

О. О. Мойбенко¹, Р. Б. Струтинський¹, Л. М. Ягупольський², А. М. Мохорт³

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

²Інститут органічної хімії НАН України, Київ

³Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

РОЗРОБКА ТА ПІДГОТОВКА ДО ВПРОВАДЖЕННЯ НОВОГО ВІТЧИЗНЯНОГО КАРДІОПРОТЕКТОРНОГО ПРЕПАРАТУ – ФТОРВМІСНОГО АКТИВАТОРА АТФ-ЗАЛЕЖНИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ ФЛОКАЛІН

Анотація: Згідно з завданням науково-дослідної роботи розроблено технологічну високорентабельну схему синтезу нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора К_{АТФ}-каналів Флокалін. Дослідження нешкідливості субстанції та лікарської форми (таблетки) показало, що згідно з класифікацією речовин за токсичністю Флокалін відноситься до класу малотоксичних сполук. Проведені *in vitro* та *in vivo* експерименти показали, що Флокалін має чіткі вазоділататорні властивості, залежні від дози, та антиаритмічну дію, дещо підвищує хвилинний об'єм крові. В експериментах з ішемією-реперфузією міокарда показано, що Флокалін має виражені кардіопротекторні властивості, а саме значно покращує функцію ішемізованого серця в період його реперфузії (зокрема покращує відновлення скорочувальної активності міокарда), проявляє антиаритмічну дію та запобігає виникненню реперфузійної вазоконстрикції. Виявлено, що при експериментальній гострій ішемії-реперфузії Флокалін має антиокиснювальні властивості, зменшує утворення вільних радикалів, сприяє збереженню структури внутрішньоклітинних органел та зменшує розмір інфаркту міокарда порівняно з контрольним експериментом на 37,5 %.

Ключові слова: К_{АТФ}-канали, Флокалін, ішемія-реперфузія, кардіопротекція.

Співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАНУ (академік НАН України О. О. Мойбенко, к. б. н. Р. Б. Струтинський) та Інституту органічної хімії НАНУ (професор Л. М. Ягупольський) розроблено новий препарат для кардіопротекції – Флокалін.

Флокалін – новий, вперше синтезований, фторвмісний активатор АТФ-чутливих калієвих (К_{АТФ}) каналів [1]. Активація К_{АТФ}-каналів, яка виникає при зменшенні кількості енергетичних субстратів – АТФ, що трапляється при гіпоксії та ішемії міокарда, є одним з потужних ендогенних механізмів захисту серця [2, 3]. Це обумовлено скороченням три-

валості потенціалу дії та зменшенням переваження клітин серця кальцієм, що є одним із загальних механізмів розвитку патологічних процесів у серці. Зменшення внутрішньоклітинного кальцію обумовлює також вазоділататорну дію Флокаліну на коронарні та периферичні судини, а також антиспастичну дію на різні органи. Відомо, що за хімічними та фармакологічними ознаками фторвмісні аналогічні сполуки мають ряд переваг порівняно з лікарськими препаратами без молекули фтору в своїй структурі. Досить часто введення атома фтору в молекулу лікарського препарату призводить до зменшення його токсичності та збільшення стабіль-

ності препарату, посилює його ліпофільність і, таким чином, доступність в організм людини; біологічна активність препарату при цьому не зменшується, а інколи навіть посилюється [4]. Суттєвою перевагою Флокаліну над іншими активаторами K_{ATP} -каналів є дуже низька токсичність (напівлетальна доза для білих щурів складає 2 150 мг/кг) при досить потужній дії на серцево-судинну систему.

Метою даної роботи було розроблення технологічної високорентабельної схеми синтезу та дослідження нешкідливості і специфічної дії на моделях ішемії та реперфузії серця нового фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів – Флокаліну.

Згідно з завданням даної роботи було розроблено проект технології одержання Флокаліну з використанням дешевих, доступних і нетоксичних реагентів при простоті проведення основних стадій синтезу. Окремі послідовні етапи оптимальних технологічних рішень процесів синтезу Флокаліну складають схему технології отримання його субстанції. У технологічному циклі одержання Флокаліну нараховується шість основних стадій, деякі з них добре проходили в лабораторних умовах. Але впровадження їх у виробництво пов'язане зі значними труднощами, тому що на етапі синтезу проміжного 4-дифторометоксифенілізотіоціанату потрібне було застосування високотоксичних реагентів, що не дало б можливості впроваджувати цей метод на фармацевтичних заводах України. Для вирішення цієї задачі був знайдений новий досконалий метод одержання 4-дифторометоксифенілізотіоціанату з використанням дешевого промислового реагенту, тим самим виключивши з технологічного циклу високотоксичні речовини, що застосовувалися раніше. Були вдосконалені всі послідовні етапи синтезу Флокаліну до оптимальних технологічних рішень процесів, що складають високорентабельну технологічну схему отримання його субстанції.

