

На правах рукописи

ШАБАНОВА НАТАЛЬЯ БОРИСОВНА

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИН-4(1Н)-ОНА
ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Волгоград – 2019

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Воронков Андрей Владиславович

Официальные оппоненты:

Каленикова Елена Игоревна - доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Оковитый Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Цереброваскулярные заболевания занимают одну из ключевых позиций среди причин ранней смертности, высокого уровня инвалидизации и потери трудоспособности населения, приобретая не только медицинскую, но и социально-экономическую значимость [Гусев Е. И., 2003; Гусев Е. И., 2013]. По данным 2013 года в РФ регистрируется порядка 500000 случаев развития ишемического инсульта ежегодно, что, несомненно, делает проблему профилактики и лечения заболеваний ишемического генеза одной из актуальных на сегодняшний день [Мазина Н.В., 2016; Ефимова О. С., 2008; Скворцова В.И., 2009]. С целью фармакотерапии нарушений церебральной гемодинамики применяется большое количество лекарственных препаратов, обладающих церебропротекторными свойствами. В то же время арсенал церебропротекторов не в полной мере удовлетворяет практикующих специалистов, вследствие чего перед экспериментальной медицинской химией и фармакологией встают новые задачи в области целенаправленного поиска и изучения новых средств, обладающих противоишемической активностью [Султанов В.С., 2010].

Степень разработанности темы

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке существует обширный арсенал препаратов, применяемых при нарушениях церебральной гемодинамики, однако их церебропротекторное действие недостаточно эффективно и не удовлетворяет клинических специалистов [Meschia J.F., 2014; Султанов В.С., 2010; Евтушенко С.К., 2013]. В результате потребности в новых средствах, обладающих церебропротекторными свойствами, представляет интерес класс производных пиримидинов, в настоящее время на основе которых создаются новые высокоэффективные биологически активные вещества [Кодониди И.П., 2010; Самотруева М.А., 2015; Gupta J.K., 2010]. Исходя из экспериментальных и литературных данных, производные пиримидина проявляют антигипоксическую [Петрова Е.В., 2013], антиагрегационную [Воронков А. В., 2016], антиоксидантную [Panda S. S., 2008; El-Mekabaty A., 2009] виды активностей. Таким образом становится целесообразным поиск среди производных пиримидина фармакологически активных соединений, оказывающих благоприятное влияние при терапии цереброваскулярной патологии, с целью дальнейшего их внедрения в практическую деятельность.

Цель исследования

Провести комплексную оценку церебропротекторной активности производных пиримидин-4(1H)-она и возможность их дальнейшего применения для лечения

цереброваскулярных заболеваний. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести фармакологический скрининг в ряду производных пиримидин-4(1H)-она с целью выявления потенциального церебропротекторного действия в условиях ишемии мозга крыс. У выбранного соединения-лидера провести оценку зависимости «доза-эффект».
2. Оценить влияние соединения-лидера на возникающие неврологические нарушения, изменения биоэлектрического потенциала, степень гидратации и некротизации мозговой ткани, провести гистологические и морфометрические исследования мозга крыс в условиях экспериментальной фокальной церебральной ишемии.
3. Изучить эндотелиотропное действие соединения-лидера среди производных пиримидин-4(1H)-она, посредством влияния его на некоторые показатели антитромботической и вазодилатирующей функции эндотелия сосудов.
4. Изучить потенциально возможные механизмы церебропротекторного действия соединения-лидера в условиях экспериментальной фокальной ишемии головного мозга крыс.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование церебропротекторного действия новых производных пиримидин-4(1H)-она в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Впервые изучено влияние профилактического введения производных пиримидин-4(1H)-она на выживаемость, неврологический дефицит, изменение когнитивных и мнестических функций, содержание лактата и глюкозы в плазме крови крыс на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий. Проанализировано курсовое влияние производного пиримидин-4(1H)-она в эффективной дозе на сенсомоторный дефицит, изменение биоэлектрического потенциала, гистоморфометрических показателей, степени гидратации и некротизации ткани мозга, а также на состояние вазодилатирующей и антитромботической функции сосудистого эндотелия на фоне фокальной ишемии головного мозга крыс. Изучено влияние соединения-лидера на процессы ПОЛ и состояние ферментов АОЗ, лактат/пируватный коэффициент, содержание внутриклеточного кальция и специфические маркеры апоптоза, что позволило выделить перспективное соединение для разработки на его основе лекарственного средства для терапии поражений ишемического генеза.

Методология исследования

В проведённой экспериментальной работе использовался комплексный подход к оценке цереброваскулярной патологии. Ход исследования соответствовал этическим нормам работы с лабораторными животными. Исследование выполнено на современном уровне с

использованием необходимого количества биологических моделей, современных методов и оборудования, адекватных поставленным задачам исследования.

Научно-практическая ценность и реализация результатов работы

Данные, полученные в ходе экспериментального исследования, свидетельствуют о церебропротекторном действии производного пиримидин-4(1H)-она под шифром PIR-9 и делают данное соединение перспективным для создания на его основе средства, применяемого при нарушениях мозгового кровообращения. Результаты работы используются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, а также при целенаправленном синтезе соединений, обладающих церебротропными свойствами.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди изучаемых производных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений) наиболее выраженным церебропротекторным действием при ишемии мозга крыс обладает вещество под лабораторными шифром PIR-9. Данное соединение корректирует неврологические и поведенческие нарушения в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.
2. Экспериментальное соединение PIR-9 способствует восстановлению сенсомоторного дефицита, биоэлектрической активности, уменьшает отек и зону некроза на фоне фокальной церебральной ишемии, что также подтверждается гистоморфометрическими исследованиями тканей головного мозга.
3. Вещество PIR-9 сохраняет антитромботическую и вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия при фокальной ишемии головного мозга.
4. Механизм церебропротекторного действия соединения-лидера из ряда производных пиримидин-4(1H)-она опосредован его антирадикальными свойствами, восстановлением лактат/пируватного равновесия, снижением содержания внутриклеточного кальция. Наряду с этим, соединение-лидер уменьшает процессы клеточной гибели, на что указывает снижение концентрации TNF α , AIF, PUMA и увеличение содержания JNK.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе использованы высокотехнологичное оборудование и современные подходы, в соответствие с методическими рекомендациями по доклиническому исследованию. В ходе проведения исследования был получен достаточный объем экспериментальных данных, обработанных статистически, что позволяет судить о степени достоверности полученных результатов. Основные положения диссертационного исследования были доложены на научных симпозиумах и конференциях: 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2017; III Международной научно-

практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», Пятигорск, 2017; VI международной научно-практической конференции «Беликовские чтения»; 71-ой Международной научно-практической конференции «Во имя жизни и здоровья», Пятигорск, 2018; XXXVI Международной научно-практической конференции «Вопросы современных научных исследований», г. Омск, 2018; Объединенном международном конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии», г. Санкт-Петербург, 2018; V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств», г. Ярославль, 2018; XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», г. Москва, 2018. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 рецензируемых в журналах рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья, индексируемая в базе данных Web of Science, 1 статья принята к печати (журнал, индексируемый в базе данных Scopus).

