

М. В. Филимонова<sup>1</sup>, Л. И. Шевченко<sup>1</sup>, В. М. Макачук<sup>1</sup>, Е. А. Чеснакова<sup>1</sup>,  
А. С. Шевчук<sup>1</sup>, А. С. Филимонов<sup>1</sup>, С. А. Крыжановский<sup>2</sup>

## ВАЗОПРЕССОРНЫЕ СВОЙСТВА ИНГИБИТОРА СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА T1059. II: ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НА МОДЕЛЯХ ГИПОВОЛЕМИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

<sup>1</sup> Медицинский радиологический научный центр (МРНЦ) имени А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, Россия, 249036, Обнинск, ул. Королёва, 4.

<sup>2</sup> ФГБУ НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

В модельных экспериментах, воспроизводящих острый тяжёлый геморрагический шок, показано, что ингибитор синтаз оксида азота T1059 (1-циклогексаноил-2-этилизоимиочевины гидробромид) при однократном парентеральном введении в нетоксических дозах (внутрибрюшинно, 10 мг/кг; внутримышечно, 30 мг/кг) оказывает выраженное гипертензивное действие, значительно превосходящее по длительности эффект фенилэфрина, и при этом снижает краткосрочную гибель подопытных животных. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей фармакологической разработки соединения T1059 с целью создания оригинального отечественного лекарственного средства, обладающего противошоковой активностью, приемлемого для применения на догоспитальном этапе лечения.

**Ключевые слова:** производные изотиомочевины; ингибиторы синтаз оксида азота; гиповолемические расстройства; гипертензивное действие.

На первом этапе исследований нами установлено, что производное изотиомочевины (ИТМ) T1059 является водорастворимым, умеренно токсичным соединением (ЛД<sub>16</sub>, ЛД<sub>50</sub>, ЛД<sub>84</sub> внутрибрюшинно (в/б) — 274, 380, 523 мг/кг), способным к конкурентному ингибированию активности синтаз оксида азота со значительной селективностью к eNOS и iNOS (ИК<sub>50</sub> для nNOS, iNOS, eNOS — 60,3, 1,8, 3,2 мкмоль), и при однократном в/б введении нормотензивным крысам Wistar в дозе 10 мг/кг оказывает длительное (не менее 90 мин) сосудосуживающее действие, сопровождающееся умеренной брадикардией [1]. Эти данные явились основанием для изучения вазопрессорных свойств этого соединения на экспериментальных моделях острой гиповолемической гипотонии.

### Экспериментальная часть

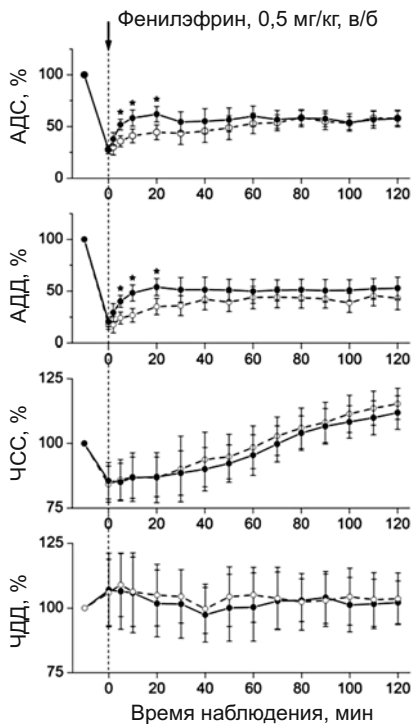
Исследования выполнены на крысах-самцах Wistar в возрасте 3–4 мес массой тела 230–320 г. Источник получения лабораторных животных, условия их содержания и ухода были такими же, как и на первом этапе исследований [1].

Субстанция соединения T1059 для данного исследования была разработана в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ имени А. Ф. Цыба по методам [1]. По данным ВЭЖХ и газовой хроматографии, содержание гидробромидов 1-циклогексаноил-2-этилизоимиочевины в субстанции — не менее 95 %, родственных примесей — менее 0,5 %, посторонних примесей и органических растворителей — менее 0,5 %. По данным фармакопейных методик содержание сульфатной золы — менее 0,1 %; тяжелых металлов — менее 0,001 %; потеря массы при высушивании — менее

5 %; содержание бактериальных эндотоксинов — менее 0,35 ЕЭ/мг; по микробиологической чистоте соответствует категории 1.2Б.

