**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА**

**«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»**

**НАГОРНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК: 616.12-008.311.1:616-092.41

-085.615.225.2.615.036.6

**КАРДІО- ТА ЕНДОТЕЛІОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ**

**ПОХІДНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛУ**

Спеціальність 14.03.05 – фармакологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора медичних наук

**Київ – 2018**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі фармакологіїНаціонального медичного університету імені О.О.Богомольця МОЗ України

|  |  |
| --- | --- |
| **Науковий консультант** | доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАН і НАМН України **Чекман Іван Сергійович**, ПВНЗ «Київський медичний університет», професор кафедри фармакології, патофізіології, клінічної фармакології і клінічної фармації, технології ліків |
| **Офіційні опоненти:** | доктор медичних наук**Серединська Наталія Миколаївна,** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», завідуюча відділом фармакології |
|  | доктор медичних наук, професор **Степанюк Георгій Іванович,** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова професор кафедри фармакології |
|  | доктор медичних наук, професор **Супрун Еліна Владиславівна,** Національний фармацевтичний університет, Інститут підвищення кваліфікації фахівців фармації, професор кафедри загальної фармації безпеки ліків |

Захист відбудеться “ 09 “ жовтня 2018 р. об 1100 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при Державній установі «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за адресою: 03057 м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут фармакології та токсикології НАМН України (03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14).

Автореферат розісланий « \_\_\_\_\_ » вересня 2018 р.

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,**

**кандидат біологічних наук І.В. Данова**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Обґрунтування вибору теми дослідження.**Серцево-судинні захворювання – артеріальна гіпертензія (АГ), ішемічна хвороба серця (ІХС), хронічна серцева недостатність (ХСН) – посідають перше місце серед причин смертності, інвалідності, непрацездатності населення [В.Н. Коваленко, 2016; Ю.М. Сіренко, 2016].

В основі патогенезу серцево-судинних захворювань провідна роль відводиться ендотеліальній судинній дисфункції (ЕД), фармакологічна корекція якої при серцево-судинній патології є наразі одним з найбільш перспективних наукових напрямків. Сучасна медицина визнає ендотелій найважливішим органом, що грає ключову роль в регуляції гомеостазу,судинного тонусу і його структури. Клітини ендотелію синтезують і секретують значний спектр біологічно активних речовин, які є потужними вазоконстрикторами і вазодилятаторами, беруть участь у процесах запалення, тромбоутворення, проліферації та ремоделювання судинної стінки, що в свою чергу, значно впливає на прогресування серцево-судинної патології [Н.И. Булаева, 2013; Я.К. Радзішевська, 2015].

Головними аспектами, що лежать в основі ЕД є зниження утворення і біодоступності оксиду азоту,який вважають сигнальним фактором вазорелаксуючої системи [Х.М.Марков, 2011; А.И.Соловьев, А.С.Хромов, 2018; A. Sharma, 2016].

Дисфункція ендотелію проявляється дисбалансом між вазоконстрикторними та вазодилятуючими речовинами, що забезпечують в нормі оптимальну функцію всіх ендотелійзалежних структур. Порушення продукції, взаємодії, руйнування ендотеліальних вазодилятуючих факторів спостерігаються одночасно з аномальною судинною реактивністю, змінами в структурі і рості судин при їх патологіях. Вивчення стану ендотеліальної стінки, пошук засобів корекціїдля відновлення ендотеліальної функції за серцево-судинною патологією є наразі одним з найбільш актуальних завдань фармакології.

Для лікування захворювань серцево-судинної системи застосовують препарати різної хімічної структури та механізму дії: бета-адреноблокатори, інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту, антагоністи кальцію, блокатори ангіотензинових рецепторів, діуретики, метаболітотропні препарати. [Г.В. Дзяк, 2011; І.С. Чекман, 2011; М.И. Лутай, 2011].У інгібіторів АПФ та блокаторів рецепторів ангіотензину ІІ, поряд з різними аспектами антигіпертензивної дії, встановлений непрямий ендотеліопротекторний ефект. Завдяки застосуванню цих лікарських засобів підвищилась ефективність фармакотерапії АГ. Але досягти фізіологічного рівня артеріального тиску у хворих на АГ не завжди можливо. Крім цього, антигіпертензивні препарати виявляють побічні ефекти[Г.В. Дзяк, 2011; І.С. Чекман, 2017].

Майбутнє за препаратами, які володіють не лише кардіопротекторним ефектом, але й опосередкованим позитивним впливом на ендотеліальну функцію судин [И.С.Чекман,2016]. Пошук засобів спрямованого лікування ЕД, що може бути патобіохімічною мішенню впливу коригуючих лікарських засобів [Reina N.J.G., 2017], і створення нового класу фармакологічних препаратів – ендотеліопротекторів – є важливим клініко-експериментальним завданням. Тому, об’єднуючою для проведення дисертаційного випробування стала концепція про ендотелій як мішень для профілактики та лікування патологічних процесів серцево-судинної системи, що призводять до ІХС, ХСН, АГ.

У теоретичному плані ще не з’ясована роль порушень при вищезазначених станах окремих лімітуючих ланок метаболізму: енергетичного обміну, обміну оксиду азоту, показників тіол-дисульфідної системи, факторів росту ендотелію, прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та компенсаторних метаболічних шляхів, а також молекулярних механізмів їх регуляції у формуванні ішемічного пошкодження міокарда та ефективність ендогенної кардіоміопротекції. Проведення цілеспрямованої кардіо- та ендотеліопротекції можливо тільки після дослідження змін цих показників та з’ясування ролі ендотелію в патогенезі вищезазначених захворювань, що дасть можливість проведення цілеспрямованої фармакологічної корекції. На сьогодні мало відомо про позитивний вплив на функціональний стан ендотелію препаратів різних фармакологічних груп, що належать до засобів первинної та вторинної кардіопротекції. Тому, значну цінність являють собою дані про вплив різних метаболітотропних засобів на функціональні характеристики ендотелію [Н.О.Горчакова,2017; В.В.Дунаев, В.С. Тишкин, 2003; И.А.Мазур, И.Ф. Беленичев, 2017].Зважаючина роль оксиду азоту, а також речовин, пов’язаних з його обміном, в підтримці функції ендотелію, особлива увага була приділена препарату «Тіотриазолін», який проявляє виражені антиоксидантні властивості, здатний регулювати   
АФК-залежні ланки клітинного метаболізму, проявляє протиішемічну, кардіопротекторну дії[І.А. Мазур, І.Ф. Бєленічев 2017;І.С. Чекман, Н.О. Горчакова, 2017; В.Д. Лукьянчук,2015]. Значний науково-практичний інтерес являють похідні амінокислоти L-лізину – яким властива нейропротекторна, протиішемічна, ноотропна та протисудомна дії[И.Ф. Беленичев, А.А. Егоров, 2009; И.Ф. Беленичев, И.В. Павлюк, 2018], мають можливість впливати на синтез L-карнітину та регулювати експресію eNOS[Л.А. Северьянова, 2007; J.A. Vita, 2011]. Базуючись на експериментальних даних про фармакологічні властивості тіотриазоліну, з метою створення препарату з більш високою кардіопротекторною активністю та наявністю нових ендотеліопротекторних властивостей в Запорізькому державному медичному університеті та НПО «Фарматрон» [И.А. Мазур, 2005; И.Ф. Беленичев, 2009] синтезовані нові молекули–похідні 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот, в т.ч. сполучення,до структури якого входять складові молекул тіотриазоліну та L- лізину – (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат,які являють зацікавленість в плані створення нових високоефективних та безпечних метаболітотропних кардіо- та ендотеліопротекторів зізначним впливом на метаболізм міокарда.

Дослідження фармакологічних властивостей нових похідних 1,2,4-триазолу є перспективними з позицій розробки засобів метаболітотропної кардіо- та ендотеліопротекції і оцінки їх ефективності при експериментальній патології серцево-судинної системи. Викладене визначає актуальність даного дослідження, його наукову новизну та практичну значимість.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**Дисертаційна робота є фрагментом наукових робот кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, що виконувалась за темами: «Експериментальне обгрунтування комбінованого застосування кардіотропних препаратів» (№ державної реєстрації 0111U009417) та «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей ендотеліопротекторних сполук» (№ держреєстрації 0115U004159). Робота також виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри фармакології та медичної рецептури за темою «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015рр.) та «HSP70/HIF-1a-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ.реєстрації 0117U000658; 2017-2020). Дисертант є співвиконавцем вищезазначених тем.

**Мета дослідження:** метою роботи було проведення первинного скринінгу за антиоксидантною, цитопротекторною активностямив ряду похідних 1,2,4-триазолу in vitro, визначення сполуки-лідера, вивченняїї кардіо- та ендотеліопротекторних властивостей, оцінкаїї ефективності на моделях патологічних станів серцево-судинної системи різного ґенезу та створення на її основі оригінального препарату.

**Завдання дослідження:**

1. Провести скринінг похідних 1,2,4-триазолу за антиоксидантною та цитопротекторною активностями in vitro та виявити сполуку-лідер.
2. Оцінити нешкідливість сполуки-лідерав гострому і хронічному експерименті.
3. Дослідити вплив сполуки-лідера на біохімічні і морфо-функціональні показники міокарда щурів за гострого інфаркту міокарда та на показники кардіо- та системної гемодинаміки кролів при гострій ішемії міокарда.
4. Вивчити вплив сполуки-лідерана показники кардіо- та системної гемодинаміки, на біохімічні та морфо-функціональні показники міокарда при хронічній серцевій недостатності.
5. Дослідити вплив сполуки-лідера, ірбесартану, квінаприлу та їх комбінацій на артеріальний тиск та біохімічні показники міокарда щурів зі спонтанною генетично зумовленою артеріальною гіпертензією (САГ).
6. Визначити параметри фармакокінетики таблеток і розчину ангіоліну.
7. Оцінити квантово-хімічні властивості сполуки-лідера.
8. Внаслідоканалізу та систематизації результатів обгрунтувати доцільність створення на основі сполуки-лідераоригінального препарату з кардіо- та ендотеліопротекторною дією для нормалізації функціонування серцево-судинної системи за умов патологічних станів різного генезу.

*Об’єкт дослідження.* Ендотеліальна дисфункція в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої ішемії міокарда, хронічної серцевої недостатності та спонтанної артеріальної гіпертензії.

*Предмет дослідження.*Ендотеліопротекторна, кардіопротекторна, протиішемічна дія найбільш активної сполуки серед 11 похідних 1,2,4-триазолу – (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої ішемії міокарду, хронічної серцевої недостатності та спонтанної артеріальної гіпертензії, профіль безпеки та фармакокінетичні характеристики.

*Методи дослідження.* Фармакологічні, токсикологічні, електрофізіологічні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, фармакокінетичні, квантово-хімічні, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** На підставі проведених фармакологічних, токсикологічних, електрофізіологічних, морфологічних, імуногістохімічних, фармакокінетичних, квантово-хімічних досліджень визначені патобіохімічні механізми розвитку ЕД, що стали підґрунтям для створення нового ендотеліопротектора прямої дії – ангіоліну.

Вперше, в дослідах in vitro серед похідних 1,2,4-триазолу визначена сполука-лідер–(S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін), яка за антиоксидантними та цитопротекторними властивостямиперевищує подібні в референс-препаратах. Вперше на моделях гострої і хронічної ішемії міокарда вивчені молекулярно-біохімічні механізми кардіо- та ендотеліопротекторної дії ангіоліну. Вперше показано, що механізм ендотеліопротекторної дії ангіоліну безпосередньо пов’язаний з підвищенням експресії VEGF, підвищенням біодоступності і подовженням часу «життя» NO, за рахунок нормалізації сполучених систем NO/SH, а також за рахунок підвищення щільності ендотеліоцитів і стимуляції їх проліферації. Вперше показано, що кардіопротекторні властивості ангіоліну пов’язані з активацією компенсаторного малат-аспартатного човникового механізму, нормалізацією NO/SH-механізмів регуляції ланок енергетичного метаболізму міокарда і антиоксидантного/прооксидантного гомеостазу, а також за рахунок зменшення загибелі кардіоміоцитів і поліпшенню загальної та кардіогемодинаміки. Показані принципові переваги ангіоліну перед бестселером метаболітотропної кардіопротекції мілдронатом.

Вперше вивчений фармакокінетичний профіль ангіоліну при внутрішньовенному та внутрішньошлунковому введенні. Продемонстрована його висока кардіотропність.

Вперше продемонстрований профіль безпеки ангіоліну. Доведено, що препарат відноситься до V класу токсичності, не має негативного впливу на органи і системи при тривалому парентеральному і внутрішньошлунковому введенні.

Показаний потенціюючий ефект ангіоліну при сумісному застосуванні з ірбесартаном і квінаприлом у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією щодо впливу на біохімічні показники (вміст аденілових нуклеотидів, маркери окислювальної модифікації білків, антиоксидантні ферменти, показники гліколізу, білки теплового шоку, компоненти системи оксиду азоту та тіол-дисульфідної системи).

В результаті квантово-хімічних розрахунків ангіоліну виявлені основні реакційні центри молекули, які можуть брати участь у комплексоутворенні. Аналіз квантово-хімічних параметрів молекули ангіоліну свідчить про те, що препарат може бути переносником NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси, що є одним із механізмів реалізації ендотеліопротекції.