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие на всех этапах работы. Проведён анализ данных литературы по теме исследования, на основании чего были разработаны протоколы экспериментов, проведены необходимые исследования и дальнейшая обработка полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения результатов, общих выводов, научно-практических рекомендаций и библиографического списка, включающего 287 источников, из них 101 отечественный и 186 зарубежных. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 36 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен литературный обзор, отражающий этиологию и медико-социальную значимость цереброваскулярных заболеваний ишемического генеза, патогенетические механизмы повреждения головного мозга в условиях ишемии, ключевая роль в развитии которого отводится недостатку макроэргов, нарушению ионного гомеостаза, ацидозу, повышению уровня внутриклеточного кальция, эксайтотоксичности, окислительному стрессу, нарушению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), апоптозу, дисфункции эндотелия сосудов. Кроме того представлены основные группы препаратов, применяемые для фармакокоррекции ишемии головного мозга.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 442 крысах-самцах линии Wistar, полученных из вивария Пятигорского

медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ. Все манипуляции, проводимые над животными, не противоречили требованиям Международной Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998.), Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) и ГОСТу Р 51000.3-96 и 51000.4-96.

В работе изучена церебропротекторная активность ряда производных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений), синтезированных на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ. В каждом блоке исследований формировались группы ложнооперированных животных (ЛО) - первая группа и животных негативного контроля (НК) - вторая группа, у которых моделировали ишемию головного мозга, остальные группы были представлены животными, получавшими исследуемые субстанции в дозе 50 мг/кг [Воронков А.В., 2017] и референтные препараты. На первом этапе исследования (фармакологический скрининг) в качестве модели ишемии головного мозга воспроизводили необратимую окклюзию общих сонных артерий крыс [Yamamoto M., 1983; Сернов Л. Н., 2000], для скрининговых исследований были использованы особи массой 170-190 грамм. В данном блоке были изучены потенциальные церебропротекторные свойства производных пиримидина, посредством влияния веществ на выживаемость, неврологический статус, когнитивные, мнестические, поведенческие нарушения и некоторые изменения энергетического обмена. Все изучаемые соединения и препараты сравнения на первом этапе работы вводились внутрибрюшинно в течение 10-ти дней до операции. По итогу проведенного фармакологического скрининга выбирали «соединение-лидер» для дальнейшего изучения. Затем оценивали зависимость «доза-эффект» соединения-лидера в дозах 25, 50 и 100 мг/кг.

Во втором блоке экспериментального исследования проводили углубленное изучение церебропротекторного действия соединения-лидера и наличие у него эндотелиотропной активности. Моделью ишемии мозга в данном исследовании выступала левосторонняя окклюзия средней мозговой артерии [Bederson J. B., 1986; Хабриев Р. У., 2005; Назарова Л. Е., 2011]. Экспериментальную субстанцию и референтные препараты вводили сразу после оперативного вмешательства и на протяжении трех дней.

На третьем этапе работы проводили оценку потенциально возможных механизмов действия выбранного нами производного пиримидина.

В качестве препаратов сравнения в экспериментальной работе были использованы кавинтон в дозе 3,2 мг/кг [Дьякова И.Н., 2007], циннаризин в дозе 5,6 мг/кг [Назарова Л.Е.,

2007], глиатилин в дозе 60 мг/кг [Назарова Л.Е., 2007], мексидол в дозе 50 мг/кг [Катунина Н.П., 2012; Инчина В.И., 2010], сулодексид в дозе 30 ЕВЛ/кг [Воронков А.В., 2015].

Церебропротекторную активность производных пиримидина на этапе скрининга выявляли путем влияния веществ на выживаемость, неврологический статус (шкала McGraw [Mcgraw С.Р., 1976; Ганнушкина И.В., 2000], когнитивные и мнестические нарушения (тесты «УРПИ» [Воронина Т.А., 2000; Sestakova N., 2013] и «ТЭИ» [Бондаренко Н.А., 1990; Bondarenko N. A., 2017]), поведенческие изменения (тесты «Открытое поле» [Буреш Я., 1991; Воронина Т.А., 2000] и «Приподнятый крестообразный лабиринт» [Sestakova N., 2013; Walf A. A., 2007]), а также содержание лактата и глюкозы в крови (наборы реактивов «Абрис +»). При углубленном изучении соединения-лидера церебротропные свойства оценивали по изменению неврологического дефицита (балльные шкалы McGraw [Mcgraw С. Р., 1976; Ганнушкина И. В., 2000], Garcia [Garcia J. Н., 1995], Combs и D'Alecy [Combs D. J., 1987]), сенсомоторных нарушений (тесты «Сужающаяся дорожка» [Schallert T., 2002; Силачѐв Д. Н., 2013], «Цилиндр» [Castro, 1972; Napieralski et al., 1998; Hatinen et al., 2008]), влиянию на биоэлектрическую активность (метод-ЭЭГ на энцефалографе «Нейрон-спектр 1») [Leemburg S., 2018], степень отека [Hayashi T., 2001] и зону некроза тканей мозга (трифенилтетразолиевый метод) [Bernauer W., 1985], кроме того были проведены гистоморфометрические исследования мозговой ткани.

Антитромботическую функцию сосудистого эндотелия изучали посредством определения агрегационной активности тромбоцитов, плазменного звена гемостаза и активности противосвертывающей системы. Анализ агрегационной активности тромбоцитов осуществлялся на двухканальном лазерном агрегометре «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», Россия, г. Москва) по методике G.Born в модификации Габбасова [Габбасов З. А., 1989] на модели АДФ-индуцированной агрегации. В качестве регистрируемых показателей при оценке коагуляционного звена гемостаза выступали активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), концентрация фибриногена (наборы реактивов НПО «РЕНАМ»). О работе противосвертывающей системы судили по активности антитромбина-III, активность которого определяли спектрофотометрически (набор реактивов НПО «РЕНАМ»). Агглютинационным методом определяли активность фактора фон Виллебранда (VWF) при помощи «набора для определения фактора Виллебранда» (НПО «РЕНАМ»).

Вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия изучали посредством изменения скорости мозгового кровотока после введения эндотелиоспецифических анализаторов: ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich), L-аргинин в дозе 150 мг/кг (Panreac), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 15 мг/кг.

При оценке *потенциальных механизмов* действия среди производных пиримидина нами было изучено его влияние на продукты перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты. С этой целью были определены следующие показатели: малоновый диальдегид (МДА) [Стальная И. Д., 1977], диеновые конъюгаты (ДК) [Гаврилов В. Б., 1983], супероксиддисмутаза (СОД) [Чумаков В.Н. 1977], глутатионпероксидаза (ГП) [Pierce S., 1978], каталаза [Королюк М.А., 1988]. Антирадикальную активность соединения-лидера определяли по способности тормозить образование нитрозил-радикала (реакция с реактивом Грисса) и супероксид-радикала [Winterbourne C.C., 1975], а также по оценке образования комплексов с железом (II) [Amudha M., 2016]. *Метаболический лактатацидоз* оценивали путем измерения лактата и пирувата в плазме крови крыс при помощи стандартных наборов реактивов «Абрис+». Содержание *внутриклеточного кальция* в ткани головного мозга оценивали на основе образовании окрашенного комплекса с о-крезолофталейном (набор реактивов «Ольвекс Диагностикум»). Концентрацию *маркеров апоптоза* в головном мозге (фактора некроза опухоли (TNF α), апоптоз-индуцирующего фактора (AIF), Jun-N-концевой киназы (JNK), p53-зависимого модулятора апоптоза (PUMA)) а также переносчика глюкозы (GLUT1), определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов производства компании Cloud Clone Corp. (США).