При дослідженні Флокаліну на нешкідливість було проведено вивчення одного із найбільш інтегральних показників біологічної активності ксенобіотиків – його гострої токсичності, яка характеризується як швидкотривала шкідлива дія на організм досліджуваної речовини в умовах одноразового або багаторазового (протягом 24 год) їх введення. Гостра токсичність Флокаліну вивчалася в порівняльному аспекті як субстанції, так і лабораторних експериментальних зразків кількох серій лікарської форми (таблетки) на тваринах різних вікових категорій: статевонезрілих, тваринах репродуктивного віку та старих; визначалася на білих щурах згідно з вимогами до лікарських засобів Державного фармакологічного центру МОЗ України, викладеними у методичних рекомендаціях [5, 6]; вивчалася також при пероральному введенні в 1 %-му крохмальному клейстері. Препарат вводили в шлунок за допомогою градуйованого зонда різними дозами – від 790 до 3 160 мг/кг. Ступінь гострої токсичності ксенобіотиків, у т. ч. і лікарських засобів, характеризується величиною дози, одноразове введення якої спричиняє загибель 50 % піддослідних тварин, тобто ЛД₅₀, для розрахунку якої використовувався метод найменших квадратів [7]. Основним критерієм доказу токсичної дії препарату була загибель піддослідних тварин. Разом з цим на протязі вказаного періоду реєструвалися дані про можливий вплив препарату на різні функції організму залежно від дози: індивідуальну масу тіла тварин, загальний стан, зміну положення тіла, стан шкіри, колір слизових оболонок, температуру тіла, наявність/відсутність міозу/мідріазу, лакримації, саливації, ринореї, зміну кольору сечі та фекалій та частоту їх виділення, сонливість, тремор, судоми, пілоерекція, зміну діяльності серцево-судинної, центральної нервової та дихальної систем і т. п. З аналізу отриманих експериментальних результатів було встановлено, що за класифікацією речовин по класу небезпеки Флокалін

відноситься до III класу, який характеризується як клас малотоксичних сполук. Виявлено, що вірогідної різниці за ступенем токсичності Флокаліну між самцями та самками відповідних вікових категорій немає: значення середньолетальних доз препарату для геронтологічних, статевозрілих і статевонезрілих самок та самців становлять відповідно 1 630–1 720, 2 310–2 310, 2 180–2 160 мг/кг (таблиця). Не відмічалось при цьому і помітних проявів клінічних симптомів отруєння Флокаліном у тварин різного віку.

Для визначення специфічної активності Флокаліну були проведені *in vitro* (на ізольованих, перфузованих по Лангендорфу серцях самців морської свинки за методом, описаним в [8]), та *in vivo* експерименти (на безплідних собаках, вагою від 15 до 24 кг за методом, описаним в [9]). В експериментах *in vitro* створювали на 20 хв ішемію та наступну на 40 хв реперфузію, в експериментах *in vivo* створювали регіональну ішемію на 90 хв та реперфузію на 180 хв, що вважалося як контроль. В інших серіях експериментів безпосередньо перед ішемією вводили Флокалін. В експериментах *in vitro* в перфузуючий серце розчин додавали Флокалін (5 мкмоль/л) протягом 5 хв,

в експериментах *in vivo* Флокалін (0,1 мг/кг) вводили внутрішньовенно. Доведено, що Флокалін залежно від дози розширює як коронарні, так і периферійні судини, зменшує системний артеріальний тиск. Максимальні коронаролітичні ефекти Флокаліну відбувалися при концентрації 100 мкмоль/л і складали у середньому $22,09 \pm 4,69\%$ ($n = 10$; $P < 0,002$) від вихідного рівня. Максимальне зниження системного артеріального тиску (у середньому на $44,99 \pm 2,07\%$ ($n = 5$; $P < 0,05$) порівняно з вихідним тиском) відбувалося при введенні Флокаліну дозою 0,75 мг/кг. Оскільки при введенні Флокаліну відбувалось деяке підвищення хвилинного об'єму крові, то можна вважати, що зменшення системного артеріального тиску спричинено вазодилататорними ефектами Флокаліну на судини. Проведені *in vitro* та *in vivo* експерименти показали, що Флокалін має виражені кардіопротекторні властивості: значно покращує функцію ішемізованого серця в період його реперфузії, зокрема покращує відновлення скорочувальної активності міокарду, проявляє антиаритмічну дію, запобігає виникненню реперфузійної вазоконстрикції та сприяє зменшенню розміру інфаркту міокарда. В контрольних дослідах серце відновлювало

