

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЦУБАНОВА НАТАЛЯ АНАТОЛІВНА

УДК 616-005.4:615.217.34:547.756

АНТИГІПОКСИЧНІ ТА ОРГАНОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ  
СПРОЦИКЛІЧНИХ ПОХІДНИХ ОКСИНДОЛУ  
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.03.05 – фармакологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора фармацевтичних наук

Харків – 2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор

**ШТРИГОЛЬ Сергій Юрійович,**

Національний фармацевтичний університет,  
завідувач кафедри фармакології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор

**ДЕВ'ЯТКІНА Тетяна Олексіївна**

Українська медична стоматологічна академія

професор кафедри експериментальної та клінічної фармакології  
з клінічною імунологією та алергологією

доктор медичних наук, професор

**ГОРЧАКОВА Надія Олександрівна,**

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,  
професор кафедри фармакології та клінічної фармакології

доктор фармацевтичних наук, доцент

**СИРОВА Ганна Олегівна,**

Харківський національний медичний університет,  
завідувач кафедри медичної та біоорганічної хімії

Захист відбудеться “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2013 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті

за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м Харків, вул. Блюхера,4)

Автореферат розісланий “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2013 р.

Вчений секретар спеціалізованої  
вченої ради, д.фарм.н., проф.

Т.С. Сахарова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Гіпоксія є типовим патологічним процесом, проте ефективність її лікування часто залишається недостатньою. Науковий інтерес до антигіпоксантив обумовлений тим, що у патогенезі більшості захворювань людини має місце гіпоксія (K. Sun, Y. Xia, 2013).

Окремі органи завдяки відмінностям тканинного метаболізму мають різну чутливість до гіпоксії. При гіпоксії в найнесприятливіших умовах перебуває нервова система (в першу чергу головний мозок), яка є найбільш чутливою до нестачі кисню та енергетичного голодування, що виникає внаслідок цього (A.N. Moskvina, 2013, I.C. Зозуля, 2012). Гіпоксичні зміни метаболізму індукують порушення збудливості, провідності та скорочуваності міокарда, що клінічно виявляється в першу чергу аритмією, оскільки скорочувальні елементи більш стійкі, ніж провідна система серця (M. Singh, et al., 2013). Чутливими до гіпоксії є також нирки. Під впливом гіпоксії початкова поліурія змінюється подальшим глибоким порушенням функції нирок і водно-сольового гомеостазу тощо (K. Nakayama, M. Nangaku, 2013). У печінці на тлі гіпоксії порушується система мікросомального окиснення, страждає детоксикація ендогенних метаболітів і ліків, гальмуються синтетичні процеси (O.O. Danchenko, et al, 2012). Перш за все страждають найчутливіші органи, про що йшлося вище, спостерігається також пригнічення рухової функції травного тракту, зниження секреторної активності шлунка, кишок і підшлункової залози (Y. Jin, et al., 2012).

Негайні компенсаторні реакції організму на гіпоксію, що розвиваються головним чином у системах транспорту кисню (гіпервентиляція, посилення кровообігу, збільшення кількості еритроцитів та гемоглобіну, зміни кривої дисоціації оксигемоглобіну), з часом змінюються на довготривалі компенсаторні реакції. Останні формуються в системах, які несуть переважне навантаження при гіпоксії та найбільше страждають від нестачі кисню (С.Г. Бурчинський, 2012). Виникають явища гіперплазії і гіпертрофії, це на певний час нормалізує інтенсивність функціонування структур, і таким чином аварійна гіперфункція дістає пластичного та енергетичного забезпечення. При виснаженні або недостатності пристосувальних механізмів розвиваються патологічні порушення, провідною ланкою яких є зниження енергоутворення (S.N. Basovich, 2013). При зниженні активності процесів мітохондріального окиснення в першу чергу пригнічується активність НАД-залежних дегідрогеназ циклу Кребса на тлі збереження активності ФАД-залежної сукцинатоксидази (І.Ф. Беленічев, 2009). Порушення мітохондріального окисного фосфорилування призводить до прогресуючого дефіциту АТФ - універсального джерела енергії у клітині (T.R. Arnett, 2010).

Відсутність раціональної класифікації антигіпоксантив, обмежений асортимент препаратів вітчизняного виробництва, а з іншого боку поширеність захворювань, що викликані та/або супроводжуються гіпоксією, обумовлюють актуальність розробки нових препаратів цього фармакологічного напрямку дії, з урахуванням переважної тропності до різних органів.

Пошук та дослідження нових біологічно активних речовин, які були б спроможні коригувати порушення метаболізму органів та тканин в умовах

гіпоксії різного генезу, є важливим напрямом медицини та фармації сьогодення (S.V. Okovityi, et al., 2012).

На базі НФаУ у межах наукової програми створення нових синтетичних субстанцій к.ф.н. Редькіним Р.Г. під керівництвом проф. Шемчука Л.А. синтезовано низку оригінальних спіроциклічних похідних оксиндолу з метою пошуку ефективних сполук із антигіпоксичною активністю. За результатами комп'ютерного прогнозування (PASS) від деяких з них можна очікувати високу антигіпоксичну активність. Отже, з урахуванням вищезазначеного потрібно дати різнобічне експериментальне обґрунтування доцільності створення на їх основі лікарських препаратів з органопротекторною дією.

**Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами.** Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету МОЗ України у рамках теми «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці», державний реєстраційний номер 01103U000478. Тему дисертаційної роботи затверджено рішеннями Проблемної комісії «Фармація» (протокол №50 від 20.02.2008 р.) НФаУ МОЗ України та Проблемної комісії «Фармакологія» (протокол №2 від 28.03.2012 р.), державної установи «Інститут фармакології та токсикології» НАМН України.

**Мета роботи** – експериментальне вивчення антигіпоксичних властивостей спіроциклічних похідних оксиндолу та дослідження органопротекторної активності сполуки лідера на тлі гіпоксичних та негіпоксичних уражень центральної нервової системи, серця, нирок та печінки.

**Задачі дослідження:**

1. Провести скринінг спіроциклічних оксиндольних похідних на антигіпоксичну активність, з'ясувати залежність «структура-дія» у даному ряді та відібрати найбільш активну сполуку для подальшого вивчення, для якої дослідити хронофармакологічні особливості дії.

2. Провести дослідження церебропротекторної активності сполуки-лідера на модельних ураженнях головного мозку.

3. Дослідити супутні психотропні властивості досліджуваної сполуки (визначити вплив на поведінку експериментальних тварин, з'ясувати можливу антидепресивну, анксиолітичну, антиамнестичну дії).

4. Вивчити кардіопротекторну дію досліджуваної сполуки на моделях ураження серця ішемічного та неішемічного генезу (модель діатермокоагуляційного інфаркту міокарда, гострого оклюзійного інфаркту міокарда та ізадринного міокардиту).

5. Дослідити нефропротекторну дію досліджуваної сполуки на моделях ураження нирок ішемічного та неішемічного генезу (модель ішемічної гострої ниркової недостатності, токсичної етиленгліколевої ниркової недостатності).

6. Провести дослідження гепатопротекторної дії досліджуваної сполуки на моделях ураження печінки ішемічного та неішемічного генезу (гострої ішемічної печінкової недостатності та тетрахлорметанового гепатиту).

7. З'ясувати біохімічні механізми реалізації антигіпоксичної і супутніх видів фармакологічної активності сполуки-лідера в різних органах (стан енергетичного обміну, в т.ч. пул макроергів, показники кислотно-лужної рівноваги, прооксидантно-антиоксидантного балансу).

8. З'ясувати вплив досліджуваної сполуки на інтенсивність процесів деструкції нейронів кори головного мозку, як найчутливіших до гіпоксії клітин за критеріями активності нейронспецифічної енолази та маркеру апоптозу – фрагментації ДНК.

9. Вивчити вплив сполуки-лідера на рівень моноамінів у головному мозку.

10. Провести порівняльний аналіз захисного впливу нової сполуки на органи з різною чутливістю до гіпоксії залежно від генезу первинних порушень.

11. Визначити показники гострої та хронічної токсичності сполуки-лідера.

Наведений перелік досліджень стане підставою для експериментального обґрунтування доцільності застосування спіроциклічного похідного оксиндолу в медичній практиці як антигіпоксанта з виразною органотропністю.

*Об'єкт дослідження:* пошук нових лікарських засобів з антигіпоксичною дією.

*Предмет дослідження:* антигіпоксична, церебропротекторна, ноотропна, антидепресивна, анксиолітична, кардіопротекторна, нефропротекторна, гепатопротекторна активності 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндолу].

*Методи досліджень:*

1. Фармакологічні – всього 12 моделей, 6 тестів та 7 методів досліджень.

2. Біохімічні – визначення рівня моноамінів головного мозку, дослідження активності нейронспецифічної енолази, фрагментації ДНК, показників кислотно-лужного балансу, показників системи ПОЛ-АОС, вивчення пулу макроергів (АТФ, АМФ, АДФ); вимірювання біохімічних показників, які характеризують функціональний стан головного мозку, міокарда, нирок та печінки.

3. Гістологічні (дослідження гістоструктури головного мозку, міокарда, нирок, печінки).

4. Токсикологічні (дослідження гострої та хронічної токсичності).

5. Статистичні (параметричні та непараметричні методи, кореляційний аналіз).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше фармакологічно вивчено новий клас сполук – структурних аналогів мелатоніну, синтезованих на основі спіроциклічного похідного оксиндолу. За результатами скринінгу 29 сполук на моделях нормобаричної та гемічної гіпоксії визначено закономірності зв'язку «структура-антигіпоксична дія». Встановлено, що поєднання трьох фармакофорів а саме: 3-метилізатину, 4-гідрогсікумарину та малондінітрилу з одночасним введенням метильної групи у 5 положення базового ядра молекули (сполука 77, 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідро-пірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол]) посилює антигіпоксичний ефект похідних оксиндолу. Для сполуки-лідера (лабораторний шифр 77) знайдено ефективну дозу (5 мг/кг) та доведено відсутність залежності антигіпоксичної дії від добових біоритмів.

Вперше проведено комплексне вивчення органопротекторної активності сполуки 77 в умовах експериментальних патологій ішемічного та неішемічного генезу. Досліджено вплив на функціональні, біохімічні, морфологічні показники органів із різною чутливістю до гіпоксії – головного мозку, серця, нирок, печінки.

Встановлено, що сполука 77 відновлює кровобіг за ішемії-реперфузії головного мозку на рівні вінпоцетину. За достовірним збільшенням виживаності тварин, нормалізацією функціональних показників ЦНС церебропротекторна дія нової сполуки вірогідно перевищує активність пірацетаму на тлі гострої церебральної ішемії. За гістологічними даними сполука 77 значно знижує процеси нейрональної деструкції, зменшує периваскулярний та перицелюлярний набряк, перевищуючи захисний вплив пірацетаму. Церебропротекторну активність сполуки 77 доповнює вперше встановлена психотропна дія (ноотропна, антидепресивна, анкіоселективна без погіршення м'язового тону та координації рухів).

Вперше доведено кардіопротекторну дію сполуки 77. На двох моделях гострого ІМ вона не поступається мексидолу за збільшенням виживаності, нормалізацією ЕКГ, АТ, ЧСС та серцевого викиду. На моделі гострого ізадринного міокардиту антицитолітична та антиоксидантна активність сполуки 77 перевищує таку мексидолу. Виразність захисної дії на міокард сполуки 77 за попередженням розвитку мікронекрозів, рівнем фібробластів, зменшенням периваскулярного набряку переважає ефективність мексидолу.

Встановлено діуретичну активність нової сполуки у здорових тварин за рахунок пригнічення каналцевої реабсорбції. За умов ішемічної та етиленгліколевої ГНН доведено нефропротекторний ефект сполуки 77, що вірогідно перевищує активність хофітолу за функціональними та біохімічними критеріями. За гістологічними даними найбільш виразний протективний ефект сполука 77 чинить у юкстамедулярній зоні та мозковому шарі нирок.

Вперше з'ясовано гепатопротекторну дію сполуки 77, яка за антицитолітичним та антиоксидантним ефектом вірогідно перевищує активність дарсилу та мексидолу на тлі гострого тетрахлорметанового гепатиту. За захисним впливом на моделі гострої ішемії печінки сполука 77 перевищує віта-мелатонін та тіотриазолін, зменшує кількість некротизованих гепатоцитів, знижує жирову дистрофію та відновлює вміст глікогену в цитоплазмі гепатоцитів.

Вперше встановлено механізм органопротекторної дії досліджуваної сполуки, який складається із: відновлення енергетичного метаболізму, антицитолітичної, антиоксидантної активності та здатності відновлювати кровобіг в ушкоджених ішемією органах (головний мозок, міокард, нирки).

Вперше доведено, що сполука 77 знижує деструкцію нейронів головного мозку (за вмістом нейронспецифічної енолази), зменшує метаболічний ацидоз на рівні мексидолу, гальмує індукований ішемією нейроапоптоз за критерієм фрагментації ДНК, вірогідно перевищуючи цитиколін. З'ясовано, що сполука 77 сприяє прискоренню обігу церебральних катехоламінів та спряженню їх обміну.

За результатами порівняльного аналізу фармакологічної активності в умовних балах за статистично значущими відмінностями відносно референс-

препаратів 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол] чинить виразну органотропну дію до життєвоважливих органів (головний мозок, міокард, нирки, печінка) за умов уражень різного генезу.

Наукову новизну підтверджено 4 патентами України на винахід: №87952 (2009), №96034 (2011), №96835 (2011), №98724 (2012) та 3 патентами на корисну модель №49789 (2010), №54671 (2010), №63370 (2011).

**Практичне значення одержаних результатів та їх впровадження.** Результати проведених досліджень експериментально обґрунтовують доцільність та перспективність застосування нової сполуки – 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндолу] – у терапії уражень гіпоксичного та іншого генезу головного мозку, міокарда, нирок та печінки.

У план виробництва нових лікарських засобів ПАТ «ХФЗ «Червона Зірка» (м. Харків) для субстанції 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідро-пірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол] на I–III кв. 2014 р. включено розробка метидик контролю якості, проекту технологічного регламенту з метою створення пероральної та парентеральної лікарської форми та впровадження у промисловий випуск нового препарату з антигіпоксичною дією (довідка № 437/1 від 29.03.13).

За матеріалами дисертації видано два інформаційних листи: № 137 (2012) «Використання спіроциклічного похідного оксиндолу для розробки лікарського засобу нефропротекторної дії» та № 138 (2012) «Інноваційні перспективи використання спіроциклічного похідного оксиндолу для розробки лікарського засобу церебропротекторної та ноотропної дії».