Статистическая обработка. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики (STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2010). В скрининговом исследовании для сравнения средних в случае подчинения данных законам нормального распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента, в противном случае - U-критерий Манна-Уитни. При углубленном изучении соединения-лидера использовали метод множественных сравнений: параметрический критерий – Ньюмана-Кейлса, непараметрический – Краскела-Уоллиса

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Фармакологический скрининг. В ходе проведенного исследования установлено, что на фоне ишемии головного мозга у крыс группы негативного контроля (НК) относительно ложнооперированных животных (ЛО) наблюдается снижение выживаемости и потребление глюкозы тканями мозга, повышается степень неврологических нарушений и содержание молочной кислоты в плазме крови крыс (табл. 1). Так же у НК группы крыс в сравнении ложнооперированными особями отмечено снижение локомоторной и исследовательской активностей, и повышение уровня тревожности (что подтверждается данными тестов «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»).

Профилактическое введение препаратов сравнения позволило уменьшить нарушения, возникающие на фоне ишемии головного мозга. Так, кавинтон и циннаризин способствовали увеличению выживаемости, потребления глюкозы мозгом, уменьшению неврологической симптоматики и уровня лактата в крови крыс, относительно нелеченых животных (табл. 1). Кроме того на фоне введения крысам референтных препаратов поведенческая активность была выше, чем у животных, не получавших фармакотерапию.

Таблица 1

Уровень выживаемости, выраженность неврологического дефицита, концентрация молочной кислоты в плазме крови и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Группа	Выживаемость, %	Неврологический индекс, баллы	Лактат, ммоль/л	Потребление глюкозы, ммоль/л
ЛО	100	-	2,06±0,08	1,49±0,04
НК	30	7,33±0,17	11,4±0,03#	0,49±0,07#
Кавинтон	50	2,40±0,24**	4,88±0,07**	1,37±0,07**
Циннаризин	60	2,33±0,28**	4,32±0,06**	1,04±0,04**
PIR-4	60	2,42±0,15**	3,64±0,19**/Δ/λ	1,24±0,11Δ/λ
PIR-5	40	3,63±0,38*	5,39±0,4**	0,75±0,09
PIR-6	20	-	-	-
PIR-7	30	-	-	-
PIR-8	20	-	-	-
PIR-9	70	2,21±0,26**	3,53±0,15**/Δ/λ	1,37±0,03**/λ
PIR-10	60	2,08±0,15**	3,98±0,18**/Δ	1,2±0,06**/λ
PIR-14	40	4,13±0,38**	5,07±0,12**	0,65±0,04
PIR-20	50	2,60±0,19**	5,99±0,17**	0,94±0,08*
PIR-23	50	3,50±0,35**	6,78±0,4**	0,83±0,03*

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), ** - ($p<0,001$); Δ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), λ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=20$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=10$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=10$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50мг/кг, $n=10$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=10$); PIR-6 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-6 (50мг/кг, $n=10$); PIR-7 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-7 (50мг/кг, $n=10$); PIR-8 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=10$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-8 (50мг/кг, $n=10$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50мг/кг, $n=10$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50мг/кг, $n=10$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50мг/кг, $n=10$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50мг/кг, $n=10$).

Стоит отметить, что циннаризин оказал более выраженное действие на неврологические и поведенческие нарушения, а кавинтон – на метаболические (уровень молочной кислоты и потребление глюкозы). Неоднозначное действие на определяемые показатели оказали производные пиримидин-4(1H)-она, так на фоне введения субстанций PIR-6, PIR-7 и PIR-8 выживаемость животных была минимальной, в результате чего было решено исключить данные вещества из дальнейшего эксперимента. Наименьшая степень неврологических нарушений отмечена на фоне получения веществ PIR-4, PIR-9, PIR-10. Влияние исследуемых соединений на поведенческие нарушения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» было сопоставимо с данными, полученными в тесте «Открытое поле». Так на фоне внутрибрюшинного введения соединения PIR-9 как горизонтальная, так и вертикальная двигательная активности были достоверно выше, а уровень тревожности животных был существенно ниже показателей нелеченых крыс, что статистически значимо не отличалось от значений групп крыс, получавших референтные препараты. Все экспериментальные соединения значимо снижали уровень молочной кислоты в плазме крови крыс. Однако стоит отметить, что профилактическое введение экспериментального соединения PIR-9, способствовало максимальному снижению уровня лактата в крови крыс как относительно нелеченых животных (на 69,04% ($p < 0,001$)), так и в сравнении с референтными препаратами (в сравнении с кавинтоном на 27,67% ($p < 0,05$), с циннаризином – на 18,29% ($p < 0,05$)). Кроме того, на фоне введения данного соединения отмечено существенное увеличение потребления глюкозы тканями головного мозга, превосходящее значение группы крыс, которые получали циннаризин на 31,73% ($p < 0,05$), и сопоставимое с животными группы кавинтона.

По совокупности данных, полученных во всех проведенных на этапе скринингового исследования тестах, лидером с потенциальной церебропротекторной активностью было выбрано экспериментальное соединение под лабораторным шифром PIR-9 (4-{2-[2-(3-гидрокси-4-метокси-фенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бутановая кислота).

Второй этап скрининговых исследований был посвящен дозозависимому изучению выбранного соединения-лидера PIR-9 на когнитивные и мнестические функции, а также на изменения энергообмена в условиях церебральной ишемии головного мозга крыс. Так как дозировка 50 мг/кг для первоначального скрининга была выбрана исходя из литературных данных, представляющих различные виды активности пиримидинов [Сочнев В.С., 2015; Воронков А.В., 2016; Луговой И.С., 2017], то для определения зависимости «доза-эффект» решено было использовать данное соединение в дозах 25, 50 и 100 мг/кг.

При изучении когнитивных и мнестических функций в тестах УРПИ и ТЭИ стоит отметить соединение PIR-9 в дозе 50 мг/кг на фоне приема которой наблюдалось наилучшее сохранение памятного следа животных, превосходящее препарат сравнения кавинтон и сопоставимое с циннаризином. Введение соединения PIR-9 в дозе 25 мг/кг привело к снижению лактата на 54,1% ($p<0,001$) относительно крыс НК, в дозах 50 и 100 мг/кг на 68,8% ($p<0,001$) и 56,4% ($p<0,001$), соответственно. Введение вещества PIR-9 50 мг/кг привело к достоверному уменьшению концентрации молочной кислоты на 26,6% ($p<0,001$) в сравнении с кавинтоном и на 16,3 ($p<0,01$) относительно группы крыс циннаризина (табл.2). Введение соединения PIR-9 привело к наиболее значимому увеличению артериовенозной разницы до 15,07% в дозировке 50 мг/кг (табл.2). Этот показатель на 34,3% превосходил данные группы крыс, получавших циннаризин. Нельзя не отметить, что потребление глюкозы на 107,6% ($p<0,001$) и 67,1% ($p<0,001$) было выше у группы особей, которым вводили PIR-9 50 мг/кг относительно крыс, получавших дозировки 25 и 100 мг/кг соответственно.

Таблица 2

Концентрация молочной кислоты в плазме крови и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Группа	Лактат, ммоль/л	Потребление глюкозы, ммоль/л
ЛО	2,02±0,08	1,46±0,05
НК	11,35±0,08&	0,44±0,08&
Кавинтон	4,82±0,2**	1,23±0,07**/α
Циннаризин	4,23±0,09**	1,02±0,03**
PIR-9 25 мг/кг	5,21±0,15**/Λ	0,66±0,08Λ
PIR-9 50мг/кг	3,54±0,16**/μ/α	1,37±0,05**/λ
PIR-9 100мг/кг	4,95±0,14**/Λ	0,82±0,03**/Λ

Примечание: & - статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$);* - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$);μ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); α – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,01$), λ - ($p<0,001$); Λ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших PIR-9 50 мг/кг ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=10); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=7); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25 (n=6), 50 (n=8), 100 (n=6) мг/кг, соответственно.