В опытах соединение T1059 использовали в виде 0,5–3 % растворов, приготовленных перед введением на основе 0,9 % асептического раствора натрия хлорида (ОАО Дальхимфарм, РФ). T1059 вводили подопытным животным однократно в/б в дозах 5, 10 и 20 мг/кг; внутримышечно (в/м) — в дозах 20 и 30 мг/кг. Выбор доз T1059 определялся полученными ранее данными по NOS-ингибирующей активности этого соединения *in vivo* и его вазопрессорной активности у нормотензивных крыс [1].

В качестве препарата-сравнения в работе использовали фенилэфрин. Выбор такого препарата был обусловлен двумя группами причин. Во-первых, в отличие от эндогенных адреномиметиков (эпинефрин, норэпинефрин, дофамин), фенилэфрин является селективным агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов, и его специфическая активность ограничена сосудосуживающим, вазопрессорным действием (в частности, не сопровождается прямым влиянием на инотропную и хронотропную функции сердца) [2]. Кроме того, по данным литературы, фенилэфрин гидролизует моноаминоксидазой (МАО) существенно медленнее эндогенных катехоламинов, и в настоящее время рассматривается как один из наиболее длительно действующих  $\alpha_1$ -адреномиметиков [2, 3]. Фенилэфрин (мезатон; 1 % раствор для инъекций, ОАО ICN Полифарм, РФ) вводили подопытным животным однократно в/б в дозе 0,5 мг/кг, которая, с учетом межвидового перерасчета [4], соответствует максимальной одно-



**Рис. 1.** Влияние фенилэфрина в дозе 0,5 мг/кг при однократном в/б введении на АД, ЧСС и ЧДД наркотизированных крыс Вистар в состоянии острого тяжёлого геморрагического шока. Здесь и на рис. 2 и 3: разброс в точках соответствует  $\pm$  СМЕ; светлые символы — данные контроля, тёмные — опытных животных. \* Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по критерию Данна с контролем.

кратной дозе для человека при в/м или подкожном (п/к) введении [3].

Исследования выполнены на модели острого тяжёлого геморрагического шока, вызванного острой, массивной кровопотерей, сходной по течению с тяжёлыми клиническими формами гиповолемических расстройств [5]. Острый тяжёлый геморрагический шок вызывали путём контролируемого забора крови в объёме 2,5 мл на 100 г массы тела (47–50 % объема циркулирующей крови (ОЦК)) из правой сонной артерии в течение 8–12 мин.

Наркотизированным животным (тиопентал натрия; 60 мг/кг, в/б; ОАО Синтез, РФ) после проведения трахеотомии катетеризовали левую яремную вену и обе сонные артерии, вводили гепарин (100 ЕД, в/в; НПО Микроген, РФ). В опытах регистрировали показатели частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД), систолического (АДС) и диастолического (АДД) артериального давления и ЭКГ в стандартных отведениях. В качестве регистратора использовали полиграф RM-6000 (Nihon Kohden, Япония) или комплекс PowerLab 8/30 (ADInstruments, Австралия). Регистрацию показателей проводили у интактных животных, затем — по окончании кровопускания. После чего контрольным животным вводили асептический 0,9 % раствор натрия хлорида (0,3 мл, в/б; ОАО Дальхимфарм, РФ), а животным подопытных групп — соединение T1059 или фенилэфрин. Регистрацию показателей продолжали в течение

последующих 120 мин. Выживших к концу срока наблюдения животных выводили из опыта воздушной эмболией.