Фрагменти роботи впроваджено в навчально–методичний процес кафедри загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ (2012), кафедри фармакології НФаУ (2012), кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету (2012), кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету (2012) та кафедри експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією Української медичної стоматологічної академії (2012).

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано літературу, аргументовано робочу гіпотезу дослідження, визначені мета, завдання. Разом із науковим консультантом визначено методичні підходи, обрано експериментальні моделі дослідження. Самостійно проведено експерименти, оброблено отримані результати, виконано їхній аналіз і узагальнення, сформульовано висновки, написано та оформлено всі розділи дисертації, підготовлено публікації до друку.

**Апробація результатів дисертації** відбулася на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Клінічна фармація в Україні» (Харків, 2007, 2008), Всеукраїнському конгресі «Сьогодення та майбутнє фармації» (Харків, 2008), I національному конгресі «Человек и Лекарство - Украина» (Київ, 2008), науково-практичній конференції «Розвиток наукової думки - 2008» (Маріуполь, 2008), X Intercontinental Congress of Young Medical Scientists (Познань, Польща, 2010), VII Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2010), IV з'їзді фармакологів України (Київ, 2010), засіданні координаційної ради НАН України (відділення

хімії) та XII науковому семінарі «Синтез, структура, властивості біологічно активних речовин» (Гурзуф, 2012), Науково-практичній конференції «Фармакологія, фізіологія і патологія нирок» (Чернівці, 2012), Національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 2013 р.), III Міжнародній науковій конференції у рамках наукової сесії НІУ «БелГУ» (Росія, Белгород, 2013).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 23 статті, з них 21 в фахових виданнях України з напрямку «фармацевтичні науки»; 1 у зарубіжному виданні, що входить до наукометричних баз, 4 патенти України на винахід, 2 інформаційних листа, 20 тез доповідей.

**Об'єм та структура дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису об'єкту та методів дослідження, 8 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків та переліку використаних джерел (285 джерел, з яких 83 із кириличною графікою, 202 – із латинською). Роботу викладено на 326 сторінках друкованого тексту, ілюстровано 94 рисунками та 54 таблицями, 10 сторінок додатків.

### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Вивчено 29 структурних аналогів мелатоніну. Для скринінгу на антигіпоксичну активність обрано моделі нормобаричної та гемічної гіпоксії (Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. реком., 2001). Визначено сполуку-лідера за антигіпоксичною дією 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2-оксиндол], під лабораторним шифром 77, для якої проведено вивчення органотропної активності. Сполуку 77 вводили внутрішньошлунково або внутрішньоочеревинно у дозі 5 мг/кг.

Як препарати порівняння при вивченні фармакологічної активності використовували мексидол (ТОВ «НВК «Фармасофт», Росія) в дозах 42 мг/кг та 100 мг/кг (Н.А. Соловьев, 2006) – у дослідях з вивчення антигіпоксичної дії на модельних патологіях різного генезу; віта-мелатонін (ЗАТ «Київський вітамінний завод», Україна) у дозах 0,5 мг/кг та 5 мг/кг у дослідях з вивчення антигіпоксичної дії на модельних патологіях різного генезу; пірацетам («Дарниця», Україна) в дозі 200 мг/кг (L. Flicker, 2002) – при дослідженні церебропротекторної, ноотропної дії, вимірюванні рівня моноамінів головного мозку; іміпрамін («Меліпрамін», «Egis», Угорщина) в дозі 25 мг/кг (D. Meltzer1, 1971) – у дослідях, з вивчення антидепресивної дії, дослідженні вмісту моноамінів головного мозку; вінпоцетин («Кавінтон», «Richter Gedeon Ltd», Угорщина) в дозі 5 мг/кг (С.Ю. Штрыголь, 2007) – при дослідженні мозкового кровобігу; цитиколін («Цераксон», Феррер Інтернаціональ, С.А., Іспанія) в дозі 120 мг/кг при дослідженні фрагментації ДНК у нейронах головного мозку за умов церебральної ішемії-реперфузії; діазепам («Реланіум», «Polfar», Польща), в дозі 10 мг/кг (J. A. Vivian, 1994) – в дослідженнях анксиолітичної дії та впливу на координацію рухів; хофітол (Lab. Rosa-Phitopharma, Франція) у дозі 110 мг/кг для щурів при дослідженні нефропротекторної дії за умов гострої ниркової недостатності; дарсил (ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) – у дозі 6,3 мг/кг за сілімаріном при вивченні гепатопротекторної дії на тлі гострого



тетрахлорметанового гепатиту; тіотриазолін (ОАО «Київмедпрепарат») – у дозі 48 мг/кг при дослідженні антигіпоксичної та гепатопротекторної активності на тлі гострої ішемії печінки. Дози цитиколіну, хофітолу, дарсилу та тіотриазоліну відповідають середньодобовим дозам для людини та перераховані у відповідності до константи видової чутливості (Ю.Б. Рыболовлев, 1979). При вивченні антигіпоксичної дії сполуки 77, її церебропротекторної та супутньої психотропної (ноотропної, антидепресивної, анксиолітичної), кардіо-, нефро- та гепатопротекторної активності використовували такі керівництва: Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації, 2001; Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005. Етапи фармакологічного дослідження сполуки 77 наведено на рис. 1.

Скринінгові дослідження фармакологічної активності з метою виявлення сполуки-лідера за антигіпоксичною дією проводили на моделях нормобаричної та гемічної гіпоксії. З'ясування добових хронофармакологічних особливостей сполуки-лідера проведено на моделі нормобаричної гіпоксії: при освітленні (10-11 година) та у темний період доби (22-23 година) за умов монохромного червоного освітлення, яке не гальмує синтез ендогенного мелатоніну та не прискорює його метаболізм.

На моделі білатеральної каротидної оклюзії (БКО) визначали вплив сполуки 77 на виживаність, неврологічний дефіцит, енергетичний метаболізм, стан кислотно-лужного балансу, активність нейронспецифічної енолази (NSE). Вміст NSE визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору NSE EIA KIT (DAI, США). За умов відтворення БКО із реперфузією вивчали кровобіг у внутрішній сонній артерії методом ультразвукової флоуметрії. Фрагментацію ДНК в ядрах нейронів соматосенсорної кори головного мозку щурів досліджували методом проточної цитометрії на приладах виробництва фірми Partec (Німеччина). В якості контролю в дослідгах з БКО використовували псевдооперованих щурів, яким виконували під наркозом маніпуляції за виключенням перев'язування судин.

Дослідження психотропної дії та неврологічного статусу вивчали на таких моделях: антиамнестичні властивості (скополамінова амнезія); антидепресивна дія (резерпінова депресія, іммобілізаційний тест); анксиолітична активність (тест хрестоподібного піднесеного лабіринту); координацію рухів та тонус скелетних м'язів (тест стрижня, що обертається); стан функціональної активності ЦНС (тест «відкритого поля») (Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекоменд., 2001; Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ, 2005.).

Кардіопротекторну дію досліджували на моделі інфаркту міокарда (ІМ) за методикою Ю.Й. Гумінського (2010), відтвореного шляхом діатермокоагуляції маргінальної гілки коронарної артерії досліджували летальність тварин, показники ЕКГ. Стан кардіогемодинаміки (артеріальний тиск (АТ), частоту серцевих скорочень (ЧСС), ударний об'єм серця) вивчали на моделі гострого оклюзійного ІМ за методом R.V. Jenings (1990).



Рис. 1 Основні етапи дослідження антигіпоксичних, органопротекторних властивостей та токсичності спіроциклічних похідних оксіндолу

Кардіопротекторну дію сполуки 77 верифікували за впливом на активність АсАТ (тест-набор «Lachema» (Чехія), коефіцієнтом маси серця, показниками ПОЛ-АОС: визначення концентрації дієнових кон'югатів (ДК) проводили за спектрофотометричним методом Стальної І.Д. (1977), вміст ТБК-реактантів визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою за методом И.Д. Стальной, Т.Г. Гаришвили (1977), визначення відновленого глутатіону (ВГ) проводили

спектрофотометрично із використанням реактиву Елмана (1990), активність каталази вимірювали за допомогою спектрофотометричного методу за реакцією із молібдатом амонію В.С. Камышников (2000).

Для оцінки участі сполуки 77 в енергетичному обміні досліджували вміст АТФ, АДФ, АМФ у тканині головного мозку, за методом Лампрехта і Тротшольда (2006), використовуючи реактиви фірми "Mannheim" (Німеччина). Цитратсинтазну активність вивчали спектрофотометрично за реакцією конденсації з ацетил-КоА (М.И. Прохорова, 1982), активність піруватдегідрогенази – за реакцією окисного декарбоксілювання пірувату із одночасним відновленням НАД (М.И. Прохорова, 1982), сукцинатдегідрогеназну активність визначали за методом, що ґрунтується на зміні оптичної щільності в присутності феназінметасульфату при ферментативному окисненні сукцинату (М.И. Прохорова, 1982).

При дослідженні нефропротекторної активності сполуки 77 за умов ішемічної гострої ниркової недостатності (ГНН) (Штриголь С.Ю., 2009) визначали вміст креатиніну, сечової кислоти (за реакцією з фосфорновольфрамовим реактивом), в плазмі крові – вміст церулоплазміну, активність АлАТ за методом Райтмана-Френкеля (1971), вміст загального білка. Вплив сполуки 77 на нирковий кровобіг вивчали, накладаючи на ліву ниркову артерію датчик ультразвукового флоуметра Т-106 (Transonic Systems Inc., США). Як контроль використовували псевдооперованих щурів. На моделі етиленгліколевої нефропатії реєстрували інтегральний захисний критерій – виживаність тварин.

Гепатопротекторну дію сполуки 77 на моделі ішемічної гострої печінкової недостатності (ГПН), (Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації, 2001) верифікували за виживаністю, антицитолітичну дію – за активністю у сироватці крові АлАТ АсАТ. Реєстрували коефіцієнт маси печінки (КМП), рівень холестази оцінювали за зміною активності лужної фосфатази (ЛФ). Зсув у системі ПОЛ-АОС аналізували за вмістом у гомогенаті печінки та сироватці крові ТБК-реактивів, ДК, ВГ, активністю каталази, вмістом церулоплазміну. Також досліджували біохімічні показники, що характеризують функції печінки: вуглеводний обмін за вмістом глікогену, який визначали з антроном у гомогенаті печінки (Ф.И. Комаров, 1999), глюкози (визначення глюкозооксидазним методом у сироватці крові стандартним набором «Філісіт-Діагностика», Україна); білковий обмін – загального білка у сироватці крові за біуретовою реакцією (В.С. Камышников, 2000). Як контроль використовували псевдооперованих щурів. На моделі тетрахлометанового гепатиту стан печінки під впливом сполуки 77 і препарату порівняння оцінювали за наступними показниками: КМП, активність АлАТ у сироватці крові, вмістом ТБК-реактивів, ДК, ВГ та активністю каталази. Жовчоутворювальну функцію визначали за швидкістю секреції жовчі, вмістом у ній жовчних кислот та холестерину.

Для морфологічного дослідження головного мозку, міокарда, нирок, печінки використовували уніфіковані методи світлової мікроскопії.

При вивченні гострої токсичності сполуки 77 використовували метод Т.В. Пастушенка (1985). Дослідження хронічної токсичності нової сполуки у дозах 5

мг/кг та 50 мг/кг проведено відповідно до рекомендацій ДФЦ МОЗ України (Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації, 2001).

У роботі використано 459 статевозрілих білих рандомбредних щурів масою 180-280 г, 802 мишей з масою 16-28 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ. Дослідження проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та ухвалою Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Процедури, що викликають біль (хірургічні втручання, етаназія) проводили під наркозом (тіопентал натрій (80 мг/кг) або етамінал натрій (40 мг/кг) (F. Simone, 2005). Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком комісії з біоетики НФаУ (протокол № 3 від 20.03.2013). Дослідження проводили у ЦНДЛ НФаУ (сертифікована ДФЦ МОЗ України, посвідчення № 21 від 30.04.2009 р.).

Варіаційні ряди перевіряли на характер розподілу. Кількісні дані обробляли за допомогою статистичної програми StatPlus 2009: за критерієм  $t$  Ст'юдента у випадках нормального розподілу, за критерієм  $W$  Вайта – за його відсутності; внутрішньогрупові відмінності аналізували за парним критерієм  $\tilde{T}$  Вілкоксона, альтернативні (виживаність, наявність/відсутність певної ознаки) – за кутовим перетворенням Фішера, в необхідних випадках, коли відсоток дорівнював 0 або 100, із поправкою Єйтса. Закономірності зв'язку між окремими показниками аналізували за коефіцієнтом кореляції Пірсона (С.Н. Лапач, 2001).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Скринінгові дослідження антигіпоксичної активності спіроциклічних похідних оксидолу та визначення можливої хронофармакологічної залежності ефекту сполуки-лідера (розділ 3).** На першому етапі проведено фармакологічний скринінг для 29 структурних оксидольних аналогів мелатоніну у дозі 0,5 мг/кг, яка відповідає середньодобовій дозі мелатоніну 6 мг. На моделі нормобаричної гіпоксії антигіпоксичну дію виявлено для одинадцяти нових сполук під шифрами 2, 6, 11, 18, 26, 27, 64, 65, 66, 76 та 77. Найбільш активною із цих нових сполук є сполука 77 (антигіпоксична активність 176%), яка не тільки у 2,8 разу ( $p < 0,001$ ) збільшувала тривалість життя тварин відносно групи контрольної патології, але вірогідно ( $p < 0,05$ ) перевищувала дію віта-мелатоніну (антигіпоксична активність 109%) та виявила тенденцію до збільшення ефективності відносно мексидолу (антигіпоксична активність 161%).

На моделі гострої гемічної гіпоксії встановлено вірогідну антигіпоксичну дію для 19 сполук під шифрами 2, 10, 12, 26, 27, 28, 29, 64, 65, 66, 76, 77, 79, 80, 84, 85, 86, 87, 90. Максимальну антигіпоксичну активність виявила сполука 77 (101%). Слід відзначити, що ефективність нової сполуки достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувала активність віта-мелатоніну (антигіпоксична активність 67,6%) та дещо переважала дію мексидолу (94,3%).