Исходя из полученных данных для проведения дальнейших исследований была выбрана доза соединения PIR-9 – 50 мг/кг, поскольку при введении животным данной дозы

был получен наиболее выраженный церебропротекторный эффект при ишемии головного мозга, сопоставимый с эффектом циннаризина и превосходящий кавинтон.

Глава 4. Изучение некоторых аспектов церебропротекторной активности соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга. В данной главе исследования проводили углубленное изучение церебропротекторных свойств соединения-лидера (PIR-9). Установлено, что субстанция PIR-9 способствовала снижению неврологических нарушений шкалам McGraw, Combs и D'Alecy и Garsia (табл. 3). При этом по показателям шкал McGraw и Garsia субстанция PIR-9 превосходила данные препаратов сравнения кавинтон и циннаризин.

Таблица 3

Неврологический дефицит по шкалам McGraw, Combs и D'Alecy, Garsia на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа \ Тест	Шкала McGraw	Шкала Combs и D'Alecy	Шкала Garsia
ЛО	0	7,83±0,31	17,67±0,21
НК	3,75±0,21	1,5±0,22**	6,67±0,42**
Кавинтон	1,5±0,18#	6,33±0,33&***#	9,83±0,48**/#
Циннаризин	1,75±0,21#	6,67±0,33*/#	10,67±0,61**/#
PIR-9	0,92±0,15# /κ/ β	7,33±0,42#	13,17±0,7**/#/μ/ β

Примечание: * - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); # - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,001$); κ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон - ($p<0,05$), μ - ($p<0,01$); β – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Тест «Сужающаяся дорожка» направлен на изучение опорно-двигательного дефицита передних и задних конечностей животных. На фоне введения соединения PIR-9 процент соскальзывания передних и задних лап животных снизился как относительно нелеченых особей, так и в сравнении с крысами, получавшими референтные препараты (рис .1).

В тесте «Цилиндр» оценивали асимметрию передних конечностей крыс при спонтанном исследовании стенок цилиндра (рис.2). Введение соединения-лидера PIR-9 способствовало увеличению использования правой конечности и уменьшению нагрузки на левую как в сравнении с нелечеными крысами, так и относительно препаратов сравнения кавинтона и циннаризина. Так, использование левой лапы на фоне получения PIR-9

уменьшилось на 23%($p<0,001$) и 22,4%($p<0,001$) относительно групп крыс, которым вводили кавинтон и циннаризин, соответственно.

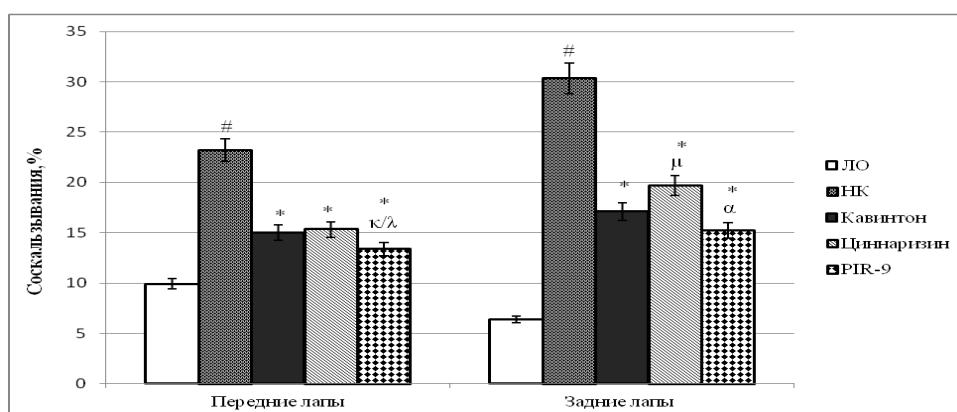


Рисунок 1. Сенсомоторный дефицит в тесте «Сужающаяся дорожка» на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,001$); κ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон - ($p<0,05$), μ - ($p<0,01$); λ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,01$), α - ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

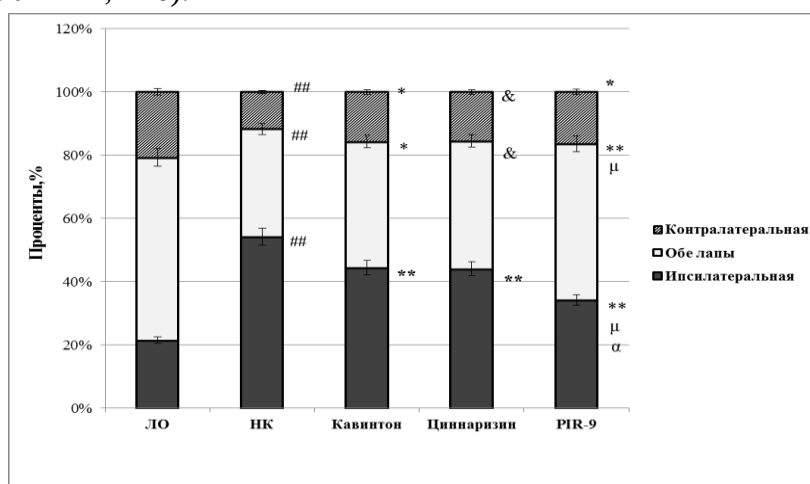


Рисунок 2. Влияние на асимметрию передних лап в тесте «Цилиндр» на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: ## - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); &- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), * - ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

Результаты, полученные в этом тесте, сопоставимы с данными теста «Сужающаяся дорожка», что свидетельствует об улучшении моторики, равновесия, уменьшении опорно-двигательных нарушений у крыс, которым вводили экспериментальное вещество PIR-9.

Таблица 4

Изменение параметров ЭЭГ у крыс на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

ЛО					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	1,94±0,07	3,13±0,08	2,02±0,12	2,17±0,14	4,25±0,20
FP2-A2	1,98±0,09	3,09±0,12	2,07±0,12	2,22±0,15	3,97±0,36
C3-A1	1,96±0,13	3,07±0,32	2,12±0,10	2,16±0,19	4,16±0,29
C4-A2	1,92±0,13	3,08±0,13	1,99±0,12	2,37±0,19	4,02±0,37
НК					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	6,86±0,33##	5,93±0,48##	1,03±0,16##	2,15±0,18	1,89±0,15##
FP2-A2	2,26±0,19	3,32±0,30	2,13±0,30	2,06±0,15	3,30±0,47
C3-A1	10,60±0,49##	9,02±0,32##	0,77±0,07##	2,31±0,26	1,57±0,25##
C4-A2	2,04±0,16	4,58±0,63&	2,14±0,23	2,13±0,31	3,26±0,49
Кавинтон					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,02±0,12**	4,41±0,28Δ	1,67±0,24Δ	2,27±0,16	2,88±0,19*
FP2-A2	2,64±0,16	3,49±0,18	1,98±0,12	2,12±0,14	3,70±0,19
C3-A1	4,49±0,14**	5,59±0,43**	1,43±0,23Δ	2,23±0,10	2,45±0,20Δ
C4-A2	2,62±0,23	3,68±0,27	1,97±0,07	2,08±0,09	3,37±0,21
Циннаризин					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,85±0,24**	4,56±0,27Δ	1,45±0,16	2,15±0,09	2,22±0,10
FP2-A2	2,72±0,16	3,36±0,13	2,04±0,09	2,10±0,16	3,23±0,11
C3-A1	5,13±0,44**	5,34±0,22**	1,42±0,21Δ	2,02±0,13	2,17±0,11
C4-A2	2,74±0,18	3,48±0,17	2,06±0,09	2,24±0,14	3,41±0,29
PIR-9					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,06±0,13**	4,34±0,29Δ	1,71±0,21Δ	2,17±0,08	2,69±0,20Δ
FP2-A2	2,57±0,16	3,44±0,17	2,04±0,10	2,12±0,08	3,69±0,19
C3-A1	4,46±0,18**	5,42±0,37**	1,45±0,24Δ	2,04±0,13	2,32±0,21Δ
C4-A2	2,69±0,20	3,60±0,23	2,02±0,07	2,26±0,14	3,57±0,22