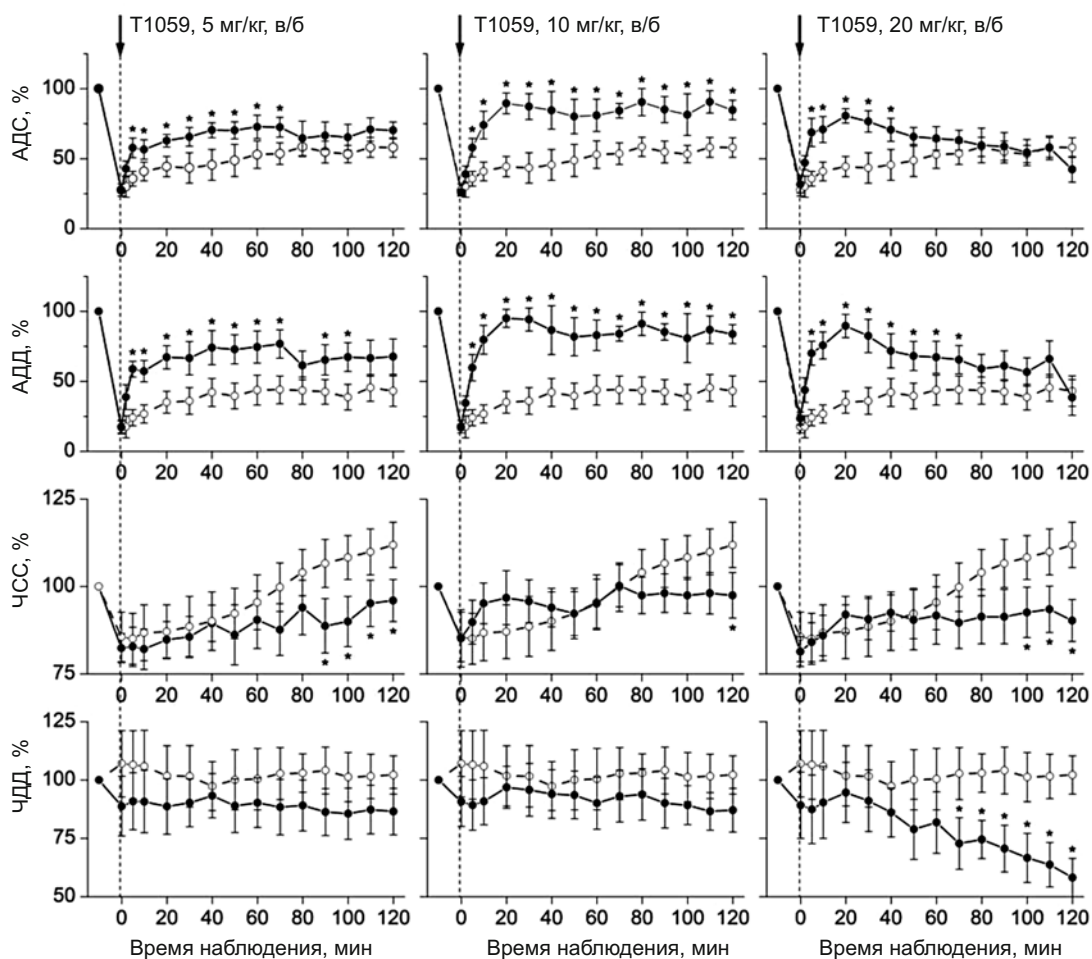
Статистическую проверку межгрупповых различий проводили с помощью непараметрических критериев. При множественном сравнении проводили ранговый дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса с использованием критерия Данна, при сравнении краткосрочной гибели применяли точный критерий Фишера [6]. Во всех случаях различия полагали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

В используемой модели острая массивная кровопотеря, составляющая 47–50 % ОЦК [4], приводила к развитию у животных острого тяжёлого геморрагического шока: на момент окончания кровопускания у крыс наблюдалась умеренная брадикардия (ЧСС снижена на 15 %) и глубокая гипотония — АДС составляло 28 %, АДД — 18 % от исходного уровня (рис. 1).

В течение первого часа после кровопотери тяжесть гипотонии у контрольных животных ( $n = 18$ ) частично компенсировалась за счёт повышения тонуса сосудов и ускорения сердечного ритма: к 60-й минуте наблюдения АДС составляло 53 %, АДД — 44 % от исходного. Однако существенной компенсации дефицита кровотока, судя по всему, не происходило: на фоне сохраняющейся гипотонии через 40–60 мин после кровопотери у значительной части этих животных при тотальной ишемии миокарда развивались грубые нарушения внутрисердечной проводимости, дыхательная аритмия, и вскоре регистрировалась остановка дыхания и сердечных сокращений. Из 18 контрольных животных 9 особей (50 %) погибло к 120 мин опыта.

Препарат сравнения фенилэфрин (0,5 мг/кг, в/б) вызывал у крыс ( $n = 10$ ), находящихся в состоянии тяжёлого геморрагического шока, быстрый подъём АД: уже на 5 мин после инъекции адреномиметика показатели АД подопытных животных были статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), чем у контрольных. Максимальный гипертензивный эффект фенилэфрина наблюдался на 10–20 мин, при этом показатели АДС были выше на 35–40 %, а АДД — на 65–75 %, чем в контроле, и составляли 45–55 % от исходного уровня перед кровопотерей. Однако вазопрессорное действие фенилэфрина при данном способе введения было непродолжительным, достоверный гипертензивный эффект наблюдался около 15–20 мин — с 5 по 20 мин после инъекции, что вполне согласуется с литературными данными [2, 3]. Начиная с 30 мин и до конца наблюдения, все регистрируемые показатели у крыс, получавших фенилэфрин, и контрольных животных статистически не различались. Кратковременное и достаточно ограниченное ослабление гипотонии при воздействии фенилэфрина в этих опытах не оказало заметного влияния на течение шока, из 10 крыс в этой группе 5 особей (50 %) погибло к 120 мин эксперимента.