Таблиця. Порівняльні показники значень середньолетальних доз Флокаліну (лікарська форма, таблетка, серії 210803 і 150405) для білих щурів різних вікових категорій та статей

Групи тварин	ЛД50, мг/кг для:		
	субстанції	таблеток, серія 210803	таблеток, серія 150405
Геронтологічні:			
самки	1 630	1 710	1 630
самці	1 630	1 720	1 720
Дорослі:			
самки	2 240	2 390	2 310
самці	2 180	2 350	2 310
Статевонезрілі:			
самки	1 900	2 180	2 180
самці	1 970	2 050	2 160

роботу у середньому тільки через $63,71 \pm 20,3$ ($n = 11$) секунди від початку реперфузії серця, тоді як в серії з Флокаліном вже через

$36,45 \pm 3,25$ ($n = 15$; $P < 0,001$) секунди, що майже в 1,75 рази швидше, ніж у контрольному експерименті. Значно краще, ніж у контрольному відбувалось і відновлення скорочувальної активності лівого шлуночка – вже на 30 хвилині реперфузії систолічний тиск в лівому шлуночку відновлювався на 99 %, тоді як в контрольних експериментах навіть під кінець реперфузії він складав лише 61 % від вихідного рівня. Позитивною якістю Флокаліну можна вважати попередження зростання реперфузійного рівня кінцево-діастолічного тиску в лівому шлуночку ішемізованого серця. Суттєвим показником кардіопротекторних властивостей Флокаліну є значне зменшення реперфузійних екстрасистол: під впливом Флокаліну кількість екстрасистол порівняно з контрольним експериментом зменшувалась у 8 разів та складала в середньому $2,83 \pm 0,94$ екстрасистол за хвилину ($n = 15$; $P < 0,001$) проти $22,86 \pm 1,59$ ($n = 11$) у контрольному. Слід зауважити, що в динаміці реперфузії Флокалін в значній мірі впливав на тонус коронарних судин. Якщо в контрольних дослідах за перші 10 хв реперфузії коронарний перфузійний тиск дещо збільшувався, то в серії дослідів з Флокаліном за той же час реакції спостерігалось суттєве розширення коронарних судин: на першій хвилині – на $21,94 \pm 1,4$ та на 10 хвилині на $6,76 \pm 0,34$ % ($n = 15$; $P < 0,05$ по відношенню до вихідного рівня). Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що Флокалін значною мірою попереджає ішемічно-реперфузійні пошкодження кардіоміоцитів: сприяє збереженню цілісності сарколеми та структури внутрішньоклітинних органел, зокрема зменшує кількість контрактур міофіламентів та попереджає деструкцію мітохондрій; сприяє зменшенню розміру інфаркту міокарда порівняно з контрольним експериментом на 37,47 % ($n = 5$; $P < 0,01$) (рис. 1). При дослідженні змін біохімічних параметрів крові було виявлено, що Флокалін проявляє антиокиснювальні властивості:

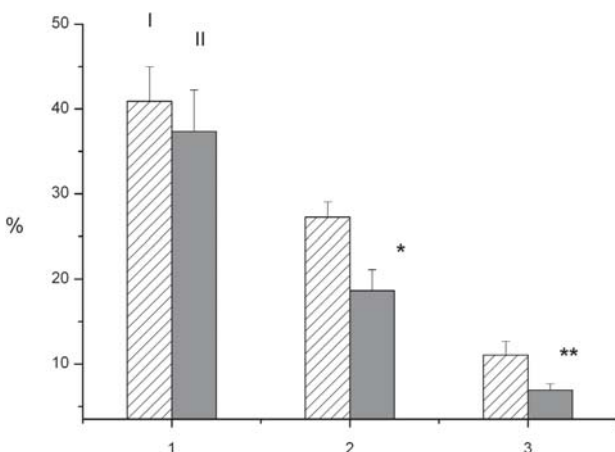


Рис. 1. Розміри зон уражень серця після ішемії-реперфузії міокарда у собак *in vivo*: I – контроль (ішемія-реперфузія); II – після введення Флокаліну (Флокалін + ішемія-реперфузія); 1 – зона ризику/площа лівого шлуночка (%); 2 – зона некрозу/зона ризику (%); 3 – зона некрозу/площа лівого шлуночка (%). * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