Примечание: & - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО (p<0,05), # - (p<0,01), ## - (p<0,001); Δ - статистически достоверно относительно группы крыс НК (p<0,05); * - (p<0,01), ** - (p<0,001);

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс,

получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

В условиях окклюзии среднемозговой артерии наиболее существенные изменения наблюдались в лобной и теменной областях пораженного полушария. Так, фокальная ишемия левого полушария у группы крыс НК характеризовалась увеличением дельта- и тета-ритмов, при снижении альфа- и высокочастотных бета-ритмов (табл. 4). При исследовании биоэлектрического потенциала головного мозга на фоне введения субстанции PIR-9 выявлено, что применение данного соединения способствовало восстановлению электрической активности мозга, о чем свидетельствуют достоверное снижение дельта- (на 41,4% ($p<0,001$) и 57,6% ($p<0,001$) в отведениях FP1-A1 и C3-A1) и тета-ритмов (в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 25,6% ($p<0,05$) и 38% ($p<0,001$)) в сравнении с животными без фармакотерапии, а также повышение средней амплитуды альфа- (на 62,1% ($p<0,05$) - отведение FP1-A1 и 85,7% ($p<0,05$) - отведение C3-A1) в и высокочастотных бета-ритмов (в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 52,4% ($p<0,01$) и 56,1% ($p<0,05$)), что сопоставимо с полученными показателями группы крыс, которым вводили препараты сравнения кавинтон и циннаризин.

Полученные данные подтверждаются уменьшением степени отека и величины зоны некроза, у крыс, которым вводили соединение-лидер. Введение субстанции PIR-9 способствовало уменьшению отека на 8,23% ($p<0,05$) и зоны некроза на 64,62% ($p<0,001$) в сравнении с нелечеными животными, при этом зона некроза была также достоверно ниже показателей препаратов сравнения (кавинтона – на 36,76% ($p<0,01$) и циннаризина – на 45,71% ($p<0,001$)) (табл. 5).

Таблица 5

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на степень гидратации и размер зоны некроза головного мозга в условиях фокальной ишемии

Группа	Степень гидратации, %	Зона некроза, %
ЛО	72,46±0,45	-
НК	80,17±0,60#	25,92±0,58
Кавинтон	74,56±0,16*	14,50±0,54*
Циннаризин	72,59±0,70*	16,89±0,46к
PIR-9	73,57±0,56	9,17±0,47*/μ/α

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон - ($p<0,01$) μ - ($p<0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

Стоит отметить, что результаты экспериментов подтверждаются гистоморфологическими исследованиями. Так при окрашивании гематоксилин эозином у группы негативного контроля определялся очаг энцефалолиза без четких границ с наличием диффузной полиморфно-ядерной лейкоцитарной инфильтрации. По периферии определялся выраженный сетчатый отек и глиальная реакция. Отмечалась деструкция нейронов с явлениями кариолиза и образованием клеток-теней, чего не наблюдалось у групп крыс, получавших препараты сравнения и соединение-лидер.

Таблица 6

Морфометрические показатели тканей головного мозга на фоне приема соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга ($M \pm m$)

Показатели	ЛО	НК	Кавинтон	Циннаризин	PIR-9
Толщина эндотелия в периферической зоне, мкм	2,2±0,1	3,1±0,6	2,6±0,4	3,2±0,5	2,5±0,3
Площадь ядер эндотелиоцитов, мкм ²	7,1±0,2	10,1±0,2	8,9±0,9	8,4±1,5	7,6±0,5
Степень выраженности спонгиозного отека (ОД оптически пустых пространств,%)	0,3±0,1	57,3±2,8#	12,1±0,6*	7,4±0,4*	18,5±0,9*
Количество нейронов в п/зр в периферической зоне (N _{нейр}), %	29,1±1,9	4,1±0,3#	10,6±0,5*	9,1±0,4*	23,3±1,2*
Число патологически измененных нейронов (N _п) в п/зр, %	0,0±0,0	5,5±1,1#	2,5±0,9	2,1±0,9	1,1±0,1*
Количество микроглиоцитов клеток в п/зр (N _{гл}), %	48,8±3,9	21,8±1,2#	36,0±1,8*	32,2±1,5*	31,0±1,1*
Нейронофаги, %	0,0±0,0	33,5±0,7#	13,4±0,7*	20,5±0,9*	11,6±0,5*
Клетки сателлиты, %	22,1±1,9	35,1±1,3#	37,5±2,1	36,1±1,5	33,0±1,7
Демаркационная зона, мкм	0,0±0,0	129,3±25,7#	95,6±35,7	75,6±9,8*	49,5±5,8*

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,05$), * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг).

В результате проведенного морфометрического анализа установлено снижение степени спонгиозного отека, размера демаркационной зоны, увеличение количества нейронов в периферической зоне, на фоне введения соединения PIR-9, что достоверно отличалось от показателей группы негативного контроля (табл. 6).

Глава 5. Изучение изменений антитромботической и вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия на фоне приема соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга. Введение производного пиримидина PIR-9 способствовало снижению, как степени, так и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с группой крыс негативного контроля на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (рис. 3). При этом соединение PIR-9 было сопоставимо по величине антиагрегантного действия с сулодексидом и превосходило кавинтон (степень агрегации ниже на 27,23% ($p<0,001$), скорость агрегации - на 15,69% ($p<0,05$)).