Отже, для всіх 29 сполук характерна наявність антигіпоксичною дії – від тенденції (подовження життя тварин на 15-20%) до статистично значущого антигіпоксичного ефекту, який виявлюється зростанням тривалості життя на 101-176% ( $p < 0,001$ ). Це можна пояснити тим, що виучувані сполуки є структурними

аналогами мелатоніну, антигіпоксична дія, якого встановлена як у даному дослідженні, так і іншими авторами (Е. Kilic, 2004; С. Ermekcioglu, 2006; И.А. Виноградова, 2009).

Аналізуючи результати досліджень визначели закономірності зв'язку «структура-антигіпоксична дія» серед 29 синтезованих похідних оксиндолу. Встановлено, що поєднання трьох фармакофорів а саме: 3-метилізатину, 4-гідрогсикумарину та малондінітрилу з одночасним введенням метильної групи у 5 положення базового ядра молекули (сполука 77, 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідро-пірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол]) сприяє посиленню антигіпоксичного ефекту (рис. 2).

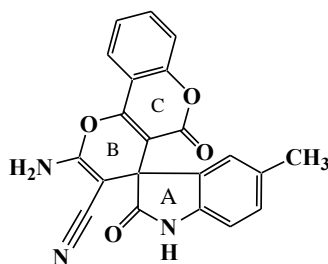


Рис. 2 Структурна формула 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідро-пірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндолу], сполуки 77.

Для сполуки 77 на моделі нормобаричної гіпоксії знайдено максимально ефективну дозу 5 мг/кг, яка була прийнята як добова умовнотерапевтична доза для наступних досліджень.

Одним з вагомих факторів, що впливають на ефективність лікарських препаратів, є залежність фармакотерапії від біоритмів. Висока ефективність мелатоніну, незначна побічна дія роблять його привабливим для терапії багатьох захворювань, але значним обмеженням у призначенні препарату є його швидка інактивація при освітленні (R.J. Reiter, 2003). Це обумовило напрямок подальших досліджень вивчення впливу добових біоритмів на антигіпоксичну активність сполуки 77 за умов гострої нормобаричної гіпоксії (табл. 1).

Для віта-мелатоніну встановлено достовірну різницю показників в залежності від рівня освітлення: у темному періоді доби активність препарату в 1,2 разу ( $p < 0,01$ ) вище за денний показник, що узгоджується із даними літератури, щодо виразної залежності дії мелатоніну від циркадного (J. Arendt, 2005). Сполука 77 (5 мг/кг) виявляла виражену антигіпоксичну дію, що було верифіковано за значним збільшенням тривалості життя тварин у 2,8 разу ( $p < 0,001$ ) відносно групи контрольної патології. Необхідно відзначити переваги нового спіроциклічного похідного оксиндолу перед віта-мелатоніном ( $p < 0,01$ ).

Отже, сполука 77 за результатами проведених скринінгових досліджень на 2 моделях гіпоксії обрана із 29 нових структурних аналогів мелатоніну за максимальною антигіпоксичною активністю. Ефективна доза нової сполуки складає 5 мг/кг. Хронофармакологічні дослідження довели відсутність впливу освітлення на антигіпоксичну дію сполуки 77 у дозі 5 мг/кг на відміну від віта-мелатоніну.

**Вплив добових біоритмів на антигіпоксичну дію сполуки 77  
за умов гострої нормобаричної гіпоксії (n=6)**

Група	Умови досліджу	
	Освітлення (11.00)	Затемнення (23.00)
	Тривалість життя тварин, с (M±m)/ % змін до контрольної патології	
Контрольна патологія	1808±42,1	1836±37,5
Мексидол, 100 мг/кг	4565±112* <sup>#</sup> / 152	4672±83,9*/ 154
Віта –мелатонін, 0,5 мг/кг	3804±70,7*/ 110	4357±76,1* <sup>§</sup> / 137
Сполука 77, 5 мг/кг	5054±102* <sup>#</sup> / 179	5213±69,2* <sup>#</sup> / 184

Примітки. Статистично значущі відмінності: \* – з показниками групи контрольної патології (p<0,001); # – з показниками групи препарату порівняння віта-мелатоніну ( p<0,01); § – з показником цієї ж самої групи об 11.00 год (p<0,01).

Оскільки головний мозок є найбільш чутливим до гіпоксії органом, подальше дослідження було спрямовано на визначити ефективності нової сполуки на тлі БКО.

**Захисні властивості спіроциклічного похідного оксиндолу на моделі церебральної ішемії (розділ 4).** Гострі порушення мозкового кровообігу (ГПМК) завжди супроводжуються нестачою кисню. Логічно було припустити, що сполука 77, яка виявила високу антигіпоксичну активність на першому етапі дослідження, здатна чинити захисний вплив на головний мозок за умов БКО.

Вплив сполуки 77 на виживаність тварин наведено на рис. 3.

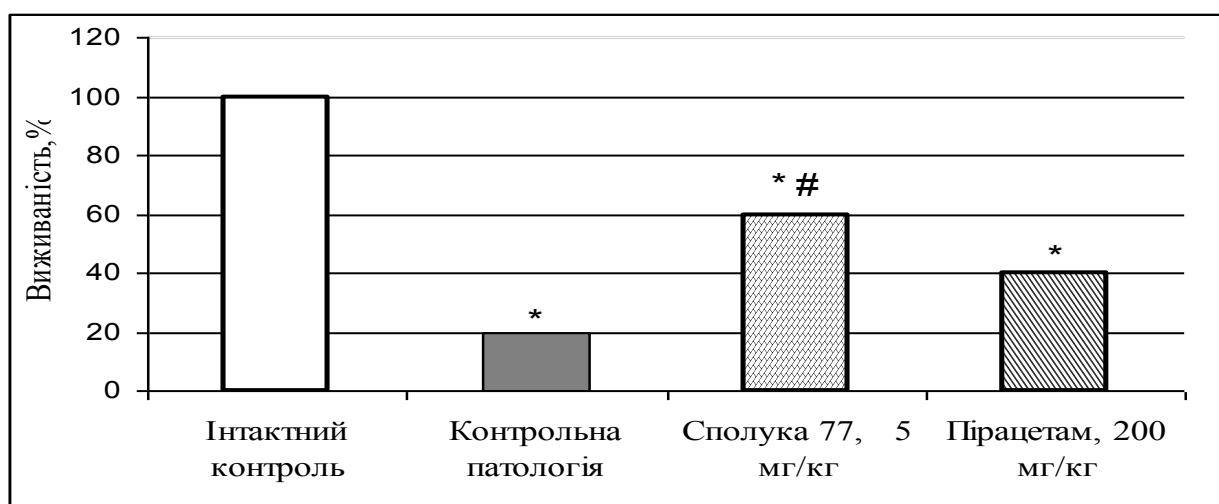


Рис. 3 Церебропротекторна активність сполуки 77 та пірацетаму на виживаність щурів за умов білатеральної каротидної оклюзії (n = 10).

Примітки: статистично значущі відмінності: \* – із показниками групи інтактного контролю, p<0,001; # – із показниками групи контрольної патології, p<0,05.

Сполука 77 збільшує виживаність тварин у 3 рази (60%), вірогідно перевищує показник контрольної патології (20%,  $p < 0,05$ ), що свідчить про значну церебропротекторну активність досліджуваної сполуки за інтегральним критерієм.

Наступним етапом дослідження стало вивчення показників функціонального стану ЦНС під впливом сполуки 77 та пірацетаму на тлі БКО. На другу добу після БКО у щурів групи контрольної патології у 2,5-2,8 разу зменшувалися горизонтальний та вертикальний компоненти локомоції, кількість обстежених отворів ( $p < 0,001$ ), що свідчить про поведінкові порушення та розвиток значного неврологічного дефіциту. Пірацетам дещо покращував усі досліджувані показники, але це зростання не сягнуло вірогідного рівня відносно показників контрольної патології. Сполука 77 виявила виразну церебропротекторну активність за критерієм зменшення неврологічного дефіциту: на другу добу після БКО відновлює всі досліджувані показники стану ЦНС: горизонтальна та вертикальна рухова активність, дослідницька активність (до рівня інтактного контролю та вихідних показників) та мала статистично значущі відмінності із групою контрольної патології ( $p < 0,05$ ).

Враховуючи незворотне припинення кровобігу з каротидного басейну, можна припустити, що сполука 77 сприяє поліпшенню кровопостачання за рахунок хребетних артерій, через це доцільно було з'ясувати вплив сполуки 77 на кровопостачання за умов ішемії-реперфузії головного мозку у порівнянні із вінпоцетином, який характеризується значним вазоактивним впливом на церебральну гемодинаміку (табл. 2).

У групі контрольної патології після відтворення 40-хвилинної гострої церебральної ішемії кровобіг був вірогідно знижений ( $p < 0,01$ ) відносно вихідного рівня на 52-54%. Введення сполуки 77 та вінпоцетину вірогідно відновлює мозковий кровобіг вже з перших 5 хв реперфузії (80,5% ( $p < 0,05$ ) та 90,3% ( $p < 0,05$ ) відповідно), і він залишається на такому ж рівні навіть через 60 хв (81,8% ( $p < 0,05$ ) та 89,4% ( $p < 0,05$ ) відповідно). Вінпоцетин дещо активніше за сполуку 77 відновлював мозковий кровобіг, проте різниця міжгрупових показників не мала статистично значущих відмінностей (за виключенням 30 хв експерименту) (табл. 2).

Церебропротекторну дію нової сполуки підтверджено гістологічними дослідженнями (рис. 4а). У контрольних (псевдооперованих) щурів мозкова тканина організована, її структура не змінена, функціональний стан нейронів у межах норми (рис. 4). У щурів контрольної патології спостерігали нейрональну дегенерацію, ділянки енцефалолізису із повною деструкцією клітинних структур, пов'язані з гіпоксією тканини мозку (рис. 4б). Сполука 77 сприяла зменшенню ознак виразності перичелюлярного та периваскулярного набряку або їх відсутності, а також значному зниженню нейрональної дегенерації. Крововиливів у м'яку оболонку або тканину мозку не спостерігали, енцефалолізис відсутній (рис. 4в). На тлі пірацетаму мали місце більш виражені ушкодження клітин головного мозку, м'які мозкові оболонки повнокровні, місцями з крововиливами, відмічені крововиливи у тканину мозку та дрібновогнищевий енцефалолізис (рис. 4г).

**Вплив сполуки 77 на кровобіг у внутрішній сонній артерії  
за умов ішемії-реперфузії головного мозку у щурів**

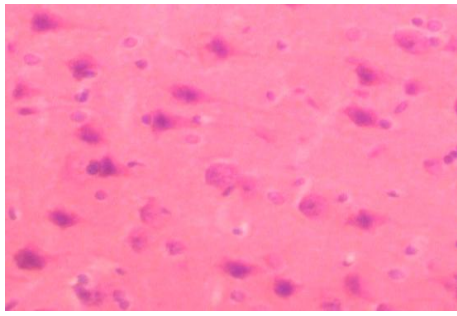
Час	Контрольна патологія, (n=6)		Сполука 77, 5 мг/кг, (n=7)		Вінпоцетин, 5 мг/кг, (n=6)	
	мл/хв	%, від базального	мл/хв	%, від базального	мл/хв	%, від базального
	6,91±0,27 (базальний рівень)		6,23±0,09 (базальний рівень)		6,40±0,25 (базальний рівень)	
<b>Ішемія 40 хв із подальшою реперфузією</b>						
5 хв	3,38±0,12 *	48,9±0,84	5,03±0,22 *#	80,5±2,54	5,85±0,31 #	90,3±2,39
10 хв	3,25±0,09 *	47,1±0,78	5,06±0,17 *#	81,1±1,78	5,77±0,31 #	89,9±1,68
20 хв	3,22±0,13 *	46,6±1,43	5,00±0,15 *#	79,7±1,87	5,77±0,26 #	90,0±1,09
30 хв	3,18±0,07 *	46,2±1,29	5,01±0,16 *#^	79,9±1,97	5,80±0,24 #	90,6±1,19
40 хв	3,18±0,07 *	46,2±1,41	5,06±0,18 *#	81,1±1,86	5,80±0,26 #	90,6±1,54
60 хв	3,23±0,11 *	46,8±0,58	5,10±0,16 *#	81,8±1,58	5,73±0,30 #	89,4±1,73

Примітка. Статистично значущі відмінності: \* – із вихідними показниками всередині групи  $p < 0,01$ ; # – із показниками групи контрольної патології,  $p < 0,05$ ; ^ – із показниками групи вінпоцетину,  $p < 0,05$ .

Отже, на тлі застосування сполуки 77 знижується виразність реактивних змін у сенсомоторній області неокортексу щурів, що характеризується значним зниженням процесів нейрональної загибелі, проявів вазогенного набряку. Позитивною дією сполуки 77 на тканину мозку є збільшення чисельності функціонально активних пірамідних нейронів. Вищезазначене свідчить про потужну церебропротекторну активність сполуки 77, яка за морфологічними критеріями церебропротективної дії на моделі БКО перевершує ефективність препарату порівняння пірацетаму.

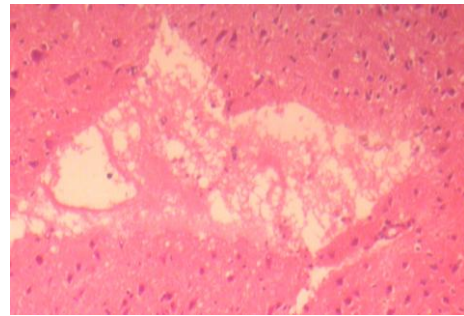
Таким чином, за результатами даної серії дослідів можна зробити висновок, що досліджувана сполука 77 виявляє виразний церебропротекторний ефект як за умов гострої необоротної церебральної ішемії, так і за умов експериментальної ішемії-реперфузії. Сполука 77 сприяє інтенсифікації мозкового кровобігу на рівні відомого вазоактивного препарату вінпоцетину. За впливом на відновлення функціональних показників стану центральної нервової системи за тестом «відкритого поля» та результатами морфологічних досліджень сполука 77 дещо перевищує ефективність пірацетаму.





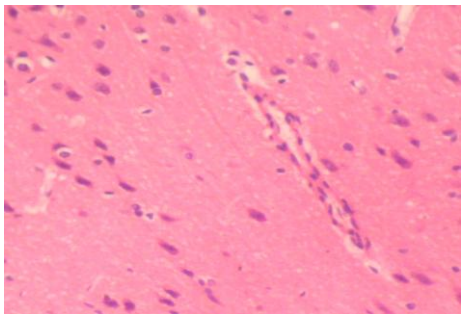
а

Препарат тканини сенсомоторної ділянки неокортексу псевдооперованого щура: нормальне співвідношення нейронів та клітин глії. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .



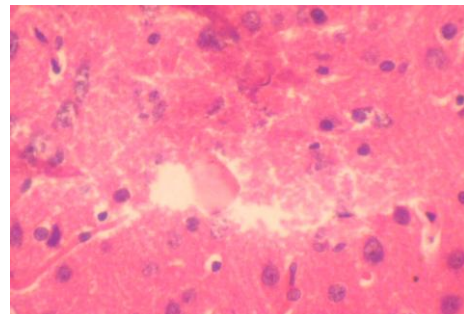
б

Препарат тканини сенсомоторної ділянки неокортексу щура на третю добу після БКО (контрольна патологія): енцефалолізис, деструкція нейронів. Гематоксилін-еозин  $\times 200$ .



в

Препарат тканини сенсомоторної ділянки неокортексу щура, що отримував сполуку 77 на третю добу після БКО: нормальний стан капіляра, відсутність периваскулярного набряку. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .



г

Препарат тканини сенсомоторної ділянки неокортексу щура, що отримував пірацетам на третю добу після БКО: дрібновогнищевий енцефалолізис. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .

Рис. 4 Вплив сполуки 77 (5 мг/кг) та пірацетаму (200 мг/кг) на гістоструктуру головного мозку щурів за умов гострої церебральної ішемії

**Вивчення психотропних властивостей спіроциклічного похідного оксидолу (розділ 5).** Після виявлення церебропротекторних властивостей доцільним було дослідити супутні психотропні ефекти. Це зумовлено результатами клінічних досліджень, які вказують на зв'язок між когнітивно-емоційними порушеннями та церебральною гіпоксією різного генезу (А.В. Горева, 2012). За даними L.C. Perlumeter (2012), порушення церебральної гемодинаміки через зниження перфузії мозку індукує розвиток дистрофічних порушень кори великих півкуль, що є провідною причиною виникнення емоційно-мнестичних порушень та вказує на прямий зв'язок між зниженням кровопостачання мозку та розвитком когнітивних порушень, результатом яких може бути деменція судинного генезу та значне погіршення якості життя хворих. Оптимальним для фармакокорекції таких станів було б застосування церебропротекторного засобу із низкою сприятливих психотропних ефектів. Тому наступним етапом дослідження було вивчення наявності психотропних ефектів сполуки 77 та препаратів порівняння, на тривожність, депресивні

порушення, амнезію, а також поведінку у тесті «відкритого поля», м'язовий тонус і координацію рухів інтактних тварин. Результати досліджень наведено у табл. 3.

Таблиця 3

### Психотропна активність сполуки 77 та референс-препаратів

Показники	Сполука 77		Діазепам 10 мг/кг	Іміпрамін 25 мг/кг	Пірацетам 200 мг/кг
	0,5 мг/кг	5 мг/кг			
Тест «відкритого поля», миші					
Сума локомоторно-дослідницької активності	↑ 1,1	↑ 1,3 *	–	–	–
Сума вегетативних реакцій	↓ 1,7	↓ 3,1 *	–	–	–
Тест хрестоподібного піднесеного лабіринту, миші					
Латентний період входу до темної камери	↓ 1,1 #	↓ 1,2 #	↑ 5,3 *	–	–
Час перебування в темних відсіках	↓ 1,1 #	↓ 1,8 #	↑ 7,2 *	–	–
Час перебування у світлих відсіках	↑ 2,2 #	↑ 5,9 *	↑ 7,1*	–	–
Кількість відвідувань темного рукава	↓ 1,5	↓ 2,0 *	↓ 2,3 *	–	–
Тест резерпінової депресії, щури					
Зміни температури тіла	–	↓ 0,6°C*	–	↓ 0,9°C*	–
Блефароптоз, бали	–	↓ 1,1 *	–	↓ 1,3 *	–
Імобілізаційний тест, миші					
Тривалість нерухомого вису	↓ 1,2 *	↓ 2,6 *	–	↓ 1,1*	–
Тест стрижня, що обертається, миші					
Кількість мишей (%), які впали зі стрижня до 30 с	↑ 1,2	↑ 1,3	↑ 3,75*	–	–
Кількість мишей (%), які впали зі стрижня до 60 с	↑ 1,2 #	↓ 0,9 #	↑ 2,5*	–	–
Тест УРПУ (скополамінова амнезія), миші					
Латентний період входу до темної камери	↑ 9,5 *	↑ 8,6 *	–	–	↑ 8,2 *
Кількість тварин, що досягли критерію навченості, %	↑ 57 *	↑ 42 *	–	–	↑ 28 *

Примітка. Статистично значущі відмінності ( $p < 0,05$ ): \* – з контролем, # – з препаратом порівняння на данній моделі; ↑ – збільшення, ↓ – зменшення показника; цифри – кратність змін (крім температури тіла).

Сполука 77 у дозі 0,5 мг/кг не викликає суттєвих змін функціонального стану нервової системи здорових тварин у тесті «відкрите поле», тимчасом як збільшення дози до 5 мг/кг сприяє підвищенню сумарного показника

локомоторно–дослідницької активності та одночасному зниженню вегетативних реакцій, що може свідчити про зменшення рівня тривожності.

У тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту встановлено дозозалежну анксиолітичну дію сполуки 77: в дозі 0,5 мг/кг спостерігається тенденція до зниження рівня тривожності у піддослідних тварин, в дозі 5 мг/кг сполука 77 значно зменшує тривожність, що виявляється у вірогідних змінах досліджуваних показників: збільшенні у 6 разів часу перебування тварини в освітлених ділянках лабіринту ( $149 \pm 12,8$  с проти  $24,8 \pm 5,15$  с у тварин інтактного контролю), зменшенні у 1,8 разу часу перебування у темному рукаві, достовірному зниженні показників вегетативного супроводу емоційних реакцій. Відмінність анксиолітичної дії сполуки 77 від діазепаму полягає у відсутності зростання латентного часу входу до темного рукава лабіринту та зниженню показника емоційності. Позитивною відмінністю анксиолітичної дії сполуки 77 (5 мг/кг) є її селективність, доведена у тесті стрижня, що обертається, за критерієм відсутності швидкого падіння тварин зі стрижня.

Встановлено дозозалежну антидепресивну активність сполуки 77 за іммобілізаційним тестом. Вірогідна антидепресивна дія у вигляді зменшення часу нерухомості спостерігалася на тлі дози 5 мг/кг, зменшення дози у 10 разів (0,5 мг/кг) характеризується значним зниженням активності нової сполуки. На моделі резерпінової депресії антидепресивну дію сполуки 77 на рівні іміпраміну верифіковано за нормалізацією температури тіла та зменшенням блефароптозу.

Механізм антидепресивної дії досліджуваної сполуки, ймовірно, обумовлено структурною подібністю досліджуваної сполуки до мелатоніну, антидепресивну дію якого пов'язують зі зменшенням активності структур лімбічної системи, у якій розташовані центри формування негативних емоцій. Зниження збудливості гіпокампу та інших емоціогенних структур здійснюється через мелатонінові рецептори та мобілізацію ГАМК-ергічних механізмів (P. Lemoine, 2011). На тлі стресу мелатонін обмежує секрецію глюкокортикоїдів, захищає організм від підвищених концентрацій катехоламінів та кортикостероїдів, що відбувається за рахунок гальмування синтезу кортиколіберину у гіпоталамусі та кортикотропіну у гіпофізі, зменшення активності сімпатоадреналової системи (A.G. Wade, 2010).

Виразна ноотропна дія сполуки 77 на рівні пірацетаму доведена на моделі скополамінової амнезії за тестом УРПУ (табл. 3). Потужна ноотропна активність сполуки 77 у обох дозах може бути пов'язана із впливом на нейромедіатори та метаболічні процеси в головному мозку, а також з покращанням його кровопостачання, про що свідчать проведені дослідження.

**Вивчення впливу спіроциклічного похідного оксиндолу на перебіг модельних патологій серцево-судинної системи (розділ 6).** Міокард поряд із ЦНС є високочутливими до нестачі кисню. Тому наступним етапом дослідження стало з'ясування впливу сполуки 77 на перебіг модельних уражень серця. На першому етапі досліджено ефективність на діатермокоагуляційній моделі гострого ІМ, патогенетичною суттю якого є жорстка гіпоксія серцевого м'яза.

ІМ, викликаний діатермокоагуляцією поверхневого шару міокарда та маргінальної гілки лівої коронарної артерії, характеризується високою летальністю, яка у тварин групи контрольної патології вже на 12 год сягнув 70%,

що можна вважати критичним періодом у розвитку даного патологічного стану (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив сполуки 77 та мексидолу на летальність щурів із діатермокоагуляційною моделлю інфаркту міокарда**

Летальність у динаміці		Контрольна патологія (n= 30)	Сполука 77, 5 мг/кг (n= 25)	Мексидол, 100 мг/кг (n= 15)
1 год	абс.	9	5	3
	%	30%	20%	20%
12 год	абс.	21	10	6
	%	70%	40%*	40%*
24 год	абс.	24	12	7
	%	80%	48%*	46,7%*
48 год	абс.	27	15	8
	%	90%	60%*	53,3%*

Примітка. \* – статистично значущі відмінності з показниками групи контрольної патології,  $p < 0,001$ .

Сполука 77 та мексидол вірогідно зменшували летальності щурів із моделлю ІМ у критичному періоді експерименту до 40%, що свідчить про виразну кардіопротекторну дію досліджуваної сполуки та референс-препарату (табл. 4).

Діатермокоагуляція лівої гілки коронарної артерії у щурів спричиняла типові для даної моделі ІМ зміни ЕКГ. У групі тварин контрольної патології на 3 добу ІМ у 100% випадків спостерігали відсутність зубця Р, ритм атріовентрикулярного з'єднання ( $p < 0,001$ ), тобто джерелом ритму була провідна система предсердно-шлуночкового вузла; у 100% випадків відмічався підйом сегменту ST над ізолінією та формування монофазної кривої, що є ознакою масивної ішемії міокарда; ЧСС зменшувалась у 2,5 разу до 130 уд./хв ( $p < 0,01$ ) відносно інтактного контролю (330 уд./хв). Інтервал Q-T, який характеризує електричну систолу шлуночків, достовірно зростав у 1,8 разу ( $p < 0,05$ ). Дані ЕКГ підтверджують тяжкість ураження міокарда в групі контрольної патології та корелюють з показником летальності.

Сполука 77, як і мексидол зменшила частку тварин із ритмом атріовентрикулярного з'єднання до 60%, сприяла нормалізації ЧСС (сполука 77 – до 164 уд./хв ( $p < 0,05$ ), мексидол - до 187 уд./хв ( $p < 0,05$ )). Тривалість інтервалу P-Q та Q-T на рівні показників інтактного контролю в обох групах. Встановлений кардіопротекторний ефект сполуки 77 на тлі ІМ, очевидно, пов'язаний з антигіпоксичною дією та знаходиться на рівні активності препарату порівняння мексидолу.

З метою вивчення впливу сполуки 77 на стан кардіогемодинаміки щурів за умов ураження міокарда відтворювали модель гострого оклюзійного ІМ за методом R.B. Jennings. У тварин групи контрольної патології через 15 хв після оклюзії коронарної артерії систолічний АТ знизився відносно показника псевдооперованих тварин на 19% ( $p < 0,05$ ), через 60 хв – на 22% ( $p < 0,05$ ), а через

120 хв зниження на 34% сягав критичних значень ( $69,0 \pm 1,6$  мм.рт.ст,  $p < 0,05$ ). Зареєстровано вірогідний розвиток брадикардії з 60 хв досліду ( $420 \pm 10$  уд/хв ( $p < 0,05$  відносно інтактного контролю) до 120 хв експерименту ( $390 \pm 9,7$  уд/хв,  $p < 0,05$ ). Значне порушення кардіогемодинаміки підтверджує достовірне зниження ударного об'єму серця протягом досліду.

Сполука 77 поступово збільшувала показники АТ, ЧСС та ударного об'єму серця на рівні препарату порівняння мексидолу, для якого також встановлена кардіопротекторна дія за умов гострого оклюзійного ІМ за відновленням кардіогемодинамічних показників.

Отже, оклюзія коронарної артерії призводить до значної дестабілізації показників кардіогемодинаміки та розвитку гострого ІМ. Сполука 77 відновлює кардіогемодинамічні показники на тлі гострого оклюзійного ІМ, при цьому, дещо перевершує ефективність мексидолу.

На наступному етапі вивчали антиоксидантну та антицитолітичну активності спіроциклічного похідного оксиндолу на тлі гострого ізадринового міокардита у щурів (табл. 5).

Таблиця 5

**Вплив сполуки 77 та мексидолу на показники системи ПОЛ - АОС при гострому ізадриновому міокардиті у щурів, (n=8)**

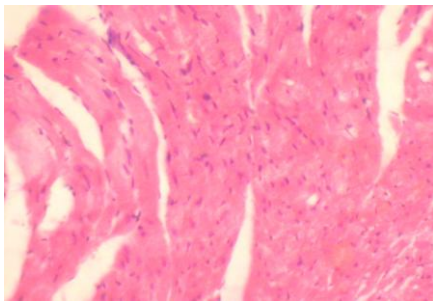
Показник	Умови експерименту			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сполука 77, 5 мг/кг	Мексидол, 100 мг/кг
Гомогенат міокарда				
ТБК-реактанти, мкмоль/г	$78,5 \pm 2,48$	$170 \pm 3,73^*$	$120 \pm 2,81^{*\#\$}$	$138 \pm 2,33^{*\#}$
ДК, мкмоль/г	$6,69 \pm 0,34$	$12,6 \pm 0,56^*$	$8,68 \pm 0,31^{*\#\#}$	$9,72 \pm 0,35^{*\#\#}$
ВГ, умов. од.	$58,0 \pm 2,77$	$28,0 \pm 1,81^*$	$45,0 \pm 1,75^{*\#\#\$}$	$36,4 \pm 2,52^{*\#\#\#}$
Сироватка крові				
ТБК-реактанти, мкмоль/л	$1,20 \pm 0,04$	$4,99 \pm 0,23^*$	$2,45 \pm 0,14^{*\#\#\$}$	$3,47 \pm 0,19^{*\#\#\#}$
ДК, мкмоль/л	$0,051 \pm 0,003$	$0,133 \pm 0,005^*$	$0,066 \pm 0,003^{*\#\#\#\$}$	$0,087 \pm 0,003^{*\#\#}$
Каталаза, мккат/мл	$0,26 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01^*$	$0,39 \pm 0,02^{*\#\#}$	$0,45 \pm 0,02^{*\#}$

Примітки: Статистично значущі відмінності з показниками групи інтактного контролю \* –  $p < 0,001$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,05$ ; Статистично значущі відмінності з показниками групи контрольної патології # –  $p < 0,001$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,05$ ; Статистично значущі відмінності з показниками з мексидолом \$ –  $p < 0,01$ .