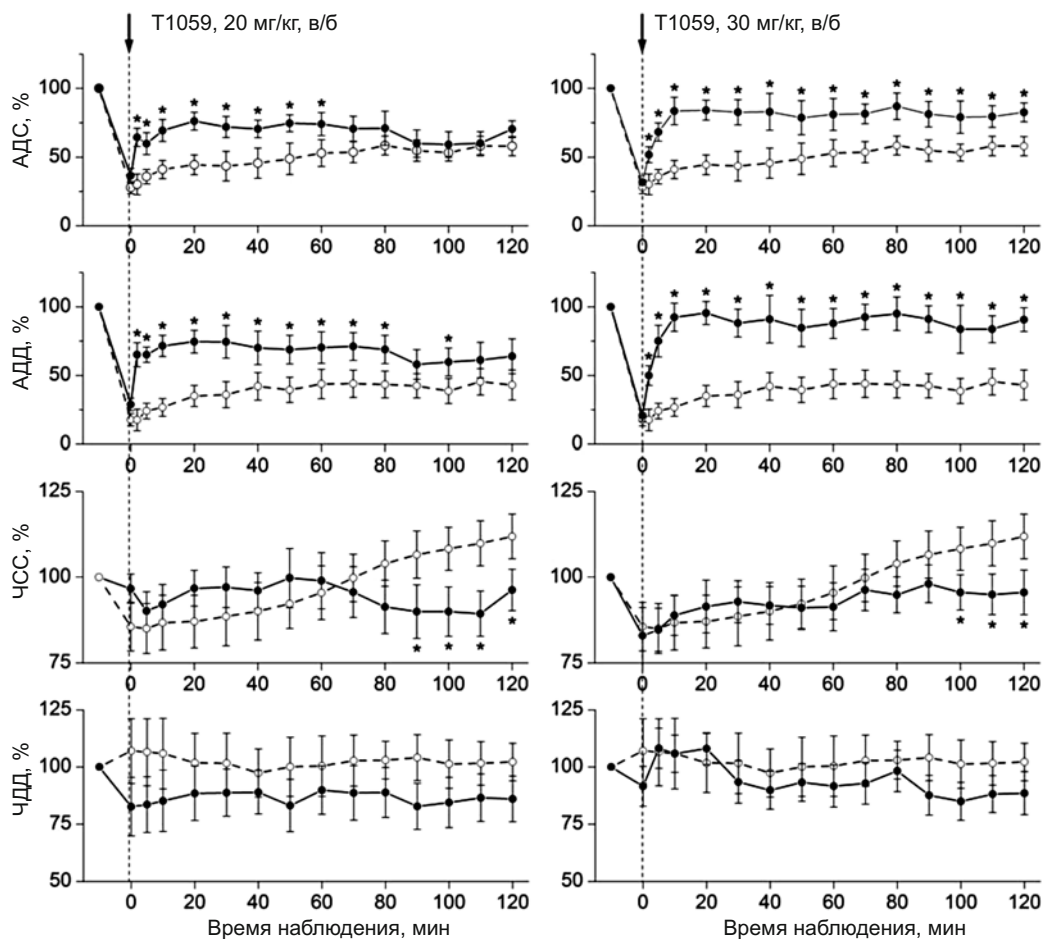
**Рис. 2.** Влияние соединения Т1059 в дозах 5, 10 и 20 мг/кг при однократном в/б введении на АД, ЧСС и ЧДД наркотизированных крыс Вистар в состоянии острого тяжёлого геморрагического шока.

Иная картина наблюдалась у подопытных животных, получавших соединение Т1059 (рис. 2). При однократном в/б введении Т1059 в дозе 5 мг/кг ( $n = 8$ ) гипертензивный эффект развивался у крыс в такие же сроки, как и при воздействии фенилэфрина. Статистически значимое повышение АД ( $p < 0,05$ ) также отмечалось уже на 5 мин после инъекции, но степень подъёма АД была в 1,2 – 1,4 раза выше, чем на фоне фенилэфрина. Максимальный гипертензивный эффект наблюдался на 10 – 60 мин, при этом показатели АДС были выше на 40 – 55 %, а АДД — на 70 – 100 %, чем в контроле, и составляли 60 – 75 % от исходного уровня перед кровопотерей. И при этом длительность вазопрессорного действия Т1059 в 2 – 3 раза превосходила продолжительность эффекта фенилэфрина: достоверный гипертензивный эффект наблюдался в течение 70 мин, а проявления повышенного тонуса сосудов прослеживались до 100 мин наблюдения.