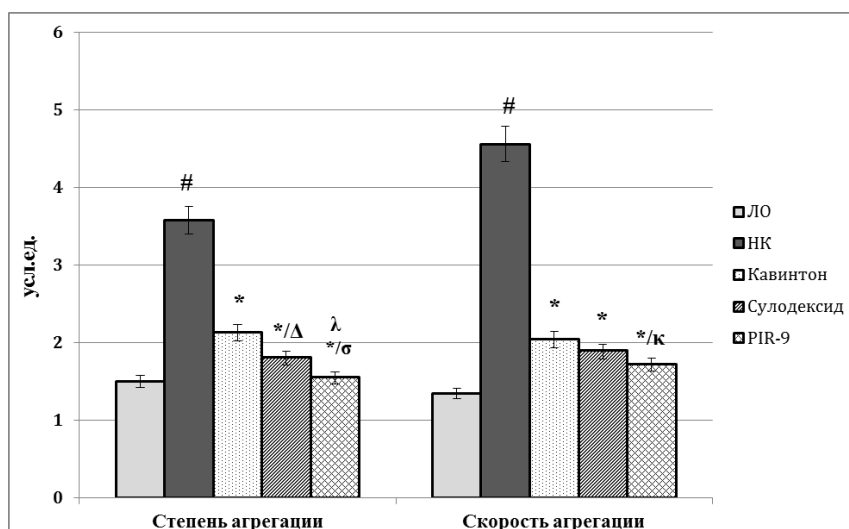


Рисунок 3. Влияние на агрегационную способность тромбоцитов на фоне приема соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), σ - ($p<0,001$); λ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших сулодексид ($p<0,01$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

Установлено положительное влияние субстанции PIR-9 на плазменный компонент гемостаза у крыс, что выражалось в нормализации показателей АЧТВ, ПВ, ТВ, снижении по сравнению с группой животных негативного контроля концентрации фибриногена и активности фактора фон Виллебранда (табл. 7). Напротив, активность противосвертывающей системы АТ-III увеличилась на 38,45% ($p<0,001$) относительно группы крыс без фармакотерапии и на 24% ($p<0,01$) относительно животных, получавших кавинтон.

Вазодилатирующую функцию эндотелия при экспериментально смоделированной фокальной ишемии головного мозга изучали при помощи определения изменения скорости локального кровотока после введения эндотелиоспецифических анализаторов: ацетилхолина (АЦХ), L-аргинина и L-аргинин метилового эфира (L-NAME).

При оценке влияния субстанции PIR-9 на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия у крыс были получены результаты, отражающие благоприятное воздействие соединения-лидера на вазомоторную функцию эндотелия сосудов. При этом эффект от применения соединения PIR-9 превосходил таковой у кавинтона и был сопоставим с эффектом сулодексида (рис. 4).

Таблица 7

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на показатели плазменного гемостаза и противосвертывающей системы в условиях фокальной ишемии головного мозга

Показатель	ЛО	НК	Кавинтон	Сулодексид	PIR-9
АЧТВ, с	37,47±1,43	13,22±1,14#	19,23±0,61**	33,47±1,35**/σ	30,97±0,96**/σ
ПВ, с	24,1±0,74	13,57±0,5#	14,67±0,44	22,17±0,73**/σ	22,33±0,59**/σ
ТВ, с	20,38±0,86	6,55±0,51#	11,65±0,66**	14,32±0,88**/κ	13,67±0,98**
Фибриноген, г/л	1,65±0,10	5,85±0,39#	3,97±0,10**	3,09±0,16**/σ	3,24±0,13**/σ
VWF, %	96,83±2,46	133,50±2,32#	128,83±2,90#	107,00±1,83#/*	114,67±2,80#/*
АТ-III, %	101,83±3,07	67,17±1,74#	75±1,86#	93±3,24**/κ	85,33±2,43###**/κ

Примечание: ##- статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$), # - ($p<0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); κ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), σ - ($p<0,001$).

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время (в секундах); ПВ – протромбиновое время (в секундах); ТВ – тромбиновое время (в секундах); Фибриноген – концентрация фибриногена (г/л); VWF - уровень фактора фон Виллебранда (%); АТ-III – уровень антитромбина-III (в процентах); ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

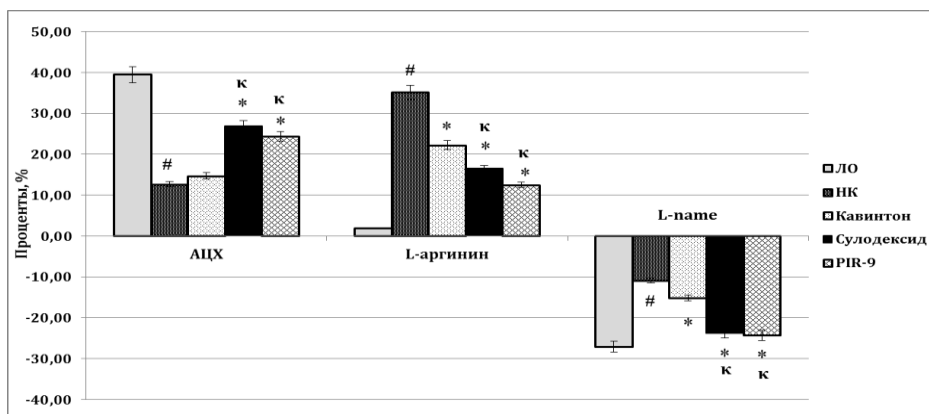


Рисунок 4. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: #- статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Оценивая результаты, полученные в ходе проведенного блока исследований, можно предполагать, что производное пиримидина под шифром PIR-9 способствовало восстановлению антитромботической и вазодилатирующей функций сосудистого эндотелия на фоне фокальной церебральной ишемии крыс, при этом по силе своего эффекта превосходя кавинтон и сопоставимо с сулодексидом, что, несомненно, указывает на эндотелиотропное действие изучаемого нами производного пиримидина.

Глава 6. Оценка потенциальных механизмов церебропротекторного действия соединения-лидера в условиях фокальной ишемии мозга крыс. Данная серия экспериментов, ориентирована на изучение потенциальных механизмов церебропротекторной активности и была разделена на три блока исследований. Первый блок направлен на изучение антиоксидантной и антирадикальной активности, в ходе которого была выявлена способность соединения PIR-9 подавлять процессы перекисного окисления липидов, что нашло отражение в снижении концентрации МДА и ДК на 28,2% ($p < 0,001$) и 51,13% ($p < 0,001$) относительно группы крыс НК (табл. 8). Роста ферментов антиоксидантной защиты на фоне введения субстанции PIR-9 не наблюдалось (табл. 8). Тем не менее, можно предполагать, что данное соединение оказывает антиоксидантное действие, снижая гиперпродукцию свободных радикалов, при этом, не влияя на сами ферменты АОЗ. Также в тестах *in vitro* были установлены антирадикальные и хелатирующие свойства соединения-лидера, сопоставимые с таковыми у мексидола и выражаемые в ингибировании образования

в модельной смеси супероксид и нитрозил радикалов, а также образовании стабильного комплекса с Fe^{2+} .

Таблица 8

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на интенсивность ПОЛ и активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты в условиях фокальной ишемии головного мозга

Показатель	ЛО	НК	Мексидол	PIR-9
МДА, нмоль/мг.белка	7,03±0,09	14,54±0,33#	8,79±0,20*	10,44±0,35*
ДК, нмоль/мг.белка	13,68±0,51	52,06±1,57#	24,36±0,96*	25,44±2,46*/μ
СОД, ед.акт/мг.белка	255,26±2,81	190,93±2,18#	229,88±3,50#/&	184,00±3,07#/μ
Каталаза, нмоль/мин./мг.белка	0,31±0,02	0,78±0,17^	1,07±0,13#	0,37±0,02&/μ

Примечание: ^ - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$), # - ($p<0,001$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), * - ($p<0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших мексидол ($p<0,01$).

ДК – диеновые конъюгаты; МДА – малоновый диальдегид; ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Мексидол – группа крыс, получавших мексидол (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

Во втором блоке определяли влияние исследуемого соединения-лидера PIR-9 и препаратов сравнения на лактат/пируватное соотношение и кальций-опосредованное повреждение в головном мозге крыс. Введение вещества PIR-9 позволило снизить отношение лактат/пируват в 4,97 раз ($p<0,001$) по отношению к нелеченым крысам, что по эффекту сопоставимо с кавинтоном и превосходило циннаризин (табл. 9).