Здійснено теоретичне та експериментальне обґрунтування доцільності призначення ангіоліну в моно- та комбінованій терапії ішемічної хвороби серця, хронічної серцевої недостатності та артеріальної гіпертензії.

**Практичне значення отриманих результатів.** Вперше на підставіотриманих результатів експериментальних досліджень розроблено концепцію фармакологічної корекції такого загрозливого предиктора серцево-судинної патології (АГ, ХС, ХСН) як ендотеліальна дисфункція, яка полягає в визначенніпріоритетних ланок-мішеней –сполучені системи NO/SH, біодоступність NO,регуляція експресії VEGF, а також у включенні в комплексну терапію даної патології препаратів, які впливають на ці ланки, зокрема ангіоліну. В результаті проведених досліджень НВО «Фарматрон» розроблені лікарські форми ангіоліну – 2,5% розчин для ін’єкцій та таблетки. На основі результатів досліджень складений звіт з доклінічних випробувань ангіоліну, який був представлений в ДЕЦ МОЗ України з метою отримання дозволу на клінічну апробацію нового лікарського засобу.

Отримання цього дозволу є підставою для перспективного випуску лікарського засобу під назвою «Ангіолін». За даними експериментальних досліджень отриманий дозвіл МОЗ Українина проведення I та II фази клінічних досліджень. Завершена I фаза клінічних досліджень.

Результати досліджень впроваджені в навчальний процес та науково-дослідну роботу на 9 кафедрах фармакології вищих медичних учбових закладів України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною науковою працею здобувача. Разом з науковим консультантом визначені тема, мета та об’єм роботи.

Автором самостійно сформульовані завдання, визначений напрямок і методичні підходи дослідження, проведений патентно-інформаційний пошук та робота з першоджерелами літератури.

Здобувач брала участь у відборі тварин, формуванні їх груп, введенні лікарських засобів, евтаназії, підготовці експериментів, дослідженні механізмів кардіо- та ендотеліопротекторних властивостей, дослідах по визначенню фізіологічних, біохімічних, морфологічних, фармакокінетичних, статистичних показників. Біохімічні та морфологічні дослідження проводилися за сприяння кафедри фармакології та медичної рецептури (зав. кафедри професор Бєленічев І.Ф.) та навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету (зав.професор Абрамов А.В.), в яких здобувач брала особисту участь. Проведений науковий аналіз отриманих результатів, сформульовані основні положення та висновки. У наукових працях, що опубліковані у співавторстві, роль здобувача є визначальною.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертаційна робота апробована на наукових конференціях та засіданнях кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Основні положення дисертації доповідалися та обговорювалися на:ХІІ з’їзді Всеукраїнського лікарського товариства ВУЛТ (м. Київ, 2013), ІІІ Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань у світлі доказової медицини» (м. Вінниця, 2013), науково-практичній конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків» (м. Тернопіль, 2013), Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій Всесвітньому дню здоров’я (м. Київ, 2014), ХХІ Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (м. Москва, 2014), XIV Національному конгресі кардіологів (м. Київ, 2014), ХІІІ Конгресі СФУЛТ (м. Чернівці, 2014), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (м. Вінниця, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії і фармакології» (м. Тернопіль, 2014), Конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування» (м. Київ, 2015), ІІІ Міжнародній конференції по серцю, мозку (м. Париж, 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам’ятіВ.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (м. Запоріжжя, 2016),І Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки–Людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 2017),науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми клінічної фармакології з позиції доказової медицини» (м. Тернопіль, 2017),Х Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров’я людини» (м. Свалява, 2017), V Національному з’їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 60 наукових праць, у тому числі 30 робіт у наукових фахових виданнях,2 монографії, 2 методичні рекомендації, 3 патенти України,23матеріали з’їздів, конференцій, конгресів.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота написана українською мовою, викладена на 346 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 7 розділів власних досліджень, обговорення результатів, а також висновків та списку використаних літературних джерел. У дисертаційній роботі наведено 67 таблиць, ілюстрована 11 рисунками.Список використаних джерел налічує 379 найменувань (224 – кирилицею, 155 – латиницею).

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи досліджень.** Досліди проведені на 85 кролях породи Шиншила обох статей масою (3,0-4,0) кг,отриманих з віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ; 495 щурах, з яких 440 білі щурі обох статей стадного розведення лінії Вістар масою (190-220) г, 55 щурах-самцях зі спонтанною артеріальною гіпертензією (САГ) масою 320 г (АТ – 180 мм рт. ст.), отриманих з віварію інституту фізіології ім. О.О. Богомольця; 150 білих мишах лінії С57BL/6, та СВА масою (18-22) г.

Робота з тваринами проводилась згідно з міжнародними вимогами про гуманне ставлення до тварин і з дотриманням вимог директив 86/609/ЕЕС з питань захисту тварин. Тварин утримували на стандартному раціоні за природної зміни дня і ночі. Доступ тварин до води був вільним. Усі маніпуляції, які можуть завдати болю, в тому числі декапітація, проведені під тіопентал-натрієвимнаркозом (40 мг/кг) [А.В. Стефанов, 2001]. Експериментальні дослідження здійсненні згідновимогам та рекомендаціям ДЕЦ МОЗ України «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів, порядку визначення установ, які проводять доклінічне вивчення лікарських засобів» (Наказ МОЗ України № 441 від 01.11.2001 зі змінами, внесеними за Наказом Міністерства охорони здоров’я України № 602 від 14.11.2005, відповідно до вимог GLP, а також «Положенняпро використання тварин у біомедичних дослідженнях» та Статуту Української асоціації з біоетики та норм GLP (1992).

Комітетом з біоетики НМУ (протокол № 112 від 31.05.2018) встановлено, що проведенні експериментальні дослідження науково обґрунтовані та не суперечать загальноприйнятим нормам біоетики, морально-етичним нормам міжнародних положень стосовно експериментальних досліджень, проведені з дотриманням відповідних правил ICH/GLP, у відповідності до законодавства України [Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – 230 с.], правилам Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою[European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986.  
– 53p.] стосовно проведення експериментальних та клінічних досліджень.

У дисертаційній роботі застосовували наступні препарати: ангіолін – (НВО «Фарматрон» (Україна), фармацевтична компанія «Артеріум» (Україна), мілдронат – АО «Гріндекс» (Латвія), апровель (ірбесартан) – Санофі Вінтроп Індастріа (Франція), аккупро (квінаприл) –Пфайзер Менюфекчуринг Дойчленд ГмбХ, (Німеччина), доксорубіцин «Ебеве» (доксорубіцин) – ЕБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ (Австрія), пітуітрин –АВ «Endokrininiai» (Литва), ізадрин – Sigma (USA).

Перед моделюванням патологічних станів визначали гостру та хронічну токсичність на 3 видах тварин (миші, щури, кролі). Вивчення гострої токсичності проводили за методом Кербера [А.О.Лойт, М.Ф. Савченков, 1996].

Середню ефективну дозу ангіоліну при парентеральному введеннівизначали на моделі гострої ішемії міокарда у щурів, яку моделювали введенням адреналіну гідрохлориду та кофеїн-бензоатунатрію[Т.А. Воронина, С.Б. Серединин, 2002].ЕД50ангіоліну розраховували після побудови кривої «доза – ефект» за допомогою програми Statistica 6.0.

Моделямипатологічних станів серцево-судинної системи були обрані:

1. Гострий інфаркт міокарда (ГІМ) (дрібновогнищевий) у щурів, що моделювали поетапним введенням ізадрину і пітуітрину [А.В. Стефанов, 2002]. за схемою: пітуітрин 0,5 Од/кгвнутрішньоочеревинно, через 20 хв ізадрин в дозі 100 мг/кг підшкірно, через 6 год – ін’єкція ізадрину в дозі 50 мг/кг, повторно через 24 год вводили обидва препарату в тих же дозах. Ангіолін вводили 3 рази внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг протягом доби паралельно з формуванням інфаркту за 30 хвилин до ін’єкції пітуітрину та ізадрину і через 30 хв після ін’єкції ізадрину. Мілдронат 10 % розчин вводили за тією ж схемою в дозі 100 мг/кг. Експериментальні тварини були поділені на 4 групи по 10 тварин.

2. Гостру ішемію міокарда у щурів моделювали шляхом незворотньої оклюзії гілки низхідної артерії[Л.И.Ольбинская, П.Ф. Литвицкий, 1986]. Операцію проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Ангіолін вводили внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг за 30 хв до операції, мілдронат за тією ж схемою в дозі 100 мг/кг. Щурі також були поділені на 4 групи по 10 тварин.

3. Гостру ішемію міокарда у кролів моделювали шляхом внутрішньовенного введення кофеїн-бензоата натрію з розрахунку 20 мг/кг, потім через 3 хв внутрішньовенно вводили адреналіну гідрохлорид з розрахунку 0,2 мг/кг адреналіну основи [Т.А.Воронина, С.Б. Серединин, 2002]. За 30 хв до введення кофеїн-бензоата натрію внутрішньовенно вводили досліджуванні препарати ангіолін – 50 мг/кг, мілдронат за тією ж схемою в дозі 100 мг/кг. У цій серії експерименту було 4 групи тварин: 1-а – інтактна (14 кролів);2-а група –кролі з гострою ішемією міокарда (5 тварин); 3-ягрупа – кролі з гострою ішемією міокарда, яким внутрішньовенно вводили ангіолін (7 тварин); 4-а група– кролі з гострою ішемією міокарда, яким внутрішньовенно вводили мілдронат (5 щурів).

4. ХСН викликали у білих безпородних щурів–за введення доксорубіцину (внутрішньоочеревинно, в кумулятивній дозі 15 мг/кг, поділеній на 6 ін’єкцій протягом 14 днів) [Н.В. Калинкина, 2001]. Препарати вводили, за схемою пропонованою[Д.П. Хлопонін, 2012],ангіолін вводили 1 раз на добу внутрішньошлунковов дозі 100 мг/кг у вигляді суспензії з твіном-80 паралельно введенню доксорубіцину протягом 14діб, і потім ще 21добу, а мілдронат в дозі 250 мг/кгза такою ж схемою.

У цій серії експерименту було 4 групи тварин: 1-а – інтактна (10 щурів);2-а група –щурі з ХСН (20 тварин); 3-ягрупа – щурі з ХСН, яким внутрішньошлунково вводили ангіолін в дозі 100 мг/кг (20 тварин); 4-а група– щурі з ХСН, яким внутрішньошлунково вводили мілдронат (20 щурів).

5. ХСН у кролів моделювали внутрішньовенним введенням доксорубіцину за подібною схемою. Ангіолін кролям вводили 1 раз на добу внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг у вигляді суспензії з твіном-80 паралельно введенню доксорубіцину протягом 14 діб, а потім ще 21 добу. Мілдронат вводили внутрішньошлунково в дозі 250 мг/кг. Тварини були поділені на 4 групи: 1-а група – інтактні (15 кролів), 2-а група – контрольні, з ХСН, яким вводили фізіологічний розчин з Твіном-80 (6 кролів), 3-я група – тварини з ХСН, яким вводили ангіолін (15 кролів), 4-а група – тварини з ХСН, яким вводили мілдронат (6 кролів).

6. Артеріальна гіпертензія (АГ), в якій використовували щурів з АГ лінії(Окамото – Аокі) SHR – САГ (spontaneously hypertensive rats) – спонтанно гіпертензивні щури, що за патогенезом наближається до артеріальної гіпертензії у людей, танормотензивні щурі лінії Вістар. Щури ізСАГ масою 320 г (АТ – 180 мм рт. ст.), яким вводили досліджувані препарати внутрішньошлунково протягом 3 місяців. Експериментальні тварини були розподілені на 7 груп: 1-а група – нормотензивні щури, яким вимірювали артеріальний тиск (АТ) двічі (на початку експерименту і через 90 днів) – 7 тварин; 2-а група – контроль, щури із САГ, масою 320 г (АТ – 180 мм рт. ст.) – 10 тварин; 3-я група – щури із САГ, яким вводили ангіолін (100 мг/кг) – 8 тварин; 4-а група – щури із САГ, яким вводили квінаприл (10 мг/кг) – 8 тварин; 5-а група – щури із САГ, яким вводили квінаприл (10 мг/кг) та ангіолін (100 мг/кг) – 8 тварин; 6-а група – щури із САГ, яким вводили ірбесартан (100 мг/кг) – 8 тварин; 7-а група – щури із САГ, яким вводили ірбесартан (30 мг/кг) та ангіолін (100 мг/кг) – 8 тварин.

Артеріальний тиск вимірювали плетизмографічним методом на хвостовій артерії щурів. Вимірювання проводили тричі на хвостовій артерії щурів з усередненням отриманих результатів.