Ізадриновий міокардит характеризується збільшенням КМС у 2,1 разу ( $p < 0,001$ ), АсАТ у сироватці крові в 1,8 разу ( $p < 0,001$ ), у гомогенаті міокарда в 1,9 разу ( $p < 0,001$ ) відносно інтактного контролю. На тлі модельної патології зареєстрована значна активація процесів ПОЛ та зниження активності АОС

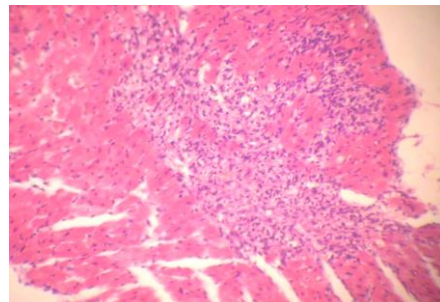
(табл. 5). Сполука 77 достовірно зменшує збільшену масу серця та інтенсивність цитолізу в міокарді (КМС становить  $0,35 \pm 0,01\%$  проти  $0,48 \pm 0,01\%$  у групі контрольної патології ( $p < 0,001$ ), рівень АсАТ знижується у 1,5 разу ( $p < 0,001$ ) у гомогенаті міокарда та сироватці крові). Встановлена значна антиоксидантна дія сполуки 77, що вірогідно перевищує активність мексидолу (табл. 5).

Підтвердженням кардіопротекторної дії сполуки 77 та її переваги над мексидолом є результати гістологічних досліджень. В інтактних щурів структура волокон міокарда та їх склад не змінено (рис. 5а). У тварин групи контрольної патології зареєстровано «старі» пошкодження кардіоміоцитів, значні ділянки деструкції серцево-м'язових волокон із некротичними змінами (рис. 5б).



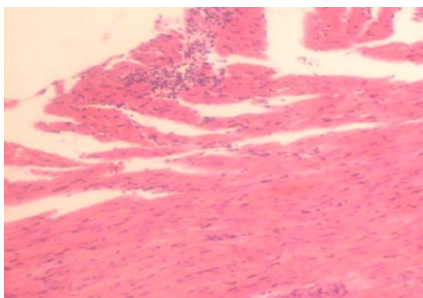
а

Препарат міокарда інтактного щура. Нормальний стан серцевих м'язових волокон. Гематоксилін-еозин  $\times 200$ .



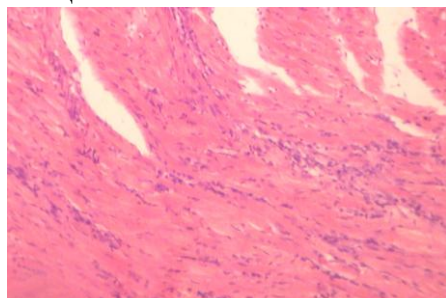
б

Препарат міокарда контрольного щура на тлі ізадринового міокардиту. Обширі клітинні інфільтрати, некроз кардіоміоцитів. Гематоксилін-еозин  $\times 100$ .



в

Препарат міокарда щура, якому вводили сполуку 77 на тлі ізадринового міокардиту. Дрібна гранульома на верхівці сосочкового м'яза лівого шлуночка. Гематоксилін-еозин  $\times 100$ .



г

Препарат міокарда щура, якому вводили мексидол на тлі ізадринового міокардиту. Гранульома на місці ділянки деструкції, розповсюджені смугоподібні клітинні скупчення. Гематоксилін-еозин  $\times 100$

Рис. 5 Вплив сполуки 77 (5 мг/кг) та мексидолу (100 мг/кг) на міокард щурів за умов гострого ізадринового міокардиту

Сполука 77 сприяла значному зменшенню деструктивних явищ. Клітинні інфільтрати мали у своєму складі молоді фібробластичні клітини, що свідчило про початок процесу репарації. Зареєстровано менше набухання міофібрил, більш виразна поперекова посмугованість волокон (рис. 5в). На тлі мексидолу виразність деструктивних змін в уражених зонах серцевого м'яза була вище на відміну від препаратів міокарда щурів, яким вводили сполуку 77. Клітинні



інфільтрати на місцях деструкції мали доволі розповсюджений смугоподібний вигляд (рис. 5г).

Отримані результати щодо вираженої кардіопротекторної дії сполуки 77, як найбільш активного за антигіпоксичною дією структурного аналога мелатоніну, узгоджуються з результатами сучасних досліджень кардіопротекторної активності мелатоніну, що свідчать про ефективність останнього у лікуванні серцево-судинних захворювань (R.J. Reiter, 2010). Цей феномен пояснюють антиоксидантною дією мелатоніну за умов експериментальної ішемії/реперфузії міокарду у щурів (G. Petrosillo, 2009). Отже, захисна дія на міокард сполуки 77 може пояснюватися її структурною подібністю до мелатоніну.

**Вивчення нефропротекторної дії спіроциклічного похідного оксиндолу (розділ 7).** Подальше дослідження органотропних властивостей сполуки 77 було спрямоване на вивчення впливу на нирки за фізіологічних умов та на тлі патологій токсичного та ішемічного генезу.

У навантажувальному водному тесті на здорових тваринах встановлено здатність сполуки 77 збільшувати діурез у 1,2 разу, ( $p < 0,05$ ), відносно інтактного контролю). Механізм сечогінного ефекту нової сполуки пов'язано з пригніченням каналцевої реабсорбції натрію та води, про що свідчить вірогідне зростання натрійурезу на 19% ( $p < 0,05$  відносно контролю). Достовірне збільшення натрій-калієвого коефіцієнту сечі в 1,3 разу ( $p < 0,05$  відносно контролю) під впливом сполуки 77 свідчить про послаблення мінералокортикоїдного контролю видільної функції нирок.

У здорових тварин досліджувана сполука, як і препарат порівняння мексидол, не змінює нирковий кровообіг, його швидкість залишається у межах показників інтактного контролю. Визначені ренальні ефекти сприятливо доповнюють церебропротекторну дію нової сполуки.

При захворюваннях нирок небезпечним є розвиток ішемічної ГНН. Цей симптомокомплекс характеризується швидкою втратою гомеостатичних функцій нирок. Він спостерігається у 5% усіх шпиталізованих пацієнтів і переважає серед хворих хірургічного та акушерського профілю (S.Uchino, 2006). Незважаючи на удосконалення методів профілактики та лікування, смертність при ішемічній ГНН складає 50%, а в окремих групах хворих (дитячий і літній вік, поліорганна недостатність) сягає 80% (P. Devarajan, 2006). Тому пошук нових нефропротекторних засобів для лікування гіпоксичного стану нирок є актуальним. Оскільки саме ішемія є найбільш значущим ланцюгом у патогенетичному каскаді виникнення та хронізації ниркової недостатності було доцільним вивчити дію сполуки 77 як потенційного нефропротектора за умов ішемічної ГНН.

При ішемічній ГНН у тварин групи контрольної патології достовірно знижувався діурез ( $p < 0,05$ ), у 58,3% тварин зареєстровано анурію та відбувається значне порушення функцій нирок (табл. 6).

Препарат порівняння хофітол вірогідно підвищував діурез ( $p < 0,05$ ) на тлі ГНН, але незначно знижував кількість тварин з анурією – 33,3% відносно групи контрольної патології, вірогідно відновлював функціональну активність нирок (табл.6).

**Вплив сполуки 77 та хофітолу на парціальні функції нирок та біохімічні показники у щурів з ішемічною ГНН на першу добу (n=6)**

Показники	Інтактний контроль	Контрольн а патологія	Сполука 77, 5 мг/кг	Хофітол, 110 мг/кг
Діурез, мл/100 г за 2 год	2,13±0,09	0,22±0,08*	0,76±0,17* #	0,92±0,27*#
% тварин із анурією	0	58,3*	16,7* #	33,3 * #
Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	59,0±2,76	263±12,7*	148±7,28* #	165±6,62* #
ШКФ, мл/год/100г	0,15±0,01	0,003±0,001*	0,009±0,001*#	0,022±0,007*#
Коефіцієнт кореляції Пірсона (діурез / вміст креатиніну сечі)	- 0,85	0,99	- 0,18	0,96
Сечовина сечі, ммоль/л	26,8±1,57	8,43±0,87*	15,5±1,09* #	16,7±2,02* #
Сечовина сироватки крові, ммоль/л	5,24±0,18	28,5±1,87*	17,4±1,51* #	16,6±1,09* #
Кліренс сечовини, мл/хв 100г	0,093±0,006	0,002±0,0*	0,004±0,001*	0,015±0,005* #
Білок сечі, г/л	0,20±0,02	0,83±0,07*	0,48±0,05* #	0,53±0,08* #
АЛАТ, моль/ч.л	0,65±0,03	1,30±0,08*	1,03±0,08*#	1,11±0,07*
АсАТ, моль/ч.л	0,56±0,02	1,23±0,06*	0,97±0,04*#	1,07±0,06*

Примітки. Статистично значущі відмінності: \* – із показниками групи інтактного контролю,  $p < 0,01$ ; # – із показниками групи контрольної патології,  $p < 0,05$ ; \$ – із показниками групи хофітолу,  $p < 0,05$ .

Сполука 77 вірогідно зменшувала кількість тварин з анурією (16,7%  $p < 0,05$ ) та перевершувала за цим показником препарат порівняння хофітол. Сполука 77 відновлювала функціональний стан нирок вірогідно відносно показників груп контрольної патології та хофітолу (табл.6).

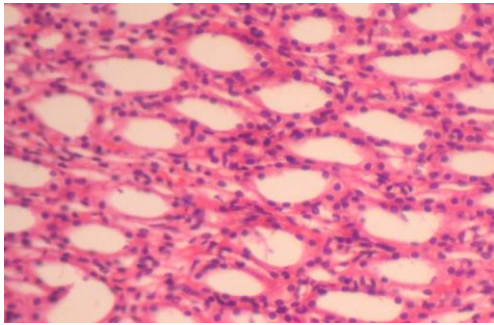
Нефропротекторна дія сполуки 77 реалізується не лише за рахунок мембранопротекторної, антиоксидантної, антигіпоксичної та антицитолітичної активності, що було встановлено раніше, а також внаслідок позитивного впливу на нирковий кровобіг, про що свідчать результати дослідження впливу сполуки 77 та мексидолу на кровобіг (мл/мин) у нирковій артерії після відтворення ішемії/реперфузії. Сполука 77 підвищує кровопостачання нирок до 54% ( $p < 0,01$ ) вже через 5 хв, а через 1 год після тотальної ішемії кровобіг сягає 70% ( $p < 0,01$ ) від вихідного рівня.

Ефективність досліджуваної сполуки за умов ішемічної ГНН перевищує дію мексидолу ( $p < 0,05$ ). Відновлення ниркового кровобігу, ймовірно, відбувається за рахунок потужного антигіпоксичного та антиоксидантного ефекту досліджуваної сполуки, оскільки активація ПОЛ і відповідне порушення функціонального стану



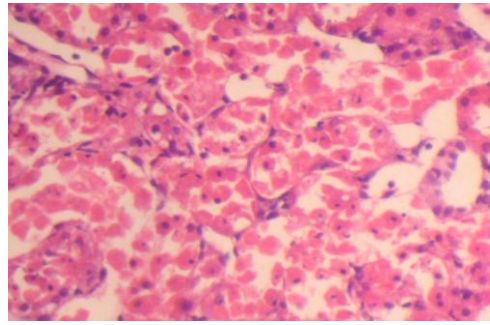
мембран є важливою ланкою патогенезу ниркової недостатності. Нефропротекторна дія нової сполуки за умов гострого ішемічного ураження нирок набуває значення в аспекті доведеної К. Eckardt (2005) залежності між розвитком гіпоксії внаслідок порушення кровопостачання та тяжкістю ураження нирок.

З метою підтвердження нефропротекторної дії нової сполуки проведені морфологічні дослідження (рис. 6а-г).



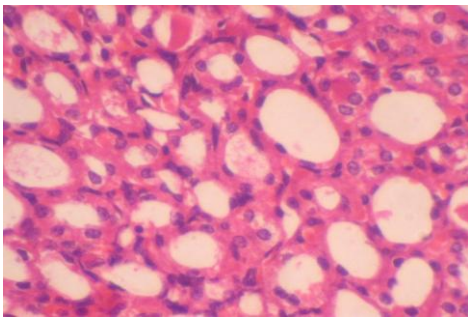
а

Нирка інтактного щура. Нормальний стан нефротелію прямих каналців та епітелію збиральних трубок. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .



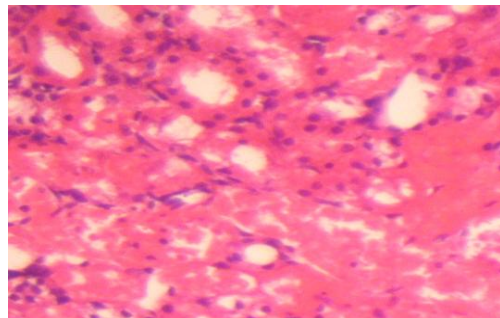
б

Нирка щура групи контрольної патології. Патологічні зміни проксимальних каналців внутрішньої зони кіркової речовини – некроз нефротелію. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .



в

Нирка щура на тлі введення сполуки 77. Стан прямих каналців та збиральних трубок мозкового шару наблизений до норми. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .



г

Нирка щура на тлі введення хофітолу. Некроз частини проксимальних каналців внутрішньої зони кіркової речовини. Гематоксилін-еозин  $\times 250$ .

Рис. 6 Вплив сполуки 77 (5 мг/кг) та хофітолу (110 мг/кг) на нирки щурів за умов гострої ішемічної ниркової недостатності на другу добу

У щурів групи контрольної патології спостерігали весь спектр патологічних змін каналцевих клітин нирок від дистрофії (набухання та вакуолізація цитоплазми) до некрозу (рис. 6б). Сполука 77 сприяла відновленню кровообігу у ниркових артеріях та зменшенню патологічних змін у паренхімі. У внутрішній та юкстамедулярній зонах нефротелій спостерігався без ознак некрозу та дезорганізації. Просвіт каналців здебільше широкій, вільний (рис. 6в). Нефропротекторна дія хофітолу була значно меншою (рис. 6г).