Таблица 9

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на уровень лактата и пирувата в плазме крови крыс в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	Лактат, ммоль/л	Пируват, ммоль/л	Лактат/пируват
ЛО	0,95±0,04	0,084±0,002	11,34±0,5
НК	6,06±0,17#	0,018±0,001#	346,28±15,61#
Кавинтон	1,36±0,11*	0,062±0,001*	21,73±1,53*
Циннаризин	1,97±0,11*	0,060±0,001*	32,46±1,39*/μ
PIR-9	1,22±0,11*/α	0,060±0,001*	20,32±1,52*/α

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

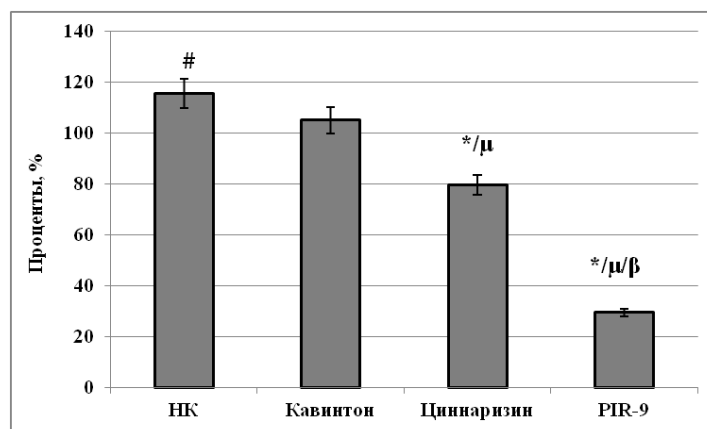


Рисунок 5. Изменение содержания кальция в гомогенате мозговой ткани относительно ложнооперированных крыс на фоне приема соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,001$); β – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин - ($p < 0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

О дополнительной секвестрации ионов кальция в клетку можно судить по увеличению их содержания на фоне фокальной церебральной ишемии у крыс, не подверженных терапии, на 115,64% относительно группы ложнооперированных особей (рис. 5). Соединение PIR-9 способствовало снижению содержания ионов кальция в сравнении с нелечеными крысами. Данный показатель также превосходил значение групп крыс, получавших препараты сравнения кавинтон и циннаризин.

Закрывающий блок был нацелен на оценку влияния исследуемой субстанции на различные маркеры клеточной гибели (TNFα, AIF, JNK, PUMA), а также на транспортер глюкозы 1 (GLUT1) в условиях фокальной церебральной ишемии крыс. Соединение PIR-9 способствовало уменьшению клеточной гибели, что отражалось в снижении TNFα на 63,97% ($p < 0,001$), AIF на 29,99% ($p < 0,001$) и PUMA на 27,27% ($p < 0,001$), и увеличении концентрации JNK на 48,06% ($p < 0,01$) относительно группы крыс негативного контроля (табл. 10). Кроме того показателям TNFα и PUMA группа крыс, получавших PIR-9, значимо отличалась от данных группы животных, которым вводили кавинтон. На фоне введения соединения-лидера также отмечено увеличение индукции GLUT1, способствующего переносу глюкозы (рис.6).

Таблица 10

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на специфические маркеры апоптоза в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	TNF α , пг/мл	AIF, нг/мл	JNK, нг/мл	PUMA, пг/мл
ЛО	19,62 $\pm$ 0,51	4,08 $\pm$ 0,24	67,01 $\pm$ 0,75	447,99 $\pm$ 17,64
НК	67,13 $\pm$ 1,70#	8,07 $\pm$ 0,45#	29,44 $\pm$ 1,96#	685,59 $\pm$ 21,12#
Кавинтон	36,85 $\pm$ 1,91**	5,23 $\pm$ 0,30**	40,51 $\pm$ 2,26*	559,78 $\pm$ 10,07**
Глиатилин	28,55 $\pm$ 1,62**/к	4,97 $\pm$ 0,22**	50,72 $\pm$ 2,82**	492,67 $\pm$ 8,69**/а
PIR-9	24,19 $\pm$ 1,22**/а	5,65 $\pm$ 0,28**	43,59 $\pm$ 3,55*	498,61 $\pm$ 6,92**/а

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,01$), а - ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Глиатилин – группа крыс, получавших глиатилин (60 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

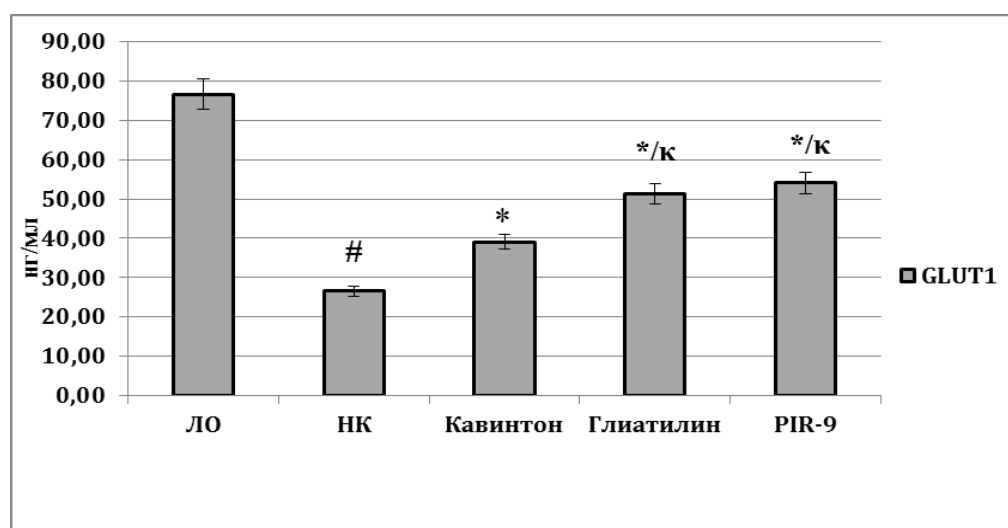


Рисунок 6. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на содержание транспортера глюкозы в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Глиатилин – группа крыс, получавших глиатилин (60 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Таким образом, проведенный этап исследования способствовал определению наличия у изучаемого деривата пиримидина поливалентного механизма церебропротекторной активности.

Заключение

В ходе проведенной работы доказано, что в ряду производных пиримидин-4(1H)-она наиболее выраженным церебропротекторным действием обладает соединение под лабораторным шифром PIR-9 в дозе 50 мг/кг, проявляемым в уменьшении неврологической симптоматики ишемического повреждения мозга, стабилизации поисковой, моторной и ментальной функций у экспериментальных животных в условиях фокальной церебральной ишемии, сохранении структурно-функциональной целостности эндотелия сосудов, уменьшении степени гидратации и некротических процессов в мозговой ткани. При этом, по всей видимости, соединение PIR-9 обладает комплексным механизмом действия, направленным на стабилизацию энергообеспечения нейронов, а также редукцию окислительного стресса и процессов апоптоза. Доказанная в ходе настоящего исследования высокая терапевтическая эффективность производного пиримидин-4(1H)-она - PIR-9, сопоставимая с таковой у препарата сравнения кавинтона и превосходящая эффекты референтного препарата циннаризина, а также комплексный характер механизма действия, затрагивающий сразу несколько ветвей каскада ишемического повреждения головного мозга, делает данное соединение перспективным объектом для дальнейшего изучения с целью создания на его основе лекарственного средства, способного восстановить активность ткани головного мозга в условиях ишемического инсульта.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о перспективности использования производного пиримидин-4(1H)-она под шифром PIR-9 как средства для коррекции цереброваскулярных нарушений, возникающих в результате острой недостаточности мозгового кровообращения.
2. Следует предложить дальнейшее изучение соединения PIR-9 с целью создания на его основе церебропротекторного средства для профилактики и лечения ишемических поражений головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный фармакологический скрининг позволил установить, что в ряду производных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений) наиболее выраженное снижение неврологического, поведенческого дефицита отмечается на фоне профилактического введения соединения под лабораторным шифром PIR-9. Наряду с вышесказанным выбранное нами соединение (PIR-9) увеличивает потребление энергетических субстратов (утилизацию

глюкозы мозговой тканью на 179,59% ($p < 0,001$) в сравнении с крысами группы НК) и снижает количество продуктов анаэробного гликолиза (уменьшение уровня лактата на 69,04% ($p < 0,001$) относительно группы крыс НК).