Показники кардіо- та системної гемодинаміки визначали загальними методами[М.И. Гуревич, 1967; І.С. Чекман, 2003]. У гострому експерименті (наркоз – уретан 1 г/кг), після катетеризації лівого шлуночка серця реєстрували основні параметри кардіо- та системної гемодинаміки – максимальний тиск лівого шлуночка (РЛШ –мм рт. ст.; системний артеріальний тиск САТ –  
мм рт. ст.; частоту серцевих скорочень ЧСС– уд./хв. Показники реєстрували на приладі HP VIRICUA Component Monitoring System Hewlett Packard, Німеччина. За допомогою методу термодилюції реєстрували хвилинний об’єм крові   
(ХОК) – мл. З урахуванням величини ХОК, САТ, ЧСС і поверхні тіла (ПТ) м2 розраховували РІЛШ, РУІЛШ. Визначення показників кардіо- та системної гемодинаміки проводили при гострій ішемії міокарда у кролів та при хронічній серцевій недостатності у кролів. Крім того, окремо проводили аналіз електрокардіограми (ЕКГ). ЕКГ проводилась на комп’ютерному аналізаторі CardioCom-2000plus (ХАІ-медика, Україна).

Біохімічними дослідженнями у щурів визначали вплив препаратів на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, енергетичний обмін, показники обміну оксиду азоту і тіол-дисульфідної системи, які ідентифікували в мітохондріальній і цитозольній фракціях міокарду. Цитоплазматичну імітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифузі «Sigma 3-30k» (Німеччина) при 14000 g10 хв при +4оС [R.Kleiger, M.Bosner, 1997]. Ступінь окислювальної модифікації білків визначали за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням маркерів окисної модифікації білка – альдегідфенілгідразонів (АФГ), кетонфенілгідразонів (КФГ)[B. Halliwell, 1999; Чекман І.С., 2016]. Спектрофотометрично визначали вміст АФГ, що мають максимум поглинання 274 нм та КФГ з максимумом поглинання за 363 нм. Антиоксидантні ферменти (активність каталази) [М.А. Королюк, 1988; І.С. Чекман, 2016], та супероксиддисмутази [С.І. Чеварі, 1988; І.С. Чекман, 2016] визначали спектрофотометрично. Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів – АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату, малату, активності малатдегідрогенази (МДГ). Вміст аденілових нуклеотидів оцінювали шляхом прямої спектрофотометрії при довжині хвилі 260 нм [М.И. Прохорова, 1982; И.С. Чекман, 2010], активність цитохрому-С-оксидази – спектрофотометричним методом [М.И. Прохорова, 1982; И.С. Чекман, 2010].Спрямованість та інтенсивність гліколізу оцінювали за рівнем лактату та пірувату; окиснення в циклі Кребса визначали за вмістом малату [R.L. Lundblad, 2010; І.С. Чекман, 2016]. Активність КФК-цт і КФК-мх в міокарді визначали після хроматографічного розділення, по оптичному тесту Варбурга [И.С. Чекман, 2010; А.В. Стефанов, 2002]. Кількість малату визначали за методом Хохорста по зменшенню НАДН при 340 нм [М.А. Прохорова, 1986]. Вміст пірувату визначали за методом Цоха-Ломпрехта по зниженню НАДН при 340 нм [М.А. Прохорова, 1986]. Вміст лактату визначали за методом Хохорста за підвищенням НАДН при 340 нм [М.А. Прохорова, 1986]. Активність НАД-залежної малатдегідрогенази (НАД-МДГ) визначали спектрофотометрично в мітохондріальній фракції. Концентрацію білку оцінювали за методом Бредфорда. Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в міокарді визначали за реакцією з реактивом Гріса [І.С. Чекман, 2010]. Активність загальної NO-синтази визначали методом, в основі якого лежить стехіометричне окиснення НАДФН в процесі реакції утворення NO із L-аргініну [І.С. Чекман, 2016]. Концентрацію ендотеліальної (eNOS) та індуцибельної (iNOS) синтази також визначали методом Вестернблотінгу. Детекцію ізоензимів NOS здійснювали за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop.

Нітротирозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвідж-методомELISA, ELISA Kit (Cat. № HK 501-02). Концентрації аргініну, аспартату, метіоніну, цистеїну і глутатіону визначали методом тонкошарової хроматографії з подальшою спектрофотометрією елюату. Вміст сумарних SH груп визначали з 5,5-дитіобіс-7-нітробензойною кислотою [J. Sedlack, 2001]. Вміст С-реактивного білку визначали на автоматичному біохімічному Prestige 24i, застосовуючи набір фірми Cormay (N каталогу 4-480 серія 210-3131). Васкулоендотеліальний фактор (VEGF) ідентифікували в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR0020) фірми Elobsciencе. Фактор некрозу пухлин альфа (TNF-α) визначали в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR0865) фірми Elobsciencе. Інтерферон-гама (INF-γ) ідентифікували в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR009)   
фірми Elobsciencе. Утворення мітохондріальної пори встановлювали спектрофотометрично за зниженням світлопоглинання при 540 нм, при додаванні200 мкмоль/л СаСl2. Потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій (ΔΨм) визначали за зміною інтенсивності флуоресценції сафраніну О [І.С. Чекман, 2010]. Якісний та кількісний жирнокислотний склад ліпідів плазми крові експериментальних щурів вивчали методом газорідинної хроматографії [Т.С. Гичка, 1998]. Розділення жирних кислот (ЖК) здійснювали на хроматографі з полум’яноіонізаційним детектором в ізотермічному режимі «Цвет-500» (Росія). Піки ЖК ідентифікували шляхом порівняння з часом утримання піків стандартних ЖК. Кількісну оцінку ЖК ліпідів в плазмі крові щурів проводили методом нормування площин піків етильованих похідних ЖК і визначали їх склад у відсотках [P.A. Sarafidis, 2006]. Зважаючи на статистичну похибку проводили аналіз жирнокислотного обміну за біохімічними класами ЖК (НЖК, ННЖК, ПНЖК). Показники сполучної тканини в плазмі крові: фракції гідроксипроліну (ГП) виділяли за методом Frey [S. Frey, 1965], вміст гідроксипроліну у фракціях (мкмоль/л) визначали за Stegemann [H.J. Stegemann, 1952], активність колагенази (мкмоль/л•год) визначали за Lindy [S. Lindy, 1973] (із використанням субстрату колагену виробництва фірми Sigma), сумарний вміст глікозаміногліканів (ГАГ) визначали за Кляцкиним С.А. та Ліфшицем Р.І. [С.А. Кляцкин, Р.И. Лифшиц, 1989].

Для вивчення морфофункціонального стану міокарда та ядер ендотеліоцитів гістологічні зрізи депарафінували за стандартною методикою та забарвлювали галоціанин-хромовими квасцями по Ейнарсону для специфічного виявлення РНК. Морфометричний аналіз кардіоміоцитівта ендотеліоцитів проводили на мікроскопі Axioskop (Ziess, Germany) за допомогою відеокамери COHU-4922(USA) та вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Electronic, Germany), збільшення х40.

Концентрацію білку теплового шоку HSP70 в цитоплазматичній та мітохондріальній фракціях гомогенату серця визначали методом Вестернблотінгу. Детекцію HSP70 здійснювали за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop.

Фармакокінетичними дослідженнями кількісно визначенасубстанція (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат – розчин для ін’єкцій та таблетках препарату «Ангіолін». Визначення концентрації активної складової сполуки «Ангіолін» проводили за допомогою високоефек­тивної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з мас-спектрометричним детектором фірми «Agilent Technologies 1200 Series» (США). Розпізнавання АФІ «Ангіоліну» здійснювали одноквадрупольним мас-спектрометром з електроспрей-іонізацією за відомими методичними прийомами, які широко використовуються в експериментальній та клінічній фармакокінетиці [И.И. Мирошниченко, 2002; Л.Н. Сернов, 2000; B. Testa, 2001].

Квантово-хімічні молекулярні структури ангіоліну досліджували за показниками: енергії сольватації, вільної енергії у водному розчині з урахуванням ефектів сольватації-десольватації, енергії молекулярних орбіталей і значення дипольного моменту, встановлених за допомогою теорії функціоналу густини [W.A. Kohn, 1965], з використанням гібридного функціоналу B3LYP [A.D. Becke, 1993] у неемпіричному базисі 6-31G (d.p) із поляризаційними функціями та сольватаційної моделі IEF PCM програмного пакету GAMESS [M.W. Schmidt, 1993].

Отримані результати оцінювали на підставі статистичної обробки методами варіаційної статистики. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою спеціалізованої програми «BioStat 2009» (AnalystSoft Inc., USA) та пакета програм «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., USA, № ліцензії AXXR712D833214FAN5). Порівняльний аналіз в групах проводили з використанням *t-*критерію Ст’юдента та U-критерію Уїтні-Манна для двох експериментальних груп, та однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за критерієм Ньюмена-Кейлса для множинних порівнянь. Статистично значущими вважали відмінності за р<0,05. Кількісні дані представлені у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

За результатами скринінгових досліджень в ряду похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот в умовах моделювання нітрозуючого стресу in vitro було встановлено, що з 11 сполук 10 виявляють достовірні антиоксидантні і цитопротекторні властивості, а 7 сполук по силі дії перевершують референс-препарати – дибунол, а-токоферол, мексидол, метіонін і унітіол. Похідні 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот в умовах нітрозуючого стресу in vitro знижують АФГ, КФГ і нітротирозинна тлі нормалізації интермедіатів тіол-дисульфідної системи клітин (нейронів) – підвищення відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази і глутатіонтрасферази, зниження окисненого глутатіону. Отримані дані свідчать не тільки про високу антиоксидантну і цитопротекторну активності похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот, але і про можливістьу них NO/SH-залежного механізму ендотеліопротекторної дії. Встановлено, що наявність і вираженість антиоксидантної та цитопротекторної активності залежать від залишку оцтової і масляної кислот та їх морфолініевої і лізінієвої солей в положенні 5 триазолового циклу. Було виявлено сполуку-лідер – (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін), для проведення подальших поглиблених доклінічних досліджень.

За результатами дослідження гострої токсичності ангіоліну (миші, щури, кролі) препарат віднесли до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини). Ангіолін не має кумулятивних властивостей, не викликає структурних змін, не призводить до виникнення дистрофічних і гемодинамічних порушень, а також до розвитку деструктивних реакцій в досліджуваних тканинах тварин при тривалому (90 і 180 діб) введенні. Була визначена середня ефективна доза ангіоліну на моделі гострої ішемії міокарда при парентеральному введенні –50,0 мг/кг. ЕД50ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні була визначена тарозрахована в роботах Бєленічева І.Ф., 2018 и становила 100 мг/кг для щурів.

Встановлено, що ангіолін (50 мг/кг) достовірно понижував ЧСС на 21,7%, зменшував відхилення ST на 20%, сприяв відновленню до контрольного рівня амплітуди зубця Т у щурів з гострим інфарктом міокарда.

При вивченні впливу ангіоліну на морфо-функціональні показники кардіоміоцитів і ендотеліоцитів при ГІМ був показаний кардіопротекторний ефект препарату, про що свідчило зменшення зони некрозу в міокарді на 57,8%, підвищення концентрації РНК в ядрах на 15,5% і в цитоплазмі міокардіоцитів на 20,1%, підвищенням щільності на 21,5% та площі на 30,1% ядер кардіоміоцитів, щільності ядер ендотеліоцитів капілярів міокарду на 68%, порівняно з контрольною групою, що свідчить про стимуляцію процесів транскрипції, а також про протиішемічні і репаративні властивості ангіоліну. Ангіолін приводив до зменшення апоптично змінених кардіоміоцитів на 60%, що свідчить про антиапоптичну дію препарату.

Моделювання ГІМ призводило до пригнічення процесів синтезу NO, який виконує в умовах ішемії міокарда роль ендотеліопротекторного і кардіопротекторного фактора, про що свідчило зменшення активності NOS, зниження продукції стабільних метаболітів NO – нітратів на тлі вираженого дефіциту субстрату синтезу NO – L-аргініну. Паралельно реєструвалося і порушення транспорту NO – зниження рівня тіолвміщуючих амінокислот – цистеїну, метіоніну і сумарної кількості SH. Загальновідомо, що NO є нестабільним, короткожиттевим радикалом і для його стабілізації та подальшого транспортування передбачені такі механізми, як утворення з тіолвміщуючими низькомолекулярними сполуками (глутатіон, цистеїн, метіонін) стійких   
S-нітрозольних комплексів [І.Ф. Бєленічев та співавт., 2002]. В умовах дефіциту тіольних сполук (оксидативний стрес, ішемія, інтоксикація, гіпертонічна хвороба) порушується транспорт NO, тому що він піддається атаці АФК з перетворенням в цитотоксичний продукт – ОNOО- [Igor F. Belenichev et al., 2015], про що свідчило підвищення маркера пероксинітриту– нітротирозину.При визначенні впливу ангіоліну на показники NO/ SHпри моделюванні ГІМ, отримані дані, які свідчать про те, що ангіолін не має прямої стимулюючої дії на активність NO-синтази та рівень L-аргініну, проте має унікальні властивості – протекторний вплив по відношенню до транспорту NO за рахунок збереження відновлених тіолів (рис. 1).



Рис.1. Вплив ангіоліну та мілдронату на показники системи NO при експериментальному інфаркті міокарда

Введення ангіоліну тваринам з експериментальним інфарктом міокарда підвищує рівень відновлених тіольних груп на 53,3%, тіолвміщуючих амінокислот – метіоніну на 35,1%, цистеїну на 170% (рис.2), як за рахунок прямої антиоксидантної дії тіольної групи в молекулі препарату, так і за рахунок підвищення активності глутатіонредуктази на 18% (рис.3).