Нефропротекторну дію сполуки 77 доведено також на моделі етиленгліколевої ГНН за інтегральним критерієм виживаності тварин. За умов

введення сполуки 77 показник летальності становив 50% ( $p < 0,05$ ), мексидолу – 62,5% ( $p < 0,05$ ), для віта-мелатоніну – 75% ( $p < 0,05$ ), проти 100% у групі контрольної патології.

Встановлена нефропротекторна дія сполуки 77 та визначений іншими авторами захисний вплив на нирки мелатоніну (G. Sezgin, 2013, O.Sinanoglu, 2012), дозволяють стверджувати про схожість їхньої активності.

Отже, за фізіологічних умов 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол] виявляє діуретичну дію, не змінює нирковий кровообіг. За умов патології нирок токсичного (етиленгліколева ГНН) та ішемічного (ішемічна ГНН) генезу сполука 77 виявляє захисну дію на нирки на рівні препаратів порівняння відновлює кровопостачання нирок.

**Дослідження гепатопротекторної дії спіроциклічного похідного оксиндолу (розділ 8).** Гіпоксичні ураження печінки ішемічного та токсичного генезу залишаються актуальним питанням сучасної медицини. У той же час невирішеною проблемою гепатології є обмежений асортимент специфічних антигіпоксиків метаболічної дії. У зв'язку з цим доцільним було з'ясувати можливість застосування нової сполуки із встановленою антигіпоксичною дією за умов ураження печінки різного генезу.

Моделі ішемічної ГПН характеризується надзвичайно високою летальністю тварин групи контрольної патології – 64,3% ( $p < 0,001$ ) протягом 24 год, що свідчить про тяжкість патології. Віта-мелатонін зменшував цей показник до 40%, тіотриазолін – до 25% ( $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології). Захисний вплив сполуки 77 встановлено за зниженням летальності до 0% ( $p < 0,001$ ). Ішемічна ГПН супроводжувалась збільшенням КМП у 1,4 разу, значною інтенсифікацією процесів ПОЛ, збільшенням вмісту ТБК-реактивів ( $p < 0,001$ ) та ДК ( $p < 0,01$ ) у гомогенаті печінки та сироватці крові у середньому в 1,4-2,6 разу, при цьому активність АОС була знижена у 1,5-1,8 разу, що встановлено за змінами вмісту ВГ ( $p < 0,01$ ) та активністю каталази ( $p < 0,01$ ).

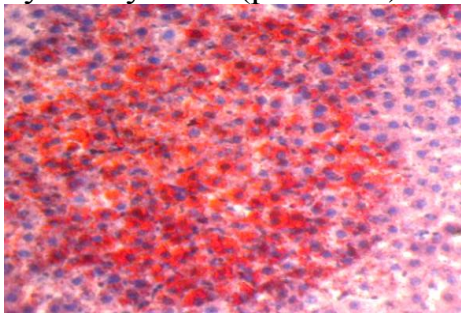
Препарат порівняння віта-мелатонін вірогідно ( $p < 0,05$ ) поступається сполуці 77 за антицитолітичною дією (активність АлАТ та АсАТ знижується на 30% ( $p < 0,01$ ) та 25% ( $p < 0,001$ ) відповідно відносно групи контрольної патології) та здатністю нормалізувати КМП та зменшувати холестатичний синдром. Відомий гепатопротектор тіотриазолін за впливом на активність АлАТ, АсАТ та лужної фосфатази дещо поступався за ефективністю новій сполуці, а за зменшенням КМП був вірогідно менш активний ( $3,90 \pm 0,10$ ,  $p < 0,05$ ) за умов введення сполуки 77 проти  $4,21 \pm 0,09$  у тварин, що отримували тіотриазолін, відповідно.

Досліджувана сполука виявила значну антиоксидантну дію, що встановлено за нормалізацією балансу ПОЛ-АОС. Зниження інтенсивності ПОЛ верифіковане за вірогідним зменшенням ТБК-реактивів ( $p < 0,001$ ) та ДК ( $p < 0,01$ ) у середньому в 1,3-2,3 разу відносно групи контрольної патології та відновленням вмісту ВГ на 40% активності каталази на 52% ( $p < 0,01$ , відносно контрольної патології).

Сполука 77 сприяє відновленню функціональної активності печінки, а саме білоксинтетичної функції (за збільшенням вмісту в 1,2 разу,  $p < 0,01$ ) загального білка в сироватці крові відносно групи контрольної патології); нормалізації

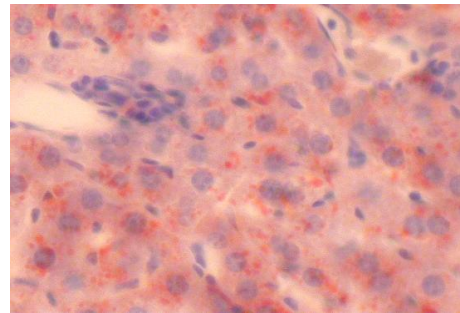
вуглеводного обміну (за збільшенням вмісту глікогену в гомогенаті печінки у 1,6 разу, ( $p < 0,001$ ) та підвищенням рівня глюкози в сироватці крові у 1,3 разу ( $p < 0,01$ ) відносно групи контрольної патології); зменшенням синдрому холестазу (за зниженням у 1,6 разу ( $p < 0,001$ ) активності лужної фосфатази відносно групи контрольної патології).

Отже, гепатопротекторна дія сполуки 77 складається із антигіпоксичної, антицитолітичної, мембранопротекторної, антиоксидантної активності. За захисним впливом на печінку за умов ішемічної ГПН сполука 77 не поступається відомому гепатопротектору тіотриазоліну та вірогідно перевищує ефективність віта-мелатоніну. Гістологічні дослідження підтверджують захисний вплив на печінку сполуки 77 (рис. 7а-г).



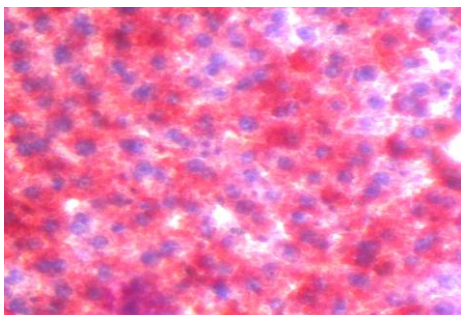
а

Препарат печінки щура групи контрольної патології. Краплі жиру у цитоплазмі гепатоцитів. Судан IV  $\times 200$ .



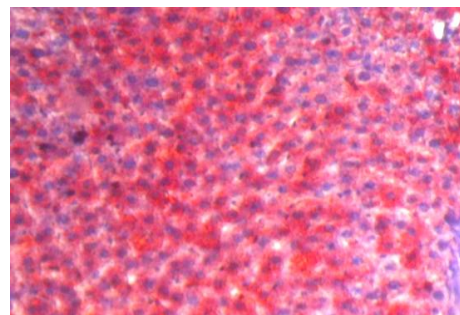
б

Препарат печінки щура, якому вводили сполуку 77. Незначне накопичення ліпідів у цитоплазмі гепатоцитів Судан IV  $\times 250$ .



в

Препарат печінки щура, якому вводили тіотриазолін. Доволі значне накопичення ліпідів у гепатоцитах. Судан IV  $\times 200$ .



г

Препарат печінки щура, якому вводили віта-мелатонін. Значна кількість ліпідів у цитоплазмі гепатоцитів. Судан IV  $\times 200$ .

Рис. 7 Вплив сполуки 77 (5 мг/кг), тіотриазоліну (48 мг/кг) та віта-мелатоніну (5 мг/кг) на печінку щурів через добу після моделювання ішемічної гострої печінкової недостатності

Нова сполука зменшує виразність жирової дистрофії гепатоцитів, морфологічні прояви гепатоцелюлярної енергетичної недостатності клітин. За позитивним впливом на виразність морфологічних ознак сполука 77 не поступається класичному гепатопротектору тіотриазоліну та перевищує протекторну дію віта-мелатоніну.

Слід відзначити, що за здатністю зменшення жирової дистрофії гепатоцитів на тлі ішемії сполука 77 переважала препарати порівняння. Також досліджувана сполука чинила виразний сприятливий вплив на морфологічні прояви енергетичної недостатності клітин (за вмістом глікогену) порівняно з препаратом порівняння віта-мелатоніном і не поступається тіотриазоліну.

Гепатопротекторна дія сполуки 77 – структурного аналогу мелатоніну – за всіма досліджуваними показниками перевищує ефективність мелатоніну, для якого встановлена гепатопротекторна дія у хворих на печінкову енцефалопатію (С. Chojnacki, 2012, I. Butun, 2013).

На моделі токсичного тетрахлорметанового гепатиту у тварин гепатопротекторна дія сполуки 77 (5 мг/кг) знаходиться на рівні, а для деяких показників вірогідно перевищує ефективність препаратів порівняння мексидолу (100 мг/кг) та дарсилу (6,3 мг/кг). Слід відзначити достовірні переваги нової сполуки перед препаратами порівняння за здатністю нормалізувати дисбаланс системи ПОЛ-АОС.

Отже, значна антицитолітична активність та антиоксидантна дія лежить в основі гепатопротекторного ефекту сполуки 77 за умов гострого токсичного ураження печінки.

Узагальнюючи одержані результати щодо вивчення впливу сполуки 77 на печінку, можна зробити висновок, що ефективність її захисної дії не залежить від генезу патології (токсичне або ішемічне ураження). Провідними механізмами гепатопротекторної дії нової сполуки є антигіпоксичний, антиоксидантний, антицитолітичний ефекти.

**Дослідження механізмів антигіпоксичної дії спіроциклічного похідного оксидолу (розділ 9).** Відомо, що ішемія, з якої починаються клінічні прояви ГПМК, запускає розвиток багатокомпонентного комплексу патобіохімічних реакцій – ішемічного каскаду, найважливіше місце у якому займає порушення енергозабезпечення нейронів, активація ПОЛ та деструкція нейрональних мембран (С.Г. Бурчинский, 2012). Особливістю церебрального метаболізму є те, що він практично не має запасу енергетичних субстратів та потребує їх постійного постачання через мозковий кровообіг (L. Owen, 2011). Це обумовлює раціональність включення до схеми лікування ішемічних уражень мозку метаболічних препаратів, здатних відновлювати енергетичний обмін, поряд із своєчасним призначенням лікарських засобів стандартної терапії – антитромботичних, гіполіпідемічних та ін. (P. Vliet, 2012). Зазначене обумовило доцільність вивчення впливу нової сполуки перш за все церебральний енергетичний обмін в умовах БКО.

Сполука 77 (5 мг/кг) покращувала показники церебрального енергетичного обміну за умов необоротної БКО, що верифіковано за значним відновленням рівня АТФ на 158% ( $p < 0,001$ ) відносно показника групи контрольної патології та нормалізацією рівня АДФ. Нова сполука вірогідно збільшує активність ферментів дихального ланцюгу – піруватдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитратсинтази та достовірно перевищувала ефективність мексидолу в дозі 100 мг/кг за всіма показниками.

Наступний етап дослідження включав вивчення активності NSE та стану кислотно-лужного балансу на тлі церебральної ішемії/реперфузії. Активність NSE, що вивільнюється із нейронів при їх деструкції корелює з об'ємом інфаркту головного мозку у пацієнтів із ГПМК (N. Anand, 2005). Встановлено, що сполука 77 виявляє значну нейропротективну дію за вірогідним зменшенням активності NSE на 55,7% ( $4,43 \pm 0,09$  нг/л,  $p < 0,001$ ) відносно групи контрольної патології ( $10,0 \pm 0,47$  нг/л), що свідчить про зниження процесу руйнування нейронів головного мозку. Мексидол зменшував цей показник до  $2,13 \pm 0,19$  нг/л.

Сполука 77 на тлі церебральної ішемії/реперфузії перешкоджає розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу – характерної ознаки гіпоксичного ураження. Нова сполука збільшує вміст стандартного бікарбонату в 1,6 разу ( $p < 0,001$  відносно контрольної патології); суми основ усіх буферних систем в 1,6 разу ( $p < 0,001$  відносно контрольної патології); знижує дефіцит буферних основ в 3,2 разу ( $p < 0,001$  відносно контрольної патології).

Зниження надходження кисню до нервових клітин швидко призводить до енергетичного дефіциту, який індукує значні пошкодження нейронів, у тому числі їх некроз або апоптоз. Деструкція нейронів, зокрема нейроапоптоз розвивається як каскадний процес, початковим етапом якого є фрагментація молекул ДНК у нейронах, що може служити індикатором тяжкості ішемічного ураження головного мозку (R. Pandya, 2011).

На третю добу після церебральної ішемії/реперфузії встановлено значне збільшення нейроапоптозу в 1,4 разу ( $p < 0,01$  відносно псевдооперованного контролю) у групі контрольної патології. Цитиколін знижує фрагментацію ДНК у 1,1 разу ( $p < 0,05$ ) відносно групи контрольної патології. Нова сполука пригнічує фрагментацію ДНК у нейронах соматосенорної зони головного мозку у 1,3 разу ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної патології, що вказує на антиапоптотичну активність та вірогідно перевищує дію цитиколіну ( $p < 0,05$ ). Нейропротекторна активність сполуки 77, очевидно пов'язана із відновленням енергетичних процесів у нейронах та нормалізацією церебрального кровобігу, що було доведено у попередніх дослідженнях.

Церебропротекторні ефекти сполуки 77 узагальнено у табл. 7. Результати 5 серій проведених досліджень доводять, що політропна церебропротекторна активність сполуки 77 реалізується за рахунок зниження процесів апоптозу, нормалізації енергетичного обміну у нейронах, поліпшення кровопостачання мозку, відновлення кислотно-лужного балансу та рівноваги ПОЛ-АОС. Вищезазначене пояснює здатність нової сполуки відновлювати гістоструктуру тканини мозку, зменшувати неврологічний дефіцит та інші прояви ГПМК.

З метою верифікації відновлення енергетичного метаболізму, як провідного механізму церебропротекторної та кардіопротекторної дії 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу] проведено серію дослідів на моделях нейрогенного стресу, гострої нормобаричної гіпоксії, а також вивчення змін енергетичного метаболізму міокарда на тлі гострого ізадринного міокардиту. Результати дослідження впливу сполуки 77 на енергетичний метаболізм наведено у табл. 8.