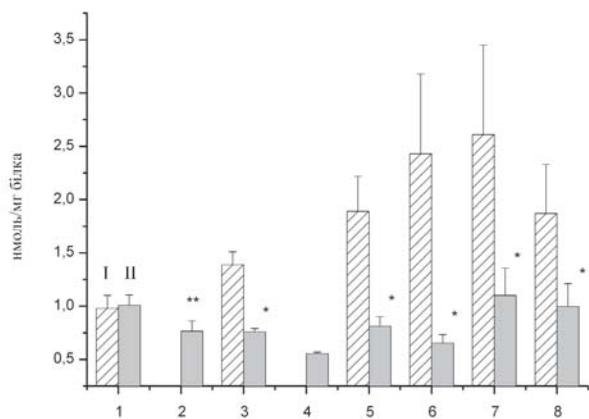


Рис. 2. Вплив Флокаліну на вміст H_2O_2 в крові при ішемії-реперфузії міокарда у собак *in vivo*: I – контроль (ішемія-реперфузія); II – після введення Флокаліну (Флокалін + ішемія-реперфузія); 1 – вихідні умови; 2 – вміст H_2O_2 при введенні Флокаліну; 3 – 1 хв ішемії; 4 – 60 хв ішемії; 5 – 90 хв ішемії; 6 – 60 хв реперфузії; 7 – 120 хв реперфузії; 8 – 180 хв реперфузії. * $P < 0,05$; ** $P < 0,05$ порівняно з вихідними даними

зменшує вміст H_2O_2 (рис. 2) та попереджає зменшення активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази.

Таким чином, під час виконання даної роботи було розроблено технологічну високорентабельну схему синтезу Флокаліну; показано, що за класифікацією речовин по класу небезпеки Флокалін відноситься до III класу; виявлено, що він розширює як коронарні, так і периферичні судини та має виражені кардіопротекторні властивості: значно покращує відновлення скорочувальної активності ішемізованого міокарда під час реперфузії; запобігає виникненню реперфузійної вазоконстрикції коронарних судин; значно зменшує кількість екстрасистол та сприяє зменшенню розміру інфаркту міокарда.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Клебанов Б. М., Малетіна І. І., Ягупольський Л. М. та ін.** Пат. 17071А Україна, МПК⁶ А 61К31/03. N-(1,2,2-триметилпропіл)-N''-ціано-N'-арилгуанідини з фторвмісними замісниками в ароматичному ядрі, які проявляють гіпотензивну та кардіотонічну дію – № 95041977; Заяв. 26.04.95; Опубл. 31.10.97. // Промислова власність. – 1997. – № 5. – С. 3.1.76.

2. **Cavero I., Djellas Y., Guillon J.-M.** Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 1995. – Vol. 9, № 2. – P. 245–255.

3. **Eells J. T., Henry M. M., Gross G. J., Baker J. E.** Increased mitochondrial K_{ATP} channel activity during chronic myocardial hypoxia. Is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? // *Circ Res.* – 2000. – Vol. 87, № 10. – P. 915–921.

4. **Yagupolskii L. M., Maletina I. I., Klebanov B. M.** Fluorine-containing cardiovascular drugs R. Filler et al. *Organofluorine compounds and biomedical application.* – 1993. – Elsevier. – P. 560.

5. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / Методичні рекомендації Державного фармакологічного центру МОЗ України. – К.: Авіцена, 2000. – 43 с.

6. Доклінічні дослідження лікарських засобів. / Методичні рекомендації. – К.: Авіцена, 2001. – 526 с.

7. **Заугольников С. Д., Кочанов М. И., Лойт А. О., Ставчанский И. И.** Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ. – М.: Медицина, 1978. – 180 с.

8. **Струтинський Р. Б., Мойбенко О. О., Ягупольський Л. М., Юзьків М. Я., Квочіна Л. І., Шиш А. М.** Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фтормісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів. // *Фізіол. журн.* – 2001. – Т. 47, № 2. – С. 16–23.

9. **Мойбенко О. О., Юзьків М. Я., Тумановська Л. В., Коцюруба А. В.** Гостра ішемія-реперфузія міокарда: роль оксиду азоту. // *Фізіол. журн.* – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 34–42.

А. А. Мойбенко, Р. Б. Струтинський, Л. М. Ягупольський, А. Н. Мохорт. РАЗРАБОТКА И ПОДГОТОВКА К ВНЕДРЕНИЮ НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ПРЕПАРАТА – ФТОРСОДЕРЖАЩЕГО АКТИВАТОРА АТФ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ФЛОКАЛИН.