Рис.2. Вплив ангіоліну та мілдронату на показники тіол-дисульфідної системи(рівень метіоніну та цистеїну) при експериментальному гострому інфаркті міокарда

Рис.3. Вплив ангіоліну та мілдронату на показники тіол-дисульфідної системи (загальні відновлені тіоли, глутатіонредуктаза) при експериментальному гострому інфаркті

Ангіолін сам може бути переносником NO або утворювати з ним стабільні S-нітрозильні комплекси, щодоведено квантово-хімічнимирозрахунками[І.С. Чекман, І.А.Мазур, 2017]. Тому він попереджає перетворення NO під дією активних форм кисню в пероксинітрит (про що свідчить пониження рівня його нітротирозину на 42%), зберігаючи його ендотеліопротекторні властивості, що вигідно відрізняє ангіолін від мілдронату, якому не притаманна така дія.

При дослідженні показників впливу ангіоліну на енергетичний обмін міокарда при моделюваннігострого інфаркту міокарда встановлено, що призначення ангіоліну вело до посилення продукції АТФ на 53,6% за рахунок інтенсифікації аеробних процесів. Ангіолін мав помірну дію стосовно вмісту субстратів окиснення – глікогену (+47%) та глюкозо-6-фосфату (+41%) в ішемізованому міокарді. Ангіолін обмежував активність анаеробного гліколізу в умовах ішемії, про що свідчить пониження рівня лактату на 57%. При цьому ангіолін нормалізував окиснення в циклі Кребса на дикарбоновій ділянці (підвищення рівня малату на 120%), трикарбоновій ділянці циклу Кребса (підвищення рівня ізоцитрату на 60%) та в дихальному ланцюгу (підвищення активності цитохром-С-оксидази на 46,7%) (табл.1).

*Таблиця 1*

**Вплив ангіоліну і мілдронату на показники енергетичного обміну  
та малат-аспартатного шунта при експериментальному**

**гострому інфаркті міокарда (n=10)**

| Досліджувані показники | Інтактні тварини | ГІМ  (контроль) | ГІМ+ангіолін (50 мг/кг) | ГІМ+мілдронат  (100 мг/кг) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| АТФ, мкм/г | 2,82±0,10 | 1,77±0,11\* | 2,72±0,1# | 2,32±0,12# |
| Глікоген, мкм/г | 10,2±0,8 | 1,87±0,10\* | 2,75±0,5# | 1,65±0,8 |
| Глюкозо-6-фосфат, мкм/г | 0,734±0,04 | 0,381±0,01\* | 0,53±0,02# | 0,431±0,02# |
| Лактат, мкм/г | 2,56±0,20 | 6,45±0,11\* | 2,77±0,11# | 7,12±0,20 |
| Піруват, мкм/г | 0,17±0,03 | 0,11±0,01\* | 0,15±0,01# | 0,14±0,02# |
| Ізоцитрат, мкм/г | 0,686±0,03 | 0,430±0,01\* | 0,611±0,01# | 0,511±0,03# |
| Малат, мкм/г | 0,72±0,02 | 0,25±0,01\* | 0,55±0,01# | 0,28±0,02 |
| МДГ, мкм/г/хв | 6,88±0,1 | 3,10±0,1\* | 7,87±0,1# | 3,87±0,02# |
| Глутамат, мкм/г | 24,4±0,3 | 17,0±0,2\* | 23,0±0,20# | 17,4±0,3 |
| Аспартат, мкм/г | 15,0±0,1 | 12,2±0,01\* | 14,4±0,1# | 11,7±0,1 |

Примітки:

1. \* – р<0,05 порівняно з інтактними тваринами;

2. # – р<0,05 порівняно з контролем.

Ангіолін інтенсифікував активність малат-аспартатного шунта, про що свідчить підвищення активності МДГ на 153%, збільшення рівня аспартату на 18%, глутамату на 35%. Ангіолін підвищував не тільки продукцію енергії, але і її транспорт, про що свідчить збільшення активності мітохондріальної креатинфосфокінази на 75% (КФК-мх) та цитозольної креатинфосфокінази на 35% (КФК-цт). Сумарний внесок мілдронату в енергозабезпечення серця в умовах ішемії був нижче, ніж енерготропна дія ангіоліну.

Ангіолін при введенні експериментальним тваринам з ГІМ мав значний антиоксидантний ефект (підвищення активності СОД, ГПР) та вплив на маркери окислювальної модифікації білку (зниження вмісту АФГ, КФГ) в порівнянні з мілдронатом (табл.2).

*Таблиця 2*

**Вплив ангіоліну і мілдронату на показники антиоксидантної системи, окислювальної модифікації білку за експериментального інфаркту міокарда (n=10)**

| Досліджувані показники | Інтактні тварини | ІМ  (контроль) | ІМ+ангіолін  (50 мг/кг) | ІМ+мілдронат  (100 мг/кг) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| СОД, у.о./мг/хв | 307,6±11 | 124±8\* | 270,7±10#1 | 183,1±12# |
| ГПР, мкм/мг/хв | 144,8±5,7 | 64,4±4,0\* | 147,7±5,0#1 | 97,7±71# |
| АФГ, у.о./г білку | 8,77±0,48 | 18,23±0,56\* | 9,12±0,32#1 | 14,1±0,51# |
| КФГ, у.о./г білку | 12,33±0,78 | 34,81±1,34\* | 14,10±1,76#1 | 25,21±1,88# |

Примітки:

1. \* – р <0,05 щодо інтактних тварин;

2. # – р <0,05 щодо контролю;

3. 1– р<0,05 щодо мілдронату.

Таким чином, при моделюванні ГІМ за нормалізуючим впливом на показники ЕКГ та обмінні процеси в міокарді, ангіолін переважав мілдронат, діючи не тільки на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, а також на енергетичний обмін (рівень АТФ, показники гліколізу, малат-аспартатного шунта). Ангіолін приГІМ нормалізував функцію мітохондрій, співвідношення тіол-дисульфідної системи і системи оксиду азоту в міокарді.

При ішемічному порушенні в міокарді щурів, викликаному оклюзією гілки низхідної коронарної артерії, була досліджена кардіопротекторна дія при профілактичному введенні ангіоліну: в групах тварин, які отримували ангіолін, спостерігалося зменшення зони некрозу міокарда на 65%, пониження сумарного відхилення ST на 80%, пониження гіперферментемії МВ-КФК на 70%, збільшеннявмісту АТФ на 34%, зменшення АФГ на 41%, КФГ на 47% (табл. 3).

*Таблиця 3*

**Вплив ангіоліну і мілдронату на зону некрозу міокарда, маркери окиснювальноїмодифікації білку, вміст АТФ, активність МВ-КФК і показники ЕКГ у тварин з оклюзією гілки низхідної коронарної артерії(n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Досліджувані показники | Інтактні тварини | ОГКА (контроль) | ОГКА+ангіолін  (50 мг/кг) | ОГКА+мілдронат (100 мг/кг) |
| Сумарне відхилення ST від ізолінії, мВ | 0 | 248±10\* | 51,5±5# | 97±8# |
| АФГ, у.о./г білку | 8,33±0,53 | 16,76±0,71\* | 9,87±0,57# | 14,12±0,77 |
| КФГ, у.о./г білку | 11,37±0,62 | 28,87±1,82\* | 15,22±1,5# | 21,32±1,4# |
| АТФ, мкм/г тканини | 2,93±0,12 | 1,81±0,11\* | 2,43±0,7# | 2,10±0,10\* |
| МВ-КФК, ммоль/л/год | 0,05±0,001 | 0,21±0,011\* | 0,062±0,005# | 0,157±0,001# |

Примітки:

1. \* – р<0,05 порівняно з інтактними тваринами;

2. # – р<0,05 порівняно з контролем.

Ангіолін при введенні кролям з гострою ішемією міокарда приводив до відновлення функції лівого шлуночка, що проявлялося у збільшенні робочого індексу лівого шлуночка на 41-52 % і робочого ударного індексу лівого шлуночкана67-44 %, підвищенні тиску в лівому шлуночку на9-46 %, а також систолічного тиску на 14-61 % протягом 20 хв ішемії. По силі впливу на показники кардіогемодинаміки ангіолін достовірно перевершував мілдронат. Профілактичне одноразове введення ангіоліну інтактним щурам і на тлі коронароспазму, викликаного пітуітрином підвищувало толерантність до фізичних навантажень на 53-70%, покращувало енергетичний метаболізм міокарда (АТФ 38%), зменшувало ішемічні зміни серця (ST – 63-77%), а також гальмувало окислювальну модифікацію білка (АФГ – на 30-38%; КФГ – на 32-39%), що свідчить про його високу кардіопротекторну активності.

При моделюванні хронічної серцевої недостатності у щурів, ангіолін в дозі 100 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні подовжував виживання тварин до 70%, збільшував кількість рухових актів за 3 хвилини, зменшував кількість тварин з важкою симптоматикою. Крім того, препарат знижував індекс маси серця на 35%, підвищував щільність кардіоміоцитів на 18%, частки одноядерних клітин на 72%, і підвищував РНК в цитоплазмі кардіоміоцитів на 24%, знижував щільність апоптично і некротично змінених клітин на 62%.

Після лікування ангіоліном щурів з ХСН зменшувалась кількість кардіоміоцитів з літичними і контрактурними пошкодженнями міофібрил, повністю були відсутні клітини з ознаками фіброзу, понижувалась щільність апоптично змінених клітин, гальмувався розвиток замісного кардіосклерозу та статистично значимо гальмувався процес активного фіброзу. Ангіолін також зменшував прояви дисфункції ендотелію, підвищуючи щільність ендотеліоцитів на 25,5%, площі ендотеліоцитів на 12,5% та зростання концентрації РНК в ядрах на 62,2%.

Курсове призначення щурам з ХСН ангіоліну сприяло достовірному пониженню маркерів дисфункції ендотелію – фактору некрозу пухлин (TNF-α) на 64,5%, С-реактивного білку на 62,2%, інтерферону-гама (IFN-γ) на 44,7% на тліпідвищення експресії васкулоендотеліального фактору (VEGF) на 193% (табл. 4).

Цей механізм забезпечує високу ендотеліопротекторну активність ангіоліну, тому що TNF-a, IL-1β і IFN-g знижують експресію eNOS і продукцію NO, підсилюють його окислювальну модифікацію, перетворюючи його в пероксинітрит. TNF-a та IFN-g пригнічують експресію VEGF і запускають апоптоз ендотеліальних клітин [I.F. Belenichev, I.A. Mazur, N.V. Bukhtiyarova, 2013].

*Таблиця 4*

**Вплив ангіоліну та мілдронату на молекулярні маркери ендотеліальної дисфункції в атріальному міокарді та сироватці крові тварин з ХСН   
на 35 добу експерименту(n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Досліджувані показники | Інтактні | ХСН(контроль) | ХСН+ангіолін (100 мг/кг) | ХСН+мілдронат (250 мг/кг) |
| VEGF,  пг/мг білку | 33,8±4,19 | 18,8±8,41\* | 55,1±7,22\*#1 | 21,5±4,11 |
| TNF-α,  пг/мг білку | 4,18±0,71 | 28,7±3,66\* | 10,2±1,78#1 | 27,1±4,87\* |
| С-реактивний білок, г/л | 4,21±0,31 | 14,13±0,87\* | 5,32±0,28#1 | 10,11±0,78\* |
| IFN-γ  пг/мг білку | 11,8±2,8 | 32,28±2,26\* | 18,21±2,31\*#1 | 36,67±4,11\* |

Примітки:

1.\* – р <0,05 щодо інтактних тварин;

2.#– р <0,05 щодо контролю;

3.1 – р <0,05 по відношенню до групи мілдронату.

В зв’язку з тим, що серцева недостатність супроводжується не тільки змінами метаболізму і функцій міокарда, але також ендотеліальною дисфункцією при якій виникає дисбаланс між вазодилятаторами і вазоконстрикторами, на тлі порушення нітроксиергічної системи [Чекман І.С., 2106]. Моделювання ХСН призводить до депривації експресії eNOS, що бере участь в ендогенних механізмах кардіопротекції, і підсилює експресію іNOS, яка відіграє важливу роль в реалізації програми нітрозуючого стресу. Як встановлено, у розвитку феномена імунозапальної реакції при ХСН, яка є однією з ланок формування ендотеліальної дисфункції, виникають різноспрямовані зміни експресії двох ізоформ NOS – ендотеліальної (зменшення, про що йшлося вище) і індуцібельної (зростання) [M. Aviram, 2012]. Встановлено, що при курсовому введенні ангіоліну спостерігалося зростання активності загальноїNOS на 20%, та вмістуL-аргініну на 14,7%, стабільних метаболітів NO на 54,5%в цитозолі міокарда тварин з ХСН. Це підтверджується результатами гістохімічного аналізу, який дозволяє встановити підвищення щільності eNOS-позитивних клітин на 17% та зменшення іNOS-позитивних клітин на 30% (табл.5).