Более выраженное и продолжительное ослабление гипотонии при в/б введении Т1059 в дозе 5 мг/кг сопровождалось также и тенденцией ( $p = 0,225$ ) к снижению тяжести течения геморрагического шока данной модели. В течение 120 мин наблюдения из 8 крыс этой группы погибло 2 особи (25 %).

При однократном в/б введении Т1059 в дозе 10 мг/кг ( $n = 11$ ) гипертензивный эффект был существенно более выраженным и продолжительным. Статистически значимое повышение АД ( $p < 0,05$ ) также отмечалось на 5 мин после инъекции, но возрастание АД было более продолжительным, максимальный эффект развивался к 15 – 20 мин после введения Т1059, и степень подъёма АД была в 1,5 – 2 раза выше, чем на фоне фенилэфрина ( $p < 0,05$ ). При этом гипертензивное действие соединения Т1059 в 5 – 7 раз превосходило по длительности эффект фенилэфрина — с 20 мин от введения Т1059 и до конца наблюдения показатели АД крыс, потерявших половину ОЦК, стабильно сохранялись на уровне 80 – 95 % от исходных показателей. Ослабление вазопрессорного действия Т1059 у различных особей этой группы начинало развиваться на 100 – 140 мин после инъекции.

При этом значительное и продолжительное ослабление гипотонии при в/б введении Т1059 в дозе 10 мг/кг сопровождалось выраженным ( $p = 0,029$ ) снижением тяжести течения шока. В течение опыта из 11 крыс этой группы погибла только 1 особь (9 %). По данным ЭКГ, у этих животных на поздних сроках отмечались умеренные признаки ишемии миокарда, но



**Рис. 3.** Влияние соединения Т1059 в дозах 20 и 30 мг/кг при однократном в/м введении на АД, ЧСС и ЧДД наркотизированных крыс Вистар в состоянии острого тяжёлого геморрагического шока.

грубых нарушений ритма и проводимости не наблюдались.

Вазопрессорное действие при в/б введении Т1059 в дозе 20 мг/кг ( $n = 9$ ), судя по всему, было избыточным для данной модели и отягощало течение геморрагического шока, вероятно, вследствие избыточной централизации кровотока. Начальное развитие гипертензивного эффекта в этом случае было сходным с эффектами Т1059 в дозе 10 мг/кг. Но у всех крыс этой группы через 15 – 20 мин после введения Т1059 развивались выраженные ЭКГ-признаки тотальной ишемии миокарда, и в дальнейшем нарастала кардиореспираторная недостаточность, проявлявшаяся грубыми нарушениями сердечного ритма и внутрисердечной проводимости, дыхательной аритмией и прогрессирующим снижением ЧДД и АД. И при этом 2-часовая гибель в этой группе (56 %) несколько превосходила гибель контрольных животных.

Вазопрессивные эффекты Т1059 при однократном в/м введении в дозах 20 и 30 мг/кг, в целом, воспроизводили эффекты этого соединения при в/б введении в дозах 5 и 10 мг/кг (рис. 3).

При однократном в/м введении Т1059 в дозе 20 мг/кг ( $n = 8$ ) степень подъема АД была в 1,3 – 1,6 раза выше, чем на фоне фенилэфрина, и длительность вазопрессорного действия Т1059 в 3 раза превосходи-

ла продолжительность эффекта адреномиметика. Достоверный гипертензивный эффект наблюдался в течение 60 мин, а проявления повышенного тонуса сосудов прослеживались до 100 мин наблюдения. При этом действие Т1059 также сопровождалось тенденцией ( $p = 0,226$ ) к ослаблению тяжести течения шока и снижению краткосрочной летальности в этой группе животных (25 %).