**Церебропротекторні ефекти сполуки 77 на різних моделях ішемії головного мозку**

№	Препарат порівняння	Зміна досліджуваних показників під впливом сполуки 77 у дозі 5 мг/кг
<b>Необоротна білатеральна каротидна оклюзія</b>		
1	Пірацетам, 200 мг/кг	Збільшення виживаності «↑» Зниження неврологічного дефіциту «↑» Нормалізація гістоструктури тканин мозку «↑»
2	Мексидол, 100 мг/кг	Відновлення енергетичного метаболізму «↑»
<b>Церебральна ішемія/реперфузія</b>		
3	Вінпоцетин, 5 мг/кг	Нормалізація кровотоку у внутрішній сонній артерії «=»
4	Мексидол, 100 мг/кг	Зниження активності нейронспецифічної енолази «=» Нормалізація кислотно-лужного балансу «=»
5	Цитиколін, 120 мг/кг	Зниження нейроапоптозу «↑»

Примітки: «↑» – ефективність сполуки 77 вірогідно перевищує дію препарату порівняння; «=» – ефективність сполуки 77 на рівні дії препарату порівняння.

**Вплив на енергетичний метаболізм сполуки 77 (5 мг/кг) у порівнянні з активністю мексидолу (100 мг/кг)**

№	Умови	Вплив на показники енергетичного обміну
1	Необоротна білатеральна каротидна оклюзія	Сполука 77 відновлює церебральний енергетичний метаболізм вірогідно в 1,2 разу ( $p < 0,05$ ) краще за мексидол
2	Нейрогенний стрес	Сполука 77 відновлює церебральний енергетичний метаболізм вірогідно в 1,2 -1,4 разу ( $p < 0,05$ ) краще за мексидол
3	Гостра нормобарична гіпоксія	Сполука 77 відновлює церебральний енергетичний метаболізм вірогідно в 1,2 -1,4 разу ( $p < 0,05$ ) краще за мексидол
4	Ізодриновий міокардит	Сполука 77 відновлює енергетичний метаболізм міокарда на рівні мексидолу

Нова сполука максимально ефективно впливає на енергетичний обмін головного мозку, в 1,2–1,4 разу перевищуючи дію мексидолу. Енергозберігаючий впливу сполуки 77 не залежить від генезу ураження. Енергетичний метаболізм міокарда за умов ізодринового міокардиту вона відновлює на рівні мексидолу.

Узагальнення органопротекторної дії сполуки 77 наведено у табл. 9.

## Узагальнення органотропних властивостей сполуки 77

Фармакологічний ефект/ препарат порівняння, мг/кг	Фармакологічна активність у балах	
	Сполука 77, 5 мг/кг	Препарат порівняння
1	2	3
<b>Церебропротекторна дія</b>		
Необоротна БКО (збільшення виживаності зниження неврологічного дефіциту, відновлення гістоструктури тканин мозку)/ пірацетам, 200 мг/кг	3/3	2/2
Необоротна БКО (відновлення церебрального метаболізму)/ мексидол, 100 мг/кг	3	2
Нейрогенний стрес (відновлення церебрального метаболізму)/ мексидол, 100 мг/кг	3	2
Гостра нормобарична гіпоксія (відновлення церебрального метаболізму)/ мексидол, 100 мг/кг	3	2
Церебральна ішемія/ реперфузія (нормалізація мозкового кровобігу) вінпоцетин, 5 мг/кг	2	2
Церебральна ішемія/ реперфузія (зниження активності нейронспецифічної енолази, нормалізація кислотно-лужного балансу)/ мексидол, 100 мг/кг	2/2	2/2
Церебральна ішемія/ реперфузія (зниження фрагментації ДНК, сенсомоторної зони неокортексу)/ цитиколін, 120 мг/кг	3	2
<i>Сума балів церебропротекторної дії</i>	<i>24</i>	<i>18</i>
<b>Кардіопротекторна дія</b>		
Іздринний міокардит (антиоксидантна, цитолітична дія, відновлення гістоструктури міокарда)/ мексидол, 100 мг/кг	3/2/3	2/2/2
Інфаркт міокарду (зниження летальності, відновлення показників ЕКГ) /мексидол, 100 мг/кг	2/2	2/2
<i>Сума балів кардіопротекторної дії</i>	<i>12</i>	<i>10</i>
<b>Нефропротекторна дія</b>		
Етиленгліколева нефропатія (зниженні летальності)/ мексидол 100 мг/кг	2	2
Ішемічна ГНН (відновлення функціональних та біохімічних показників нирок, нормалізація гістоструктури нирок) хофітол, 110 мг/кг	2/2/3	2/2/2
<i>Сума балів нефропротекторної дії</i>	<i>9</i>	<i>8</i>
<b>Гепатопротекторна дія</b>		
Тетрахлорметановий гепатит (антиоксидантна, антицитолітична дія, виділення та склад жовчі)/ дарсил 6,3 мг/кг	3/3/2	2/2/2

Продовження табл. 9

1	2	3
Ішемічна ГПН (зниження летальності, антицитолітична, антиоксидантна дія, відновлення функціональних показників печінки, нормалізація морфоструктури печінки)/ тіотриазолін, 48 мг/кг	3/3/3/2/2	2/2/2/2/2
<i>Сума балів гепатопротекторної дії</i>	21	16

Примітки: фармакологічна дія у балах: «1 бал» – відсутність вірогідних відмінностей із контрольною патологією, «2 бали» – вірогідні відмінності відносно контрольної патології, «3 бали» – вірогідні відмінності відносно препарату порівняння.

Аналіз дослідження свідчить про виразну органотропність сполуки 77 до життєвоважливих органів, найбільш чутливих до гіпоксичних уражень різного генезу (головний мозок, міокард, нирки, печінка).

Порівняльний аналіз фармакологічної активності сполуки 77 та віта-мелатоніну наведено у табл. 10.

Таблиця 10

### Порівняльний аналіз фармакологічної дії сполуки 77 та віта-мелатоніну

Досліджувані показники	Фармакологічна активність у балах	
	Сполука 77	Віта-мелатонін
Антигіпоксична дія (нормобарична гіпоксія/ гемічна гіпоксія)	3/3	2/2
Збільшення локомоторно-дослідницької активності у здорових тварин за тестом «відкрите поле»	3	1
Етиленгліколева нефропатія (зниження летальності)	2	2
Ішемічна ГПН (зниження летальності, антицитолітична/ антиоксидантна/ відновлення функціональних показників печінки/ нормалізація гістоструктури печінки)	3/3/3/3/3	2/2/2/2/1
<i>Сума фармакологічних ефектів</i>	26	16

Примітки: фармакологічна активність у балах: «1 бал» – відсутність вірогідних відмінностей із групою контрольної патології (або інтактного контролю у тестах на здорових тваринах); «2 бали» – вірогідні зміни відносно групи контрольної патології; «3 бали» – вірогідні зміни відносно віта-мелатоніну.

Отримані дані свідчать про перевагу нової сполуки перед мелатоніном за фармакологічною активністю: захисна дія сполуки 77 майже в 2 рази перевищує ефективність мелатоніну. Позитивною характеристикою нової сполуки є



відсутність залежності ефекту від освітлення на відміну від віта-мелатоніну, що викладено вище.

**Дослідження токсикологічних властивостей спіроциклічного похідного оксиндолу (розділ 10).** Встановлено, що ЛД<sub>50</sub> сполуки 77 при пероральному введенні щурам перевищує 15000 мг/кг. Відповідно до класифікації Сидорова К.К. досліджувана сполука є відносно нешкідливою речовиною та відноситься до VI класу токсичності. За умов тривалого застосування (30 діб) встановлено відсутність токсичного впливу сполуки 77 у дозах 5 мг/кг (добова умовнотерапевтична доза) та 50 мг/кг (10-кратна добова умовнотерапевтична доза) на функції життєво важливих органів та систем організму дослідних тварин.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукової проблеми, розробки нового препарату антигіпоксantu із органопротекторною дією, яка полягає у патогенетичному обґрунтуванні застосування 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндолу], обраного за результатами скринінгових досліджень із нової комбінаторної бібліотеки спіроциклічних похідних оксиндолу.

1. Із 200 конденсованих гетероциклічних сполук із ядром 4H-пірано[3,2-с]хромену за комп'ютерним прогнозом обрано 29 похідних, для яких проведено скринінгові дослідження антигіпоксичної дії на моделях нормобаричної та гемічної гіпоксії та визначено закономірності зв'язку «структура-антигіпоксична дія». Встановлено, що поєднання трьох фармакофорів а саме: 3-метилізатину, 4-гідрогсікумарину та малондінітрилу з одночасним введенням метильної групи у 5 положення базового ядра молекули (сполука 77 – 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідро-пірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол]) – сприяє посиленню антигіпоксичного ефекту. Для сполуки 77 визначено ефективну умовнотерапевтичну добову дозу 5 мг/кг та доведено відсутність залежності антигіпоксичної дії від добового ритму освітлення на відміну від препарату порівняння віта-мелатоніну.

2. Сполука 77 виявляє виразний церебропротекторний ефект як за умов необоротної гострої церебральної ішемії, так і за умов ішемії-реперфузії. На відміну від препарату порівняння пірацетаму, сполука 77 сприяє більш повному відновленню показників стану ЦНС. За гістологічними даними церебропротекторна дія нової сполуки перевищує пірацетам. За умов ішемії-реперфузії головного мозку досліджувана сполука вірогідно ( $p < 0,05$ ) відновлює церебральний кровобіг у каротидному басейні відносно контрольної патології на рівні препарату порівняння вінпоцетину.

3. Сполука 77 у дозі 5 мг/кг виявляє комплекс психотропних ефектів, який складається із ноотропної (антиамнестична активність 93% на моделі скополамінової амнезії), антидепресивної (зниження тривалості нерухомого вису у 2,6 разу ( $p < 0,05$ ), зменшення блефароптозу у 1,1 разу ( $p < 0,05$ ), нормалізація температури тіла ( $p < 0,05$ ) на моделі резерпінової депресії) та анксиолітичної активності (збільшення часу перебування у світлих відсіках у 5,9 разу ( $p < 0,01$ ), зменшення відвідувань темного рукава та часу перебування у ньому у 1,8-2 рази

( $p < 0,01$ ). Особливістю останньої є селективність із відсутністю небажаного впливу на тонус м'язів та координацію рухів (зменшення у 2 рази ( $p < 0,001$ ) кількості тварин, що впали зі стрижня до 60 с відносно діазепаму), що сприятливо відрізняє сполуку 77 від діазепаму.

4. Встановлено кардіопротекторну дію сполуки 77 у дозі 5 мг/кг на діатермокоагуляційній моделі гострого інфаркту міокарда у щурів на рівні мексидолу в дозі 100 мг/кг. Сполука 77 вірогідно знижує летальність з 96,7% до 60% ( $p < 0,001$ ), збільшує кількість тварин із синусовим ритмом, знижує ЧСС та нормалізує показники ЕКГ ( $p < 0,05$ ). На моделі гострого оклюзійного інфаркту міокарда доведено здатність нової сполуки відновлювати артеріальний тиск, ЧСС, ударний об'єм крові ( $p < 0,05$ ). За умов гострого ізадринного міокардиту захисна дія сполуки 77 на міокард перевищує ефективність мексидолу, що верифіковано за нормалізацією КМС ( $p < 0,001$ ), зниженням активності АсАТ ( $p < 0,001$ ), зменшенням вмісту ТБК-реактивних, ДК та збільшенням вмісту ВГ, каталази ( $p < 0,001$ ) біохімічних показників. За результатами гістологічних досліджень на тлі сполуки 77 встановлено відсутність мікронекрозів у лівому шлуночку та появу молодих фібробластів, тобто початок процесу репарації на відміну від менш виразної протективної дії на міокард мексидолу.

5. Сполука 77 у фізіологічних умовах (здорові тварини) у дозі 5 мг/кг збільшує діурез за рахунок пригнічення канальцевої реабсорбції натрію та води, вірогідно посилює натрійурез на 19% ( $p < 0,05$  відносно контролю). За умов ішемічної та етиленгліколевої гострої ниркової недостатності сполука 77 у дозі 5 мг/кг виявляє нефропротекторну дію, за якою перевищує хофітол, віта-мелатонін та мексидол, суттєво знижує деструктивні процеси в канальцях нефронів, особливо у проксимальних та у висхідній частині петлі Генле, зменшує виразність наслідків порушення кровобігу. За даними напівкількісної оцінки виразності патологічних змін нефротелію нефропротекторний ефект сполуки 77 перевищує активність хофітолу у дозі 110 мг/кг ( $p < 0,05$ ).

6. Сполука 77 у дозі 5 мг/кг виявляє значну гепатопротекторну дію на модельних патологіях ішемічного та токсичного генезу. За показником летальності на моделі ішемічної гострої печінкової недостатності її гепатопротекторна активність (летальність 0%) вірогідно перевищує захисну дію віта-мелатоніну (40%,  $p < 0,001$ ) та тіотриазоліну (25%,  $p < 0,01$ ). Сполука 77 чинить значну антицитолітичну дію, вірогідно знижує активність маркерів цитолізу АлАТ та АсАТ у сироватці крові (на 44% та на 49% відповідно відносно контрольної патології,  $p < 0,001$ ). Антиоксидантну дію нової сполуки встановлено за нормалізацією балансу ПОЛ-АОС (зниження вмісту ТБК-реактивних, ДК, збільшення ВГ, активності каталази у 1,3-2,3 разу,  $p < 0,01$  відносно контрольної патології). Захисний вплив сполуки 77 на печінку перевищував дію тіотриазоліну та віта-мелатоніну ( $p < 0,05$ ). Гепатопротекторну дію сполуки 77 підтверджує зменшення некротизованих гепатоцитів, зниження їх жирової дистрофії та відновлення вмісту глікогену у цитоплазмі. За умов гострого тетрахлорметанового гепатиту антицитолітична та антиоксидантна дія нової сполуки вище за активність дарсилу ( $p < 0,05$ ) та мексидолу ( $p < 0,05$ ). Сполука 77 нормалізує функціональні (збільшення швидкості секреції жовчі у 2,2 разу

відносно контрольної патології,  $p < 0,001$ ) та біохімічні показники (зниження холестерину у сироватці крові у 1,3 разу  $p < 0,001$ , збільшення вмісту холестерину та жовчних кислот у жовчі у 1,3 разу,  $p < 0,01$ , відносно контрольної патології). Встановлено вірогідні переваги нової сполуки за антиоксидантною дією над мексидолом ( $p < 0,05$ ) та дарсилом ( $p < 0,05$ ).