*Таблиця 5*

**Вплив ангіоліну та мілдронату на показники синтезу, метаболізму системи оксиду азоту в міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності   
на 35 добу експерименту(n=10)**

| Досліджувані показники | Інтактні тварини | ХСН (контроль) | ХСН+  ангіолін  (100 мг/кг) | ХСН+  мілдронат  (250 мг/кг) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Загальна NOS, нмоль/мг білку/хв | 36,7±2,31 | 14,8±1,23\* | 17,8±1,35# | 14,2±1,67\* |
| Щільність eNOS-позитивних клітин | 477,3±21,7 | 223,1±18,5\* | 231,2±22,0\* | 217,2±24,2 |
| Щільність іNOS-позитивних клітин | 125,2±16,2 | 247,8±20,3\* | 173,7±14,3# | 251,3±27,3 |
| Метаболіти NO (нітрати), мкмоль/г тканини | 28,7±2,25 | 12,1±1,12\* | 18,7±1,21# | 11,8±1,12 |
| Нітротирозин, нмоль/г тканини | 21,2±2,11 | 62,1±4,51 | 27,1±2,18# | 53,1±6,34 |
| L-аргінін, мкмоль/г тканини | 12,8±1,4 | 6,1±0,48\* | 7,0±0,52# | 5,1±0,43 |

Примітки:

1. \* – р<0,05 щодо інтактних тварин;

2. #– р<0,05 щодо контролю.

Отримані дані свідчать про те, що ангіолін попереджає перетворення NO під дією активних форм кисню в пероксинітрит, про що свідчить зниження рівня нітротирозину на 42%, при збереженні ендотеліопротекторних властивостей цього месенджера.

При курсовому введенні ангіоліну спостерігається відновлення показників тіол-дисульфідної системи. Встановлено, що ангіолін у тварин з ХСН підвищував вміст відновлених тіольних груп на 66,3%, метіоніну – на 43%, цистеїну – на 85%. Найбільш виражений вплив ангіоліну проявлявся по відношенню до глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи – підвищувалась активність ГР на 97,7%. Зростала концентрація відновленого глутатіону на 118,7% та зменшувався вміст його окисненої форми на 46,7% в цитозолі міокарда експериментальних тварин (рис. 4).

Рис. 4.Вплив ангіоліну та мілдронату на показники тіол-дисульфідної системи в міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності на 35 добу експерименту

Ангіолінприводив до нормалізації енергетичного метаболізму міокарда при ХСН – збільшення продукції АТФ на 47% за рахунок інтенсифікації аеробних реакцій (підвищення рівня ізоцитрату на 35%) і компенсаторною активацією малат-аспартатного шунта (підвищення активності НАД-МДГ на 195%, рівня малату на 185%), зниження анаеробного гліколізу (зниження лактату на 47%), нормалізації функції мітохондрій (активність мітохондріальної КФК підвищувалася на 82%). Моделювання ХСН призводить до активації оксидативного стресу, який є важливим механізмом прогресування цієї патології – АФК пригнічують скорочувальну функцію міокарда і запускають апоптоз кардіоміоцитів,викликають прямий негативний інотропний ефект [T.D. Warner, 2009]. Курсове введення тваринам з ХСН ангіоліну мало значну антиоксидантну дію, що проявлялося підвищенням активності СОД на 144%, ГПР на 158% та пониженням маркерних продуктів – АФГ на 50% та КФГ на 60% (табл. 6).Виявлена здатність ангіоліну зменшувати оксидативний стрес, що реалізується як за рахунок підвищення активності антиоксидантних ферментів –СОД і каталази, так і за рахунок прямої антиоксидантної дії: зменшення утворення супероксидрадикала і пероксинітриту (ONOO-). Така дія пов’язана з наявністю тіольних груп в молекулі препарату, який може виступати як скавенджер АФК [Мазур І.А., Бєленічев І.Ф., 2009].

*Таблиця 6*

**Вплив ангіоліну та мілдронату на показники антиоксидантної системи   
та оксидативного стресу при ХСН на 35 добу**

**експерименту(n=10)**

| Умови експерименту | СОД, у.о./мг/хв | ГПР, мкм/мг/хв | АФГ,  у.о./г білку | КФГ,  у.о./г білку |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Інтактні щури | 328,6±13,6 | 147,2±8,9 | 12,2±0,97 | 7,2±0,72 |
| ХСН(контроль) | 118,0±9,2\* | 51,7±4,2\* | 36,1±2,41\* | 19,8±1,33\* |
| ХСН+ангіолін (100 мг/кг) | 287,7±14,7#  (+144%) | 133,2±8,2 #(+158%) | 18,2±1,8#  (-50%) | 10,7±1,14#  (-46%) |
| ХСН+мілдронат(250 мг/кг) | 139,1±11,2\* (+18%) | 54,4±5,7\* (+0%) | 32,1±3,11\*  (-11%) | 15,1±1,11\*  (-24%) |

Примітки:

1. \* – р<0,05 порівняно з інтактними тваринами;

2. # – р<0,05 порівняно з контролем.

При моделюванні ХСН у кролів встановлені порушення показників кардіо- і системної гемодинаміки, які характеризують скоротливу активність міокарда. Ангіолін в дозі 100 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні кролям з ХСН відновлював дисфункцію лівого шлуночка, що відображено зростанням РІЛШ на 30%, РУІЛШ – на 29%, Рмах– на 21,3%. Порівняння протекторного впливу ангіоліну з мілдронатом на моделі ішемічної хвороби серця та хронічної серцевої недостатності дозволило виявити більшу кардіо- та ендотеліопротекторну дію ангіоліну порівняно з мілдронатом на функціональні біохімічні та морфологічні показники.

В експериментах на щурах зі спонтанною генетично зумовленою артеріальною гіпертензією (САГ) ангіолін в монотерапіїне впливав на артеріальний тиск, а в комбінації з ірбесартаном та квінаприлом не змінював їх антигіпертензивної дії. У щурів з САГ ангіолін в дозі 100 мг/кг знижував при монотерапії, а в більшому ступені в сполученні з квінаприлом, ірбесартаном маркери окислювальної модифікації білків (АФГ, КФГ), як в мітохондріальній, так і в цитозольній фракціях міокарду щурів з САГ (рис. 5) та нормалізував жирнокислотний склад ліпідів в плазмі крові щурів: відношення насичених і ненасичених жирних кислот.

Рис. 5. Вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх комбінацій на показники окислювальної модифікації білків в мітохондріальній фракції серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

Ангіолін при внутрішньошлунковому введенні (100мг/кг) на відміну від ірбесартану (30 мг/кг) та квінаприлу (10 мг/кг) збільшував в мітохондріальній і цитозольній фракціях міокарду щурів з САГ вміст аденілових нуклеотидів, білку теплового шоку (HSP 70) (табл.7) та попереджав відкриття мітохондріальної пори.Сумісне введення ангіоліну з ірбесартаном та квінаприлом мало профілактичний вплив щодо змін вищезазначених показників.

*Таблиця 7*

**Концентрація HSP70 в гомогенаті серця експериментальних тварин**

| Групи тварин | HSP70, у.о./г білку | |
| --- | --- | --- |
| Цитозольна  фракція | Мітохондріальна фракція |
| Інтактні (n=8) | 8,782±0,304 | 6,515±0,264 |
| САГ (контроль) (n=10) | 2,326±0,32\* | 0,758±0,304\* |
| САГ+ангіолін (100мг/кг) (n=8) | 5,242±0,301# | 2,783±0,172# |
| САГ+ірбесартан(30мг/кг) (n=8) | 2,438±0,172 | 0,811±0,464 |
| САГ+ ангіолін (100мг/кг) +  ірбесартан(30мг/кг)(n=8) | 7,114±0,241# | 3,241±0,141# |
| САГ+квінаприл (10мг/кг) (n=8) | 2,450±0,213 | 0,783±0,354 |
| САГ+ангіолін (100мг/кг) +  квінаприл(10мг/кг) (n=8) | 6,671±0,288# | 2,821±0,115# |

Примітки:

1. \* – р<0,05 порівняно з інтактними тваринами;

2. #– р<0,05 порівняно з САГ.

При вивченні впливу ангіоліну та його комбінацій з ірбесартаном і квінаприлом на систему NO та тіол-дисульфідну систему на моделі (САГ) щурів отримані наступні результати. При артеріальній гіпертензії у щурів ірбесартан і квінаприл не відновлювали активність ГР та вміст загальних відновлених тіолів в мітохондріальній і цитозольній фракціях гомогенату серця щурів. Ангіолін підвищував активність ГР в мітохондріальній фракції гомогенату серця щурів при артеріальній гіпертензії в 2,1 рази, при сполученні з квінаприлом в 2,2 рази, з ірбесартаном – в 2,6 рази. При цьому вміст загальних відновлених тіолів зростає під впливом ангіоліну на 19%, його комбінації з квінаприлом на 42%, з ірбесартаном – в 1,6 рази. В цитозольній фракції гомогенату міокарду щурів ангіолін збільшував активність ГР в 2,1 рази, в комбінації з квінаприлом в 2,4 рази, з ірбесартаном – в 3,3 рази. Вміст загальних відновлених тіолів зростав під впливом ангіоліну на 61%, в комбінації з квінаприлом в 1,8 рази, з ірбесартаном–в 2,2 рази.

Були також визначенні параметри фармакокінетики ангіоліну таблеток, при пероральному введенні та розчину для ін’єкцій, при в/м введенні щурам. Квантово-хімічними дослідженнями визначені реакційні центри молекули, що беруть участь у комплексоутворенні. Ангіолін може бути переносником NO утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси. Ангіолін запобігав перетворенню NO під дією АФК в пероксинітрит, зберігаючи його ендотеліопротекторні властивості.

На рис. 6 визначенні головні механізми реалізації кардіо- та ендотеліопротекторної дії ангіоліну при патологічних станах серцево-судинної системи.



Таким чином, отримані експериментальні дані щодо позитивного впливу ангіоліну на функцію і метаболізм серця при патологічних станах, зокрема на набуті ланки-мішені ендотеліальної дисфункції – сполучні системи NO / SH, біодоступність NO, експресії VEGF, а також на енергозалежні механізми скорочувальної функції міокарда, стали основою його доклінічних та експериментальних досліджень внаслідок виконання яких МОЗ України було дозволено проведення та успішно завершена перша фаза клінічних випробувань ангіоліну, як кардіо- та ендотеліопротекторного засобу.

**ВИСНОВКИ**

Дисертаційна робота вирішує важливу проблему фармакології, а саме розробку засобів корекції ключового предиктора серцево-судинної патології – ендотеліальної дисфункції, шляхом створення оригінального препарату на основі 1,2,4-триазолу (L-лізину 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацет) Ангіолін у вигляді розчину для ін’єкцій і таблеток та підтвердження його ефективності і безпеки на доклінічному етапі.