При однократном в/м введении Т1059 в дозе 30 мг/кг ( $n = 10$ ) гипертензивный эффект был существенно более выраженным и продолжительным. В этом случае максимальный гипертензивный эффект развивался к 10 мин после введения Т1059, и степень подъема АД была в 1,5 – 2 раза выше, чем на фоне фенилэфрина ( $p < 0,05$ ). При этом гипертензивное действие соединения Т1059 в 6 – 8 раз превосходило по длительности эффект фенилэфрина, с 10 мин от введения Т1059 и до конца наблюдения показатели АД стабильно сохранялись на уровне 75 – 95 % от исходных показателей. Ослабление вазопрессорного действия Т1059 у различных особей этой группы начинало развиваться на 110 – 160 мин после инъекции. При этом длительное ослабление гипотонии в этом случае также сопровождалось выраженным ( $p = 0,040$ ) снижением краткосрочной летальности подопытных животных, в

течение опыта из 10 крыс этой группы погибла только 1 особь (10 %).

Таким образом, полученные результаты показывают, что ингибитор NOS T1059 при однократном в/б введении в дозе 10 мг/кг (~1/27 ЛД<sub>16</sub>) и однократном в/м введении в дозе 30 мг/кг (~1/9 ЛД<sub>16</sub>) крысам Вистар в состоянии острого тяжелого геморрагического шока оказывает выраженное вазопрессорное действие, сопровождающееся длительным (не менее 2 ч) гипертензивным эффектом и статистически достоверным снижением краткосрочной (2-часовой) гибели животных.

Следует отметить, что способность к повышению краткосрочной выживаемости на ранних стадиях декомпенсированного геморрагического шока экспериментально показана и для ряда других ингибиторов NOS. Причём этот эффект обеспечивали не только ингибиторы NOS с высокой вазопрессорной активностью [7], но и селективные ингибиторы iNOS [8, 9], слабо влияющие при гиповолемии на тонус сосудов, но ограничивающие деструктивные процессы, вызванные окислительным стрессом на фоне острой ишемии. В этой связи соединение T1059, являющееся селективным ингибитором eNOS и iNOS, потенциально может быть эффективным для краткосрочного предотвращения развития полиорганной недостаточности

при острых гипотониях и этот вопрос, по нашему мнению, нуждается в дальнейшем детальном исследовании.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ и правительства Калужской области (12-04-97524-р-центр-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Филимонова, Л. И. Шевченко, В. М. Макаrchук и др., *Хим.-фарм. журнал*, **52**(4), 7 – 12 (2018); *Pharm. Chem. J.*, **52**(4), 294 – 298 (2018).
2. Д. А. Харкевич, *Фармакология. Учебник для вузов*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2010).
3. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства. Пособие для врачей*, Новая Волна, Москва (2005).
4. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований*, Ч. 1, Гриф и К, Москва (2012).
5. Д. С. Саркисов, П. И. Ремезов, *Воспроизведение болезней человека в эксперименте*, Москва (1960).
6. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1998).
7. M. Khazaei, B. Barmaki, A. Nasimi, *Int. J. Prev. Med.*, **3**(1), 47 – 53 (2012).
8. M. C. McDonald, M. Izumi, S. Cuzzocrea, et al., *J. Physiol. Pharmacol.*, **53**(4 Pt 1), 555 – 569 (2002).
9. M. M. Soliman, *J. Emerg. Trauma Shock*, **7**(3), 190 – 195 (2014).

Поступила 23.03.17

## VASOPRESSOR PROPERTIES OF NO SYNTHASE INHIBITOR T1059. PART II: HEMODYNAMIC EFFECTS ON HYPOVOLEMIC DISORDERS

M. V. Filimonova<sup>1</sup>, L. I. Shevchenko<sup>1</sup>, V. M. Makarchuk<sup>1</sup>, E. A. Chesnakova<sup>1</sup>, A. S. Shevchuk<sup>1</sup>, A. S. Filimonov<sup>1</sup>, and S. A. Kryzhanovskii<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A. F. Tsyb Medical Radiology Research Center, Department of P. A. Herzen Federal Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249036 Russia

<sup>2</sup> V. V. Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

Model experiments reproducing acute severe hemorrhagic shock showed that nitric oxide synthase inhibitor T1059 (1-cyclohexanoyl-2-ethylisothiourea hydrobromide) upon a single parenteral administration at non-toxic doses (*i/p*, 10 mg/kg; *i/m*, 30 mg/kg) produced a pronounced hypertensive effect, which was much longer than the effect of phenylephrine and, at the same time, reduced the short-term mortality of experimental animals. The results show good prospects of further pharmacological development of compound T1059 in order to create a domestic drug with antishock activity acceptable for use at the pre-hospital stage of treatment.

**Keywords:** isothiourea derivatives; NO synthase inhibitor; T1059; hypovolemic disorders; hypertensive action.