7. Механізм церебропротекторної дії сполуки 77 є багатовекторним та включає антигіпоксичний вплив, відновлення кровобігу, зниження деструкції нейронів (за вмістом нейронспецифічної енолази) та зменшення метаболічного ацидозу на рівні мексидолу. Нова сполука запобігає розвитку енергодефіциту за умов різних модельних патологій (гостра церебральна ішемія, гостра нормобарична гіпоксія, нейрогенний стрес, ізадринний міокардит), збільшує рівень АТФ (46-57%,  $p < 0,05$ ), зменшує накопичення АДФ (23-28%,  $p < 0,05$ ), нормалізує активність ферментів дихального ланцюга. Відновлення енергетичного метаболізму не залежить від генезу патології. За впливом на показники енергетичного обміну у головному мозку досліджувана сполука вірогідно ( $p < 0,05$ ) перевищує мексидол, у міокарді діє на його рівні. У механізмі органопротекторного ефекту бере участь антиоксидантний та антицитолітичний вплив сполуки 77 доведений на різних експериментальних моделях (ізадринний міокардит, ішемічна гостра ниркова та печінкова недостатність, тетрахлорметановий гепатит), що перевищує такий препаратів порівняння (мексидол, дарсил, тіотриазолін).

8. У механізмі нейропротекторної дії нової сполуки бере участь інгібування фрагментації ДНК (в 1,3 разу відносно контрольної патології  $p < 0,05$ ) у нейронах кори головного мозку щурів на тлі церебральної ішемії/реперфузії, що свідчить про антиапоптотичну дію, яка в 1,15 разу ( $p < 0,05$ ) перевищує активність цитиколіну в дозі 120 мг/кг.

9. У механізмі психотропних ефектів сполуки 77 бере участь вплив на обмін моноамінів головного мозку. Зменшується вміст норадреналіну та адреналіну ( $p < 0,05$ ), знижується співвідношення норадреналін/дофаміну ( $p < 0,05$ , відносно інтактного контролю), що може свідчити про прискорення обігу катехоламінів в головному мозку тварин. Коефіцієнт лінійної кореляції Пірсона між вмістом дофаміну та норадреналіну дорівнює:  $r = 0,05$  (інтактний контроль),  $r = 0,94$  (сполука 77),  $r = 0,86$  (пірацетам),  $r = 0,98$  (іміпрамін). Під дією нової сполуки та препаратів порівняння створюється сильний додатний зв'язок між вмістом дофаміну та норадреналіну. Аналогічні зміни відбуваються у парі адреналін-дофамін:  $r = 0,19$  (інтактний контроль),  $r = 0,95$  (сполука 77),  $r = 0,81$  (пірацетам) та  $r = 0,97$  (іміпрамін). Отже, досліджувана сполука та препарати порівняння посилюють спряженість обігу катехоламінів в головному мозку.

10. Порівняльний кількісний аналіз захисного впливу нової сполуки на органи з різною чутливістю до гіпоксії залежно від генезу первинних порушень дає підставу вважати найбільш перспективним подальше вивчення та застосування 4,3'-спіро[(2-аміно-3-нітрил-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксидолу] при ураженнях головного мозку та печінки.

11. За параметрами гострої токсичності сполука 77 відноситься до класу відносно нешкідливих речовин (VI клас токсичності,  $LD_{50} > 15000$  мг,

внутрішньошлункове введення). Встановлено відсутність токсичного впливу сполуки 77 у дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг при тривалому застосуванні (30 діб) на функції життєво важливих органів та систем організму тварин.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:**

1. Цубанова Н. А. Стан кардіогемодинаміки щурів при гострому інфаркті міокарда під впливом мексидолу і нового структурного аналогу мелатоніну / Н. А. Цубанова, А. І. Березнякова // Запорозький медичний журнал. – 2008. – № 1 (46). – С.15–16. (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів).
2. Синтез 4,3'-спіро-[(2-аміно-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он)-2'-оксіндолів] та їх антикоагулянтна активність / Р. Г. Редькін, Л. А. Шемчук, В. П. Черних, А. І. Березнякова, Н. А. Цубанова // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2008. –Т.6, Вип. 2(22). – С.24-29. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
3. Цубанова Н. А. Дослідження можливої ангіпоксичної дії деяких спіроциклічних оксіндольних похідних 2-аміно-3-ціано-4*n*-пірану / Н. А. Цубанова // Клінічна фармація. – 2009. – Т.13, №2. – С.62–64.
4. Цубанова Н. А. Дослідження церебропротекторної дії та гострої токсичності нової сполуки – спіроциклічного похідного оксіндолу / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – № 1(6). – С.36–41. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
5. Цубанова Н. А. Дослідження антидепресивної та анксиолітичної дії спіроциклічного похідного оксіндолу / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Вісник фармації. – 2011. – № 1(65). – С.77–80. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
6. Цубанова Н.А. Вплив спіроциклічних похідних оксіндолу на нейромедіаторні моноаміни головного мозку мишей / Н.А. Цубанова, С.Ю. Штриголь // Фармаком. – 2011. – №1/2. – С.81–84. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
7. Цубанова Н. А. Нефропротекторні властивості спіроциклічного похідного оксіндолу на моделі ішемічної гострої ниркової недостатності / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Фармаком. – 2011. – № 3. – С.65–69. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
8. Цубанова Н. А. Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на кровопостачання головного мозку, деструкцію нейронів і кислотно-лужний баланс при експериментальній церебральній ішемії / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь, О. А. Ходаківській // Фармаком. – 2011. – №4. – С.60–63. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
9. Цубанова Н. А. Антидепресивні властивості спіроциклічного похідного оксіндолу / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь, Р. Г. Редькін // Клінічна фармація.

- 2011. – Т.15, №1. – С.56–60. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
10. Цубанова Н. А. Ренальні ефекти спіроциклічного похідного оксіндолу в інтактних щурів / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Український медичний альманах. – 2011. – Т.14, №4. – С. 179–180. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
11. Цубанова Н. А. Ноотропні властивості спіроциклічного похідного оксіндолу та його вплив на рівень моноамінів головного мозку / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Український біофармацевтичний журнал. – 2011. – № 1(12). – С.26–29. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
12. Цубанова Н. А. Дослідження кардіопротекторної дії спіроциклічного похідного оксіндолу / Н. А. Цубанова // Український біофармацевтичний журнал. – 2011. – № 6 (17). – С.27–30.
13. Цубанова Н. А. Порівняння кардіопротекторних властивостей спіроциклічного похідного оксіндолу та мексидолу у щурів із моделлю гострого інфаркту міокарда / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь, О. А. Ходаківській // Клінічна фармація. – 2012. – Т.16, №1. – С.35–37. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
14. Цубанова Н. А. Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на показники церебрального енергетичного обміну в умовах гіпоксичної та негіпоксичної патології / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь, Т. В. Горбач // Клінічна фармація. – 2012. – Т.16, №4. – С. 51–54. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
15. Цубанова Н. А. Гістологічні дослідження впливу спіроциклічного похідного оксіндолу на перебіг гострої ниркової недостатності у щурів / Н. А. Цубанова // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2012. – Т.7, №1. – С.115–120.
16. Цубанова Н. А. Вивчення гепатопротекторної дії спіроциклічного похідного оксіндолу за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту / Н. А. Цубанова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – №3(28). – С.61–65.
17. Цубанова Н. А. Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на показники енергетичного обміну та гістоструктуру міокарда за умов гострої ізадринової патології / Н. А. Цубанова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – №4(29). – С.44–48.
18. Цубанова Н. А. Хронофармакологічне дослідження активності спіроциклічного похідного оксіндолу на тлі гострої гіпоксії / Н. А. Цубанова // Український медичний альманах. – 2012. – Т.15, №5 (додаток). – С. 278–279.
19. Цубанова Н. А. Вивчення токсичності спіроциклічного похідного оксіндолу на щурах за умов тривалого введення / Н. А. Цубанова // Український біофармацевтичний журнал. – 2012. – №4(21). – С. 30–34.
20. Цубанова Н. А. Дослідження впливу спіроциклічного похідного оксіндолу на показники енергетичного обміну при експериментальній церебральній ішемії / Н. А. Цубанова // Фармаком. – 2012. – № 4. – С.81–84.

21. Цубанова Н. А. Захисна дія спіроциклічного похідного оксіндолу в умовах етиленгліколевої нефропатії / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Буковинський медичний вісник. – 2012. – № 3(63), ч.2. – С.231–233. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
22. Шатилов А. В. Влияние производных (2-оксоиндолинилиден-3)-уксусной кислоты и спироциклического производного оксіндола на поведенческие реакции и морфологические изменения головного мозга на моделях церебральной ишемии / А. В. Шатилов, Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // *Сигиерул медікал. Молдова*. – 2013. – Vol.56, №1. – С.35–40. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
23. Цубанова Н. А. Порівняльний аналіз впливу спіроциклічного похідного оксіндолу та віта-мелатоніну на показники центральної нервової системи / Н. А. Цубанова // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 2 (25). – С.67–70.
24. Цубанова Н. А. Структурні аналоги мелатоніну – новий клас сполук для пошуку біологічно активних речовин // Матеріали VII Всеукраїн. наук.– практ. конф. «Клінічна фармація в Україні», 15-16 листопада; НФаУ.-Х., 2007.-С.178.
25. Цубанова Н. А. Дослідження антигіпоксичних властивостей серед похідних 2-аміно-3-ціано-4Н-пірану / Н. А. Цубанова, О. С. Лук'янчук, О. О. Саричев // Сьогодні та майбутнє фармації: Тези доповідей Всеукраїнського конгресу, м. Харків, 16-18 квітня 2008 р. / Ред.кол.: В.П.Черних та ін. – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С.434. (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, аналіз та узагальненні отриманих результатів).
26. Цубанова Н. А. Гіпоксія та антигіпоксанти / Н. А. Цубанова, С. О. Бондаревський // Розвиток наукової думки – 2008: Збірка матеріалів всеукраїнської науково–практ. конф., м. Миколаїв, 10 жовтня 2008 р. – Миколаїв. – 2008. – Т.4. – С.67-69. (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів).
27. Цубанова Н. А. Фармакологічні скрінінгові дослідження спіроциклічних похідних триптофану / Н. А. Цубанова, С. О. Бондаревський // Актуальні питання медицини і фармації: Збірка матеріалів науково–практ. конф. молодих вчених, м. Запоріжжя, 7 жовтня 2008 р. – Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2008. – С.4. (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів).
28. Цубанова Н. А. Вивчення захисної дії спіроциклічного похідного оксіндолу за умов гострої церебральної ішемії / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України (Харків, 15-17 верес. 2010 р).У 2 т. / М-во охорони здоров'я України, НФаУ.: В.П.Черних (голова) та ін. уклад.– Х.: НФаУ, 2010. – Т.2. – С.140. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).
29. Цубанова Н. А. Психотропні властивості спіроциклічного похідного оксіндолу / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь // Фармакологія та лікарська

токсикологія. – 2011. – № 5(24). – С.338–339. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

30. Журенко Д. С. Фармакологический скрининг спироциклических производных оксіндола / Д. С. Журенко, Н. А. Цубанова // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: Сб. материалов III Междунар. науч. конф. в рамках научной сессии НИУ «БелГУ», г. Белгород, 12-17 апр. 2013 г.: под ред. проф. И.В.Спичак.– Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2013. – С.118–120. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

31. Присич К. С. Особенности современных нейрометаболических препаратов / К. С. Присич, Н. А. Цубанова, А. Ф. Пиминов // Клінічна фармація: 20 років в Україні: Матеріали Національного конгресу (Харків, 21-22 березня 2013 року). Харків, 2013. – С.186–187. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

32. Zhurenko D. S. Hepatoprotective activity of spirocyclic derivative oxindole under acute hepatic ischemia / D. S. Zhurenko, N. A. Tsubanova // Actual questions of development of new drags: Abstracts of XX International scientific and practical conference of young scientists and student (April 25-26, 2013). Editorial board Chernykh V.P.– Kh.: Publishing office, 2013. – P.181. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

33. Цубанова Н. А. Використання спіроциклического похідного оксіндолу для розробки лікарського засобу нефропротекторної дії: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №137 – 2012. Протокол №74 від 22.02.2012 р. / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь. – К., 2012. – 4 с. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

34. Цубанова Н. А. Інноваційні перспективи використання спіроциклического похідного оксіндолу для розробки лікарського засобу церебропротекторної та ноотропної дії: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №138 – 2012.– Протокол №74 від 22.02.2012 р. / Н. А. Цубанова, С. Ю. Штриголь. – К., 2012. – 4 с. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

35.

36. Пат. 87952 Україна, МПК С07D 209/04, С07D 209/96, С07D 311/96, С07D 405/02, С07D 491/20, А61К 31/33, А61К 31/404, А61К 31/436, А61К 31/437, А61К 31/438. 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол], який проявляє антигіпоксантну активність / Редькін Р. Г., Цубанова Н. А., Черних В. П., Шемчук Л. А., Березнякова А. І., Репетева О. В.; заявник та патентовласник НФаУ. – №200815044; заявл. 26.12.2008; опубл. 25.08.2009, Бюл. №16. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

37. Пат. 96034 Україна, МПК С07D 209/04, С07D 209/96, С07D 311/96, С07D 405/02, С07D 491/20, А61К 31/33, А61К 31/404, А61К 31/436, А61К 31/437, А61К 31/438. Застосування 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу] в якості церебропротекторного засобу / Н.А.

Цубанова Н. А., Штриголь С. Ю., Редькін Р. Г.; заявник та патентовласник НФаУ. – №200912110; заявл. 25.11.2009; опубл. 26.09.2011, Бюл. № 18. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

38. Пат. 96835 Україна, МПК А61К 31/404, А61К 31/4353, А61Р 25/22. Застосування 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу] як засобу з анксиолітичною дією / Цубанова Н. А., Штриголь С. Ю., Редькін Р. Г.; заявник та патентовласник НФаУ. – №20103625; заявл. 29.03.2010; опубл. 10.10.2011, Бюл. № 23. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).

39. Пат. 98724 Україна, МПК А61К 31/33, А61К 31/404, А61К 31/436, А61К 31/437, А61К 31/438, А61Р 13/12. Застосування 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу] як нефропротекторного засобу / Цубанова Н. А., Штриголь С. Ю., Редькін Р. Г.; заявник та патентовласник НФаУ. – №201102182; заявл. 24.02.2011; опубл. 11.06.2012, Бюл. №11. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень, аналізі та узагальненні отриманих результатів).