Аннотация: В соответствии с заданием научно-исследовательской работы разработана технологическая высокорентабельная схема синтеза нового отечественного кардиопротекторного препарата – фторсодержащего активатора K_{ATP} -каналов Флокалин. Исследования безвредности субстанции и лечебной формы (таблетки) показали, что в соответствии с классификацией веществ по токсичности Флокалин относится к классу малотоксичных соединений. Проведенные *in vitro* и *in vivo* эксперименты показали, что Флокалин проявляет четкие вазодилаторные свойства, зависящие от дозы, и антиаритмическое действие, увеличивает минутный объем крови. В экспериментах с ишемией-реперфузией миокарда показано, что Флокалин имеет выраженные кардиопротекторные свойства, а именно значительно улучшает функцию ишемизированного сердца в период его реперфузии (в частности улучшают восстановление сократительной активности миокарда), проявляет антиаритмическое действие и предупреждает появление реперфузционной вазоконстрикции. Показано, что при экспериментальной острой ишемии-реперфузии Флокалин имеет антиокислительные свойства, уменьшает образование свободных радикалов, способствует сохранению структуры внутриклеточных органелл и уменьшает размер инфаркта миокарда по сравнению с контрольным экспериментом на 37,5 %.

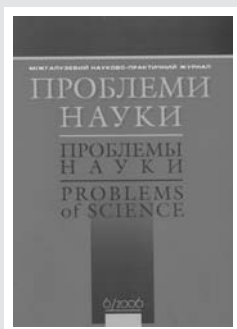
Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, Флокалин, ишемия-реперфузия, кардиопротекция.

O. O. Moybenko, R. B. Strutynskiy, L. M. Yagupolskii, A. M. Mohort. CREATION AND PREPARATION OF THE NEW DOMESTIC CARDIOPROTECTIVE DRUG – FLUORINE-CONTAINING ACTIVATOR OF ATP-DEPENDENT POTASSIUM CHANNEL FLOKALIN TO PUT INTO OPERATION.

Abstract: In accordance with the task of the present scientific-research work the technological highly remunerative scheme of synthesis of the new orginative cardioprotective preparation – fluorine-containing K_{ATP} channel opener Flokalin has been developed. Investigation of innocence of this substance and drug (tablets) has shown that Flokalin belongs to the class of low toxical compounds. In vitro and in vivo experiments have shown that Flokalin exhibits the dilatation of blood vessels depending on dose; decreases the number of extrasystoles; increases minute volume of blood. The experiment with myocardial ischemia-reperfusion has shown that Flokalin had expressed cardioprotective properties: vastly improves cardiac function during reperfusion (in particular, improves recovery of the contractive activity of miocardium), decreases arrhythmias in ishemic hearts and prevents appearance of reperfusion vasoconstriction. It has been shown that under modeling experimental acute ischemia-reperfusion Flokalin has the antioxidant properties, reduces free radical production, protects the structure of intracellular organel and limits infarct size of heart by 37,5 % comparing with the control group.

Keywords: K_{ATP} channels, Flokalin, ischemia-reperfusion, cardioprotection.

Надійшла до редакції 11.05.06



Вельмишановні панове !

Продовжується передплата на журнал "Проблеми науки" на 2007 р. Журнал, зареєстрований ВАК в галузі економічних наук, є міжгалузевим науково-технічним виданням, призначеним для керівників міністерств, відомств, наукових і навчальних установ, науковців, фахівців НДІ і КБ, новаторів, інвесторів і викладачів.

Щомісяця в журналі публікуються матеріали з розбудови інноваційної економіки, базованої на знаннях, а також з реформування наукової діяльності, з розвитку галузевої і міжгалузевої науки, державної та Регіональної наукової, інноваційної та інвестиційної політики, міжнародного наукового співробітництва. Крім того подається інформація про новітні українські та зарубіжні досягнення у сферах наукового обслуговування в різних галузях господарювання, друкуються рецензії на монографії та ін.

Передплату здійснюють усі відділення зв'язку.

Передплатний індекс 74193 у розділі каталогу "Журнали". Вартість журналу на півріччя 186 грн., на три місяці 93 грн. Передплату також можна оформити у ТОВ НВП «Ідея», м. Донецьк, вул. Артема, 84, т/ф (062) 381-09-32, та в редакції журналу (за замовленням), тел. (044) 528-81-91.

З повагою
Голова редакційної ради журналу,
головний редактор, академік НАНУ

В.Семиноженко