2. Анализ зависимости «доза-эффект» для соединения PIR-9 позволил установить, что наиболее выраженное церебропротекторное действие данное соединение оказывает в дозе 50 мг/кг.

3. Соединение PIR-9 при фокальной церебральной ишемии крыс способствует восстановлению неврологических нарушений, биоэлектрической активности мозга, кроме того снижению отека и зоны некроза на 64,62% ($p < 0,001$) (в сравнении с нелечеными животными).

4. Соединение PIR-9 при фокальной церебральной ишемии крыс восстанавливает антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов, что можно оценить по снижению агрегационной способности тромбоцитов (степень и скорость агрегации на 56,7% ($p < 0,001$) и 62,28% ($p < 0,001$) соответственно была ниже в сравнении с крысами группы негативного контроля), устранению гиперкоагуляционного сдвига и коррекции функции противосвертывающей системы, по силе эффекта не уступая референтным препаратам.

5. Экспериментальное соединение PIR-9 сохраняет вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов, о чем можно судить по реакции на эндотелийспецифические анализаторы (АЦХ, L-аргинин, L-NAME) при фокальной церебральной ишемии крыс.

6. Механизм церебропротекторной активности соединения PIR-9 обусловлен снижением ПОЛ: уровень малонового диальдегида снизился на 28,2% ($p < 0,001$), диеновых конъюгатов на 51,13% ($p < 0,001$) (в сравнении с крысами группы НК). Кроме того, указанное выше соединение частично восстанавливает нарушенное лактат/пируватное соотношение, снижает уровень внутриклеточного кальция, а также корректирует концентрацию ферментов апоптоза (TNF α , AIF, JNK, PUMA) и увеличивало содержание транспортера глюкозы-1 на 103,5% ($p < 0,001$) (относительно нелеченых особей).

Список опубликованных работ по теме диссертации

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ

1. Луговой И.С., Кодониди И.П., Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Кодониди М.И. Целенаправленный синтез n-пептидных производных пиримидин-4(1н)-она, обладающих церебропротекторными свойствами. // Здоровье и образование в XXI веке – 2017. – Т3. - №8 – С. 195-199.

2. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Поздняков Д.И., Луговой И.С., Кодониди И.П. Влияние новых производных пиримидин-4(1н)-она на психоэмоциональный дисбаланс и

некоторые нарушения энергетического обмена у крыс на фоне ишемии головного мозга. // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26738> (дата обращения: 08.09.2017).

3. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Кодониди И.П., Шаталов И.С. Церебропротекторная активность новых производных пиримидин4(1H)-она PIR9 и PIR10 при необратимой окклюзии общих сонных артерий. // Фармация и фармакология. 2018; 6(2):167-181. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-167-181>

4. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Воронкова М.П. Оценка влияния соединения PIR-4 на отек головного мозга при билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. -2018. - №4(68) – С. 117-121

5. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Воронкова М.П., Лысенко Т.А. Изучение дозозависимого церебротропного эффекта производного пиримидина под шифром PIR-9 на фоне экспериментальной ишемии головного мозга крыс. // Фармация и фармакология. 2018;6(6):548-567 DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-548-567

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых Web of Science

6. Voronkov A.V., Shabanova N.B., Voronkova M.P., Lysenko T.A., Arlt A.V., Zatsepina E.E. The effect of PIR-4 substance on the necrosis zone in experimental focal cerebral ischemia in rats. // Arhiv EuroMedica. – 2018. – Vol. 8. - №2 – P. 37-38.

Работы, опубликованные других в изданиях

7. **Шабанова Н.Б.**, Шаталов И.С. Изучение влияние производных пиримидин-4(1H)-она на развитие когнитивного дефицита и некоторые показатели энергообмена на фоне ишемии головного мозга крыс. // Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству– 2017. – С. 66-69

8. **Шабанова Н.Б.**, Изучение влияния некоторых новых производных пиримидин-4(1H)-она на неврологический дефицит и поведенческую активность крыс при экспериментально смоделированной ишемии головного мозга. // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины– 2017. – С. 805-806

9. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.**, Нигарян С.А. Антигипоксическая активность соединения PIR-4 (производное пиримидин4(1H)-она) в условиях гипобарической гипоксии у мышей. // XXV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». – 2018. - С. 63

10. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.** Влияние новых производных пиримидин-4(1H)-она на неврологический дефицит крыс в условиях ишемии головного мозга. // V съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств», Экспериментальная и клиническая фармакология, Т 81, №S- 2018. - С. 47

11. **Shabanova N.B.,** Voronkov A.V. Assessment of new pyrimidine derivative (PIR-10) and sulodexide influence on endothelial function in focal cerebral ischemia of rats. // The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology, p -247-248

12. **Шабанова Н.Б.** Изучение влияния нового производного пиримидина на поведенческую активность крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» на фоне экспериментально смоделированной ишемии головного мозга. // Вестник современных исследований – 2018. - №10-7(25) - С. 187-189

13. **Шабанова Н.Б.,** Воронков А.В. Изменение неврологического и сенсомоторного дефицита на фоне введения нового производного пиримидина в условиях фокальной ишемии головного мозга крыс. // Материалы 71-ой международной научно-практической конференции «Во имя жизни и здоровья» - 2018. – С. 259-266

Принята к печати (журнал, индексируемый в базе данных Scopus)

14. Воронков А.В., **Шабанова Н.Б.** Про/антиоксидантная активность новой субстанции PIR-10 (производное пиримидина) в условиях экспериментально смоделированной фокальной ишемии головного мозга крыс. // Анализ риска здоровью.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AIF - апоптоз-индуцирующий фактор

JNK - Jun-N-концевая киназа

L-NAME - нитро – L – аргинин метиловый эфир

PUMA - р53-зависимый модулятор апоптоза

TNF α - фактор некроза опухоли α

VWF - фактора фон Виллебранда

АДФ – аденозиндифосфат

АОЗ – антиоксидантная защита

АТ – III - антитромбин – III

АЦХ - ацетилхолин

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

ГП - глутатионпероксидаза

ДК - диеновые конъюгаты

ЛО – ложнооперированные животные

МДА - малоновый диальдегид

НК - крысы группы негативного контроля

ПВ - протромбиновое время

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД -

ТВ – тромбиновое время

ТЭИ - тест экстраполяционного избавления аверсивной среды

УРПИ - тест условного рефлекса пассивного избегания