1. Внаслідок проведеного скринінгу in vitro антиоксидантноїтацитопротекторної активностей в ряду 11 похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот, на суспензії нейронів щурів в умовах нітрозуючого та оксидативного стресу– визначена сполука-лідер L-лізіній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін), що проявляє найбільшу ефективність і перевершує референс-препарати (мексидол, метіонін, унітіол, α-токоферол і дибунол).
2. За результатами дослідження гострої токсичності ангіоліну на 3 видах тварин (миші, щури, кролі) при внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному введенні, ангіолін віднесений до V класу токсичності (практично нетоксичний). Встановлена відсутність загальнотоксичної дії ангіоліну в експериментах на щурах при внутрішньоочеревинному введенні в діапазоні доз (50-500) мг/кг протягом 90 днів та внутрішньошлунковому введенні в діапазоні доз (100-1000) мг/кг протягом 180 днів. Ангіоліну не притаманна кумуляція. Визначена ефективна доза ангіоліну (50 мг/кг) при внутрішньоочеревинному введені щурам за змінами активності МВ-КФК на моделі гострого інфаркту міокарда.
3. Ангіоліну в дозі (50 мг/кг) властива кардіопротекторна дія на моделі ГІМ, про що свідчить нормалізація показників ЕКГ у щурів, морфофункціональних та біохімічних характеристик міокарда: достовірне пониження ЧСС на 21,7%, зменшення відхилення ST на 20%, відновлення до контрольного рівня амплітуди зубця Т, зменшення зони некрозу на 57,8%, підвищення концентраціїРНК в ядрах кардіоміоцитів на 15,5%, в цитоплазмі на 20,1% (р≤0,05),зменшення щільності ядер апоптичних деструктивно змінених кардіоміоцитів на 60%.Профілактичне одноразове введення ангіоліну (50 мг/кг, в/в) кролям з гострою ішемією міокарда призводило до відновлення функції лівого шлуночка, що виражалося у збільшенні робочого індексу лівого шлуночка на 41-52 % і робочого ударного індексу лівого шлуночка на67-41 %, підвищенні тиску в лівому шлуночку на 9-46 %, а також систолічного тиску на 14-61 %. За всіма зазначеними показниками ангіолін перевершував мілдронат в дозі (100 мг/кг).
4. Кардіо- та ендотеліопротекторна дія ангіоліну за ГІМ підтверджена нормалізацією біохімічних показників, про що свідчитьймовірне відновлення показників системи синтезу, метаболізму,транспорту оксиду азоту (активність NO – синтази, вміст метаболітів NO, нітротирозину, L-аргініну) та тіол-дисульфідної системи (вміст метіоніну, цистеїну, відновлених сульфгідрильних груп), показників енергетичного обміну (вміст аденілових нуклеотидів, глікогену, глюкозо-6-фосфату, пірувату, ізоцитрату, малату, активність креатинфосфокінази, малатдегідрогенази, цитохром-С-оксидази), прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу (рівень АФГ, КФГ, активність СОД, глутатіонпероксидази).
5. Кардіо- та ендотеліопротекторна дія ангіоліну проявлялась за гострої ішемії міокарда, яку моделювали оклюзією гілки низхідної коронарної артерії у щурів, про що свідчило відновлення вмісту АТФ, активності креатинфосфокінази в міокарді та антиоксидантнаактивність, підтверджена зменшенням вмісту АФГ, КФГ. Ангіолін (50 мг/кг) проявляв ефективність як за лікувального, так і за профілактичного введення інтактним щурам і на тлі коронароспазму підвищуючи толерантність тварин до фізичних навантажень, покращуючи енергетичний метаболізм і обмежуючи ішемічне пошкодження міокарда, а також відновлюючи показники скоротливої активностіміокарда, РІЛШ, РУІЛШ, Рmax та АТ на тлі ураження кофеїн-бензоатом натрію та адреналіном у кролів, перевершуючи активність мілдронату.
6. Кардіо- та ендотеліопротекторна активність ангіоліну проявлялася на тлі ХСН, за умов ураження доксорубіцином, про що свідчили підвищення виживаності до 70% тварин, зниження індексу маси серця на 35%, підвищення щільності кардіоцитів на 18%, підвищення РНК на 24%, зниження щільності апоптичних і некротично змінених клітин на 62%, а також до підвищення щільності ендотеліоцитів судин міокарда на 25%, підвищення в них концентрації РНК на 62%, зниження щільності ендотеліоцитів з ознаками апоптозу на 43%, а також зменшення експресії молекулярних маркерів дисфункції ендотелію –  
   TNF-a на 64,5%, С-реактивного білка на 62,2%, INF-g на 44% на тлі підвищення експресії VEGF на 193%, а також суттєве (р≤ 0,05) відновлення функції лівого шлуночка, що характеризувалося зростаннямРІЛШ на 29%, РУІЛШ на 29%, Рmax лівого шлуночка на 21,3% у кролів. За дії ангіоліну нормалізувалась більшою мірою, ніж за впливу мілдронату, активність тіол-дисульфідної системи і системи оксиду азоту: підвищувалися рівень відновленого глутатіону на 188%, активність ГР на 97,7% на тлі збільшення тіолвміщуючих амінокислот – цистеїну і метіоніну на тлі підвищення стабільних метаболітів NO на 54,5%, знижувався рівень нітротирозину на 130% на тлі підвищення активності загальної NOS на 20%, підвищувалась експресія еNOS на 17% і зменшувалась експресія iNOS на 30%,Ангіолін значно підвищував рівень показників енергетичного обміну міокарда щурів з ХСН –збільшення продукції АТФ на 47% за рахунок інтенсифікації аеробних реакцій (підвищення рівня пірувату, ізоцитрату) і компенсаторною активацією малат-аспартатного шунта (підвищення активності НАД-МДГ на 195%, рівня малата на 185%), зниження анаеробного гліколізу, нормалізації функції мітохондрій (активність мКФК на 82%).
7. На тлі генетично зумовленої артеріальної гіпертензії ангіолін при внутрішньошлунковому введенні (100 мг/кг) щурам з САГ не призводив до зростання гіпотензивної дії, за умов комбінованого застосування з ірбесартаном (30 мг/кг)та квінаприлом (10 мг/кг), суттєво знижуючив міокарді вміст маркерів окислювальної модифікації білків (АФГ, КФГ): в мітохондріях АФГ на 16%, КФГ проявляв тенденцію до зниження, в цитозольній фракції, вміст АФГ понижувався на 38%, КФГ на 46%. При введенні ангіоліну в сполученні з квінаприлом маркери окислювальної модифікації білків понижуютьсяв більшому ступені, ніж в сполученні з ірбесартаном. Комбіноване застосуванняангіоліну з квінаприлом для нормалізації зазначених показників більш ефективне, ніж з ірбесартаном. Ангіолін, ірбесартан, квінаприл, а в більшому ступені комбінація квінаприлу з ангіоліном нормалізувала жирнокислотний склад ліпідів в плазмі крові щурів: відношення насичених і ненасичених жирних кислот. Ангіолін на відміну від квінаприлу та ірбесартану приводив до збільшення в мітохондріальній і цитозольній фракціях міокарду щурів з САГ вміст аденілових нуклеотидів, білку теплового шоку (HSP 70) та попереджав відкриття мітохондріальної пори, а також спричинював більш значущий, ніж препарати порівняння, нормалізуючий вплив на показники тіол-дисульфідної системи (активність глутатіонредуктази, вміст загальних відновлених тіолів) в мітохондріальній і цитозольній фракціях кардіоміоцитів, співвідношення еNOS/iNOS в міокарді, достовірно підвищуючи активність загальної NOS зменшуючи концентрацію продуктів перетворення (нітротирозину, нітритів). Разом з тим ірбесартан і квінаприл в комбінації з ангіоліном здійснювали профілактичну дію на вищезазначені показники.
8. Механізм ендотеліопротекторної дії ангіоліну підтвердженийквантово-хімічними дослідженнями, за яких визначені реакційні центри його молекули, що беруть участь у комплексоутворенні та встановлено, що ангіолін може бути переносником NO шляхом утворення з останнім стабільних S-нітрозильних комплексів та запобігати перетворенню NO під дією АФК в пероксинітрит, зберігаючи його (NO) ендотеліопротекторні властивості.
9. Встановлені показники фармакокінетики ангіоліну при введенні таблеток: максимальна концентрація сполуки становила 5879,6±1613,6 нг/мл за експериментальними результатами, за математичною моделлю 6481,4±736,2 нг/мл, середній час перебування в 180 хв Концентрація АФІ ангіоліну падала до   
   рівня 538,4±83,4 нг/мл, при обрахуванні відповідної математичної моделі   
   179,7±59,8 нг/мл, показник кліренсу 771, 9±86,5 мкг/хв–1\*кг-1. При одноразовому внутрішньовенному введенні 2,5% розчину для ін’єкцій ангіоліну в дозі 50 мг/кг максимальна концентрація в крові становила15,90±1,74 мкг/мл за математичною моделлю 14,70±1,57 мкг/мл. Досягнення максимальної концентрації в крові відбувалося за 8,2±0,8 хв, експериментальний 12,0±2,0 хв. Зниження вмісту АФІ відбувалося на 20 хв після введення, через 111,6±19,6 хв наближається до нижньої межі кількісного визначення. Даний результат є основою для розробки схеми, кратності та дозового режиму при застосуванні ангіоліну за умов подальших клінічних досліджень.
10. Теоретично обгрунтована та експериментально доведена доцільність створення на основі сполуки-лідера оригінального препарату з кардіо- та ендотеліопротекторною дією для нормалізації функціонування серцево-судинної системи за умов патологічних станів різного генезу.

**Список праць, опублікованих за темою дисертації**

1. Нагорная Е.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Мазур И.А., Бухтиярова Н.В., Волчик Ю.А., Парнюк Н.В.NO – зависимые механизмы кардиопротекторного действия препарата МТ при курсовом назначении SHR-крысам. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2013. Т. 76, № 8. С. 24-26 (Особистий внесок –участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
2. Нагорна О.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Брюзгіна Т.С.Вплив ірбесартану та ангіоліну на жирнокислотний склад ліпідів нирок при експериментальній артеріальній гіпертензії у щурів. *Український біофармацевтичний журнал.* 2014. Т. 4, № 33. С. 4-6 (Особистий внесок –участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
3. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Брюзгіна Т.С.Вплив сумісного застосування квінаприлу з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів із артеріальною гіпертензією. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2014. Т. 1, № 37. С. 73-77 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків, оформлення статті до друку).
4. Нагорна О.О., Ярош О.К., Кучеренко Л.І., Бідненко О.С. Параметри фармакокінетики таблеток «Ангіолін» у крові щурів після перорального введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2014. Т. 2, № 38.С. 64-69 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, обробка та аналіз отриманих даних, формулювання висновків і подальших перспектив, підготовка статті до друку).
5. Нагорна О.О., Кучеренко Л.І., Мазур І.А., Волуй А.В., Кузнєцова О.В., Ярош О.К.Фармакокінетичні параметри ін’єкційної форми нового метаболітотропного препарату «Ангіолін». *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2014. № 4-5 (40). С. 60-66 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, комплексна оцінка отриманих даних, формулювання висновків і подальших перспектив, підготовка статті до друку).
6. Нагорна О.О., Ярош О.К., Кучеренко Л.І., Волуй А.В., Кузнецова О.В.Кардіотропність нової ін’єкційної форми препарату «Ангіолін» після внутрішньом’язового введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2014. Т. 6, № 41. С. 87-92 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
7. Нагорна О.О., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Брюзгіна Т.С.Вплив ірбесартану, ангіоліну та їх сполучення на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів при артеріальній гіпертензії. *Вісник проблем біології і медицини.* 2014. Вип. 3, Т. 3, № 112. С. 166-169 (Особистий внесок – участь у визначенні концепції роботи,проведення експерименту, систематизація та аналіз отриманих даних, формулювання висновків, подання статті до друку).
8. Нагорна О.О., Магомедов С.О., Чекман І.С., Кузуб Т.А., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф.Дія ірбесартану в комбінації з ангіоліном на компоненти сполучної тканини щурів при експериментальній гіпертензії. *Вісник проблем біології і медицини.* 2014. Вип. 4, Т. 3, № 115. С. 156-159 (Особистий внесок – участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
9. Нагорная Е.А., Кучеренко Л.И., Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Авраменко Н.А.Фармакологическая модуляция кардиопротектором ангиолином компенсаторного малат-аспартатного шунта энергетического метаболизма в условиях экспериментального инфаркта миокарда. *Вестник новых медицинских технологий.*2014. Т. 21, № 2. С. 80-83 (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, систематизація отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
10. Нагорна О.О., Колесник Ю.М., Чекман І.С., Мазур І.А., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції та пошук ендотеліопротекторів. *Журнал Національної академії медичних наук України.* 2014. Т. 20, № 3. С. 289-299 (Особистий внесок –аналіз літературних джерел, підготовка матеріалів до друку).
11. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Кучеренко Л.Ф., Волчик Ю.А., Мазур І.А., Парнюк Н.В., Авраменко М.О., Портна О.О. Пошук речовин із кардіопротективною активністю в ряду похідних галогенідів 1-алкіл- та карбоксіалкіл-4-іліденаміно-1,2,4-триазолію. *Clinical pharmacy*. 2014. V.18, No. 3. P. 35-41 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).
12. Нагорна О.О., Магомедов С.О., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Чекман І.С., Кузуб Т.А.Вплив квінаприлу в комбінації з ангіоліном на компоненти сполучної тканини щурів при експериментальній гіпертензії. *Лікарська справа.* 2015. № 5-6. С. 116-120 (Особистий внесок – планування та проведення експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка матеріалів до друку).
13. Нагорна О.О., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В.Вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх сполучення на показники окиснювальної модифікації білків кардіоміоцитів щурів при артеріальній гіпертензії. *Вісник проблем біології і медицини.* 2015. Вип. 2, Т. 4, № 121. С. 161-164 (Особистий внесок – участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
14. Нагорна О.О., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О.Вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх комбінацій на вміст аденілових нуклеотидів, білків теплового шоку та мітохондріальну функцію. *Актуальні проблеми сучасної медицини.* 2015. Вип. 3, Т. 15, № 51, ч. 2. С. 240-246 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
15. NagornayaE.A., BelenichevI.F., KucherenkoL.I., MazurI.A., BidnenkoA.S., BukhtiyarovaN.V., AvramenkoN.A. Functionalnitricoxideconjugatesystemsstate/restoredheartthiolsofratsinmodelingisadrine-pituitrin’smyocardialinfarctionusingmetabolite-tropiccardioprotector «Angiolin». *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology.* 2015. V. 4, No 1. Р. 15-19 (Особистий внесок – аналіз отриманих результатів, формулювання висновків,підготовка матеріалів до друку).
16. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Чекман І.С. Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їх комбінацій на показники тіол-дисульфідної системи в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 2, Т. 3, № 130. С. 169-173 (Особистий внесок – планування та проведення експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
17. Нагорна О.О., Мазур І.А., Кучеренко Л.І., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О.Вплив ангіоліну на морфофункціональні характеристики кардіоміоцитів щурів при хронічній серцевій недостатності. *Вісник проблем біології і медицини.* 2016. Т. 1, № 3 (131). С. 206-210 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення матеріалів до друку).
18. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Кучеренко Л.І., Мазур І.А., Чекман І.С.Дія ангіоліну на показники прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в міокарді щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Т. 1, № 3 (131). С. 117-120 (Особистий внесок – участь у проведенні дослідження, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка матеріалів до друку).
19. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Чекман І.С.Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на систему оксиду азоту в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2016. № 4-5 (50). С. 70-77 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
20. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Кучеренко Л.І., Мазур І.А., Чекман І.С.Вплив ангіоліну на показники енергетичного обміну в міокарді щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2016. Т.16, Вип. 4, (56), ч.1. С. 273-277 (Особистий внесок – участь у розробці концепції роботи, проведенні експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення статті до друку).
21. NahornaE.A., ChekmanI.S., BelenichevI.F., KolesnikY.M, AbramovA.V., GorchakovaN.A., LevichS.V. MolecularandBiochemicalMechanismsofMitochondrialDysfunctioninSpontaneouslyHypertensiveRats. *BiologicalMarkersandGuidedTherapy.* 2016. Vol. 3, No 1. P. 73-87 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків).
22. Nagornaya E.A., Belenichev I.F., Mazur I.A., Kucherenko L.I., Gorbacheva S.V., Bidnenko A.S.The Molecular and Ultrastructural Aspects of the Formation of Mitochondrial Dysfunction in the Modeling of Chronic Cerebral Ischemia: The Mitoprotective Effects of Angiolin. *Neurochemical Journal*. 2016. V. 10, No 2, P. 131-136 (Особистий внесок – аналіз літературних даних, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків).
23. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Чекман І.С.Вплив ангіоліну на показники системи оксиду азоту в міокарді щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 4, Т. 2 (134). С. 96-99 (Особистий внесок –участь у розробці концепції роботи, проведенні експерименту, статистична обробка отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка матеріалів до друку).
24. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Кучеренко Л.І., Чекман І.С. Вплив ангіоліну на показники тіол-дисульфідної системи в міокарді щурів з хронічною серцевою недостатністю. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017. Т. 17, Вип. 1 (57). С. 248-251 (Особистий внесок –участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
25. Нагорна О.О. Зайченко Г.В., Горчакова Н.О., Шумейко О.В., Білки теплового шоку – нова ланка в механізмах дії лікарських засобів. *Вісникпроблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4, Т. 1 (139). С.31-41 (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, підготовка матеріалів до друку).
26. Нагорна О.О., Чекман І.С., Казакова О.О., Мазур І.А., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В., Сирова Г.О., Довгань Р.С., Загородний М.І. Новий оригінальний метаболітотропний ендотеліопротектор «ангіолін»: квантово-хімічні параметри та особливості фармакологічної дії. *Доповіді Національної академії наук України: Науково-теоретичний журнал Президії НАН України*. 2017. № 8. С. 86-93 (Особистий внесок – участь у розробці концепції роботи, проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
27. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Чекман І.С.Вплив ангіоліну на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів у щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю. *Український журнал медицини, біології та спорту.* 2017. № 3 (5). С. 21-25 (Особистий внесок – участь у проведенні експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).
28. Нагорна О.О. Вплив ангіоліну на показники кардіо- та системної гемодинаміки при хронічній серцевій недостатності у кролів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. № 5 (7).С. 55-58.
29. Нагорна О.О. Вплив ангіоліну та мілдронату на інтегративні показники стійкості організму, вміст білку, морфометричні маркери в міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2018. Т. 18, Вип. 1 (61). С. 181-184.
30. Нагорна О.О. Вплив похідних 1,2,4-триазолу на сполучені системи: відновлені тіоли / NO in vitro. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2018. Т. 18, Вип. 2 (62). С. 160-168.
31. Загородній М.І. Експериментальна артеріальна гіпертензія: вплив лікарських засобів / М.І. Загородній, Р.С. Довгань, О.О. Нагорна, Л.І. Кучеренко, І.А. Свінціцький. – Київ: «Задруга», 2014. – 280 с. (Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи).
32. Беленичев И.Ф. Нейропротекция и нейропластичность / И.Ф. Беленичев, В.И. Черний, Е.А. Нагорная, С.В. Павлов, Т.В. Черний, Н.В. Бухтиярова, И.А. Андрогова, Л.И. Кучеренко, Н.А. Горчакова. – Киев: «Логос», 2015. – 510 с. (Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи, підготовка до друку окремих частин).
33. Чекман И.С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных эндотелипротективных препаратов / И.С.Чекман, И.Ф. Беленичев, Е.А. Нагорная, Н.А. Горчакова, Н.В. Бухтиярова, А.В. Абрамов, Л.И. Кучеренко. – Методические рекомендации, Киев 2014, 60 с.
34. Чекман І.С. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції / І.С. Чекман, І.Ф. Бєленічев, О.О. Нагорна, Н.О. Горчакова, В.Д. Лук’янчук, Н.В. Бухтіярова, С.В. Горбачова, Г.О. Сирова. – Методичні рекомендації, Київ 2016, 80 с.
35. Пат. 105618 Україна, (51) МПК(2014.01): A61K 31/4196 (2006.01), A61P 25/00, A61P 9/10 (2006.01) Застосування броміду 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію як активної основи лікарських засобів для корекції порушень функціонування нітроксидергічної системи органа-мишені-мозку при гострих порушеннях мозкового кровообігу / Мазур І.А., Бєленічев І.Ф., Кучеренко Л.І., Чекман І.С., Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Бухтіярова Н.В., Парнюк Н.В., Нагорна О.О., Авраменко М.О., Волчик Ю.А - 201312038 заявл. 14.10.2013; опубл. 26.05.2014, Бюл. № 10.
36. Пат. 90901 Україна, (51) МПК G01N 33/68 (2006.01) Спосіб оцінки ефективності використання квінаприлу в комбінації з лізинієм при експериментальній артеріальній гіпертензії / Нагорна О.О., Брюзгіна Т.С., Горчакова Н.О., Чекман І.С. -201400889 заявл. 31.01.2014; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 11.
37. Пат. 90903 Україна, (51) МПК G01N 33/68 (2006.01) Спосіб оцінки ефективності використання ірбесартану в комбінації з лізинієм при експериментальній артеріальній гіпертензії / Нагорна О.О., Брюзгіна Т.С., Горчакова Н.О., Чекман І.С.- 201400891 заявл. 31.01.2014; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 11.
38. Нагорна О.О., Горчакова Н.О.Вплив фулерену С60(ОН)24 на стан оксидантної системи. *Український науково-медичний молодіжний журнал.Спец. вип. до 170-річчя кафедри фармакології та клінічної фармакології НМУ ім. О.О.Богомольця, 25-26 травня 2011 р.* 2011. № 4.С. 71.
39. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С.Вплив лізінію на діяльність серця і показників системної гемодинаміки кролів в умовах експериментального міокардиту. *Людина та ліки України.* VI Національний конгрес 21-22 березня 2013 р. Київ. С. 47.
40. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С.Порівняльна антигіпертензивна активність ірбесартану, квінаприлу, лізінію в експериментах на щурах зі спонтанною артеріальною гіпертензією. Мат. ХІІ з’їзду Всеукраїнського лікарського Товариства (ВУЛТ), 05-07 вересня 2013 р. Київ,«Українські медичні віст», 2013. Т. 10, № 1-4 (76-79). С.274–275.
41. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С.Вплив ірбесартану, квінаприлу, лізінію та їх комбінації на артеріальний тиск щурів зі спонтанною гіпертензією. Мат. Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання внутрішньої медицини», присвячені 100 річчю з дня народження професора А.П.Полещука, Київ, 26-27 вересня 2013 р. Київ, «Український медичний часопис», 2013. С. 35.
42. Нагорна О.О., Стежка В.А., Горчакова Н.О., Чекман І.С.Вплив ірбесартану на процеси ліпідної пероксидації щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією. Мат. Науково-практичної конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків» 17-18 жовтня, 2013 р. м. Тернопіль, 2013. С. 78.
43. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С., Брюзгіна Т.С. Вплив ірбесартану, квінаприлу, лізінію та їх комбінацій на жирнокислотний склад ліпідів зі спонтанною артеріальною гіпертензією. Мат. VII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань у світлі доказової медицини», Вінниця, 25-26 листопада 2013 р. Вінниця, «Нілан-ЛТД», С. 52–53.
44. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Брюзгіна Т.С.Медико-соціальні аспекти підвищення ефективності комбінації інгібіторів АПФ з метаболітотропними препаратами. Мат. міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої Всесвітньому дню здоров’я, Київ, 7-9 квітня 2014 р. Київ, «Український науково-медичний молодіжний журнал», №2 (78), С. 173.
45. Нагорная Е.А.,Беленичев И.Ф., Чекман И.С., Кучеренко Л.И., Парнюк Н.В., Горчакова Н.А., Бухтиярова Н.В., Мазур И.А., Волчик Ю.А. Энергопродуцирующая функция митохондрий SHR-крыс на фоне экспериментальной терапии новым β-адреноблокатором с NO-модулирующим эффектом гипертрил. Мат. ХХI российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 7-11 апреля, 2014 г. Москва, ЗАО РИЦ «Человек и лекарство», 2014.С. 297–298.
46. Нагорная Е.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Чекман И.С., Мазур И.А., Горчакова Н.А., Бидненко А.С., Стеблюк В.С.Разработка и создание метаболитотропных эндотелиопротекторов на основе s-замещенных 1,2,3-триазола: пример ангиолина. Мат. ХХI российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 7-11 апреля, 2014 г. Москва, ЗАО РИЦ «Человек и лекарство», 2014.С. 156.
47. Нагорная Е.А., Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Волчик Ю.А., Бухтиярова Н.В., Горчакова Н.А., Чекман И.С.Возможности коррекции нарушений в нитроксидергической системе миокарда SHR крыс: фокус на β-адреноблокатор с NO-модулирующим эффектом.Мат. XV Національного конгресу кардіологів України, Київ, 23-25 вересня, 2014 р. Київ, «Український Кардіологічний Журнал», 2014. дод. 4,С. 182-183.
48. Нагорная Е.А., Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Горчакова Н.А., Чекман И.С. Энерготропные аспекты кардиопротективного действия ангиолина: HSP70-опосредованные механизмы реализации.Мат. XV Національного конгресу кардіологів України, Київ, 23-25 вересня, 2014 р. Київ. «Український Кардіологічний Журнал», 2014. дод. 4, С. 183.
49. Нагорна О.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Брюзгіна Т.С.Вплив квінаприлу з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів нирок щурів при артеріальній гіпертензії. Мат. Конгресу СФУЛТ, Чернівці-Київ-Чікаго, 16-18 жовтня, 2014 р. Київ, «Українські Медичні Вісті», 2014. Т.11, С. 364.
50. Нагорна О.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф. Вплив ірбесартану на фракції гідроксипроліну в сироватці крові щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією та активність колагенази. Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання експериментальної і клінічної біохімії та фармакології», Тернопіль, 9-10 жовтня 2014 р. Тернопіль, «ТДМУ: Укрмедкнига»,2014. С. 89.
51. Нагорна О.О., Мазур І.А., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В.Вплив ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їх сполук на активність глутатіонредуктази та вміст сумарних тіолових сполук в міокарді щурів з артеріальною гіпертензією. Мат. VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», Вінниця, 9-10 листопада, 2015 р. Вінниця, «Нілан-ЛТД», 2015. С. 189-190.
52. Нагорная Е.А., Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Горчакова Н.А.Перспективные звенья-мишени эндотелиопротекции. Первый опыт создания метаболитотропного эндотелиопротектора «Ангиолин».Мат. конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування», Київ, 12-13 листопада, 2015р. Київ, «Кровообіг та гемостаз», 2015. № 1-2,С. 111-112.
53. Nagornaya E.A.,Chekman I.S.,Belenichev I.F.,Gorchakova N.A., Buchtiarova N.A.,Levich S.V.Participation of mitochondria of neurons in the initiation of signaling pathways of neuroapoptosis in spontaneously hypertensive rats. Мat. of 3rd International Conference onHeart & Brain, Paris, February 25-27, 2016 y. Paris, **ICHB 2016**, Abstr. (№035).
54. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Мазур І.А., Кучеренко Л.І., Горчакова Н.О., Чекман І.С. Вплив ангіоліну на інтегративні показники стану та лабораторні дані щурів з хронічною серцевою недостатністю. Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої пам’яті професора В.В. Дунаєва: «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», Запоріжжя, 24-25 листопада, 2016 р. Запоріжжя, «ЗапорізькийДержавний медичний університет», 2016. С. 58-59.
55. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Кучеренко Л.І., Чекман І.С. Ангіолін – засіб з ендотеліопротекторними та протиішемічними властивостями. Мат. I Міжнародної науково-практичної конференції «Ліки – Людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», Харків, 30-31 березня, 2017 р. Харків, «НФаУ» , 2017. Т.2, С. 230-231.
56. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О.,Мазур І.А.,Чекман І.С.Кардіопротекторні властивості ендотеліопротектора ангіоліну при експериментальному інфаркті міокарда. Мат. Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми клінічної фармакології з позиції доказової медицини», Тернопіль, 13-14 квітня, 2017 р. Тернопіль, «Тернопільський державний медичний університетім. І.Я. Горбачевського», 2017. С. 49-50.
57. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Бєленічев І.Ф., Мазур І.А., Яковлєва І.Ю.Чекман І.С.Кардіопротективна дія метаболітотропнихзасобів при руховій гіпоксії. Мат. Х міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції«Сучасні аспекти збереження здоров’я людини», Ужгород, 21-22 квітня, 2017 р. Ужгород, «УжНУ», 2017. С. 298-299.
58. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Чекман І.С.Вплив ангіоліну на показники енергетичного обміну міокарду при гострому інфаркті у щурів. Мат. Х міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції«Сучасні аспекти збереження здоров’я людини», Ужгород, 21-22 квітня, 2017 р. Ужгород, «УжНУ», 2017.С. 331-333.
59. Нагорная Е.А., Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Горчакова Н.А., Рыженко О.О.Возможный механизм нейропротективного действия нового оригинального препарата «Ангиолин».Мат. V Національного з’їзду фармакологів України, Запоріжжя, 18-20 жовтня, 2017 р. Запоріжжя, ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017.С. 84-85.
60. Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Чекман І.С.Визначення антиішемічного впливу ангіоліну. Мат. V Національного з’їзду фармакологів України, Запоріжжя, 18-20 жовтня, 2017 р. Запоріжжя, ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017. С. 98-99.

**АНОТАЦІЯ**

**Нагорна О.О. Кардіо- та ендотеліопротекторні властивості похідних 1,2,4-триазолу. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». – Київ, 2018.

У дисертаційній роботі проведено скринінг in vitro 11 сполук, похідних 1,2,4-триазолу та визначена сполука-лідер ангіолін, що перевищувала за антиоксидантною активністю інші досліджувані речовини.

Проведені дослідження гострої токсичності ангіоліну на 3-х видах тварин при різних шляхах введення, за результатами яких він віднесений до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини). В експериментах на щурах при тривалому введенні встановлена відсутність загальнотоксичної дії ангіоліну. Ангіолін не має кумулятивних властивостей. Визначена ефективна доза ангіоліну, яка становить при внутрішньоочеревинному введенні(50 мг/кг).При ГІМ та ХСН досліджений нормалізуючий вплив ангіоліну більш виражений в порівнянні з мілдронатом на показники: ЕКГ, ЧСС, ST, морфофункціональні характеристики міокарда, біохімічні: показники системи синтезу, метаболізму, транспорту оксиду азоту, тіол-дисульфідної системи, енергетичного обміну, прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у щурів. При введенні ангіоліну кролям з ХСН відновлювалась скоротлива функція лівого шлуночка. У щурів із САГ препарат не змінював АТ, але нормалізував в монотерапії та в комбінації з ірбесартаном і квінаприломвміст маркерів окислювальної модифікації білків (АФГ, КФГ), вміст аденілових нуклеотидів, білку теплового шоку (HSP 70), співвідношення еNOS/iNOS, зменшуючи концентрацію продуктів перетворення (нітротирозину, нітритів), попереджав відкриття мітохондріальної пори міокарда та відновлював жирнокислотний склад ліпідів в плазмі крові щурів. Встановлені показники фармакокінетики ангіоліну в розчині для ін’єкцій та таблетках. Квантово-хімічними дослідженнями визначена роль ангіоліну в перенесенніNO та запобіганні перетворенні NO в пероксинітрит, зберігаючи його ендотеліопротекторні властивості.

Експериментальні дані свідчать про те, що Ангіолін володіє вираженою кардіопротекторною, ендотеліопротекторною активністю, в основі якої лежить здатність препарату послаблювати прояви ендотеліальної дисфункції і структурно відновлювати функціональні порушення міокарда.

**Ключові слова:** ангіолін, квінаприл, ірбесартан, мілдронат, гострий інфаркт міокарда, хронічна серцева недостатність, енергетичний обмін, метаболізм оксиду азоту, антиоксидантна дія, кардіо- та ендотеліопротекторні властивості.

**SUMMARY**

**Nagorna O.O.Cardio- and endothelial-protective properties of derivatives of 1,2,4-triazole.– Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.**

Thesis for the degreeofDoctor ofMedicalSciences in specialty 14.03.05 –Pharmacology.SI«InstituteofPharmacologyandToxicologyoftheNational AcademyofMedical SciencesofUkraine»,Kyiv, 2018.

In the basis of the pathogenesis of cardiovascular disease, the leading role is given to endothelial vascular dysfunction, which can be the pathobiochemical target of the effect of corrective medicines.

It is known that many medicines with different mechanisms of indirect action on the function of vascular endothelium (ACE inhibitors, AT-II receptor blockers, L-lysine escinate, and medicines of metabolitotropic action).

The active substance (S)-2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolo-5-thioacetate (the working name of Lizini, the new name isAngiolin) was synthesized in the Pharmatron Research Institute for the purpose of creating an effective metabolitotropic endothelioprotector which combines in its structure fragments of the molecules of thiotriazolin and L-lysine escinate and has high anti-ischemic, cardioprotective, neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory properties.

Due to the fact that endothelial dysfunction is a consequence of oxidative and nitrosating stress, screening of 11 compounds among 1,2,4-triazole derivatives was carried out on suspension of neurons in rats, among which angiolin was identified as a leader compound that exceeds anti-oxidant properties of other investigating substances.

In order to determine the safety of angiolin, experiments were conducted to study its acute and chronic toxicity on 3 species of animals by different ways of administration.These experiments showed that the medicine belongs to the class V of toxicity (practically non-toxic substances).

To determine and evaluate the average effective dose (ED50), studies were conducted on model of acute myocardial infarction. As a result of these studies, it was found that the effective dose of «Angiolin» is – 50 mg/kg.

Subsequently, the effect of the direct endothelioprotector angiolin and the metabolitotropic medicine of indirect action of mildronate on the ECG measures ​​of rats, morphofunctional and biochemical characteristics of the myocardium, in acute myocardial infarction were compared.Angiolin (50 mg/kg) to a greater extent than mildronate (100 mg/kg) normalized ECG measures ​​in rats, significantly lowering the heart, reducing the ST deviation, restoring to the control level the T wave amplitude. Angiolin normalized to a greater extent than mildronate morphofunctional characteristics of the myocardium, namely, reduced the necrosis region, increasing the concentration of RNA nuclei of cardiomyocytes, cytoplasm by.In this case, angiolin, in comparison with mildronate, to a greater extent reduced the tendency of nuclei of apoptotic destructively altered cardiomyocytes.Angiolin renewed the parameters of the synthesis system, metabolism, transport of nitric oxide (activity ofNO-synthase, NO content, nitrotirosine, L-arginine) and thiol-disulphide system (content of methionine, cysteine, reduced sulfhydryl groups), energy metabolism indices (adenine nucleotide content, glycogen, glucose-6-phosphate, pyruvate, isocitrate, malate, creatine phosphokinase activity, malate dehydrogenase, cytochrome C-oxidase), prooxidant-antioxidant homeostasis (level of AFG, CFG, glutathione peroxidase SOD activity).In acute myocardial ischemia which was modeled by the occlusion of the branch of the descending coronary artery of rats, angiolin restored more than mildronatethe content of ATP, activity of creatine phosphokinase in the myocardium and showed antioxidant action, reducing the content of AFG, CFG.In acute myocardial ischemia in rabbits, which was modeled by the introduction of caffeine and adrenaline, angiolin, by prophylactic intravenous administration (50 mg/kg) reconstructed the parameters of the contractile activity of the myocardium RILSH, RUILSH, Рmax and arterial pressure which exceeded the effect of mildronate.

On the model of doxorubicin chronic cardiac insufficiency in rats, angiolin to a greater extent than mildronate increased motor activity on 35th day, prevented the development of myocardial hypertrophy and prevented the loss of protein in the cytoplasm and mitochondria, reduced the density of nuclei of apoptotic and destructively altered cardiomyocytes, increasing the area, the density of nuclei, concentrationRNA in the nuclei and the cytoplasm of cardiomyocytes, prevented the development of fibrosis and restored morphometric indices of endothelial cells.In chronic heart failure in rats, angiolin increased to a greater extent than mildronate the content of total NO synthase, L-arginine, eNOS density, decreased iNOS, the level of metabolites NO, nitrotirosin, reduced the levels of thiol-disulphide system (content of methionine, cysteine, totalrecovered thiols, glutathione reductase activity, glutathione peroxidase).Angiolin increased the level of energy metabolism of myocardium in rats with CHF (adenine nucleotide, lactate, pyruvate, malate, glutamate, aspartate, creatine phosphokinase activity).At an intravenous administration of angiolin (100 mg/kg), rabbits with doxorubicin CHF observed the restoration of the fraction of the left ventricle, which was reflected by an increase in RILS, by RUILSH, and by left ventricular resection.

In rats of SHR angiolin 100 mg/kg and its combination with irbesartan and quinapril reduced the content of markers of oxidative modification of proteins (AFG, KFG), increases intracellular content of of adenine nucleotides, a heat shock protein (HSP 70), the ratio of eNOS/iNOS, normalizes fatty acid composition of lipids in blood plasma.

To determine the main active angiolin centers, the study of its quantum-chemical properties was carried out.

For further application and obtaining permission for clinical trials the pharmacokinetic characteristics of angiolin were determined for oral and parenteral administration.

**Keywords:**angiolin, quinapryl, irbesartan, mildronat, acute myocardial infaction, chronic cardial failure, energetic balance (metabolism), nіtric oxide metabolism, anti-oxidative action, cardio-endotheliоprotective action

**АННОТАЦИЯ**

**Нагорная Е.А. Кардио- и ендотелиопротекторные свойства производных 1,2,4-триазола. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Государственное учреждение «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». – Киев, 2018.

В диссертационной работе проведен скрининг in vitro 11 соединений, производных 1,2,4-триазола и определено соединение-лидер ангиолин, которое превышает по антиоксидантной активности другие исследуемые вещества.

Проведены исследования острой токсичности ангиолина на 3-х видах животных при различных путях введения, по результатам которых он отнесен к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества). В экспериментах на крысах при длительном введении установлено отсутствие общетоксического действия ангиолина. Ангиолин не имеет кумулятивных свойств. Определена эффективная доза ангиолина, которая составляет при внутрибрюшинном введении (50 мг/кг). При ОИМ и ХСН исследовано нормализующее влияние ангиолина, более выраженное по сравнению с милдронатом на показатели: ЭКГ, ЧСС, ST, морфофункциональные характеристики миокарда, биохимические: показатели системы синтеза, метаболизма, транспорта оксида азота, тиол-дисульфидной системы, энергетического обмена, прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза у крыс. При введении ангиолина кроликам с ХСН восстанавливалась сократительная функция левого желудочка. У крыс с САГ препарат не изменял АД, но нормализовал в монотерапии и в комбинации с ирбесартаном и квинаприлом содержание маркеров окислительной модификации белков (АФГ, КФГ), содержание адениловых нуклеотидов, белка теплового шока (HSP 70), соотношение еNOS/iNOS, уменьшая концентрацию продуктов преобразования (нитротирозина, нитритов), предупреждал открытие митохондриальной поры миокарда и восстанавливал жирнокислотный состав липидов в плазме крови крыс. Определены показатели фармакокинетики ангиолина в растворе для инъекций и таблетках. Квантово-химическими исследованиями определена роль ангиолина в переносе NO и предотвращении преобразования NO в пероксинитрит, сохраняя его эндотелиопротекторные свойства.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ангиолин обладает выраженными кардиопротекторной, эндотелиопротекторной активностями, в основе которых лежит способность препарата ослаблять проявления эндотелиальной дисфункции и структурно восстанавливать функциональные нарушения миокарда.

**Ключевые слова:** ангиолин, квинаприл, ирбесартан, милдронат, острый инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, энергетический обмен, метаболизм оксида азота, антиоксидантное действие, кардио- и эндотелиопротекторные свойства.

**Перелік умовних скорочень**

DNIC – динітрозольний комплекс заліза

iNOS – індуцибельна синтаза оксиду азоту

еNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту

HIF-1α – фактор, що індукується гіпоксією

NO – оксид азоту

VEGF –(vascular endothelial growth factor) –фактор росту ендотелію судин

АГ – артеріальна гіпертензія

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

АДФ – аденозиндифосфорна кислота

АМФ – аденозинмонофосфорна кислота

АФГ – альдегідфенілгідразони

АФК – активні форми кисню

ГПР – глутатіонпероксидаза

ГПМК – гостре порушення мозкового кровообігу.

ГР – глутатіонредуктаза

ЕД – ендотеліальна дисфункція

ГІМ –гострий інфаркт міокарда

КФГ – кетонфенілгідразони

кфк-цт – активність креатинфосфокінази в цитоплазмі

кфк-мх – активність креатинфосфокінази в мітохондріях

ЛШ – лівий шлуночок

МДГ – малатдегідрогеназа

МВ КФК – активність ізоензиму креатинфосфокінази в сироватці крові

ОМБ – окисна модифікація білка

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

РІЛШ – робочий індекс лівого шлуночка

РУІЛШ – робочий ударний індекс лівого шлуночка

ХСН – хронічна серцева недостатність

ЧСС – частота серцевих скорочень

|  |
| --- |
| Підписано до друку 30.08.2018 р. Формат 60×84/16. Обсяг 1,9 авт. арк. Зам. 205. Наклад 100. |
| Друкарня НМУ, Київ – 57, проспект Перемоги, 34 |