарапульцев, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН – N 2008125545/14; заявл. 23.06.2008; опубл. 27.07.2010 // Бюл. 2010. N 21. – 6 с.

#### **Публикации в других изданиях**

23. Оценка нейрореплетического/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 // Человек и лекарство : материалы XXIII Рос. национал. конгресса. Москва, 2016. С. 201.

24. 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.

25. 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 // Человек и лекарство : материалы XXII Рос. национал. конгресса. Москва, 2015. С. 225.

26. Сарапульцев А.П. Модуляция активности апоптотических процессов при экспериментальном инфаркте миокарда иммуномодуляторами разных химических групп / **А.П. Сарапульцев**, П.А. Сарапульцев // Кардиология на перекрестке наук : материалы VI Междунар. конгресса совместно с X Междунар. симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому ультразвуку, XXII ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2015. С. 136-137.

27. **Сарапульцев А.П.** Предотвращение развития синдрома no-reflow под действием соединения 117 группы замещенных тиadiaзинов при экспериментальном инфаркте миокарда / А.П. Сарапульцев, П.А. Сарапульцев // Кардиология на перекрестке наук : материалы VI Междунар. конгресса совместно с X Междунар.

симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому ультразвуку, XXII ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2015. С. 137-138.

28. 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** // Кардиология на перекрестке наук : материалы Международного конгресса совместно с V Междунар. симпозиумом по эхокардиографии и сосудистому ультразвуку, XVII ежегод. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы кардиологии». Тюмень, 2010. С. 235-236.

29. Воздействие на воспалительный компонент инфаркта миокарда с помощью соединения из группы тиаминов / О.Н. Чупахин, П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев, М.А. Ранцев, **А.П. Сарапульцев** // Молекулярная медицина и биобезопасность : сб. науч.-практ. ст., посв. V междунар. конф. Москва, 2008. С. 91-92.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5-HT<sub>3A</sub> – серотониновый рецептор типа 3A  
 ADRA<sub>1A</sub> – α<sub>1</sub>-адренорецептор  
 Aff – аффинность  
 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).

CHRМ1 – мускариновый холинорецептор типа 1  
 DAT – дофаминовый транспортер  
 DRD1 – дофаминовый рецептор типа 1  
 DRD2 – дофаминовый рецептор типа 2  
 GABRA1 –  $\alpha$ 1-субъединица ГАМК-А рецептора  
 GABRB2 –  $\beta$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора  
 GABRG2 –  $\gamma$ 2-субъединица ГАМК-А рецептора  
 GAT1 – ГАМК-транспортер типа 1  
 Grn – 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 – тромбокрит  
 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  
 АЛТ – аланинаминотрансфераза  
 АСТ – аспаратаминотрансфераза  
 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

**САРАПУЛЬЦЕВ  
АЛЕКСЕЙ ПЕТРОВИЧ**

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

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук