

ГБОУ ВПО ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

Волотова Елена Владимировна
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ
МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ).

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
член-корр. РАН, ЗРВИ РФ,
профессор, доктор медицинских наук,
Иван Николаевич Тюренков

Волгоград – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Актуальность поиска новых церебропротекторных средств	17
1.2 Проблемы разработки и внедрения эффективных средств профилактики и лечение НМК	17
1.3. Связь нарушений мозгового кровообращения с ЭД	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	58
ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ ЦЕРЕБРО- И ЭНДОТЕЛИОТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ.....	83
3.1 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием среди производных ГАМК.	83
3.2 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием в ряду производных глутаминовой кислоты с гетероциклическими и ароматическими заместителями.....	110
3.3 Поиск веществ с церебро - и эндотелиотропным действием в ряду производных амидов бензойной кислоты.	118
3.4 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием в ряду производных хиназолина.	129
3.5 Сравнительное исследование церебро- и эндотелиопротективной активности соединений- лидеров, магния сульфата, кавинтона, цитиколина.	145
3.6 Заключение.	149
ГЛАВА4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА.	151

4.1	Эффективность соединений-лидеров при нарушениях мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной недостаточностью половых гормонов.	153
4.2	Эффективность соединений-лидеров при нарушениях мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной экспериментальным сахарным диабетом.	170
4.3	Влияние соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на размер зоны повреждения головного мозга при фокальной ишемии.	182
4.4	Заключение.	183
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ.		185
5.1	Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на психоэмоциональный статус животных с хроническим НМК.	186
5.2	Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на физическую выносливость и координацию животных с хроническим НМК.	189
5.3	Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 на когнитивные функции животных с хроническим НМК.	190
5.4	Влияние курсового введения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на мозговое кровообращение и вазодилатирующую функцию эндотелия животных с хроническим НМК.	193
5.5	Заклучение.	194
ГЛАВА 6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ ПРИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВОЗРАСТНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ И ХРОНИЧЕСКИМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ.		195
6.1	Эффективность соединений-лидеров при НМК при эндотелиальной дисфункции, связанной с возрастными изменениями. ...	196

6.2	Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на поведенческий статус 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса.....	204
6.3	Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на уровень артериального давления 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса.	207
6.4	Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса	209
6.5	Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на состояние иммунной системы и уровень про- и противовоспалительной цитокиновой регуляции после воздействия хронического комбинированного стресса.....	212
6.6	Влияние соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на морфофункциональное состояние структур головного мозга 12-ти и 24-ти месячных животных, перенесших комбинированное стрессовое воздействие.....	214
6.7	Иммуногистохимические исследования маркеров 12-ти и 24-х месячных животных, перенесших комбинированное стрессовое воздействие.....	220
6.8	Заключение	231
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ЖИВОТНЫХ НА ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РГПУ-135 И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА		232
7.1	Оценка выживаемости и психоневрологического статуса животных с различным иммунологическим статусом, получавших РГПУ-135 и препараты сравнения, при моделировании ишемии головного мозга.	234

7.2	Состояние мозгового кровообращения и степень гидратации мозговой ткани при церебральной ишемии у животных с различным иммунным статусом, получающих РГПУ-135 и препаратов сравнения.	238
7.3	Содержание нейронспецифических белков и нейротрофинов при церебральной ишемии у животных с различным иммунным статусом, получавших РГПУ-135 и препараты сравнения.	240
7.4	Заключение.	244
ГЛАВА 8. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.		245
8.1	Эндотелиопротекторное действие исследуемых веществ.	245
8.2	Биохимические аспекты механизма действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.	262
8.3	Заключение.	265
ОБСУЖДЕНИЕ.		266
ВЫВОДЫ.		287
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.		290
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.		291
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.		292

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность поиска новых средств для лечения нарушений мозгового кровообращения (НМК) обусловлена высоким удельным весом сосудистых заболеваний мозга в структуре заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временной нетрудоспособности и первичной инвалидизации [Суслина З.А., 2005; Kim A.S., 2015]. В настоящее время существует широкий арсенал лекарственных препаратов, рекомендованных в терапии нарушений мозгового кровообращения, однако их эффективность в полной мере не удовлетворяет требованиям клиницистов [Гусев Е.И., 2013; Данилов В.И., 2014; Макарова Л.М., 2014; Рябченко А. Ю., 2014; Bettger P.J., 2014]. В доклинических исследованиях многие вещества оказываются высокоэффективными, но при клинических исследованиях они не проявляют той активности, которая регистрировалась в эксперименте [Corbett D., 1998; Röther J., 2008; Auriel E., 2010; Cook D. J., 2011; Kaur H., 2013; Moretti A., 2015; Tymianski M., 2015]. С одной стороны, данный факт можно связать с тем, что нейрометаболические, функциональные и морфологические особенности нервной системы, многофакторность патогенеза, зональность и этапность ишемического повреждения головного мозга затрудняют успешное использование препаратов с нейропротекторной активностью, механизм действия которых зачастую направлен лишь на одно из звеньев ишемического каскада [Minnerup J., 2012; Kaur H., 2013; Majid A., 2014; Turner R. C., 2015; Lo E.H., 2016]. Например, прямые церебровасодилаторы, антиоксиданты, антиагреганты и другие монотаргетные средства в условиях ишемических нарушений, оказались малоэффективными. С другой стороны, при разработке новых лекарственных препаратов с нейропротекторными свойствами на этапах доклинических исследований зачастую полностью исключается влияние на состояние организма в целом преморбидного фона, который в свою очередь в реальных клинических условиях предшествует и способствует развитию основного заболевания [Ankolekar S., 2012; Buga A. M., 2013; Turner R. C., 2013; Xu S. et al., 2013; Dirnagl U., 2014; Петров В. И.,

2016]. Можно предположить, что изучение эффективности новых препаратов при моделировании НМК на интактных (здоровых) животных с сохраненными системами регуляции тонуса сосудов может дать более выраженный фармакологический эффект, чем у животных с сопутствующими патологическими состояниями и, в частности, с выраженными нарушениями эндотелиальной системы. В реальных клинических условиях выбор оптимального метода лечения конкретного больного базируется не только на особенностях патологического процесса, но и на знании соматического состояния пациента до развития недостаточности мозгового кровообращения, что зачастую приводит к комбинированию нескольких лекарственных средств. В этой связи, очевидно, что стратегия поиска и разработки новых эффективных средств для профилактики и лечения острых и хронических НМК должна базироваться на иной методологии, учитывающей терапевтический потенциал наиболее активных веществ по наличию поливалентного механизма действия.

Степень научной разработанности проблемы

В последние годы среди ведущих факторов, обуславливающих течение, исход и развитие осложнений у больных с НМК, большое внимание отводится эндотелиальной дисфункции (ЭД), связанной нарушением равновесия между факторами, вызывающими вазодилатацию, антитромботическое, противовоспалительное, антипролиферативное действие и факторами, оказывающими сосудосуживающее, тромбогенное, провоспалительное и пролиферативное действие [Смирнов И.Е., 2010; Гусев Е.И., 2015; Олешко Т. Б., 2015; Хохлов А.Л., 2015; Воробьева Е.Н., 2016]. По мнению многих исследователей при продолжительном нарушении структуры и функций эндотелиальной системы, она начинает играть ключевую роль в патогенезе практически всех сердечно-сосудистых заболеваний [Cannon R.O., 1997; Furchgott R.E., 1998; Lupinskaya Z.A., 2003; Герасимов А. А., 2015; Федин А. И., 2015; Matsuzawa Y., 2015; Gimbrone M. A., 2016]. Поэтому в настоящее время НМК рассматриваются в тесной связи с ЭД, которая может

быть причиной или следствием атеросклероза, артериальной гипертензии, сахарного диабета (СД), недостаточности половых гормонов (НПГ), возрастных изменений и др., и является мишенью для фармакотерапии этой патологии [Танамян М.М., 2008; Гусев Е.И., 2009; Mandosi E., 2015; Matsuzawa Y., 2015; Gimbrone M. A., 2016]. На основании изложенного в настоящее время существует несомненный интерес к эндотелиальной системе как мишени для таргетной терапии НМК, поэтому представлялось целесообразным разработать новую методологию поиска средств коррекции цереброваскулярных заболеваний и изучить эффективность ряда новых соединений при недостаточности мозгового кровообращения, моделируемой в условиях ЭД.

Цель исследования – разработать новую методологию поиска средств фармакологической коррекции нарушений мозгового кровообращения (НМК) и на ее основе осуществить среди четырех химических рядов выбор высокоактивных соединений с церебро- и эндотелиопротекторной активностью, перспективных для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний.

Для решения указанных целей были поставлены следующие **задачи исследования:**

1. Обосновать и разработать новую методологию поиска средств для фармакологической коррекции НМК.
2. Провести в ряду производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов гиброксibenзойной кислоты, хиназолинов целенаправленный поиск веществ, обладающих выраженными церебропротекторными свойствами при острых НМК, моделируемых перманентной двусторонней окклюзией общих сонных артерий, сравнив их эффективность с клинически апробированными препаратами (магнием сульфатом, кавинтоном, цитиколином).
3. Провести сравнительный анализ эффективности фармакологической коррекции наиболее активными соединениями НМК и эндотелиальной дисфункции различного генеза

(гипоэстрогениндуцированной, вызванной экспериментальным сахарным диабетом, возрастными изменениями сосудов).

4. Изучить церебропротекторные свойства наиболее активных соединений при хронических НМК, вызванных 28-ми дневным гравитационным воздействием.

5. Исследовать влияние преморбидного фона (изменений в иммунном статусе, стресса, возрастных особенностей) на выраженность неврологических нарушений, поведение, координацию, когнитивный дефицит, изменения содержания маркеров повреждения мозга (NSE, MBP, BDNF) у животных с НМК, получавших наиболее активные соединения.

6. Изучить механизм эндотелиопротекторного действия наиболее активных соединений у животных с нарушениями мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции по их влиянию на содержание количество циркулирующих эндотелиоцитов, фактора фон Виллебранда, состояние антитромботической и противовоспалительной функций эндотелия, а также *in vitro* по влиянию – на продукцию NO эндотелиальными клетками.

7. Изучить влияние наиболее активных веществ на содержание продуктов ПОЛ, активность ферментов АОС, их метаболические эффекты, коагуляционный гемостаз.

8. На основании сравнительного анализа действия изучаемых соединений на мозговое кровообращение в условиях экспериментально вызванной патологии и эндотелиальной дисфункции разработать рекомендации по фармакологической коррекции нарушений мозгового кровообращения с учетом преморбидного фона, возрастных различий.

Научная новизна работы

Разработана и апробирована новая методология целенаправленного поиска веществ с церебропротекторным действием при различных НМК, базирующаяся на поэтапном изучении: первоначально на моделях ишемии головного мозга, воспроизводимых на условно здоровых животных, а на

втором этапе – наиболее активные вещества изучались на животных с преморбидными состояниями (СД, НПГ, возрастными изменениями, различными состояниями иммунитета), сопровождающиеся ЭД, одним из основных патогенетических факторов, лежащих в основе практически всех сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе НМК.

Впервые выполнено сравнительное комплексное изучение церебро- и эндотелиопротекторных свойств 4 различных химических рядов соединений (производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов гиброксibenзойных кислот, хиназолина) на животных без и с отягощенным преморбидным фоном. Показано их неоднозначное церебро- и эндотелиопротекторное действие при НМК, протекающих на фоне СД, НПГ, различных состояний иммунной системы.

Впервые при НМК в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной сахарным диабетом, гипоестрогемией, возрастными изменениями выявлена высокая церебро- и эндотелиопротекторная активность фенильного производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135), пиридилового производного ГАМК (РГПУ-195), композиции фенибута и салициловой кислоты (РГПУ-189), композиции мефебута и L-аргинина (РГПУ-260).

Впервые установлено повышение активности e-NOS, базальной и стимулируемой продукции NO эндотелиальными клетками, снижение количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, повышение утилизации глюкозы мозгом, снижение агрегации тромбоцитов и продуктов ПОЛ, повышение активности антиоксидантной системы у животных с НМК на фоне ЭД под влиянием соединений РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-135, РГПУ-260, что очевидно лежит в основе их церебропротекторного действия и делает перспективными для дальнейшей разработки в качестве препаратов для профилактики и лечения НМК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная методология поиска новых средств для лечения цереброваскулярных заболеваний при моделировании острых и хронических

НМК в условиях отягощенного преморбидного фона дает возможность оценить церебро- и эндотелиотропные свойства соединений в условиях, более приближенных к клинической ситуации, чем это моделируется сегодня и позволит с большей вероятностью экстраполировать результаты доклинических исследований на клиническую практику. Проведенный анализ полученных данных об эффектах новых церебропротекторных средств – производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135), производных ГАМК (РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) в условиях острых и хронических НМК доказывает их неодинаковую активность у животных с различным преморбидным фоном. Это позволит в последующем при создании на их основе препаратов для лечения определенных цереброваскулярных заболеваний более дифференцированно проводить клиническое изучение, учитывающее имеющиеся патологии пациентов.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа носила экспериментальный характер, выполнена на двух видах лабораторных грызунов (крысы и мыши). На каждом этапе исследования при распределении животных были сформированы не менее двух контрольных групп (интактные и с экспериментальной патологией, которым вводился только физиологический раствор в дозе и объеме, эквивалентном получаемым опытными группами). Экспериментальные модели патологий были выбраны в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Хабриев Р.У., 2005; Спасов А.А., 2010; Миронов А.Н., 2012]. Используемое в работе технологическое оборудование ВолгГМУ, НИИ фармакологии ВолгГМУ являлось специализированным и позволяло выполнить поставленные задачи. Методы статистического анализа полученных результатов соответствовали рекомендованным для проведения доклинических исследований. При разработке новой методологии поиска лекарственных препаратов для лечения и профилактики НМК использован концептуальный подход, предполагающий предварительную разработку концепции исследования, с

последующим апробированием ее на этапе доклинического изучения наиболее активных соединений у животных с нарушенным преморбидным фоном.

Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол №156-2012 от 6.04.2012г.

Реализация результатов исследования

На основании данных, полученных в ходе диссертационного исследования, предложена дальнейшая программа целенаправленного поиска соединений с церебро- и эндотелиопротекторными свойствами среди производных хиназолинов (кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России), гиброксibenзойных кислот (кафедра химии ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России), ГАМК, глутаминовой кислоты (кафедра органической химии Российского Государственного Педагогического Университета им. А.И.Герцена (г. Санкт-Петербург)).

Разработанная новая методология поиска и доклинического фармакологического изучения веществ для коррекции НМК используется в научно-исследовательской работе кафедры фармакологии и биофармации ФУВ Волгоградского государственного медицинского университета (ВолгГМУ), НИИ фармакологии ВолгГМУ, кафедре фармакологии ВолгГМУ.

Полученные результаты об эндотелиопротекторных свойствах новых производных ГАМК, глутаминовой кислоты гиброксibenзойных кислот, хиназолина включены в раздел учебных программ курса фармакологии на кафедрах фармакологии и биофармации ФУВ, фармакологии, клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолгГМУ. Материалы работы оформлены в виде информационных писем, которые используются в учебном процессе и научной работе кафедры фармакологии ВолгГМУ, фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, лаборатории фармакологии сердечно-

сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ. По материалам настоящей работы получены 4 патента Российской Федерации на изобретение, поданы 2 заявки на получение патентов Российской Федерации в Роспатент.

Полученные результаты об изучении церебро- и эндотелиопротекторных свойств амидов бензойных кислот и производных ГАМК и глутаминовой кислоты составили основу для выполнения двух государственных заданий (номера государственных регистраций 115042410205, 115042410206) по проведению доклинических исследований средства для коррекции НМК.

Часть диссертации выполнена в рамках доклинических исследований нового средства, повышающего активность эндотелиальной NO-синтазы, разрабатываемого по государственному контракту с Минпромторгом РФ № № 14411.2049999.19.050 от 15 августа 2014 года на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы (НИОКР) «Доклинические исследования лекарственного средства, повышающего активность эндотелиальной NO - синтазы», шифр «2.1 Синтаза 2014», заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (утвержденной постановлением правительства РФ от 17.02.2011 г. № 91).

Положения, выносимые на защиту

1. Выполненное исследование показало, что действие исследуемых веществ в значительной степени зависит от имеющегося преморбидного фона (НПГ, СД, состояния иммунной системы, стресса, возрастных особенностей) у экспериментальных животных. Так вещества VMA10-17, VMA13-15, C18, C40, РГПУ-151, РГПУ-152, оказывающие выраженное церебропротекторное действие при окклюзии сонных артерий на условно-здоровых животных, оказались малоэффективными при моделировании НМК на фоне сопутствующей патологии (СД, НПГ). Курсовое введение

соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 животным, перенесшим НМК при экспериментальном СД, НПГ, приводило к повышению выживаемости крыс, уменьшению неврологических нарушений, улучшению вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия.

2. Среди производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов гидроксibenзойной кислоты, хиназолинов наиболее выраженным церебро- и эндотелиопротекторным действием обладают соединения РГПУ-135 (фенильное производное глутаминовой кислоты), РГПУ-195 (пиридиловое производное ГАМК), РГПУ-189 (композиция фенибута с салициловой кислотой), РГПУ-260 (композиция мефебута с L-аргинином). Церебро- и эндотелиопротекторное действие РГПУ-135 не зависит от состояния иммунной системы, в равной степени выражено при интактном, стимулируемом, подавленном иммунитете. Соединение РГПУ-189 и РГПУ-135 оказывают выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие при эндотелиальной дисфункции вызванной стрессорным воздействием и возрастными изменениями сосудистой системы, РГПУ-195 – при хроническом НМК.

3. Механизм эндотелиопротекторного действия РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 заключается в повышении активности эндотелиальной NO-синтазы, увеличении базальной и стимулируемой продукции NO, повышении вазодилатирующей, антитромботической и противовоспалительной функций эндотелия.

4. Представленные данные свидетельствуют о необходимости пересмотра методологии поиска и разработки препаратов для профилактики и лечения НМК и проведения исследований фармакологической активности новых средств при моделировании цереброваскулярных заболеваний в условиях отягощенного преморбидного фона. Проведенное сравнительное изучение 4 химических рядов соединений позволяет говорить о том, что выраженность церебро- и эндотелиопротекторного действия веществ при

НМК зависит от исходного состояния животных и наличия у них сопутствующей патологии.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечивалась применением современных методов исследований и валидированных экспериментальных моделей, с использованием высокотехнологичного оборудования, кондиционностью химических, биологических материалов и лабораторных животных, величиной экспериментальных выборок. Анализ данных и их обобщение проведены с применением методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих характеру данных и задачам экспериментов. Все выявленные закономерности, эффекты, обобщения и выводы подтверждались результатами статистического анализа.

Основные материалы диссертации были представлены на международной научной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)» (Ярославль, 2009), 69-й и 70-й открытой научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием (Волгоград, 2011, 2012), 2-ом, 3-м, 4-м, 5-м Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии» (Волгоград, 2010, 2011, 2012, 2013), научно-практической конференции, посвященной 90-летию учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск, 2011), научно-практической конференции «Аспирантские и докторантские чтения: дерзания нового времени – поиск инноваций» (ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва 2012), VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2012), 14-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012), IV Съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), V международном молодежном медицинском конгрессе, «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013» (Санкт-Петербург, 2013),

Всероссийской конференции «Фармакологическая нейропротекция», посвященная 90-летию отдела нейрофармакологии им. С.В.Аничкова (Санкт-Петербург, 2013), 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015), научно-практической конференции с международным участием «Дезадаптация различного генеза и пути её фармакологической коррекции» (Пятигорск, 2015).

Публикации.

По результатам диссертационной работы опубликовано 42 научные работы: 20 научных статей в рецензируемых изданиях перечня ВАК Министерства образования и науки РФ, 18 работ в материалах симпозиумов и научных конференций, 4 патента РФ. Получено 2 приоритетные справки на поданные заявки.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 344 страницах машинописного текста, иллюстрирована 83 таблицами, 80 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VIII), обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает 448 источника, из них отечественных 150, иностранных 298.

Личный вклад автора.

Автору принадлежит основная роль в обосновании и выборе направлений исследований, планировании и проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, написании статей, докладов, тезисов и подготовке к их публикации в научных изданиях, докладах и обсуждении на отечественных и международных конференциях. В экспериментальных работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим, состоящим в участии на всех этапах – от постановки задач и выполнения, обработки, полученных данных, до оформления результатов в виде отчетов, публикаций и докладов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность поиска новых церебропротекторных средств

В статистических материалах, опубликованных Министерством здравоохранения Российской Федерации о заболеваемости взрослого населения России в 2014 году, приводятся следующие цифры: больных с диагнозом инфаркт мозга зарегистрировано 266 441, всего с цереброваскулярными болезнями зарегистрировано 479 857 пациентов. При этом, начиная с 2008 г. заболеваемость ССЗ в России (как общая, так и впервые выявленные случаи) находится на максимальном уровне за все время ведения государственной статистики по болезням этой группы [Щербаков Д. В., 2014; Сайгитов А. Т., 2015].

По данным европейских исследований, на каждые 100 000 населения приходится 600 больных с последствиями инсульта, из них 60% являются инвалидами, многие утрачивают возможности к самообеспечению, нуждаются в постоянном уходе на фоне тяжелой когнитивной и двигательной дисфункции, социальной дезадаптации. В связи со старением населения и увеличением заболеваемостью сахарным диабетом, ожирением, метаболическим синдромом, артериальной гипертензией, атеросклерозом, т.е. теми болезнями, которые повышают риск развития нарушений мозгового кровообращения и осложняют их течение, важность проблемы профилактики заболевания (в т. ч. вторичной) и реабилитации больных, перенесших инсульт переоценить трудно. При этом в настоящее время распространенность ключевых факторов риска развития НМК (артериальная гипертензия, сахарный диабет, атеросклероз, метаболический синдром) также неуклонно растет.

Очевидно, что глобальное внимание к НМК определяется не только социальными факторами, но колоссальными затратами систем здравоохранения государств по всему миру. Непрямые экономические потери от НМК также весьма значительны, они связаны с преждевременной (в трудоспособном возрасте) смертностью, преждевременной потерей

трудоспособности и самообеспечения. В результате продолжает нарастать значимость исследований, целью которых является разработка новых методов и средств ранней диагностики и эффективной терапии НМК и коррекции связанных с ними последствий (данные о клинических исследованиях различных нейропротекторных препаратов представлены в табл.).

Таблица 1

Зарегистрированные нейропротекторные препараты (Internet Stroke Center, 2011)

Класс ЛС	Клинические исследования				
	Продолжаются	Завершены	Количество	Фаза	Всего
1. Блокаторы кальциевых каналов					
Нимодипин	0	23	23	III	45
Флунаризин	0	22	22	III	
2. Хелаторы кальция					
DP-b99 (DP-ВАРТА)	1	3	4	II	4
3. Антиоксиданты					
Эбселен	1	3	2	III	9
Тирилазад (U-74006F)	0	7	7	II	
4. ГАМК-агонисты					
Клометизол	0	2	2	II	2
5. Глутамат антагонисты					
AMPA антагонисты					
YM872 (zonampanel)	0	2	2	II	21
ZK200775 (MPQX)	0	1	1	II	
Конкурентный антагонист NMDA					
CGS19755 (selfotel)	0	2	2	III	
Блокаторы NMDA каналов					
Аптиганел (CNS-1102, Cerestat)	0	1	1	III	
CP-101,606 (Траксопродил)	0	1	1	III	
Магнезия	2	6	8	III	
NPS1506	0	1	1	I	
Антагонисты глицинового центра					
ACEA1021 (Licostinel)	0	0	0	I	
GV150526 (Gavestinel)	0	5	5	III	
Антагонисты полиаминового рецептора					
Элипродил (SL 82-0715)	0	1	1	III	
6. Ростовые факторы					
Фактор роста фибробластов	0	2	2	III	2
7. Ингибиторы адгезии лейкоцитов					
ICAM-антитела (Enlimomab)	0	1	1	III	2
Hu23F2G (Rovelizumab)	0	1	1	III	2

8. Ингибиторы оксида азота					
Лубелузол	0	3	3	III	3
9. Опиоидные агонисты					
Налмефен (Cervene)	0	2	2	III	2
10. Предшественник фосфатидилхолина					
Цитиколин ((CDP-choline)	2	7	9	III	9
11. Агонисты рецепторов серотонина					
BAУх3702 (Repinotan)	0	2	2	III	2
12. Блокаторы натриевых каналов					
Фосфенитоин	0	1	1	III	4
Лубелузол	0	3	3	III	
13. Активатор калиевых каналов					
BMS-204352	0	1	1	III	1
14. Механизм не ясен (поливалентный)					
Пирацетам	1	3	4	III	4

Международные многоцентровые клинические исследования нейропротекторных препаратов были начаты еще 1980-е годы. В настоящее время они продолжаются и с каждым годом их количество увеличивается. Так если до начала 90-х годов прошлого века публикации по этому вопросу были единичными, то начиная с 2000-х их количество превышает 1000 по экспериментальным и 4000 по клиническим исследованиям. Это связано с тем, что по мере изучения механизмов клеточной гибели при ишемии головного мозга появлялись и новые направления лечения НМК. В настоящее время список препаратов с нейропротекторными свойствами весьма обширен (табл. 1), однако все они не лишены недостатков [Ovbiagele В., 2003; Auriel E., 2010; Сергеев Д.В., 2010; Sui-yi Xu, 2013; Бурчинский С. Г., 2015].

Так например, нимодипин (антагонист кальция) в исследованиях на животных увеличивал просвет сосудов головного мозга и уменьшал их спазм после субарохноидального кровоизлияния. Однако в 5 наиболее крупных клинических исследованиях эффективности данного препарата при приеме внутрь и внутривенно с участием более 3400 пациентов, а также по данным мета-анализа Кохрановского сообщества, были получены отрицательные результаты.

Другой группой перспективных нейропротекторных препаратов являлись антагонисты глутамата (NMDA- и AMPA-рецепторов). Глутамат

относится к одному из основных нейромедиаторов ЦНС [Brassai A., 2015]. Он участвует в цитотоксическом повреждении нейронов при ишемии головного мозга. Дизоцилпин и декстрометорфан, являющиеся антагонистам NMDA рецепторов, уменьшали объем инфаркта головного мозга, однако их разработка была остановлена ввиду нежелательных реакций (сонливости, галлюцинаций, повышенной раздражительности, гипотонии и даже остановки дыхания), выявленных на этапе пилотных клинических исследований [Sui-yi Xu, 2013]. Единственным антагонистом NMDA-рецепторов, достигшим этапа крупных клинических исследований, являлся аптиганел, однако его изучение было прекращено на 2/3-й фазе в связи с отсутствием эффективности и увеличением смертности [Сергеев Д.В., 2010]. Конкурентный антагонист NMDA-рецепторов CGS19755 (selfotel) также обладал побочными эффектами (спутанность сознания, галлюцинации, раздражительность, паранойя) в дозе значительно меньшей той, которая была определена как эффективная на этапе доклинических исследований.

В попытке найти блокатор рецепторов NMDA с лучшим профилем безопасности, чем "чистые" антагонисты глутамата, как потенциальные нейропротекторные препараты были изучены Licostinel и Gavestinel, которые действуют в качестве антагонистов рецепторов NMDA, путем предотвращения связывания глицина с рецептором. Было предположено, что вещества, которые блокируют глутаматный сайт NMDA-рецептора, обычно обладают такими побочными эффектами как психо-эмоциональное возбуждение, спутанность сознания, галлюцинации, седация, нежелательные явления со стороны сердечно-сосудистой системы, тогда как антагонисты глицинового центра будут проявлять нейропротекторное действие с менее серьезными неблагоприятными эффектами. Действительно, внутрибрюшинное введение Licostinel (ACEA-1021) животным уменьшало объем инфаркта головного мозга и улучшало их неврологическое состояние при транзиторной фокальной ишемии. Далее в клинических исследованиях было установлено, что пациенты с ишемическим инсультом хорошо

переносили данный препарат и у них не наблюдалось серьезных психомоторных эффектов, хотя интервал улучшения по шкале NIHSS был сравним с 20 пациентами группы плацебо [Albers G.W., 1999]. Дальнейшее изучение было остановлено компанией Novartis после того, как кристаллы Licostinel были обнаружены в моче некоторых пациентов с нежелательными явлениями. CoCensys прекратил исследования и разработку Licostinel в 2005 году [Grupke S., 2015].

Gavestinel при его доклиническом изучении также значительно уменьшал размер инфаркта у крыс с перевязанной средней мозговой артерией и ингибировал деполяризацию нейронов *in vitro* [Bordi F., 1997]. В многоцентровом исследовании GAIN (Glycine Agonist in Neuroprotection) с участием 1367 пациентов, перенесших ишемический инсульт, Gavestinel не подтвердил свою эффективность [Sacco R.L., 2001].

Магний может играть защитную роль при ишемии головного мозга путем блокады кальциевых каналов, ингибирования высвобождения возбуждающих нейромедиаторов и [Ovbiagele B., 2003; Овечкин А. М., 2013]. Однако в крупном многоцентровом исследовании IMAGES эффективность введения магнезии через 12 часов от начала острого инсульта, не была доказана, при этом смертность в группе сульфата магния была несколько выше, чем в группе плацебо [Muir K.W., 2004]. В настоящее время пока не опубликованы результаты 3-й фазы клинических исследований сульфата магния (FAST-MAG), в котором препарат рассматривается в качестве прототипа нейропротективного средства для лечения острого инсульта, начатого до госпитализации пациента и проведения нейровизуализации, в течение первых 2-х часов от начала заболевания [Muir K.W., 2004; Сергеев Д.В., 2010].

Среди AMPA-антагонистов одним из перспективных веществ было ZK 200775, которое на этапе доклинических исследований значительно уменьшало размер инфаркта после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии [Turski L., 1998]. Однако в клинических исследованиях AMPA-

антагонист – ZK 200775 ухудшал неврологическое состояние больных с острым ишемическим инсультом, оказывая выраженное седативное действие [Suzuki M., 2003]. Клинические исследования были досрочно остановлены.

Весьма перспективным представлялась разработка препарата лубелузола, предотвращающего пресинаптическое высвобождение глутамата, снижающего концентрацию нейротрансмиттера во внеклеточном пространстве перинфарктной зоны мозга [Scheller D., 1995, Silver B., 1996], а также способного тормозить глутамат-индуцированную нейротоксичность оксида азота, снижая активность нитроксидсинтазы [Lees K.R., 1988]. Результаты же клинических исследований были неоднозначны. Так по данным 2-й фазы клинических испытаний, с участием 232 больных с острым ишемическим инсультом, была установлена безопасность и хорошая переносимость препарата, отмечалось снижение летальности на 10% относительно, получавших плацебо, и улучшение клинического исхода инсульта [Diener H.C., 1996]. По результатам двух мультицентровых плацебо-контролируемых исследования 3-й фазы [Grotta J. 1997, Onal M.Z., 1997] назначение лубелузола в дозе 7,5 мг/ч внутривенно, а затем в дозе 10 мг/ч приводило к преходящему удлинению интервала Q-T на ЭКГ. В одном из исследований не был подтвержден достоверный эффект препарата по показателю летальности, тогда как в другом - были установлены тенденция к снижению летальности и достоверное увеличение (на 7%) числа больных с хорошим восстановлением нарушенных неврологических функций через 3 месяца после инсульта. Показано наличие положительного нейропротективного эффекта лубелузола у больных с малым и среднетяжелым инсультом, тогда как при тяжелом инсульте эффекта от лечения не было [Hantson L., 1998]. Клиническое испытание, основанное на применении лубелузола в течение первых 8 часов с момента развития инсульта, не подтвердило позитивного действия препарата [Diener H.C., 1999].

В качестве нейропротекторного препарата среди агонистов 5-HT_{1A} – рецептора был синтезирован BAYx3702 (Repinotan), который способен ингибировать опосредованное ишемией высвобождение глутамата путем активации клеточной гиперполяризации. Безопасность, переносимость и его дозирование изучены в исследовании BRAIN. Repinotan хорошо переносился. Однако, repinotan показал недостаточную клиническую эффективность для того, чтобы оправдать затраты на его дальнейшие исследования [Teal P., 2005].

Налмефен – антагонист опиоидных рецепторов с преимущественным сродством к каппа-опиоидным рецепторам и, в несколько меньшей степени, к μ -опиоидным рецепторам, был разработан в начале 1970-х гг. Предварительное введение налмефена крысам с глобальной ишемией ингибировало высвобождение глутамата [Graham S.H., 1993], а также уменьшало объем реперфузионных повреждений при транзиторной ишемии головного мозга [Faden A.I., 1990]. К сожалению, в рандомизированном плацебо контролируемом исследовании с участием 368 пациентов, перенесших ишемический инсульт, налмефен оказался неэффективным [Grupke S., 2015].

Пирацетам представляет собой препарат, влияющий на метаболизм головного мозга, обладающий нейропротективными и противосудорожными свойствами [Muller W.E., 1999, Winblad B., 2005]. В исследовании 3-й фазы при применении пирацетама в течение 12 часов после начала заболевания в дозе 12 г в/в и затем в дозе 12 г в сутки в течение 4-х недель преимуществ пирацетама в сравнении с плацебо выявлено не было [Сергеев Д.В., 2010].

Одним из наиболее успешных нейропротекторных препаратов является цитиколин – природный эндогенный мононуклеотид (цитидин-5-дифосфохолин), участвующий в синтезе фосфолипидов мембран клетки. Являясь предшественником ацетилхолина, цитиколин обеспечивает усиление синтеза и высвобождение ацетилхолина с повышением активности холинэргической системы. Цитиколин является одним из немногих

нейропротекторных препаратов с доказанной клинической эффективностью [Grupke S., 2015]. Учитывая доказанную в результате контролируемых исследований и мета-анализов эффективность цитиколина у пациентов с острым ишемическим инсультом, информация о препарате внесена в ряд национальных рекомендаций по лечению инсульта, среди которых Шотландские национальные рекомендации по лечению больных с инсультом и транзиторными ишемическими атаками, Рекомендации по лечению инсульта испанского министерства здравоохранения, а также международные Европейские рекомендации по лечению инсульта и транзиторных ишемических атак, разработанные Европейской организацией по борьбе с инсультом в 2008 г. [Сергеев Д.В., 2010].

Таким образом, несмотря на накопленные сведения об этиопатогенезе НМК эффективных лекарственных средств, способных влиять на исход и течение данного заболевания, существует весьма ограниченное количество. Поэтому разработка новых препаратов для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний в настоящее время является актуальной задачей фармакологии и клинической медицины. Наиболее перспективными в этом отношении будут вещества, обладающие мультимодальным механизмом действия. С этой точки зрения особый интерес представляют эндотелипротекторы и изучение эндотелиальной системы в контексте понимания ее роли в патогенезе острых и хронических НМК, а так же в патогенезе тех нозологических форм болезней, осложнением которых могут стать сосудистые нарушения, в том числе, происходящие в головном мозге. Эндотелий может рассматриваться в качестве одной из основных мишеней, влияние на которую позволит предупредить НМК и повреждения нервной ткани с ним связанные или повысить эффективность проводимой терапии. В многочисленных исследованиях актуализируется вопрос о том, что именно эндотелий является важнейшим звеном профилактики повторных сосудистых катастроф, которые являются причиной более половины смертельных исходов в постинсультном периоде. Таким образом,

применение препаратов, улучшающих вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную, антипролиферативную функции эндотелия окажет превентивное действие на основные факторы риска возникновения НМК.

Одной из новых групп препаратов, которые потенциально могут оказывать мультитаргетное действие при цереброваскулярных заболеваниях, обладая как церебро-, так и эндотелиопротекторными свойствами, являются вещества с ГАМК-ергическим механизмом действия. γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является главным тормозным нейромедиатором центральной нервной системы (ЦНС), рецепторы которого широко распространены в различных структурах головного мозга. При выбросе ГАМК в синаптическую щель происходит активация ионных каналов ГАМК_A- и ГАМК_C-рецепторов, приводящая к ингибированию нервного импульса [Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., 2010, 2011; Путилина М.В., 2011]. Под влиянием ГАМК активируются также энергетические процессы мозга, повышается дыхательная активность тканей, улучшается утилизация мозгом глюкозы, улучшается кровоснабжение.

Способность ГАМК-ергических препаратов модулировать активность одного из основных возбуждающего медиатора ЦНС – глутамата и создавать устойчивое равновесие между возбуждающими и тормозными системами позволяют предполагать их высокую церебропротекторную активность [Meldrum B.S., 1989]. На начальных этапах ишемии происходит мгновенное высвобождение глутамата и ГАМК из пресинаптических терминалей, в первые 4 часа ГАМК-ергическая тормозная нейротрансмиссия оказывается недостаточной [Гусев Е.И., 2001]. Повышение активности ГАМК-ергической системы позволяет регулировать интенсивность развития процессов глутамат-кальциевого каскада. Увеличение уровня ГАМК оказывает достоверное церебропротекторное действие, защищая нейроны от ишемического повреждения [Green A.R., 1992]. Препараты производных ГАМК кроме острого периода инсульта, широко применяются в качестве

средств репаративной терапии, комплексно воздействуя на метаболизм и кровообращение мозга. Другой компонент церебропротекторного действия при ишемии головного мозга ГАМК-ергических препаратов связан с подавлением глутаматно-кальциевого каскада, а именно с ингибированием синаптического высвобождения глутамата и входа ионов Ca^{2+} в нейроны, [Кулинский В.И., 1997; Hasbani M.J., 2001; Serena J., 2001; Лунышина Е.В., 2003; Островская Р.У., 2003; Мирзоян Р.С., 2005; Cho Y.R., 2007].

Экспериментальные и клинические наблюдения показали, что препараты, созданные на основе ГАМК и ее производных (аминалон, пикамилон, пирацетам, оксибутират натрия, фенибут и др.) кроме того могут быть отнесены к веществам с ноотропной активностью [Арушанян Э.Б., 2005; Воронина Т.А., 2007; Воробьева О.В., 2008; Титова Н.В., 2007; Бурчинский С.Г., 2008; Черний В.И., 2008]. В данную группу препаратов входят сама ГАМК в виде препарата аминалона (гаммалона), ее циклическое производное из семейства рацетамов – пирацетам, фенил-пирацетам (фенотропил) и другие родственные ему соединения, комплексы ГАМК с витаминами - пантотеновой (пантогам) и никотиновой (пикамилон) кислотами, оксибутират натрия, фенибут, нооклерин и др. [Воронина Т.А., Середенин С.Б., 1998; Воронина Т.А., 1991, 2003; Аведисова А.С., 2005; Морозов П.В., 2003; Ashton H., Young A.H., 2003].

При церебральной ишемии, вызванной двусторонней окклюзией общих сонных артерий, пирацетам обеспечивали протективный эффект, существенно снижая смертность животных в поздние сроки реперфузии [Мирзоян Р.С., 2003, 2005]. Кроме того, пирацетам обладает способностью улучшать свето- и цветовосприятие у лиц, перенесших черепно-мозговую травму, значимо снижая пороги яркостной чувствительности сетчатки [Арушанян Э.Б. 2003; Ashton H., Young A.H., 2003].

Сохранение под влиянием ГАМК-ергических препаратов с ноотропной активностью достаточного уровня или улучшения реципрокных взаимоотношений процессов активации и торможения в ЦНС позволяет

формировать “активную защиту”, повышая тем самым устойчивость организма и расширяя его адаптационные возможности [Воронина Т.А., 2007]. Такая способность уже выявлена у многих производных и структурных аналогов ГАМК – пирацетама, пантогама, пиридитола, фенибута, фенотропила и др. [Грачева С.В., 1985; Петров В.И., 1997].

Кроме того, производные и структурные аналоги ГАМК отличаются широкий спектр фармакологической активности, который включает в себя антиамнестические, противогипоксические, анксиолитические, седативные, противосудорожные свойства [Ковалев Г.В., 1985, 1990; Раевский К.С., 1986; Бойко С.С., 1997; Воронина Т.А., 1991, 2003; Титова Н.В., 2007].

Установлено также взаимодействие ГАМК-ергической системы и системы NO – ЦНС в центральной регуляции кровообращения. Повышение экспрессии eNOS в ростральной вентролатеральной отделах продолговатого мозга ведет к увеличению внеклеточной концентрации ГАМК [Ishide T., 2005]. В ряде исследований было показано, что существует корреляция между содержанием оксида азота и активностью ГАМК-трансаминазы, а также самой ГАМК, глутаминовой кислотой, активностью глутаматдекарбоксилазы. Согласно результатам, полученных Jayakumar A.R (1999), введение животным L-аргинина повышает концентрацию NO в структурах головного мозга, при этом активность ГАМК-трансаминазы снижается, а уровень глутаминовой кислоты и глутаматдекарбоксилазы не изменяется. Введение животным N-(G)-нитро-L-аргинини -метилового эфира (ингибитора NOS) вызывает снижение NO, ГАМК, глутаминовой кислоты в структурах головного мозга, при этом активность ГАМК-трансаминазы и глутаматдекарбоксилазы повышается. Было также показано, что высокие концентрации NO в головном мозге подавляют активность ГАМК-трансаминазы [Jayakumar A.R, 1999].

Оксид азота может моделировать ГАМК-ергическую передачу посредством изменения возбудимости ГАМК-ергических нейронов или с помощью прямой модуляции механизма высвобождения медиатора [Kilbinger

Н,1999; Takuya Kishi, 2001]. Степень продукции оксида азота соответствует медиаторной активности ГАМК-ергических интернейронов и пропорциональна уровню активации глутаматных рецепторов, расположенных в локусах их контактов с афферентным проводником. Возбужденные рецепторы обеспечивают мощный приток ионов кальция в цитоплазму нервной клетки, активируя кальмодулин и сцепленную с ним NOS. Диапазон участия оксида азота в регуляции сосудистого тонуса зависит от соотношения активности возбуждающих и тормозящих элементов коры: нейроны, вовлеченные в генерацию высокочастотных разрядов, особенно в условиях гипоксии и окислительного стресса, способны экспрессировать индуцибельную изоформу NOS [Каличенко С.Г., 2015]. ГАМК/нитроксидаергическим продуцентам принадлежит ключевая регулирующая роль микроциркуляции в головном мозге. Помимо оксида азота, синтезируемого эндотелием, его выделяют через мембрану своих отростков тормозные клетки, вызывая дополнительное расширение микрососудов, которое колеблется в зависимости от соотношения уровней возбуждения и торможения клеток-мишеней. Следует отметить, что кроме оксида азота, мощный релаксирующий эффект на стенку внутрикорковых артериол оказывает ГАМК, которая выделяется в участках периваскулярных контактов ГАМК-ергических нейронов [Brand-Schieber E., 2004; D'Angelo E., 2014]. В коре мозжечка иммунореактивная ГАМК определяется в цитоплазме эндотелиоцитов, а на люминальной поверхности капилляров обнаруживается система ее высокоаффинной транспортировки. Расширение сосудов здесь опосредуется токами ионов через каналы ГАМК_A-рецепторов, расположенных на мембранах гладких мышечных клеток [Regidor J., 1993; Choi Y.B., 2000].

Также, возможно, что эндотелиопротективный эффект, оказываемый ГАМК - ергическими веществами, может быть связан как с усилением энергетических процессов в головном мозге, так и с улучшением церебрального кровотока, его ауторегуляции.

Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнений, что препараты созданные на основе производных ГАМК способны оказывать мультимодальное действие, у будут обладать церебро- и эндотелиопротекторными свойствами. Однако существующие в настоящее время препараты подобной химической структуры пока не лишены недостатков и не способны в полной мере решить проблему адекватной фармакотерапии НМК. Поэтому исследования по созданию церебропротекторных препаратов на основании нейроактивных аминокислот, обладающих мультаргентным механизмом действия, в настоящее время представляются целесообразными и вполне обоснованными.

1.2 Проблемы разработки и внедрения эффективных средств профилактики и лечение НМК

Создание мер эффективной ранней диагностики и профилактики, а также борьба с наиболее значимыми факторами риска возникновения НМК рассматривается как основное направление медицинских, научных и социальных институтов. Разрабатываемые лечебные стратегии направлены не только на создание новых лекарственных кандидатов, но и способов доставки действующих веществ к органам мишеням. При этом и научное, и практическое медицинское сообщество сходятся во мнении, что необходимо повышать число выпускаемых оригинальных лекарственных средств, а для этого необходимо увеличить число кандидатов, успешно прошедших все стадии клинических испытаний.

В настоящее время складывается драматичная ситуация, поскольку количество отозванных лекарственных препаратов с различных фаз клинических испытаний, а также число молекул-кандидатов, не прошедших их по тем или иным причинам, колеблется в диапазоне приблизительно от 80% до 97%, в зависимости от терапевтической области [Kola I., 2004; Collins F. S., 2011; Garner J. P., 2014; Hay M., 2014]. Наиболее подробные экономические данные предоставляются Paul S. M., Mytelka D. S.,

Dunwiddieet C.T. (2010). Авторы отмечают, что отсев неэффективных соединений на этапе доклинических исследований колоссален. Впрочем, эти неудачи происходят в течение относительно недорогого этапа разработки лекарственного средства и составляют лишь 2% от общей стоимости вывода лекарства до клинического испытания. Напротив, процент отсева в клинических исследованиях примерно 90%, но эти этапы исследований значительно дороже, поэтому они составляют 73% стоимости доведения препарата до рынка [Paul S. M., 2010]. Эти цифры подчеркивают огромные социальные последствия неудачи в клиническом апробировании потенциального препарата. Создание препаратов для лечения редких заболеваний длится дольше и стоит значительно дороже. Разработка лекарств – это длительный, сложный процесс. В среднем, он занимает не менее десяти лет с момента открытия активной молекулы до выхода ее на рынок, а последующие за ним клинические исследования длятся в среднем 6-7 лет. Средняя стоимость исследования и разработки каждого успешного препарата оценивается в среднем в \$1,8 миллиарда. Это число включает стоимость неудачных попыток – из тысяч, а иногда миллионов соединений, которые могут быть протестированы в доклинических испытаниях и получают одобрения для исследований на людях. Вероятность клинического успеха, т.е. вероятность того, что препарат после начала клинических испытаний будет утвержден для дальнейшего применения, оценивается на уровне менее 12%. Успех требует огромных ресурсов – высококвалифицированных специалистов, современных технологий и материалов, постоянно меняющийся производственный процесс, а также комплексное управление всеми этапами проекта – вот те требования, которые предъявляются к современным лабораториям, занимающимся разработками новых лекарств.

Как уже говорилось выше, требования к проведению доклинических исследований постоянно ужесточаются (поскольку растет число неудачных клинических исследований), а соответственно растет и их стоимость. Вместе с тем все больше публикуется исследований, раскрывающих возможные

причины неэффективности кандидатов, демонстрировавших обнадеживающие результаты в эксперименте, в попытках применения их на человеке. Ниже мы постарались осветить наиболее часто упоминаемые из них.

Одной из причин несоответствия в эффективности лекарственных средств в экспериментальных и клинических исследованиях может являться сознательное или подсознательное завышение исследователями данных о своих изобретениях. В то время как в клинических исследованиях эффективность средства кандидата часто может занижаться. В результате авторами предлагается введение минимальных стандартов по разнообразию, числу и качеству проведенных исследований на животных, перед подачей заявки на проведение клинических исследований [Sena E., 2007]. При этом этические комитеты, контролирующие работу экспериментаторов, выступают за минимизацию использования животных, что в свою очередь ведет к ограничению выборки животных.

Многие ученые чрезмерно оптимистические результаты доклинических исследований церебропротекторных средств объясняют как следствие умышленных или неумышленных методологических недостатков, допускаемых при проведении экспериментов. Это предположение подтверждается и тем, что результаты большинства исследований не удается воспроизвести сторонними лабораториями [van der Worp H. B., 2005; Scott S., 2008; Prinz F., 2011].

Мета-анализ доступных данных по шести экспериментальным исследованиям средств для лечения заболеваний ЦНС [Hackam D. G., 2007] показал отсутствие убедительных доказательств возможности переноса их для клинических испытаний. Были обнаружены существенные несоответствия между результатами экспериментов на животных и людях, а также выявлены существенные методологические расхождения и недостатки. Например, только восемь из 113 исследований эффективности тромболизисной терапии при инсульте на животных сообщили об объеме

выборки и дизайне исследования, была ли проведена рандомизация, было ли исследование маскированным и многоцентровым и т.д. Т.е. те правила проведения и представления результатов исследований, которые являются неотъемлемой частью клинических исследований, не соблюдаются в экспериментальных. Естественно авторы исследования не распространяют свои выводы на все экспериментальные работы, но утверждают, что подобных много и это может быть причиной неудовлетворительных клинических апробаций.

Последовательный поиск лекарственных средств сопряжен с возникновением ложных предубеждений относительно проявляемого соединением эффекта. Методические неточности и ошибки могут быть следствием неправильно выбранной модели, а животные модели могут весьма отдаленно напоминать клинический пример в исследовании. Подопытные животные как правило молодые, редко имеют сопутствующие заболевания. Большинство экспериментов на животных имеют ограниченный размер выборки и с большей вероятностью сообщают о более высоких оценках эффекта, в то время как, крупные клинические исследования стремятся к набору максимального числа пациентов.

Многие ученые [Hunter J., 2011; McManus R., 2013] все чаще вспоминают высказывания, суть которых сводится к тому, что в большинстве опубликованных исследований выводы не соответствуют действительности, что приводит к тому, что потенциальная польза от экспериментальных исследований для человека ставится под сомнение.

Основной причиной отрицательного завершения клинических исследований является недостаточная эффективность средств кандидатов. Например, как рассмотрено Zahs K. R., Ashe K. H. [2010] более 200 различных потенциальных кандидатов для лечения болезни Альцгеймера были зарегистрированы, как эффективные на животных (в доклинических исследованиях), но ни один не доказал свою эффективность на людях. Действительно, коэффициент убыли препаратов для лечения болезни

Альцгеймера с 2002 по 2012 год был 96.4% [Cummings J. L., 2014]. Аналогично, около 500 соединений были охарактеризованы как эффективные в снижении последствий острого ишемического инсульта на животных, но пока только 2 доказали свою эффективность в клинике [van der Worp H. B., 2010]. Основной причиной в этом случае выделяются фундаментальные недостатки экспериментальных моделей. Моделирование болезни путем создания нокаутных животных не вполне соответствует патогенезу большинства заболеваний, хотя достаточно полно воспроизводит его симптоматику. С развитием персонализированной медицины очень много скептицизма связано с возможностью дальнейшего исследования эффективности разрабатываемых лекарственных средств на человеке. [Abelson J. F., 2005; Zuchner S., 2006; Shmelkov S. V., 2010]. Большинство болезней, которые в настоящее время являются социально значимыми и для лечения которых создается большинство препаратов, имеют ярко выраженный стадийный характер. Например, болезнь Паркинсона диагностируется, когда пациенты уже потеряли более 50% дофаминергических нейронов, т.е. в терминальной фазе болезни, после прохождения которой проявляются клинические симптомы, на устранение которых должна быть направлена современная терапия, но при экспериментальном моделировании и попытках фармакологической коррекции данный факт зачастую не учитывается [Tolosa E., 2007]. Поиск препаратов для лечения расстройств ЦНС у человека труден ввиду сложной организации самой системы у людей и которую невозможно воспроизвести на животных, поэтому эффективность фармакологической коррекции когнитивных нарушений в эксперименте и клинике может существенно различаться [Miner B. G., 2005; Hunter J., 2011]. При моделировании патологии ученые стремятся сделать все манипуляции максимально стандартными, что абсолютно невозможно в клинических случаях. В фармакологических моделях вариабельность животных рассматривают как негативное явление, которое стремятся минимизировать, в том числе, и

путем генной модификации, при этом в испытаниях на людях невозможно даже снизить влияние индивидуальных и личностных характеристик на результат исследований. В доклинических исследованиях, проводимых многими лабораториями, может иметь место сглаживание эффектов, оказываемых фармакологическими агентами или обнаруживаться ложное их действие. Например, истинный неврологический статус животного может маскироваться болевым синдромом, низкая поведенческая активность – снижением чувствительности органов чувств (слепота, глухота и прочее), высокий болевой порог, регистрируемый в тесте отдергивания хвоста, может быть связан не с анальгетической активностью [Tricklebank M.D., Garner J. P., 2012], а с выраженным психотропным действием вещества или со скрытым повреждением хвоста животного или его индивидуальными особенностями. Смысл в том, что процессы, которые наблюдает экспериментатор, могут быть не связаны с болезнью животного, действия на него фармакологического соединения или их комбинации, однако, альтернативные объяснения наблюдаемых фактов принимаются далеко не во всех исследованиях.

Содержание животных также влияет на результаты эксперимента. Так, если вначале предъявляемые требования включали только санитарно-гигиенические аспекты (чистота, материал подстила, корм, микробиологические показатели и пр.), то в настоящее время еще и эколого-социальные (обогащение среды, обеспечение физиологических потребностей, развитие организма и т.д.). Таким образом, содержание животных определяет биологический и экологический “фон”, на котором патологический процесс будет развиваться, что должно быть обязательно учтено при выполнении исследований, поскольку может существенно повлиять на полученные результаты [Weiss J. M., 1971]. Яркий пример этому стресс. Содержание животных в клетке не может быть комфортным для всех особей. На некоторых животных определенные условия оказывают стрессогенное действие (более или менее выраженное), которое не может не

сказываться на результатах эксперимента и которые следует если не учитывать, то хотя бы обращать внимание [Würbel H., 2000]. Для некоторых видов животных в местах их постоянного содержания необходимо вносить некоторые дополнительные элементы, которые позволяют животным естественным образом устранить фактор, являющийся для них стрессогенным. К примеру, внесение гнездового или твердого (для стачивания резцов) материала в клетку к грызунам [Gaskill B. N., 2009, 2012, 2013]. Животное, содержащееся в небогащенной среде, не может считаться нормальным, и предсказать результаты эксперимента на таких животных очень сложно, тем более пытаться перенести их на людей.

Не только материальные условия содержания животных, но и их социальный аспект может значительно влиять на результат эксперимента, особенно при тестировании фармакологического средства. Например, если крыс размещали в одиночные клетки, тяжесть течения моделируемой патологии, ее летальность и число «неудачных» соединений резко возрастало [Hermes G. L., 2009]. И наоборот, в социально обогащенной среде, пусть и минимально (2-3 особи в клетке, но длительно с одними и теми же партнерами), крысы жили дольше и у них фиксировалось меньше осложнений и на большем числе животных удалось добиться положительного результата [Yee J. R., 2008]. Это демонстрирует то, что социальный аспект содержания животных может оказать значимое влияние на результативность препаратов [Kerr L. R., 1997; Kroenke C. H., 2006; Yee J. R., 2008; Hermes G. L., 2009]. Еще один пример – низкое социальное обогащение в условиях содержания мышей приводит к снижению их иммунитета [Cao L., 2010; Begley C. G., 2012; Mak I. W., 2014].

Бедная среда обитания в условиях вивария приводит к резкому снижению порога возбудимости животных на внешние раздражители незаметные для экспериментатора, которые могут вызвать реакции, маскирующие или подменяющие собой действия фармакологических веществ. Например, запах, не воспринимаемый экспериментатором (пота,

табака и т.д.) и являющийся резким или уникальным для животного, может вызвать стресс-реакцию, обуславливающую анальгетический эффект в тесте отдергивания хвоста [Sorge R. E., 2015].

J. P. Garner в своей работе сделал вывод: о том, что, если мы хотим, чтобы животные модели, отвечали патофизиологии болезней человека и были бы одинаково с ним восприимчивы к действию лекарств, тогда мы должны начать выполнять эксперименты на животных, как если бы они проводились на людях [Garner J. P., 2015].

Другими словами, если мы хотим, чтобы результаты, получаемые при проведении экспериментов были бы достаточны для прогнозирования клинического эффекта, то мы должны измерять те же клинические явления и, что не менее значимо, в тех же условиях [Garner J. P., 2011; Tricklebank M. D., Garner J. P., 2012].

Отсутствие широкомасштабных доклинических исследований – это еще одна причина провалов «лидеров» в клинических исследованиях. Тем более, что в современной мировой науке необходимость проведения обзорных исследований результатов экспериментов на животных, в том числе и в области фармакологии, сомнений не вызывает, но такие исследования единичны, а в нашей стране их практически нет. Создание систематических исследований возможно позволит снизить число провальных клинических исследований новых лекарств, поскольку позволит независимо, критически рассмотреть результаты экспериментальных исследований, провести историческую критику, оценить выбор моделей, животных, дизайна и процедур, провести анализ цитирований публикаций и спросить мнение клинициста. Последнее особенно важно, поскольку, как уже говорилось выше, одна из причин провалов – это разные подходы и взгляды на проведение исследований у специалистов, занятых в доклинических и клинических исследованиях. Таким образом, мета-анализы и систематические обзоры могут быть не только полезны с точки зрения своей информационной составляющей, но и выступать в качестве связующего

звена между клиническими и доклиническими исследованиями. Такие работы позволят избежать лишних затрат на проведение клинических исследований, поскольку помогут выявить слабые стороны препаратов кандидатов. Так первый систематический обзор исследований, проводимых на животных, был проведен после провалившихся клинических исследований эффективности нимодипина при остром ишемическом инсульте [Horn J., Limburg M., 2001]. Опубликованный обзор указывал на явные недостатки в проведении доклинических исследований, а именно: низкий методологический уровень работ, отсутствие рандомизации при формировании экспериментальных групп и их ослепление от исследователей, некорректный статистический анализ. Кроме того авторам обзора не удалось найти данных об исследованиях, показывающих протективные свойства от введения нимодипина в острый период ишемического инсульта с точки зрения долгосрочных наблюдений. В результате было сделано заключение, что доказательства доклинических исследований эффективности применения нимодипина при остром ишемическом инсульте являлись недостаточными для начала проведения клинических испытаний. Если бы обзор вышел раньше, провалившиеся испытания возможно было бы предотвратить.

В обзорном исследовании, проведенном Ciccone A., Candelise (2003), анализировались эффекты тромболитических препаратов на моделях ишемического инсульта. В отдельных работах сообщалось о возникновении внутримозговых кровоизлияний на фоне применения некоторых тромболитических препаратов (в большинстве случаев этот факт вообще не учитывался), но поскольку таких сообщений было недостаточно, реальный риск развития кровоизлияний был зарегистрирован только в клинических исследованиях. Впоследствии выяснилось, что этого можно было избежать путем проведения мета-анализа публикаций, поскольку при объединении данных риск развития кровоизлияний становился более значительным и очевидным.

Таким образом, на результаты доклинических исследований обращается недостаточно внимания или к ним относятся пренебрежительно, хотя они проводятся именно для получения важной клиницистам информации [Pound P., 2004].

Во многих проводимых исследованиях соединений, предположительно обладающих нейропротекторной активностью при различных повреждениях ЦНС, ученые выявляют эффективность на основании измерения количественных характеристик, таких как объем некроза и/или зоны ишемии, содержание маркеров повреждения нервной ткани, уровень кровотока и т.д. В то время как функциональному состоянию ЦНС (изменение поведенческих реакций, изменение восприятия, памяти и т.д.) уделяется недостаточное внимание. Эффективное доклиническое испытание предполагаемых цитопротекторных средств при экспериментальном повреждении головного мозга требует соответствующей функциональной оценки в дополнение к количественному измерению травмы [Hudzik., 2000; DeBow S.B., 2003]. Поведенческие тесты должны быть валидированы для конкретного типа повреждения и быть чувствительны к нему. Большинство тестов вполне способно выявить повреждение мозга, но далеко не все предназначены для сравнения тяжести травмы. Поэтому для эффективного сравнения животных с экспериментальным повреждением мозговой ткани в настоящее время рекомендуется использовать несколько поведенческих тестов, учитывая результаты которых, можно с более высокой достоверностью давать заключение о степени нарушения функционирования ЦНС или об эффективности нейропротекторного средства [MacLellan C. L., 2006].

Несмотря на многолетнюю историю изучения и борьбы с цереброваскулярными заболеваниями в их патогенетических аспектах до сих пор обнаруживают «белые пятна», наличие которых может отчасти объяснить отсутствие лекарственного средства с высокой терапевтической эффективностью. Ишемический инсульт представляет собой гетерогенную группу заболеваний, которая может быть дифференцирована на несколько

нозологических форм: преходящие или постоянные, тромбоэмболические или тромботические окклюзии церебральной артерии. Все нозологические формы приводят к существенному снижению кровотока в бассейне одной или нескольких мозговых артерий, что заканчивается фокальным или множественным инфарктом мозга. Современное понимание патофизиологии инсульта выходит за рамки непосредственных последствий нарушения местного кровотока. Основные механизмы, в том числе и комплекс клеточных и молекулярных каскадов, хорошо известны и подробно рассматривались многими авторами [Dirnagl U., 1999; Schaller B., 2004; Saito A., 2005; Гусев Е. И., 2013].

События, которые происходят в ишемическом ядре и прилегающей к нему ткани (пенумбра), происходят каскадно или параллельно друг другу с множеством вариантов и критических точек. Непосредственные механизмы повреждения включают эксайтотоксичность, деполяризацию мембран в периинфарктной ткани, оксидативный стресс, клеточный и тканевой ацидоз. Позже наступают воспаление и апоптотические процессы. Параллельно с этими патологическими каскадами нарушаются естественные эндогенные механизмы защиты, регенерации, приспособления и перестройки, что также приводит к более тяжелому течению и ухудшению прогноза инсульта [Dirnagl U., 1999; Schaller B., 2004; Saito A., 2005]. Необходимо отметить, что течение как первой, так и второй группы процессов значительно варьирует от пациента к пациенту, а также они очень чувствительны к многим факторам будь то изначальное состояние, преморбидный фон, фармакологический агент/агенты или комбинация этих воздействий.

Доклинические исследования, в которых ученые пытаются воспроизвести влияние хотя бы таких факторов как возраст или сопутствующее заболевание, очень дороги и их количество минимально [Hussain M.S., Shuaib A., 2008].

Недостаточное обращение внимания на результаты доклинических исследований зачастую являются причиной не только неудач при

клиническом апробировании соединений, но и трагедий вследствие увеличения летальных исходов на фоне проводимой терапии. Так ингибиторы функции тромбоцитов, антикоагулянты и тромболитики рекомендуются как для профилактики, так и лечения острого ишемического инсульта. Эксперименты на животных предсказывали увеличение риска развития внутричерепного кровотечения. В результате того, что об этом своевременно не сообщалось, препараты были зарегистрированы в клинических исследованиях (AbESTT-II) на пациентах с острым ишемическим инсультом, которые были досрочно прекращены на III фазе, поскольку значительно увеличилась смертность людей [Adams H.P. Jr., 2008]. Аналогичная ситуация произошла при клиническом апробировании статинов, в котором они показывали хорошие результаты, но после их отмены существенно повышался риск (предсказанный в доклинических исследованиях) развития внутричерепных кровотечений, ухудшалась функция сосудов и повышалась смертность [Flint A. C., 2012]. Внутривенная тромболизисная терапия была впервые опробована на кроличьей модели [Zivin J. A., 1985], впоследствии ее эффективность была доказана и у людей [Caplan L. R., 1999]. Однако применение тромболизисной терапии в доклинических условиях проводилось на животных моделях, подразумевающих отсутствие риска трансформации ишемического инсульта в его геморрагическую форму (животные с случившейся трансформацией из эксперимента, естественно, исключались), а при первых клинических исследованиях это обстоятельство не было учтено. При проведении дальнейших исследований в протоколы были внесены соответствующие исправления, касающиеся в основном требований к включению пациентов и более детальной постановки диагнозов, однако предшествующие этому неудачные клинические исходы исправить нельзя. Таким образом, для успешного использования результатов доклинических исследований необходим их критический и систематический анализ, а не подбор доказательств в пользу эффективности и безопасности потенциального

препарата [Zechariah A., 2010]. Более того, нельзя забывать и о том, что доклиническая наука должна в первую очередь помогать решать клинические проблемы [Lemon R., 2005].

Помимо всех вышеперечисленных причин возможных неудач клинических исследований лекарственных препаратов также на результаты апробации оказывает несоответствие доз и режимов терапии, применяемых у животных и человека. При моделировании и лечении каждой конкретной патологии разработчики препаратов стремятся найти эффект и тем самым подбирают все возможные варианты проводимой терапии, игнорируя зачастую примеры клинических случаев и размеры терапевтического окна этого заболевания у человека. Экспериментальная доза также может подбираться исследователем в очень широком диапазоне, который будет расширяться, пока не подберется эффективная. В результате экспериментальное соединение в подобранной эффективной дозе может хорошо переноситься и работать на здоровых крысах или добровольцах I и II фазы клинических испытаний, но давать нежелательные эффекты в III фазе [Grotta J., 2002]. Многие исследования на животных используют профилактический режим введения и получают хорошие результаты, в то время, как клинические исследования практически всегда вводят лекарства терапевтически, что и является причиной неэффективности соединения. Этот пример является, достаточно распространённым в контексте несоответствий условий исследований [Hooijmans C. R., 2012].

Таким образом, исследования на животных с каждым годом становятся дороже, в то время как только 30% из них можно назвать фундаментальными (в будущем эта цифра будет существенно ниже, поскольку для открытия фундаментальных знаний все чаще используются более тонкие технологии, связанные с использованием мишеней, изолированными клетками, тканями, органами, геномными линиями, молекулярным моделированием и пр.), остальные 70% приходятся на прикладные, большая часть которых связана с созданием или апробацией активных химических соединений, лекарств. В

настоящее время существующие протоколы доклинических исследований должны быть пересмотрены, поскольку статистика их полезности для человека выявляет их фактическую бесполезность. Один из способов повышения качества доклинических исследований, с точки зрения адекватности переноса их результатов в клиническую практику, мы видим в использовании в значительной степени соответствующей (адекватной) патологии человека животных с экспериментальными моделями патологии. Имеется ввиду, что большинство исследований проводится на молодых (значительно реже старых) интактных животных, тем самым нивелируется влияние сопутствующей моделируемой патологии. Таким образом, изменяется базовый принцип исследования, а именно, соответствие моделируемой патологии клиническому случаю.

Известно, что важнейшими факторами, приводящими или осложняющими НМК, являются стресс, сахарный диабет и недостаточность половых гормонов, вызывающие эндотелиальную дисфункцию и сопутствующие ей процессы. Все перечисленные факторы чрезвычайно значимы не только с точки зрения адекватности моделируемой патологии (без их учета просто невозможно говорить о ней), но они могут существенным образом менять фармакокинетику, фармакодинамику и параметры токсичности исследуемого соединения, установленные на здоровых животных и добровольцах в I фазе клинических испытаний. Влияние процессов, о которых идет речь, очень трудно предсказать с точки зрения фармакологии, поскольку при таком подходе речь идет о персонализированной доклинической медицине. С другой стороны, моделирование патологии на животных с преморбидным фоном неизбежно будет сопряжено с увеличением числа животных, включенных в исследование, его значительным удорожанием и удлинением по времени. Тем не менее, такой подход обеспечит большее сходство экспериментальных условий с клиническими, что позволит не только повысить вероятность предсказания эффективности соединения в клинике, но и более адекватно

планировать клинические испытания [Kimmelman J., 2012, 2015]. Исследования на животных с сочетанной патологией полезны и для препаратов, уже внедренных в клиническую практику. Они позволяют установить или уточнить механизмы и некоторые фармакологические эффекты, особенности действия, которые могут проявиться только при сочетанной патологии [London A. J., 2015].

Все выше перечисленные факторы и причины безусловно значимы для создания более эффективных систем проведения доклинических исследований, но основная масса критиков экспериментов на животных, аргументирует неудачи доклинических исследований невозможностью воссоздания в них тех нарушений, которые наблюдаются у человека. Наиболее распространенными животными для моделирования нарушений мозгового кровообращения являются грызуны, главным образом крысы, мыши и песчанки, меньше (по этическим и материальным причинам) используются кошки, собаки, свиньи и приматы. Подробные протоколы исследований и моделей, а также отзывы о преимуществах и недостатках их использования описаны достаточно подробно во многих исследованиях [Carmichael S. T., 2005; Dirnagl U., 2009; England T. J., 2009; Braeuninger S., 2012; Sozmen E. G., 2012]. Многие авторы сходятся во мнении, что максимально близко клиническому варианту отвечают модели фокальных поражений мозговой ткани, как постоянные, так и временные. Как правило, окклюзия сосуда достигается за счет использования мелких внутрипросветных нитей, сгустка крови или про-тромботического препарата [Carmichael S. T., 2005; Dirnagl U., 2009; Sozmen E. G., 2012]. Транзиторная окклюзия сосуда учитывает эффекты спонтанной реперфузии, или соответствует ситуации успешного тромболизиса. Предрасположенные к инсульту спонтанно гипертензивные крысы практически полностью отражают патофизиологическое возникновение и течение инсульта и в настоящее время служат единственным примером его неинвазивной модели [Yamori Y., 1976; Howells D. W., 2010; Bailey E. L., 2011]. На сегодняшний

момент нет идеальных инвазивных моделей инсульта, но это не означает, что их нельзя использовать или модифицировать постепенно приближая к клиническим вариантам у человека. Основными направлениями, на которые следует обратить внимание исследователей при моделировании НМК, признаны гетерогенность данной патологии и наличие сопутствующих заболеваний.

Гетерогенность инсульта отражает широкое разнообразие различных методов его моделирования, которые были созданы [Howells D. W., 2010]. Большинство животных, включая грызунов и крупных животных, демонстрируют столь же высокую степень неоднородности в мозговой сосудистой сети (строение виллизиева круга, средней мозговой артерии, коллатералей, образованных от слияния трех пар: задних, средних и передних мозговых артерий и т.д.) как и у человека [Ashwini C. A., 2008; Howells D. W., 2010]. Даже инбредные штаммы грызунов, таких как мыши C57BL/6 штамм [Beckmann N., 2000; McColl B. W., 2004] и разные штаммы крыс или песчанок [Howells D. W., 2010], характеризуются большой степенью изменчивости анатомии их церебрального сосудистого русла, влияя на их предрасположенность и чувствительность к инсульту, на тяжесть, прогноз исхода и действие фармакологических веществ [Barone F. C., 1993]. Таким образом, как бы ни старались исследователи работать с однородными животными все варианты архитектоники сосудов головного мозга как животных, так и человека учесть нельзя, что рассматривается как положительное качество, повышающее валидность [Howells D. W., 2010].

Не смотря на то, что в настоящее время наблюдается «омоложение» инсульта, все же большинство пациентов с НМК это лица пожилого возраста с отягощенным преморбидным фоном [Howells D. W., 2010]. С возрастом увеличивается число заболеваний, особенно хронических, уменьшаются возможности адаптации к экзогенным и эндогенным воздействиям [Путилина М.В., 2011]. К тому же в старшей возрастной группе пациентов невозможно выделить один фактор риска, чаще встречаются комбинации

двух, а иногда и трех факторов. Клинико-эпидемиологические исследования показывают, что у лиц старшей возрастной группы на 1 пациента приходится в среднем от 2 до 4 заболеваний, каждое из которых может явиться самостоятельной причиной НМК или же быть коморбидным. Это связано, возможно, с тем, что при старении огромное значение имеет нарушение процессов нейрогуморальной регуляции, в частности старение сосудов и адаптационных возможностей сосудистого русла. Выраженное поражение миокарда и сосудов, вызывая ухудшение МК, что в итоге приводит к вторичным гипоксическим поражениям мозга с развитием диапедезных геморрагий, очагов некроза с формированием кист, лакун, более многочисленных в области базальных ганглиев. Развиваются изменения в системе мелких сосудов – микроангиопатии, которые носят функциональный и структурный характер [Румянцева С. А., 2011]. К особенностям структурных изменений относят утолщение базальной мембраны капилляров, а к функциональными нарушениями – развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД), повышение проницаемости сосудистой стенки, гемодинамические нарушения, изменение вязкости крови, нарушение функции тромбоцитов. Также у пожилых больных с инсультом происходит накопление коллагена типа IV, снижение сульфат протеогликана, хондроитин и дерматан сульфата, а также таких гликопротеинов, как ламинин, фибронектин и энактин [Путилина М.В., 2011]. Нарушения метаболических процессов в сосудистой стенке и нейронах лежат в основе развития структурных изменений в ткани мозга атеросклеротического, либо нейродегенеративного характера, которые определяют возникновение того или иного заболевания фоном для других. Однако, чаще всего в доклинических исследованиях препаратов для лечения НМК используются животные молодого возраста, функциональное состояние сердечно-сосудистой системы которых значительно отличается от старых и взрослых животных. Поэтому целесообразно проводить углубленные исследования фармакологической активности веществ-кандидатов на животных обоего

пола, разного возраста с сопутствующими заболеваниями, такими как сахарный диабет, гиперлипидемия, артериальная гипертензия, ожирение и др. Многие из этих моделей вполне доступны [Howells D. W., 2010]. Еще больше исследований не учитывает такие патологические состояния как постинсультный стресс, тревожно-депрессивный синдром и иммуносупрессия [Walker F. R., 2014]. Таким образом, доклинические исследования лекарственных средств должны отражать максимальное количество аспектов заболевания у человека. Также результат терапии необходимо оценивать не только в первые часы или сутки после инсульта, а и отсрочено – через 1 месяц, 2 и 3 [Lees K. R., 2012; Schellinger P. D., 2012], при этом тесты должны включать обязательную оценку когнитивных и моторных функций животных [DeVries A. C., 2001; Gladstone D. J., 2002; Hetze S., 2012]. Все эти мероприятия позволят сделать доклинические исследования более информативными, точными, воспроизводимыми и отражающими реальные клинические случаи, что в конечном итоге может привести к снижению числа неудачных клинических испытаний лекарств кандидатов.

1.3. Связь нарушений мозгового кровообращения с ЭД

Гетерогенность инсульта по мнению ряда авторов является одной из основных причин неудачных клинических исследований соединений, показавших высокую эффективность на доклиническом этапе. При этом гетерогенность цереброваскулярной патологии возникает по двум взаимосвязанным, но разным причинам. Первая, это индивидуальные особенности организма (пол, вес, возраст, психическое состояние, сопутствующие заболевания, вредные привычки и т.д.) до наступления сосудистой катастрофы, а вторая – это индивидуальное течение самой болезни (локализация и размер инфаркта, возникающая на его фоне сопутствующая патология: черепно-мозговая травма, нарушения дыхания, гипотермия, аритмия, депрессия и т.д.). Исследования на животных, как уже

было отмечено ранее, зачастую не берут во внимание первую группу факторов, хотя их влияние на тяжесть, течение и прогноз инсульта, а также на эффективность и безопасность лекарственной терапии трудно переоценить. К тому же, распространенность сосудистой коморбидности у больных ССЗ высокая, что значительно увеличивает риск развития сердечно-сосудистых катастроф. В то же время имеются общие причины сосудистой коморбидности, воздействием на которые можно положительно повлиять на ситуацию в целом [Оганов Р. Г., 2015]. Таким образом, пре- и коморбидные состояния оказывают значительное влияние на развитие, течение и исход НМК.

В настоящее время выделяют ряд факторов риска (как немодифицируемых, так и модифицируемых) развития инсульта, связующим звеном которых является развитие эндотелиальной дисфункции. К ним можно отнести сахарный диабет, артериальную гипертензию, пожилой возраст, недостаточность половых гормонов, факторы образа жизни (избыточный вес, стрессогенное воздействие).

Сахарный диабет является одним из основных заболеваний, на лечение которого брошены усилия специалистов всего мира и он признан неинфекционной эпидемией 20-го века. Помимо этого, данное заболевание является одной из основных причин развития тяжелой сердечно-сосудистой и неврологической патологии, такой как нейродегенеративные заболевания, атеросклероз, инсульт, инфаркт, нейропатии, артериальная гипертензия. Даже если СД2 не осложняется сосудистой катастрофой, его наличие значительно усложняет течение и лечение заболевания (начальные формы ИБС, АГ, стресс, небольшие когнитивные нарушения и т.д.), которые обычно не вызывают опасений у людей без диабета. У лиц с СД2, риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний выше на 75% [Dandona P., 2008]. Пациенты с СД 2 типа страдают повышенным риском инфаркта миокарда и инсульта, риск развития этих заболеваний у них сопоставим с таковым у лиц, уже перенесших инсульт или инфаркт т.е. их профилактическое лечение

должно проводиться по правилам, применяемым для профилактики повторных эпизодов этих патологий. [Haffner S.M, 1998]. В дополнение к этому, пациенты с сахарным диабетом часто имеют избыточный вес, метаболический синдром и как правило различные стадии атеросклероза [Association A.D., 2003]. Микрососудистые осложнения СД2 вызваны длительным воздействием гипергликемии и глюкозотоксичности, развитием оксидативного стресса и дисфункции эндотелия, что было доказано во многих экспериментальных и клинических исследованиях СД1 (DCCT / EDIC) и для СД2 (UKPDS, ACCORD, ADVANCE, VADT). Усугубляет проблему и то, что компенсация углеводного обмена не снижает риск развития осложнений [Holman R.R., 2014]. Это связано с тем, что снижение уровня глюкозы не приводит к устранению эндотелиальной дисфункции, а высокий микро- и макрососудистый риск связаны именно с ней.

Все вышесказанное усугубляется избыточной продукцией оксида азота индуцибельной формой синтазы оксида азота, которая больше всего активируется при СД (больше чем при АГ, ИБС, старении, недостаточности половых гормонов и других причин ЭД) [Takumida M., 1998; Imrie H., 2010]. Количество оксида азота, продуцируемое индуцибельной синтазой, в сотни и тысячи раз больше, чем эндотелиальной. Его избыточное содержание в крови приводит к образованию перокснитрита, который оказывает мощное разрушающее действие на контактирующие с ним клеточные структуры и еще больше усиливает повреждение эндотелиального слоя [Kuzkaya N., 2003; Rask-Madsen C., 2007]. Биодоступность оксида азота у больных сахарным диабетом снижена, в результате чего намного сложнее (по сравнению с другими причинами ЭД – АГ, недостаточность половых гормонов, стресс, старение и д.р.) восстанавливается нормальная вазодилатирующая способность сосудистого русла [McVeigh G.E., 1992; Makimattila S., 1999; McNeill E., 2012]. Эндотелиальная дисфункция при СД 2 типа также обуславливает нарушения в системе гемостаза, а именно повышение его прокоагуляционного потенциала, возрастает содержание плазминогена,

антитромбина III, которые ингибируют фибринолиз, а также тканевого активатора плазминогена, фактора коагуляции VII- VIII и Виллебранда [Meigs J.B., 2000].

Несмотря на обширные общемировые исследования, направленные на понимание патогенеза и разработку эффективных мер по борьбе с цереброваскулярными болезнями на фоне гипергликемии, не создано ни одного препарата или терапевтической стратегии, которая бы доказано снижала риск развития и /или тяжесть нарушений мозгового кровообращения при СД2 [Ergul A., 2009]. Тяжелейшее течение и последствия, а также трудность восстановления после сосудистой катастрофы являются следствием истощения адаптивных возможностей организма, эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса, наличием сопутствующих нейро-, нефро-, кардио-, психопатий. Необходимо отметить, что при СД, наряду с повреждением эндотелия, резко снижается его обновляемость, что было обнаружено по резкому уменьшению числа клеток предшественников эндотелиоцитов [Руда М.М., 2010]. Таким образом, все выше отмеченное свидетельствует о том, что коррекция эндотелиальной дисфункции должна проводиться сразу после постановки диагноза СД2. Это в совокупности с эффективной гипогликемической стратегией, возможно, позволит снизить риск и облегчить течение и последствия нарушений мозгового кровообращения. Устранение или коррекция эндотелиальной дисфункции также позволит повысить возможности медикаментозной терапии как СД, так и его последствий. Несмотря на понимание описанных выше фактов, на сегодняшний момент мировая фармацевтическая промышленность и врачебное сообщество не может представить препарат или стратегию эффективной терапии ЭД на фоне СД2. Препараты, которые предлагаются для лечения заболеваний сосудов, практически никогда не тестируются на животных с коротким, тем более с длительным (2-4 месяца) СД, а гипогликемические средства редко тестируются в качестве эндотелио- и церебропротекторов на фоне данного заболевания.

Myers R. E., Yamaguchi S (1977) были первыми, кто сообщил о том, что острая гипергликемия дополняет нейроповреждения в результате глобальной ишемии головного мозга у обезьян, вызванной остановкой сердца. В дальнейшем негативное влияние гипергликемии было продемонстрировано на моделях черепно-мозговой травмы [Agardh C. D., 1981; Warner D. S., 1995]. Natale J. A. и др. (1990) продемонстрировали, что гипергликемия $18 \pm 0,9$ ммоль/л приводит к увеличению лактата и лактатацидоза при глобальной ишемии, моделируемой у собак. Sieber F.E. и соавт. [Sieber F.E., 1994] отмечали, что увеличение кислотности в гомогенатах головного мозга, вызванное ишемией больше при острой гипергликемии, а при хронической меньше. При моделировании ишемии, большинство исследователей указывают, что гипергликемия увеличивает ишемические повреждения. Courten-Myers G. и др. [de Courten-Myers G., 1988;] сообщили об увеличении размера инфаркта мозга как при длительной, так и при острой гипергликемии. В более поздних исследованиях эти же авторы показали, что острая гипергликемия повышает вариативность повреждения [de Courten-Myers G., 1992]. По сравнению с нормогликемией, у кошек с гипергликемией наблюдалось трехкратное увеличение объема инфаркта. Anderson R. E. [Anderson R. E., 1999] показали, что гипергликемия, как острая, так и хроническая снижает устойчивость животных к гипоксии, а гипогликемия 2,8 ммоль/л увеличивает. Существуют и другие исследования [Nedergaard M., 1987], в которых сообщается, что гипогликемия снижает объем некроза при окклюзии средней мозговой артерии. Однако в другом исследовании было показано, что гипергликемия приводила к снижению размера некроза и отека мозговой ткани после фокальной ишемии, размер инфаркта в результате моделирования на фоне острой гипергликемии был также ниже, чем в группе с нормальным уровнем глюкозы крови [Ginsberg M. D., 1987]. Подобные результаты были получены на кроликах и кошках [Zasslow M. A., 1989].

Результаты обратимых очаговых моделей ишемии при различных уровнях гликемии также неоднозначны. Большинство исследований

сообщает, что на фоне гипергликемии наблюдается увеличение повреждения [de Courten-Myers G., 1992; Gisselsson D., 1999; Liu L., 2007], почти в 7 раз повышается смертность животных после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии [de Courten-Myers G., 1992]. Также Ennis S. R. (2007) было отмечено, что на фоне гипергликемии наблюдается значительное нарушение целостности гематоэнцефалического барьера, что чрезвычайно важно для анализа течения и последствия ишемических поражений головного мозга. Эти данные подтвердились в исследованиях Kamada H. и соавт. [Kamada H., 2007]. Однако в ряде других работ сообщалось, что уровень глюкозы крови не влиял на размер инфаркта у спонтанно гипертензивных животных [Slivka A. P., 1991].

Диабет способствует пролиферации гладкомышечных клеток сосудов [Srivastava A. K., 2002; Sima A. A. F., 2004], дегенерации эндотелиальных клеток и перицитов, утолщению базальной мембраны капилляра [Jakobsen J., 1987], а также увеличению агрегации и адгезии тромбоцитов к эндотелию [Dunbar J. C., 1990; Stratmann B., 2005].

Kikano G. E. и др. (1989) показали, что острая гипергликемия не имеет никакого влияния на анатомическую плотность капилляров в мозге. Более раннее исследование показало, что острая гипергликемия не изменяет общий диаметр сосудов, но вызывает значительный отек эндотелиальных клеток, ослабляя тем самым мозговую перфузию [Paljärvi L., 1983]. Постепенное повреждение эндотелиальных и гладкомышечных клеток в коре головного мозга начинается на самых ранних этапах диабета [Moore S. A., 1985]. После первого месяца экспериментального сахарного диабета, пиальные сосуды животных были расширены и извилисты, увеличилось артериовенозное шунтирование [McCuskey P. A., 1984; Johansen J. S., 2005]. После 5 месяцев диабета появились очаговые изменения в толщине базальной мембраны сосудов и параллельно этому наблюдалось повреждение нейрональной ткани. Дальнейшие наблюдения показывали постепенное усугубление морфологических изменений в цереброваскулярной системе. При сахарном

диабете морфологическим изменениям предшествуют, а впоследствии ими усугубляются, функциональные. Повышается сосудистый тонус за счет увеличения миогенного фактора и их жесткость, снижается вазодилатирующий ответ на эндокринные и биохимические регуляторы [Noyman I., 2002; Didion S. P., 2007; Oizumi X., 2006], уменьшается эндотелийзависимая вазодилатация и повышается чувствительность эндотелия к сосудосуживающим агентам [Jaraјaru Y. P., 2008].

Таким образом, острая и хроническая гиперликемия может приводить к морфологическим нарушениям в сосудах головного мозга, что влияет на тонус сосудов, течение цереброваскулярной патологии и возможности фармакотерапии.

Другим фактором риска развития инсульта является НППГ. В настоящее время установлено, что эстрогены оказывают благоприятное воздействие на сердечно-сосудистую систему. Полагают, что замедление развития и прогрессирования ЭД опосредовано через эстрогеновые рецепторы эндотелиоцитов, которые за счет фосфорилирования через протеинкиназные каскады активируют eNOS, [Figtree G. A., 2010; Palmieri D., 2014]. В результате чего увеличивается высвобождение NO, снижается секреция эндотелина-1 [Карева Е.Н., 2010], ослабевает действие тромбоксана и катехоламинов. Подавляют экспрессию ангиотензиновых рецепторов 1 типа и увеличивают биодоступность NO, образующегося в эндотелии эстрогены [Тюренков И.Н., 2009]. Эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) у женщин зависит от фазы менструального цикла, так например она максимальна во время фолликулярной и лютеиновой фаз, когда уровень эстрадиола в сыворотке крови наиболее высок, а во время менструации функция эндотелия у женщин не отличается от функции эндотелия у здоровых мужчин [Hashimoto M., 1995; Улубиева Е. А., 2015]. Впервые резкое прогрессирование ЭД при наступлении менопаузы было отмечено D.S. Celermajer (1994). У здоровых людей, образующееся количество эстрогенов и прогестерона в организме, способствует сохранению

равновесия вазорегулирующих факторов с преобладанием сосудорасширяющих, антитромботических, противовоспалительных и антипролиферативных. Дефицит указанных гормонов может приводить к развитию ЭД и ассоциированных с ней сердечно-сосудистых заболеваний. Так в 1976 г. в Framingham Heart Study было установлено, что у женщин в постменопаузе в 2,6 раза увеличивается частота развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с женщинами того же возраста в пременопаузе [Gordon T., 1978]. Было также отмечено, что риск возникновения инфаркта миокарда повышается в два раза, если менопауза наступает в возрасте до 35 лет, и в семь раз, после тотальной овариоэктомии [Нейфельд И. В., 2012]. К тому же, развитие метаболических нарушений, ожирения, атеросклероза также связано со снижением продукции половых гормонов. Немаловажная роль в развитии ЭД при НППГ отводится оксидативному стрессу. Отмечено, что у женщин в период постменопаузы отмечается ЭД более выраженная, чем у мужчин сходного возраста [Celermajer D.S., 1994; Майчук У.Ю., 2003; Тюренков И.Н., 2006]. Дополнительным плеiotропным эффектом женских половых гормонов является их опосредованное влияние на липидный профиль, обмен глюкозы и инсулина, систему гемостаза.

НППГ напрямую связана с возрастными изменениями. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что при старении развивается ДЭ, сопровождающаяся сокращением синтеза эндотелием факторов вазодилатации и усилением продукции вазоконстрикторных субстанций. Одновременно обнаружено развитие структурных изменений эндотелия: появление в сосудах участков, лишенных эндотелиальной выстилки [Остроумова О. Д., Дубинская Р. Э., 2004].

К модифицируемым факторам риска НМК относят стресс. При воздействии которого происходит активация гипоталамо-гипофиз-надпочечникового нейросеркторного аппарата. Увеличение продукции и высвобождения из надпочечников глюкокортикоидов, минералкортикоидов и

катехоламинов, которые вызывают ряд эффектов в органах мишенях, происходит на фоне повышения продукции АКТГ. К общим эффектам катехоламинов и глюкокортикоидов относят: повышение внутриклеточного содержания ионов кальция, мобилизация энергетических и структурных ресурсов, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, увеличение реабсорбции катионов натрия, экскреция катионов калия. Изменения активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и электролитного баланса сопровождаются гемодинамической перестройкой, изменениями реологических параметров крови и функционального состояния сосудов. Адренергическая стимуляция приводит к увеличению объема циркулирующей крови, общего периферического сопротивления сосудов, артериального давления [Walton K. G., 2002]. На сегодняшний день установлено, что выраженность эндотелий-зависимых гемодинамических изменений у здоровых добровольцев в ответ на стрессорное воздействие (стимуляция электричеством, помещение ступни в холодную воду, вынужденная сосредоточенность, рассказ о собственном негативном опыте) различны, что связано неодинаковой реактивностью эндотелия сосудов. Так, общее периферическое сопротивление сосудов в группе людей с низкими значениями реактивной эндотелийзависимой артериальной дилатации в 2 раза выше, чем значения аналогичного показателя в группе людей с высокими значениями эндотелийзависимой артериальной дилатации [Sherwood A., 1999]. Изменения гемодинамики при стрессе обусловлены не только изменениями просвета сосудов, но и повышением концентрации компонентов свертывающей системы крови: у пациентов, перенесших острый стресс, концентрация норадреналина прямо коррелирует с содержанием D-димеров и фибриногена [Wirtz P., 2009]. Повышение содержания антигенов ФВ и D-димеров в крови связано со стимуляцией β -адренорецепторов: концентрация прокоагулянтов повышается в ответ на введение агонистов β -адренорецепторов и снижается до нормальных значений при приеме β -блокаторов [R. von Kanel, 2002].

К изменению значений реологических параметров крови (вязкости, скорости кровотока, напряжения сдвига и др.) приводит повышение ее прокоагулянтной активности. Напряжение сдвига (shear stress) является одним из реологических параметров, регулирующим состояние эндотелия сосудов. Повышение касательного напряжения выше 50 дин/см^2 увеличивает экспрессию NOS-1 и NOS-2 в клетках эндотелия, что сопровождается повышением продукции NO, который в избыточных количествах индуцирует оксидантный стресс и апоптоз эндотелиоцитов. Выраженность апоптотических изменений в условиях высокого касательного напряжения прямо коррелирует с локальной внутриклеточной концентрацией липопротеидов низкой плотности [Cancel L. M., 2010]. Снижение касательного напряжения до 10 дин/см^2 и менее сопровождается изменением проницаемости эндотелия для отдельных веществ: увеличивается потребление воды, альбуминов, липопротеидов низкой плотности, уменьшается количество митотически делящихся клеток эндотелия (прогениторные эндотелиальные клетки). При культивировании клеток эндотелия в условиях касательного напряжения от $0,2$ до $3,6 \text{ дин/см}^2$ количество митозов снижается более чем в 2 раза по сравнению с контрольными образцами [Warboys C., 2010]. Снижение касательного напряжения до $2,5 \text{ дин/см}^2$ вызывает изменения экспрессии генов: активируется синтез факторов гемостаза, интерлейкинов, молекул адгезии, снижается синтез антикоагулянтных факторов, блокируется продукция NO [Tarbell J. M., 2010]. При отклонениях от нормы (повышении или снижении) касательного напряжения увеличивается продукция ЦОГ-1 [Potter C., 2011]. Все описанные изменения несут в себе как адаптивные, так и повреждающие эффекты. Повреждающими эффектами являются: перегрузка клеток эндотелия ионами Ca^{2+} , повреждение клеточных мембран, истощение энергетических ресурсов, ишемическое повреждение тканей за счет вазоспазма, избыточная пролиферативная активность на фоне иммунодефицита [Пшенникова М. Г., 2009]. Одним из следствий описанных

выше повреждающих эффектов является развитие ЭД. Так, признаки ЭД можно наблюдать у здоровых людей после стандартного 24-часового дежурства: повышение систолического и диастолического артериального давления, снижение ЭЗВД [García-Fernández R., 2002]. Влияние хронического стрессорного воздействия на развитие сосудистой патологии еще более выражено: даже у подростков, регулярно испытывающих стресс, выявляются субклинические проявления кардиоваскулярных заболеваний, сопровождающиеся качественными изменениями реактивности сосудов [Low C. A., 2009].

В настоящее время очевиден тот факт, что исследования эффективности и безопасности лекарств на доклиническом этапе разработки необходимо проводить на животных, у которых моделируемая патология будет не только максимально похожа на ее клиническую форму, но и будет сочетанной. Именно это может существенно повысить информативность экспериментальных исследований (поскольку полученные в них данные можно очень ограниченно перенести на человека) и сделать доклиническую разработку лекарств более эффективной. Подобные вопросы (причина неэффективности лекарственной терапии при переходе с доклинических исследований к клиническим) могут рассматриваться независимо от конкретной патологии, но в терапии сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний ввиду их высокой распространенности и коморбидности пример эндотелиальной дисфункции наиболее показателен. Систематические ошибки [Ioannidis J. P. A., 2005; Sena E. S., 2010; Prinz F., 2011]; пренебрежение принципами клинических исследований при проведении доклинических [Harding E. J., 2004; Würbel H., 2007; Macleod M. R., 2008; Kilkenny C., 2009; Klehmet J., 2009; Muhlhausler B. S., 2013; Hanell A., 2014]; методологические и интерпретационные проблемы при использовании генно-модифицированных животных [Wolfer D. P., 2002; Crusio W. E., 2004, 2009]; пренебрежения влиянием фенотипической пластичности и факторами внешней среды на результаты эксперимента [Chesler E. J., 2002; Festing M.

F.2014]; плохой статистический анализ результатов [Würbel H., 2007, 2013; Nieuwenhuis S., 2011; Prinz F., 2011; Festing M. F., 2014] – вот далеко не все возможные причины неэффективности активных веществ на доклиническом этапе в ходе клинических исследований [Geerts 2009; Zahs K. R., 2010; Begley C. G., 2012]. Таким образом, на основании изложенного можно заключить, что важнейшим направлением в разработке лекарственных средств для лечения нарушения мозгового кровообращения является пересмотр методологии доклинических исследований, базирующихся на использовании животных без пре- и коморбидных состояний. При этом моделирование ЭД, как наиболее распространенного фактора риска развития НМК, является обязательным, а препараты и соединения, устраняющие эндотелиальную дисфункцию, могут оказаться эффективными в проводимой терапии ССЗ, в том числе и НМК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

Исследование проведено на 2586 крысах обоего пола (самцах и самках) трех возрастных групп (6-ти, 12-ти, 24-х месяцев), 360 мышам-самцам массой 18-22 г, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с Приказом Минздрава (Минздравсоцразвития) России о надлежащей лабораторной практике, ГОСТом Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики, Рекомендациям ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)». Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол №154-2012 от 6.04.2012г.

Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН (Ленинградская область), ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России) (г. Волгоград) и содержались с учетом правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Освещение вивария было естественным, температурный режим соответствовал +20-+24°C при влажности воздуха 45-65%. Еженедельно в помещении вивария проводилась 20 мин. санитарная обработка антисептиками и бактерицидная обработка стен, пола, клеток, стеллажей (без животных), передвижным двух ламповым «Бактерицидным облучателем» типа ОБНП.

Первоначально, после доставки из специализированного питомника животные в течение 2-х недель находились на карантинном режиме в отдельном боксе вивария кафедры фармакологии и биофармации ФУВ

ВолгГМУ. Содержание животных в боксе было стандартным, они были размещены в пластиковые клетки на подстиле из стружек мягких пород дерева от 6 до 12 особей в каждой, обеспечивался свободный доступ к воде и полнорационному гранулированному корму, предназначенному для лабораторных животных ГОСТ Р 50258-92 (Изготовитель ЗАО «Волосовский комбикормовый завод»). По истечении карантина животных перемещали в экспериментальный отсек, где проводился их осмотр и распределение по группам. При этом грызуны с нарушенным шерстяным покровом, поведением, с массой тела, отличающейся более, чем на 10% от средней в группе, выбраковывались.

2.2 Исследуемые соединения и препараты сравнения

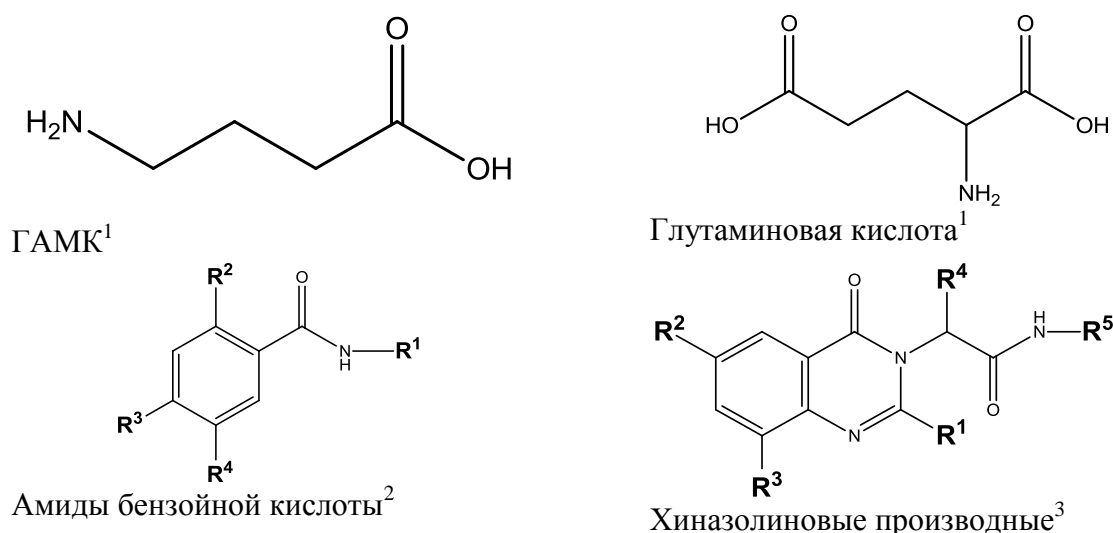


Рис. 1. Общие структуры исследуемых соединений

¹ Выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой органической химии РГПУ им.А.И.Герцена, д.х.н., проф. Берестовицкой В.М., к.х.н., доц. Васильевой О.С. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

² Выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой химии ВолгГМУ, д.х.н., проф. Брелю А.К., к.х.н., доц. Лисиной С.В. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

³ Выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, д.х.н., проф. Озерову А.А. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

В работе изучена церебропротекторная активность 4 химических рядов соединений: производные ГАМК и глутаминовой кислоты, хиназолиновые производные; амиды гидроксibenзонных кислот.

Исследуемые вещества на этапах скрининга были изучены в дозах, составляющих от 1/30 до 1/10 от M_r (молекулярной массы), растворялись в физиологическом растворе *ex tempore* и вводились внутривенно в объеме 0,1 мл раствора на 100 г веса крысы. Во всех экспериментальных сериях животные контрольных групп получали 0,9% раствор NaCl в объеме 0,1 мл на 100 г веса. Для веществ с высокой активностью первоначальные дозы были кратно увеличены/уменьшены в 2 и 4 раза.

В качестве препаратов сравнения на различных этапах исследования были использованы: фенибут 25 мг/кг (получен на кафедре органической химии РГПУ им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия), кавинтон 3,8 мг/кг (Gedeon Richter, Венгрия), цитиколин 500 мг/кг (Ferrer Internacional S.A., Испания), глиатилин 100 мг/кг (Italfarmaco, Италия), магния сульфат 300 мг/кг (Биохимик, Россия), церебролизин 2,5мл/кг (EVER Neuro Pharma GmbH, Австрия)

Режим и кратность введения веществ и препаратов сравнения зависели от целей и характера выполняемых исследований, подробно они будут описываться в соответствующих главах.

2.3 Дизайн исследования

Первичный скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности соединений был проведен на условно здоровых животных, у которых моделировали НМК путем одномоментной окклюзии общих сонных артерий (ОСА). О церебро- и эндотелиопротекторном действии веществ судили по их способности влиять на выживаемость животных, развитие неврологических нарушений, состояния мозгового кровообращения (МК) и вазодилатирующей функции эндотелия. Далее были выбраны наиболее активные соединения, изучена зависимость выраженности церебропротекторного действия от

используемой дозы, сопоставлена их активность с препаратами сравнения.

На следующем этапе исследования эффективность соединений лидеров изучалась на животных с фокальной ишемией головного мозга, имеющих одно из возможных экспериментально вызванных преморбидных состояний (недостаточность половых гормонов или сахарный диабет). Для этого за 7 (при СД) или 28 дней (при НПГ) до окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) моделировалась соответствующая патология. После ОСМА животным в течение 7 дней вводились исследуемые соединения и препараты сравнения, проводилась оценка их неврологического состояния (шкалы McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), 9-бальная шкала Combs и D'Alecy [Combs D.J., 1987] и шкала Garcia [Garcia J.H., 1995], тест Rota-rod, ОП, ТЭИ, УРПИ, тест лестница («Staircase test»), сужающаяся дорожка), на завершающем этапе оценивали состояние мозгового кровообращения (МК), вазодилатирующую функцию эндотелия, размеры зоны инфаркта мозга, производился забор крови для измерения биохимических показателей и гемостаза.

Далее наиболее активные соединения были изучены в условиях хронического НМК. Критерии эффективности были такими же, как и при острых НМК. Дополнительно для анализа когнитивных нарушений и глубины дефицита использовался радиальный 8-лучевой тест, для оценки уровня тревожности животных – ПКЛ.

На следующем этапе исследования НМК моделировалось у старых животных. Выраженность эндотелиопротекторного действия наиболее активных веществ также оценивалось при стрессором воздействие на животных двух возрастных групп (12 и 24-х месяцев).

Далее было изучено влияние состояния иммунной системы на эффективность церебропротекции изучаемыми соединениями при НМК (подробная схема эксперимента будет представлена ниже).

На завершающем этапе исследований изучены различные механизмы действия соединений лидеров (влияние на антитромботическую,

противовоспалительную функции эндотелия, состояние процессов ПОЛ и антиоксидантной системы).

2.4 Методы экспериментального моделирования церебральной ишемии

Метод моделирования ишемии головного мозга, вызываемой необратимой одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий у крыс.

Необратимая одномоментная двусторонняя окклюзия ОСА у крыс выполнялась следующим образом: операционное поле обрабатывалось раствором антисептика, после чего по средней линии шеи проводили небольшой разрез мягких тканей, открывая доступ к сосудам. Далее тупым способом выделялись левая и правая ОСА, которые затем лигировались и перевязывались (у группы ложнооперированных животных обе ОСА также выделялись, но перевязка не выполнялась). Рана послойно ушивалась, операционное поле повторно обрабатывалось раствором антисептика. После операции животных помещали в индивидуальные клетки под согревающую лампу до момента выхода из наркоза. В первые 6 часов постоперационного периода за крысами вели непрерывное визуальное наблюдение с целью фиксации случаев ранней гибели. Далее проводилась регистрация выживаемости животных на 12, 24, 48 и 72 час после операции. Поскольку старые животные хуже переносили оперативное вмешательство (наблюдался высокий процент летальных исходов), у крыс данной возрастной категории была выполнена полная перевязка одной сонной артерии и частичная (с сохранением кровотока до 50% от исходных значений) второй.

Метод моделирования ишемии головного мозга, вызываемой необратимой поэтапной билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

Поскольку одномоментная двусторонняя перевязка ОСА у крыс приводит в среднем к гибели 50-70% экспериментальных животных в течение первых 2-3 суток наблюдения, это затрудняет изучение динамики восстановительного периода и оценку эффективности терапии [Макарова Л.М., 2006; Горбачева С.В., 2007]. Поэтому для моделирования НМК при

различных состояниях иммунной системы была выбрана модель поэтапной перевязки ОСА с интервалом в 3-е суток между окклюзией левой и правой сонной артерии, что позволило снизить уровень летальности оперированных животных и оценить динамику восстановительного периода [Фатеев И.В., 2011]. После каждой перевязки ОСА участок мягких тканей обрабатывали раствором антисептика (хлоргексидином), далее рану послойно ушивали и операционное поле обрабатывали 70% спиртом. В зависимости от продолжительности терапии смоделированной патологии исследуемые вещества вводили внутривентриально через 3, 12, 48, 72 часа (3-ий день) – при лечении в течение 3-х дней или продолжали применение на 4, 5, 6, 7 дни после ишемии головного мозга

Метод моделирования хронического НМК у крыс, вызванного 28-ми дневным гравитационными перегрузками в каудоокраниальном векторе.

Моделирование хронического НМК у экспериментальных животных осуществлялось путем создания перегрузок в каудо-краниальном векторе с использованием специальной центрифуги, которая была разработана и изготовлена ООО «Сталинград» (Ремонтное представительство компании Bosh, Волгоград)². Воздействие гравитационных перегрузок осуществлялось в течение 28 дней с величиной перегрузки 5g.

Метод моделирования фокальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией средней мозговой артерии.

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у крыс производили необратимой окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию на глубину перекрывающую устье отхождения средней мозговой артерии [Iaci J.F., 2010]. В качестве анестезии использовался хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг.

² *Выражаем искреннюю признательность Д.А. Акулову (директору ООО «Сталинград»-BOSCH-сервис) за изготовление установки для моделирования гравитационных перегрузок*

2.5 Метод моделирования дефицита половых гормонов.

Недостаточность половых гормонов (НПГ), как экспериментальная модель ЭД, вызывалась путем экстирпации матки с придатками у самок крыс, массой 180-210 гр., в возрасте 4-6 месяцев [Робертус А.И, 2010; Воронков А.В., 2011]. Всем животным после операции был проведен курс антибиотикотерапии (цефазолин 10 мг/кг внутримышечно) в течение 10 дней. Группам интактных животных вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Контроль эффективности кастрации выполнялся методом определения стадии полового цикла у самок при цитологическом исследовании согласно описания Я. Д. Киршенבלата [Киршенблат Я.Д., 1973].

У самок на протяжении эстрального цикла наблюдается варьирование активности различных звеньев регуляции кровообращения. Наиболее стабильны фазы диэструса и эструса, хотя и представляют собой противоположные звенья адаптивности: диэструс – уровень эффективной адаптации и синхронизации всех ступеней регуляции кровообращения, эструс – состояние напряжения регуляторных систем [Hashimoto M., 2005]. Поэтому у групп ложнооперированных и интактных самок доплерографическое исследование выполнялось только в фазу диэструса, когда колебания гормонального фона минимальны.

2.6 Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2.

Негенетическую модель сахарного диабета 2 типа моделировали на животных после ночного голодания (с 8.00 до 10.00) путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг / кг (СТЗ) на фоне предварительного (за 15 минут до введения СТЗ) введения никотинамида в дозе 230 мг/кг. Стрептозотоцин растворяли в натрий-цитратном буфере (рН 4,5), а никотинамид – в физиологическом растворе [Спасов А.А., 2011]. Гипергликемия подтверждалась путем измерения уровня глюкозы через 72 ч

после введения токсина. Животные, имеющие концентрацию глюкозы в крови более 8 ммоль/л, отбирались для исследования.

2.7 Метод хронического стрессирования животных.

Для изучения влияния исследуемых соединений на нервную и иммунную системы в условиях хронического стресса животных подвергали воздействию нескольких стрессирующих факторов: иммобилизации, резкого громкого звука, пульсирующего света и покачивания, порядок воздействия которых выбирался случайным образом [Тюренков И.Н., 2013]. Стрессирование проводили в течение 6-ти дней (ежедневно по 30 мин). Исследуемые вещества вводили внутривенно за 1 час до стресса на протяжении 6 дней (схема 1).

День эксперимента	Выполняемые манипуляции					
	ОП	УРПИ	Введение веществ	Стресс	АД	МК, забор крови
1		Обучение				
2		Воспроизведение 1				
3-8						
9		Воспроизведение 2				
10						

Схема 1. Дизайн исследования влияния соединений и препаратов сравнения на нервную и иммунную системы животных 12 и 24 мес. возраста при хроническом стрессировании.

2.8 Модели изменения иммунореактивности.

Для подавления иммунной системы (ИС) у животных вызывали введением селективного иммунодепрессанта – циклоспорина в дозе 5 мг/кг (торговое название «Экорал», IVAX Pharmaceuticals, Чешская Республика) [Homan W.P.; 1980, Zijlstra G.S., 2009], который обладает избирательным действием на Т-лимфоциты и реакции ими опосредованные (например, высвобождение ими цитокинов или продукцию антител зависимость от Т-хелперов), тормозит развитие реакций иммунитета клеточного типа и не обладает угнетающим эффектом на кроветворение и фагоцитарное звено

иммунитета. Циклоспорин вводили перорально ежедневно в первой половине дня на протяжении всего эксперимента. Ежедневная доза 5 мг/кг делилась на два приема (утро и вечер), поскольку вещество обладает коротким периодом полувыведения. В зависимости от кратности терапевтического введения исследуемых веществ циклоспорин применялся по схеме 2.

Для активации ИС животных применяли иммуномодулирующее средство «Пирогенал» (Медгамал, филиал ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия), представляющее собой липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi* и обладающее широким спектром действия, активирует гипоталамо-гипофизарно надпочечниковую гормональную ось, фагоцитарную систему, стимулирует выработку IL-1 и IL-2, обладает положительным влиянием на регенерацию тканей при повреждении и др. Пирогенал, в зависимости от применяемой дозы, оказывает иммуномодулирующий и пирогенный эффекты (0,1-5 мкг/кг), [Бардахчян Э.А., 1997; Гриневич В.В., 2003], поэтому нами была выбрана доза ЛПС 10 мкг/кг с частотой внутрибрюшинного введения через день в первой половине дня на протяжении всего эксперимента. В зависимости от кратности терапевтического введения исследуемых веществ ЛПС применялся по схеме 2.

Схема 2. Изучение нейропротекторного и иммунокорригирующего действия исследуемых веществ при НМК в условиях интактного и измененного состояния иммунной системы животных.

А. Применение исследуемых веществ в течение 3-х дней после моделирования ишемии головного мозга.

День эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Интактная ИС	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Подавленная ИС										
Стимулированная ИС	○		○		○		○		○	
Манипуляции		⊗				⊗	△	△	△	XXX

Б. Применение исследуемых веществ в течение 7-ми дней после моделирования ишемии головного мозга.

День эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Интактная ИС	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Подавленная ИС														
Стимулированная ИС	○		○		○		○		○		○		○	
Манипуляции		⊗				⊗	△	△	△	△	△	△	△	XXX

Обозначения:

— - Интактная иммунная система (ИС), никакие вещества для изменения состояния иммунитета не применялись

■ - Подавление иммунной системы (ИС) путем введения Циклоспорина в дозе 5 мг/кг

○ - Стимулирование иммунной системы (ИС) путем введения ЛПС в дозе 10 мкг/кг на

⊗ - Перевязка левой общей сонной артерии на 2 день эксперимента, затем правой – на 6 день

△ - Введение исследуемых веществ после моделирования ишемии головного мозга

■ - Тест ОП
■ - Тест Rota-rod

XXX- Регистрация интересующих параметров. Вывод животных из эксперимента

2.9 Метод оценки неврологического дефицита у животных.

Неврологический статус крыс после окклюзии общих сонных артерий оценивали по шкале stroke-index McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), по 9-балльной шкале Combs и D'Alecy [Combs D.J., 1987] и шкале Garcia [Garcia J.H., 1995]. По шкале McGraw оценивалось наличие у животных следующих симптомов: вялость, тремор, одно- и двусторонние полуптозы и птозы, манежные движения, парезы и параличи конечностей, коматозные состояния, летальные исходы. За каждый симптом присваивался балл (от 0.5 до 10), при наличии нескольких – баллы суммировались. Шкала оценки Combs и D'Alecy позволяет оценить экстрапирамидные нарушения и включает в себя проведение тестов, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие животных. При этом, чем меньше суммарный балл, тем более выраженные нарушения отмечались у животных. По шкале Garcia определяли выраженность следующих показателей: мышечный тонус, двигательную активность, основные физиологические рефлексы, координацию движения, чувствительность. По каждому тесту присваивали следующие баллы: 3 балла – норма, 2 балла – незначительное нарушение симметричности, 1–0 балла – выраженные нарушения или отсутствие движения.

Дополнительно для оценки координации движений и мышечного тонуса животных использовали тест «Rota-Rod» (установке производства ООО «Нейроботикс», Россия). Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

На модели ОСМА – оценка неврологического дефицита производилась по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia через 1, 3, 7 суток от момента нанесения повреждения, в «тесте-лестница» до моделирования и на 7 сутки после.

При перевязке общих сонных артерий оценка неврологического дефицита проводилась по шкалам McGraw через 6, 12, 24, 48 и 72 часа после операции.

2.10 Методы оценки поведенческого статуса, когнитивных и мнестических функций у животных.

Влияние исследуемых композиций на поведение, а также когнитивные и мнестические функции оценивали при проведении стандартных психофармакологических тестов: «Открытое поле-круг» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), «Тест экстраполяционного избегания» (ТЭИ). Формирование рефлекса в тесте УРПИ проводили за 24 часа до моделирования патологий.

Для исследования когнитивных функций была выбрана установка радиального (8-лучевого) лабиринта, позволяющая оценить состояние долговременной и рабочей памяти. Используемый в работе 8-лучевой лабиринт состоял из центральной площадки в форме правильного восьмиугольника диаметром 34 см, имеющей стенки из плексиглаза высотой 20 см. Через отверстия в стенке центральная площадка соединена с рукавами (шириной 10 см и длиной 86 см), расположенными перпендикулярно к каждой стороне восьмиугольника. Исследование в лабиринте выполнялось в несколько этапов. Первоначально крысы, которые были отобраны для исследования в 8-лучевом радиальном лабиринте, подвергались предварительному 2-х дневному голоданию. Далее следовал двухдневный период адаптации. В 1-й день (адаптации) в лабиринт одновременно помещали по 5 животных. На поверхности лабиринта были разбросаны семена подсолнечника в качестве пищевого подкрепления. Крысам разрешалось свободно обследовать лабиринт в течение 30 минут. Во 2-й день (адаптации) каждая крыса индивидуально обследовала лабиринт в течение 15 минут. Каждый раз животное помещалось в центр лабиринта головой ко входу в рукав №1, хвостом к рукаву №5. С 3-го дня начинался период

обучения, при этом семена подсолнечника помещались в рукава симметрично №2, №4, №6, №8. В каждом из указанных рукавов находилось по одному семени. Наблюдение за животным продолжалось до тех пор пока крыса не находила 4 семечки или до окончания времени опыта (10 мин.). При выполнении теста анализировались следующие показатели: 1) число ошибок рабочей памяти, т.е. посещение животным рукава в котором оно уже было; 2) число ошибок долговременной памяти, т.е. повторное посещение животным рукава без пищи; 3) число последовательно посещенных подкрепляемых рукавов; 4) число животных, достигнувших критерия обученности (животное считалось обученным, если оно в течение двух дней совершало не больше одной ошибки, посетив при этом все четыре подкрепленных рукава). Тестирование когнитивных функций в радиальном лабиринте продолжалось в течение 21 дня.

Тест «сужающаяся дорожка»

Установка для теста «сужающаяся дорожка» представляет собой приподнятую горизонтальную планку (дорожку) длиной 165 см, с темной камерой, закрепленной с одного конца. По обоим концам дорожки располагаются «стартовая» (15х6 см) и «разгрузочная» (15х1,5 см) площадки. Между ними находится равномерно сужающаяся, от 6 см в начале и 1,5 см в конце, часть дорожки длиной 135 см. На протяжении всей дорожки, по обеим ее сторонам и на 2 см ниже уровня ее плоскости имеются выступы по 2 см в ширину, которые позволяют животным ставить ослабшую переднюю или заднюю конечность, чтобы не упасть с дорожки. [Schallert T., 2002; Тюренков И.Н., 2014].

В начале тестирования животное всегда помещали в темный отсек на 1 мин. В первые два дня обучения, животное изначально помещалось от чёрного ящика на расстоянии 10-15 см. В процессе дальнейшего обучения это расстояние увеличивали до $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ длины доски. При воспроизведении животное запускали с широкой части доски, которая ещё делится на среднюю и узкую части. Учитывалось общее количество шагов,

совершённых животным. На каждом участке дорожки подсчитывали количество ошибок («соскальзываний»), совершенное контралатеральной и ипсилатеральной конечностью. Делили эти суммы ошибок на число шагов по одной части дорожки и получали долю ошибок на один шаг. Для определения доли асимметрии, долю ипсилатеральных ошибок вычитали из доли контралатеральных. Данный параметр получали для каждого животного, на каждом участке дорожки и использовали для оценки тяжести неврологических отклонений.

«Тест лестница» («Staircase test»).

Установка для проведения теста «лестница» представляет собой удлиненную камеру (285×90×60 мм) с приподнятой центральной плоской платформой внутри длиной 2/3 камеры и шириной 27 мм, образующей узкое пространство над платформой. По обеим сторонам от платформы в дальнем конце камеры находится съемная парная лестница с 7ю ступенями. Животное, заняв место на платформе, имеет возможность дотянуться и собрать зерна, помещенные на ступенях парной лестницы по обеим сторонам от платформы. Чтобы достать зерна, животному необходимо тянуться и собирать зерна только одной лапой с каждой стороны. Точность мелкой моторики позволяет интактному животному собрать практически все зерна от верхних (13 мм ниже платформы), до нижних (64 мм ниже платформы) ступеней. Ступени в тесте «лестница» представляют собой 7 уровней сложности этой задачи. Количественным показателем является число зерен собранных крысой каждой конечностью.

Обучение животных. За три дня до начала тестирования животные приучаются к установке и к выполнению задачи. Продолжительность ознакомления 15-30 минут в день. К четвертому дню крысы должны научиться успешно выполнять задачу и доставать с каждой стороны платформы минимум по 4 зерна, в противном случае животное исключается из эксперимента [Montoya, 1991; Тюренков И.Н., 2014].

Процедура тестирования. После успешного ознакомления животного с установкой начинается трехдневный этап тестирования. Животные помещаются в установку один раз в сутки на 15 минут, после чего подсчитывается число оставшихся зерен и вычисляется количество собранных. При тестировании на каждую лестницы помещаются по 2 зерна. Тестирование выполняется до и после моделирования фокальной ишемии головного мозга. Если количество собранных на одной стороне зерна, устойчиво превышает число собранных на другой, возможно выделение преимущественно используемой животным конечности для нанесения повреждения на контралатеральной стороне. Воспроизведение теста «лестница» проводился однократно через 7 суток после моделирования фокальной ишемии.

2.11 Методические подходы и способы регистрации уровня локального мозгового кровотока

Регистрации уровня локального мозгового кровотока методом ультразвуковой доплеровской флоуметрии.

Во всех экспериментальных сериях оценку уровня мозгового кровотока (МК) животных проводили с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», г. Санкт-Петербург), с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Датчик доплерографа фиксировался в стереотаксической установке, мозговой кровотоки животных регистрировался в проекции средней мозговой артерии. Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированным животным (хлоралгидрат 400 мг/кг) с использованием депиляционного крема удалялся шерстяной покров верхней поверхности черепа, которая в последствие скальпировалась. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка bregma, определялось место трепанационного отверстия. Трепанация производилась бором с конической

фрезой, до твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. В качестве контактной среды использовался гель для проведения УЗИ.

Метод оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга.

Для оценки вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов использовался методический подход, предложенный Тюренковым И.Н., Воронковым А.В. (2008), который заключался в изучении изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (NO). Используемые нами модуляторы системы NO вводились внутривенно, в следующей последовательности: ацетилхолин (0,01 мг/кг, Acros organics, США); нитро - L-аргинин (10 мг/кг, Acros organics, США). Для оценки эндотелийнезависимой (ЭНВД) вазодилатации вводили нитроглицерин (0,007мг/кг, МТХ, Москва). Каждое введение анализатора осуществлялось после возвращения МК до исходного уровня. По увеличению или уменьшению скорости МК в процентах по отношению к исходному судили соответственно о расширении или сужении просвета сосудов, а также о стимулируемой и базальной продукции и об участии NO в регуляции тонуса сосудов вазодилатирующей функции эндотелия кровообращения. Регистрация изменений скорости мозгового кровотока проводилась в проекции средней мозговой артерии крыс с помощью ультразвукового доплерографа по методу описанному выше.

Для определения количества десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови был использован метод, который основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью АДФ. после взятия кровь центрифугировали в течение 10 мин при 200g, затем плазму смешивали с раствором натриевой соли аденозиндифосфата (АДФ-Na). В течение 10 мин аккуратно перемешивали, путем встряхивания пробирки и повторно центрифугировали для осаждения эндотелиальных клеток. Полученный в результате осадок суспендировали в растворе NaCl. В камере Горяева

подсчитывали количество эндотелиоцитов в 2 сетках камеры методом фазово-контрастной микроскопии, полученный результат умножали на $10^4/\text{л}$ [Hladovec J. 1978, Н.Н. Петрищев, 2001].

2.12 Исследование антитромботической функции эндотелия

Исследование антитромботической активности соединений проводили на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Крыс интраперитонеально наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг), затем производили разрез по средней линии шеи, после чего тупым способом препарировали сонную артерию, на которую накладывали марлевый диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (0,025 мл). Для ограничения контактов окружающих тканей с раствором хлоридом железа под сосуд подкладывали пленку Parafilm. Далее устанавливался ультразвуковой датчик аппарата Доплера. Регистрацию кровотока вели до полной окклюзии сосуда (характеризуется отсутствием пульсации сонной артерии выше участка наложения тромбообразующего агента и характерного артериального звукового сигнала). По увеличению/снижению времени от момента наложения раствора хлорида железа до полного прекращения кровотока оценивали влияние исследуемых соединений на антитромботическую функцию эндотелия.

Противовоспалительная функция эндотелия оценивалась по уровню маркера системного воспаления - С-реактивного белка (СРБ). Определение СРБ проводили с помощью набора реагентов для качественного и полуколичественного определения содержания СРБ в сыворотке крови методом латекс-агглютинации (С-реактивный белок, латексный, "Ольвекс Диагностикум", 100 опр., 051.011). При наличии в исследуемой пробе СРБ он взаимодействует с соответствующими антителами, находящимися на поверхности латексных частиц, с образованием мелких или крупных зерен. Использовали свежеполученную сыворотку крови. Положительная реакция

свидетельствует о наличии СРБ в исследуемой сыворотке в концентрации не менее 6 мг/л. Все образцы, давшие положительную реакцию, подлежали дополнительному количественному исследованию. По результатам титрования образца определяли величину, обратную титру СРБ (величину, обратную максимальному разведению, в котором получен положительный результат интенсивностью 2+). Концентрацию СРБ в образце рассчитывали по формуле: концентрация СРБ (мг/л) = 6 мг/л × (величина, обратная титру образца).

2.13 Методы изучения биохимических показателей.

Метод определения потребления глюкозы.

Потребление глюкозы головным мозгом определялось разницей концентраций глюкозы в артериальной и венозной крови. Артериальная кровь забиралась путем пунктирования общей сонной артерии животного. Венозная кровь бралась из венозного сагиттального синуса животного. Определение содержания глюкозы проводили по глюкозооксидазному методу [Колб В.Г., Камышников В.С., 1982], согласно инструкции фирмы-производителя набора «Глюкоза-ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия).

Метод определения концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в плазме крови.

Концентрацию ТБК-АП определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). К 3 мл 1% ортофосфорной кислоты последовательно добавляли 0,25 мл плазмы крови и 1 мл 0,7 % раствора тиобарбитуровой кислоты, после чего нагревали на водяной бане в течение 60 минут. Далее пробы остужали, добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 мин до образования однородной белой суспензии. После центрифугирования супернатант фотометрировали при двух длинах волн $\lambda=535$ нм и $\lambda=570$ нм

против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет содержания ТБК-АП проводили по формуле

$$C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16$$

где С – концентрация ТБК-активных продуктов в опытной пробе; D_{535} – оптическая плотность пробы при 535 нм; D_{570} – оптическая плотность при 570 нм; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид-ТБК в л/мкмоль/см; 16 – коэффициент разведения плазмы.

Метод определения активности супероксиддисмутазы в плазме крови.

Определение активности супероксиддисмутазы проводили по методу В.А. Костюк (1990), который основан на реакции окисления кверцетина. К 4,4 мл 0,015 М фосфатного буфера рН 7,8, содержащего 0,08 мМ этилендиаминтетраацетата и 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина, вносили 0,5 мл плазмы крови, в холостую и контрольную пробы вносили 0,5 мл 0,9% NaCl. Реакцию запускали внесением 0,1 мл раствора кверцетина в диметилсульфоксиде (1 мг на 5 мл), в холостую пробу вносили 0,1 мл диметилсульфоксида.

Измеряли оптическую плотность проб на 0 и 20 минуте при длине волны $\lambda=406$ нм против холостой пробы в кювете с длинной оптического пути 1 см. Расчет процента ингибирования проводили по формуле:

$$I = 100 - \frac{D_{оп\ 0} - D_{оп\ 20}}{D_{кон\ 0} - D_{кон\ 20}} \times 100$$

где I – процент ингибирования; $D_{оп}$ и $D_{кон}$ – оптические плотности опытной и контрольной проб.

2.14 Методы изучения основных параметров гемостаза крови.

Изучение агрегации тромбоцитов.

Влияние соединений на агрегацию тромбоцитов изучали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов научно-производственной фирмы «БИОЛА» (г. Москва) по методу Born G.(1962) в модификации Габбасова З.А. и соавт. (1989). Метод основан на регистрации

степени изменений светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к последней веществ, индуцирующих агрегацию, в условиях постоянного перемешивания, а также на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале.

Исследования проводили на богатой тромбоцитами плазме. Для этого цитратную кровь центрифугировали по 200g в течении 10 минут на центрифуге СН 6М (ELMI, Латвия). Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием обогащенной тромбоцитами плазмы при 650g в течение 15 минут. Необходимо отметить, что исходный уровень тромбоцитов определяли в камере Горяева, при этом, статистически значимой разницы между их количеством в экспериментальных группах обнаружено не было.

В ходе эксперимента в кювету агрегометра вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37° в течение 3 мин. После инкубации добавляли индуктор агрегации динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Ренам», Россия) в конечной концентрации 5мкМ. При графической регистрации процесса агрегации тромбоцитов (в течение 5 минут) получали кривые, отражающие процесс падения оптической плотности обогащенной тромбоцитами плазмы. Уровень и скорость агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды и наклону агрегатограммы.

Методы изучения влияния исследуемых веществ на коагуляционный гемостаз.

Определение показателей гемостаза осуществлялось на программируемом оптико-механическом коагулометре - Минилаб 701 с использованием наборов для определения протромбинового времени, тромбин-теста, фибриноген - теста, активированного частичного тромбопластинового времени (производство НПО РЕНАМ, Россия).

Определение фактора фон Виллебранда (ФВ) выполнялось с помощью «набора для определения фактора Виллебранда (производство НПО РЕНАМ, Россия)» на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научно-производственной фирмы "Биола" (г. Москва, Россия).

2.15 Иммуноферментный анализ.

Определение концентрации белков и активных молекул осуществляли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы «Cusabio-Rat» (Китай) на ИФА-комплексе фирмы Тесап (Австрия). В работе на разных этапах исследовали уровень следующих биологически активных агентов: СРБ нг/мл (С-реактивный белок), молекула межклеточной адгезии VCAM-1 нг/мл, IL-1 β пг/мл, IL-6 пг/мл, NSE нг/мл (нейронспецифическая енолаза), МВР нг/мл (основной белок миелина), BDNF пг/мл (нейротрофический фактор головного мозга).

Определение уровня половых гормонов у животных с НППГ. С целью оценки изменения уровня гормонов в исследуемых группах при моделировании НППГ был использован ИФА с помощью автоматического ридера Elx800 и с использованием наборов: Прогестерон ELISA EIA-1561, Пролактин ELISA EIA-1291, Фолликулостимулирующий гормон ELISA EIA-1288, Эстрадиол ELISA EIA-2693(DRG Instruments GmbH, Германия).

2.16 Определение зоны инфаркта мозговой ткани при ОСМА

Для сопоставления выраженности моторных нарушений и размера зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга [Brait V. H., 2010]. Для этого изготавливались срезы больших полушарий толщиной 2 мм, которые затем инкубировались в 0,2% растворе 2,3,5,-трифенилтетразолия хлорида при 37°C в течение 20 минут. После окрашивания срезы фотографировались на цифровую камеру в одной плоскости с миллиметровой линейкой. Измерение

площади окрашенной и неокрашенной ткани осуществлялось при помощи программного обеспечения ImageJ. Для избежания возможного завышения площади некротической ткани вследствие отека, учитывался скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывался в процентах относительно объема интактной гемисферы по упрощенной формуле: $ЗИ = ((B - (A - C))/B) * 100\%$, где А – суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах (мм²), В – суммарная площадь интактных гемисфер на срезах (мм²), С – суммарная площадь зон инфаркта на срезах (мм²).

2.17 Морфологические методы исследования

После эвтаназии животных их головной мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 10% нейтральном формалине, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. Срезы толщиной 5-7 мкм. Производили окрашивание срезов гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, CA). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к iNOS, eNOS (NeoMarkers, Fremont, CA 1:100, 1:50) В качестве хромогена был использован диаминобензидин. Изменение уровня экспрессии нитрооксидсинтаз оценивали в баллах от 0 до 3: 0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабо выраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание).

Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria) цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan).

2.18 Методы определения продукции NO эндотелиальными клетками и анализ фосфорилированных форм eNOS.

Идентификацию эндотелиальных клеток проводили с помощью иммуногистохимического маркера эндотелиальных клеток - белка адгезии эндоглина (CD105). Первичные антитела: CD105 (Endoglin) Mouse Anti-

Human mAb (clone SN6), unconjugated, вторичные антитела: Rabbit anti-Mouse, conjugated- FITC.

Выделения клеток и культивирования.

- Клетки выделяли из стерильно собранных пупочных канатиков (длина 15 см), которые транспортировались в лабораторию в течении 6 часов в среде ДМЕМ. В стерильном боксе из пупочного канатика выгонялись остатки крови, в вену помещались канюли и зажимались хомутом.
- Пупочный канатик промывали физиологическим раствором с помощью шприца.
- Заполняли канатик 0,1% раствором коллагеназы (*Clostridium histolyticum*, ПанЭко) (при этом открыв зажим с противоположного конца) до появления розовых капель коллагеназы с противоположного конца. После полного заполнения вены, зажимом перехватывали канюлю и инкубировали канатик при $T=37^{\circ}\text{C}$ 60 минут на водяной бане.
- После инкубации аккуратно массируя пупочный канатик, клеточную суспензию сливали в стерильную центрифужную пробирку, канатик промывали 10 мл среды ДМЕМ.
- Содержимое пробирки центрифугировали при 1000 об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в 1мл среды.

Подсчет жизнеспособных клеток в камере Горяева проводили с витальным красителем трипановым синим (смешав клеточную суспензию и краситель в соотношении 1:1) или используя смесь флуоресцентных красителей (этидий бромид и акридиновый оранжевый) в том же соотношении к клеточной суспензии.

Высевали клетки на планшеты, обработанные 0,2% раствором желатина. Среда культивирования: среда М199 с солями Эрла и глутамином или ДМЕМ, эмбриональная телячья сыворотка инактивированная - 10%, пируват натрия, 7% раствор NaHCO_3 , фактор роста эндотелиальных клеток 2,5 нг/мл.

Продукцию NO оценивали по методу Грисса с использованием растворов 1%-ного сульфаниламида и 0.1%-ного N-(1-нафтил)-этилендиамина, приготовленных в 2.5%-ной ортофосфорной кислоте. Эффект разрабатываемой субстанции исследовали после 1 часа инкубации клеток HUVEC.

Количество клеток в пробах составляло 1,2-1,8 млн/мл. В качестве положительного контроля использовали ацетилхолин в той же концентрации. Из результатов, полученных на стимулированных клетках, вычитали результат, полученный в тех же условиях на тех же клетках, но без стимуляции.

Протокол определения

Из лунок, в которых культивировались клетки не менее 4 дней, отбиралась питательная среда (в ней измеряли базовый уровень NO, без стимуляции) и заменялась свежей средой, содержащей смесь исследуемых соединений и раствора L-аргинина (400 мкМ)

- Ацетилхолин (АХ) и L-аргинина
- Разрабатываемая субстанция и L-аргинина

Все навески тестируемых веществ растворяли в воде, непосредственно перед экспериментом таким образом, чтобы в среде они находились в конечной концентрации 60 мкМ.

Планшеты с клетками инкубировали 60 минут в CO₂ - инкубаторе.

Содержание NO определяли в среде, для чего, полностью отбирали питательную среду, центрифугировали 10 мин при 1000 об. Полученную надосадочную жидкость смешивали с реагентом Грисса 1:1. Оптическую плотность проб измеряли при длине волны 540 нм. Контрольная проба содержала 1 часть питательной среды (без добавок) и 1 часть красителя.

Результаты выражали в виде разницы ΔNO (из результатов, полученных на стимулированных клетках, вычитали результат, полученный в тех же условиях на тех же клетках, но без стимуляции).

Анализ фосфорилированных форм eNOS

Фосфорилированные формы eNOS выявляли методом вестерн-блота с первичными кроличьими моноклональными антителами к eNOS, фосфорилированной по Ser1177 или Thr496 (Life technologies), и вторичными - Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), конъюгированными со щелочной фосфатазой.

2.19 Острая токсичность

Острую суточную токсичность при однократном введении изучали на мышах-самцах массой 18-22 г. Соединения вводили животным внутрибрюшинно в различных возрастающих дозах однократно. Наблюдение за животными проводили в течение суток, отмечая клинику отравления и количество погибших животных. Расчет ЛД₅₀ проводили методом пробит анализа.

2.20 Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$. Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка [Реброва О.Ю., 2002]. Если данные подчинялись нормальному распределению, их анализ проводился с помощью критерия Ньюмена-Кейлса [Гланц С., 1988; Реброва О.Ю., 2002]. В случае принадлежности данных к ненормальному распределению, для выявления различий между двумя группами использовался критерий Мана-Уитни, между несколькими группами – Краскела-Уоллиса, затем для множественного сравнения групп между собой использовался критерий Данна [Гланц С., 1988]. Обработка данных производилась с помощью пакетов программ Microsoft Excel XP и BioStat 2008. Результаты исследования представлены в таблицах и на рисунках в виде $M \pm m$.

ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ ЦЕРЕБРО- И ЭНДОТЕЛИОТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ.

На первом этапе проведен анализ суммарного церебро- и эндотелиотропного действия 4-х рядов веществ при моделировании недостаточности мозгового кровообращения путем необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий, поскольку в рамках данного блока исследований не представлялось возможным сделать заключение о наличии у веществ селективного эндотелиотропного действия. О церебропротекторной активности веществ при ишемии мозга судили по их способности влиять на показатели выживаемости животных, выраженность психоневрологических нарушений (суммарный балл неврологического дефицита, состояние мнестических функций, показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности), уровень мозгового кровотока. Об эндотелиопротекторном действии исследуемых веществ судили на основании анализа динамики мозгового кровотока в ответ на введение модуляторов синтеза оксида азота. Учитывая сопряжение последствий острых и хронических нарушений мозгового кровообращения с возникновением поведенческих нарушений и когнитивного дефицита, через 3 суток после окклюзии сонных артерий выполнялись тесты (ОП, ТЭИ, УРПИ), направленные на выявления данных нарушений. Исследуемые соединения на данном этапе вводились внутрибрюшинно однократно за 30 мин до моделирования ишемии головного мозга.

3.1 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием среди производных ГАМК.

Производные ГАМК давно привлекают внимание исследователей в качестве перспективных молекул для создания на их основе лекарственных препаратов. Это объясняется поливалентным механизмом действия

производных ГАМК, способных в условиях различных патологий оказывать мультитаргетное действие. Так в условиях ишемии головного мозга они улучшают реологические свойства крови [Бородкина Л.Е., 2009]; подавляют глутаматно-кальциевый каскад [Кулинский В.И., 1997; Hasbani M.J., 2001; Serena J., 2001; Лунышина Е.В., 2003; Островская Р.У., 2003; Мирзоян Р.С., 2005]; предупреждают накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повышают активность антиоксидантных систем [Багметов М.Н., 2006; Бородкина Л.Е., 2009]; способствуют нормализации качественного и количественного состава фосфолипидов и оказывают протективное влияние на мембранные структуры нервной ткани [Мирзоян Р.С., 2003]; увеличивают скорость утилизации глюкозы и нивелируют явления энергодефицита [Розанов В.А., 1989; Pascual J.M., 2001; Shwartz-Bloom R.D., 2001].

Однако, если использовать в качестве исходной структуры незамещенные аминокислоты, то созданные на их основе лекарственные препараты, зачастую, характеризуется невысокой биодоступностью, плохо проникают через гематоэнцефалический барьер. Для решения этой проблемы кафедрой органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия) были синтезированы различные производные ГАМК, имеющие заместители в α , β , γ положениях, при этом по результатам, ранее проведенных исследований на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ [Тюренков И.Н., 1986], наиболее активными и менее токсичными оказались производные ГАМК, имеющие радикалы в β положении. При модернизации структуры ГАМК были также синтезированы ряд соединений, имеющих заместители по карбоксильной группе (например, мефебут). Однако такие вещества обладали большей токсичностью, при этом по эффективности они не уступали β -производным ГАМК и оказывали протективное действие в меньших дозах.

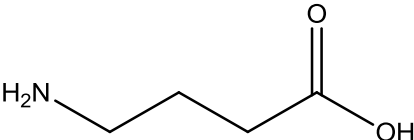
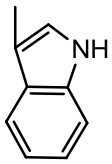
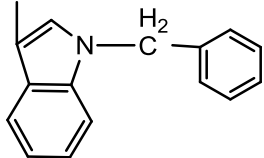
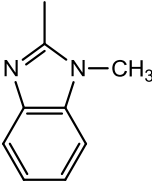
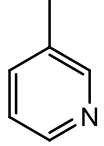
Еще одним направлением синтеза с целью улучшения фармакологических свойств ГАМК и ее производных стало добавление различных биологически активных кислот, таких как лимонная, щавелевая, никотиновая, глутаминовая, салициловая, L-аргинин, глицин. Предполагалось, что это, может улучшить биодоступность, потенцировать эффект исходного вещества за счет синергизма действия, снизить токсичность и уменьшить спектр возможных побочных эффектов. В связи с выше изложенным, были изучены церебро-и эндотелиопротекторные свойства различных производных ГАМК в условиях ишемии головного мозга.

3.1.1 Скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности производных ГАМК с гетероциклическими и ароматическими заместителями в β -положении.

Первыми из производных ГАМК были изучены, имеющие гетероциклические и ароматические заместители в β -положении (табл.2), поскольку как было ранее отмечено, именно введение радикалов в β -положение ГАМК позволяет синтезировать наиболее активные и малотоксичные соединения. По результатам первичного скрининга фармакологической активности и ранее проведенных исследований на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ были выбраны 4 соединения для изучения их церебропротекторных свойств в условиях ишемии головного мозга (табл.2).

Таблица 2

Структуры производных ГАМК с гетероциклическими и ароматическими заместителями в β -положении

Структура	β -заместитель	Шифр соединения	Доза, мг/кг
 <p>ГАМК</p>		РГПУ-136	22
		РГПУ-160	31
		РГПУ-196	27
		РГПУ-195	22

3.1.1.1 Изучение церебро- и эндотелиопротекторных свойств РГПУ-136, РГПУ-160, РГПУ-195, РГПУ-196.

Данные о динамике гибели животных после билатеральной окклюзии общих сонных артерий представлены в табл.3. Так, максимальная гибель животных в ходе эксперимента была отмечена в контрольной группе и составила 70%. Среди исследуемых соединения, в большей степени вещество РГПУ-195 уменьшало гибель крыс после перевязки сонных артерий (табл.3).

При анализе неврологических нарушений по шкале McGraw было отмечено, что у животных контрольной группы после окклюзии ОСА наблюдался рост неврологического дефицита к концу вторых суток (7.8 ± 0.6), который сохранялся и через трое суток наблюдения (табл.4). Из неврологических симптомов наблюдались манежные движения, параличи конечностей, односторонний и двусторонние блефароптозы, тремор. На протяжении последующих двух суток неврологический дефицит у них практически не менялся.

Таблица 3.

Влияние производных ГАМК на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	85	70	65*	40*	30*
РГПУ-136	10	80	80	60	60	60
РГПУ-160	12	75	75	67	58	58
РГПУ-195	20	90	80	70	70	70#
РГПУ-196	12	83	83	67	67	58

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0.9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p<0,05$).

Неврологический дефицит (индекс McGraw) у животных, получавших РГПУ-195 нарастал незначительно, только в первые 12 часов и по сравнению с показателями контрольной группы был значительно ниже на протяжении всего периода наблюдения (табл.4).

Таблица 4

Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) животных после двухсторонней необратимой ОСА.

Группа животных	Время после окклюзии общих сонных артерий				
	6 часов	12 часа	24 часа	48 часа	72 часа
Контроль-ишемия	5,9±0,6	6,9±0,6	7,3±0,6	7,8±0,6	7,8±0,8
РГПУ-136	5±0,9	6,3±0,7	5,8±1,2	5,7±1,2	5,8±1,2
РГПУ-160	5,7±0,8	6,4±0,8	5,9±1,0	5,9±1,1	5,8±1,2
РГПУ-195	4,1±0,5#	4,5±0,7#	4,5±0,9#	4,6±0,8#	4,5±0,9#
РГПУ-196	5,6±0,8	6,3±0,7	6,1±1,1	6,2±1,0	6±1,2

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p<0,05$).

Неврологический дефицит и изменения в поведенческом статусе животных с острой ишемией головного мозга отражают тяжесть нарушений, вызванных НМК. При двусторонней окклюзии ОСА крыс соединение РГПУ-195 оказывало выраженное церебропротекторное действие, о чем

свидетельствовало сохранение показателей психоневрологического статуса: двигательной, суммарной ориентировочно-исследовательской активности, а так же способности к решению экстраполяционной задачи (табл.5).

Таблица 5.
Показатели животных через 72 часа после окклюзии ОСА в тестах ОП, ТЭИ, УРПИ.

Группа	ОП		ТЭИ	УРПИ
	Количество пересечённых квадратов	Количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки	Латентный период решения экстраполяционной задачи, с	Латентный период захода в тёмный отсек теста УРПИ, с
ЛО	25±1,5	22,5±1,7	4,8±1,1	180
Контроль-ишемия	6,7±1,7*	6±1,3*	144,7±18,7*	48±26,6*
РГПУ-136	10,2±2,5	8±2,1	114,7±32,7	126,5±33,9
РГПУ-160	12,1±1,5	11,9±1,9	138,1±19,9	113,4±31,6
РГПУ-195	18±1,4#	13,4±1,2#	80,1±10#	154,8±13,5#
РГПУ-196	12,7±0,9	10±1,2	130,3±24,4	112,4±31,9

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p<0,05$).

Перевязка ОСА сопровождалась значительным снижением уровня МК. Так у животных группы негативного контроля через 72 часа после ОСА уровень МК был достоверно ниже в 1,8 раза, чем в группе ЛО животных (табл.6). При этом у данной группы наблюдалось менее выраженное повышение МК при введении ацетилхолина и менее выраженное его снижение при введении нитро-L-аргинина в сравнении с ЛО животными, тогда как введение нитроглицерина вызывало сопоставимые изменения у животных всех исследуемых групп, что указывает на сохранение независимого от состояния эндотелия и реализуемого при участии гуанилатциклазы миогенного механизма дилатации сосудов (табл.6).

Таблица 6

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина животным с перевязанными ОСА.

Группы животных	Фоновые значения, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,10±0,23	30±1,0	-34,5±0,63	35,5±1,4
Контроль Ишемия	2,25±0,09*	7±0,96*	-12±2,07*	38,4±0,97
РГПУ-136	2,4±0,18	12±1,23	-22,1±0,94	40,2±1,4
РГПУ-160	2,5±0,2	16,7±0,4	-16±2,2	39±1,7
РГПУ-195	2,8±0,1#	25±0,93#	-28±0,45#	37,6±1,3
РГПУ-196	2,5±0,13	18±0,53	-19±0,8	40,9±1,2

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p<0,05$).

У животных, получавших РГПУ-195, МК был на 24% выше, чем у животных группы негативного контроля. При оценке ЭЗВД установлено, что прирост кровотока на введение ацетилхолина у крыс, получавших РГПУ-195, был более выраженный по сравнению с аналогичным у контрольных животных. Тогда как реакция на введение нитроглицерина, как было сказано выше, была сопоставима и статистически значимо не отличалась ни от группы ЛО животных, ни от группы негативного контроля (табл.6). Введение остальных производных ГАМК не оказало значимого церебро- и эндотелиопротекторного эффекта у животных с ишемией головного мозга.

Таким образом, среди β - производных ГАМК наиболее выраженным церебро- и эндотелиопротекторным действием обладало соединение РГПУ-195, имеющее пиридиловый заместитель. Далее был проведен анализ зависимости доза-эффект для данного соединения. Несколько уступало РГПУ-195 по выраженности церебропротекторного действия вещество РГПУ-136, в структуру которого был введен метил-индол. Однако присоединение к соединению РГПУ-136 бензольного кольца (соединение РГПУ-160) приводило исчезновению церебропротекторной активности. Не оказало церебропротекторного действия и производное ГАМК, имеющее в β -положении имидазольный заместитель (РГПУ-196). Следовательно наиболее

перспективными для создания на основе β - производных ГАМК веществ с церебро- и эндотелиопротекторной активностью являются соединения с пиридиловыми заместителями.

3.1.1.2 Изучение зависимости церебро- и эндотелиотропного действия от дозы соединения РГПУ-195[‡].

Суммарные данные о выживаемости животных после окклюзии ОСА и развитию у них неврологических нарушений представлены в табл.7, табл.8.

Соединение РГПУ-195 оказывало доза-зависимое действие при ишемии головного мозга у животных. При этом диапазон его эффективных доз составил от 22 до 44 мг/кг, а снижение (до 11 мг/кг) и повышение (до 88 мг/кг) приводило к уменьшению церебро- и эндотелиопротекторного действия РГПУ-195.

Таблица 7

Влияние соединения РГПУ-195 в разных дозах на выживаемость животных после необратимой билатеральной окклюзии ОСА

Группа животных	Доза, мг/кг	N	Выживаемость (%) животных после окклюзии ОСА				
			6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	-	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	-	20	75	70	60	40*	30*
РГПУ-195	11	20	80	70	50	40	40
	22	20	90	80	60	60	60
	44	20	100	80	75	75	75#
	88	20	100	70	60	50	40

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО группой ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

Так на фоне применения РГПУ-195 в дозах 22 мг/кг и 44 мг/кг к концу 3-их суток после окклюзии ОСА отмечалась большая выживаемость животных по сравнению с контрольной группой животных на 30% и 45% соответственно (табл.7). При этом у животных, получавших соединение

[‡]Исследование выполнено совместно Н.В. Мазиной

РГПУ-195 в указанных дозах, суммарный индекс McGraw был достоверно ниже по сравнению с показателями контрольной группы (табл.8).

Таблица 8

Неврологический дефицит по шкале McGraw (в баллах) у животных после необратимой окклюзии ОСА на фоне применения соединения РГПУ-195

Группа животных	Доза, мг/кг	Время после необратимой окклюзии ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	-	5,9±0,6	6,9±0,5	7,3±0,6	7,8±0,6	7,8±0,8
РГПУ-195	11	5,5 ±0,6	6,0 ±0,7	6,9 ±0,8	7,7 ±0,7	7,2±0,8
	22	4,8 ±0,6	4,9 ±0,7 [#]	5,6 ±0,8	5,7 ±0,8 [#]	5,4 ±0,9 [#]
	44	4,2 ±0,4 [#]	4,6 ±0,7 [#]	4,7 ±0,8 [#]	4,6 ±0,8 [#]	4,6 ±0,8 [#]
	88	4,2±0,5 [#]	5,6±0,7	5,7±0,8	6,3±0,9	7,1±0,8

Примечание:

– различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия (p<0,05).

Кроме того применение РГПУ-195 (22 и 44 мг/кг) способствовало сохранению МК у животных после окклюзии ОСА, о чем свидетельствовали более высокие показатели МК у крыс данных групп по сравнению с животными контрольной группы (табл.9)

При введении ацетилхолина отмечено, что прирост МК у крыс, получавших РГПУ-195 в дозах 22 мг/кг и 44 мг/кг был выше по сравнению с контрольной группой животных. В группах, получавших соединение РГПУ-195 в дозах 11 мг/кг и 88 мг/кг, введение ацетилхолина вызывало значительно меньший прирост МК (табл.9). Полученные результаты, позволяют считать, что при необратимой билатеральной окклюзии ОСА снижается синтез оксида азота и его выброс, стимулированный введением ацетилхолина.

Таблица 9

ЭЗВД и ЭНВД у животных через 72 часа после окклюзии ОСА

Группа	Доза, мг/кг	МК (у.е) исходный	Прирост кровотока (в %) на введение		
			ацетилхолина	N-L-аргинин	нитроглицерина
ЛО	-	4,11±0,21	28±2,6	-36,3±1,6	39,9±3,6
Контроль-ишемия	-	2,25±0,24*	6±2,8*	-11,7±1,1*	38±2
РГПУ-195	11	2,30±0,06	11,9±2,5	-11±1,2	34,3±2,26
	22	2,98±0,11	22,1±1,8	-23,1±1,2 [#]	37,4±2
	44	3,52±0,13 [#]	25,4±2,9 [#]	-26,1±2,1 [#]	36,4±2,5
	88	2,40±0,16	11,0±2,27	-15,5±2,0	37,6±2,5

Примечание:

МК – мозговой кровоток; *,# – p<0,05 – различия достоверны соответственно по сравнению с ложнооперированными (ЛО) или контрольной группой животных.

Введение нитроглицерина вызвало увеличение МК сопоставимое у всех крыс, что свидетельствует о сохранности эндотелий независимого механизма вазодилатации.

Таблица 10

Суммарные данные об эффективных дозах, терапевтическом индексе и LD₅₀ соединения РГПУ-195

Шифр соединения	ED ₃₀	ED _{max}	LD ₅₀	ТИ
РГПУ-195	22 мг/кг	44 мг/кг (↓45%)	2300 мг/кг	104

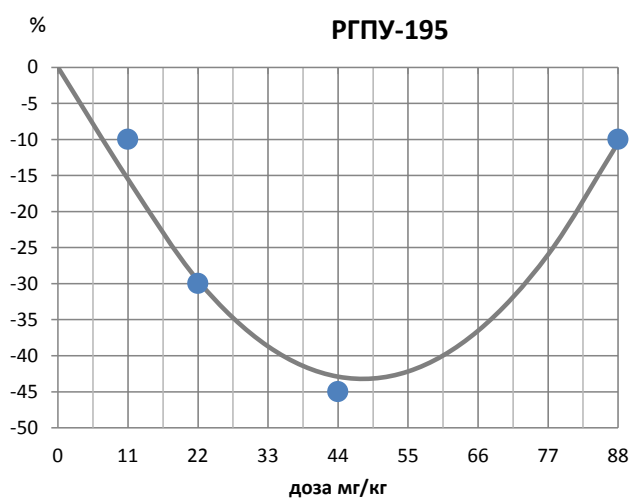


Рис. 2. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединения РГПУ-195

Обозначения:

по оси ОХ – исследуемые дозы; по оси ОУ – процент выживших животных

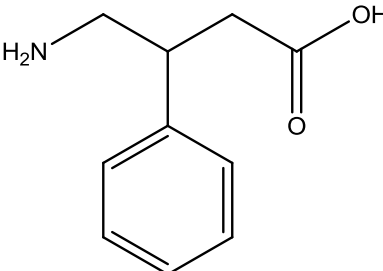
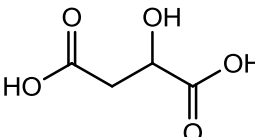
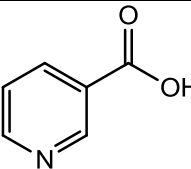
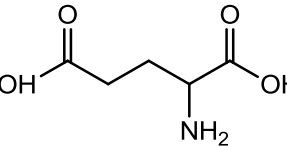
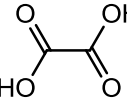
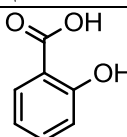
Основываясь на анализе кривой доза-эффект и полученных суммарных данные об эффективных дозах РГПУ-195, его терапевтическом индексе и LD₅₀ (табл.10, рис.2), для дальнейшего исследования была выбрана доза 44 мг/кг.

3.1.2 Скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности производных фенибута с органическими, биологически активными кислотами[§]

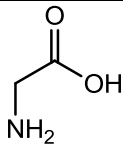
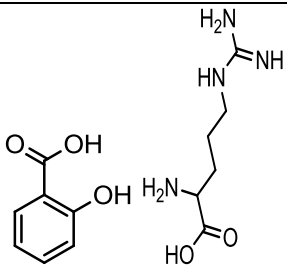
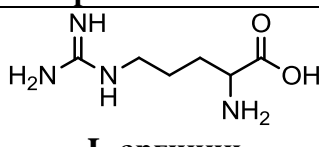
Фенибут и его производные давно привлекают внимание исследователей в качестве нейропротекторных средств. Однако на сегодняшний день их эффективность в клинических условиях при НМК не была доказана. Учитывая опыт создания препаратов путем включения в структуру других биологически активных веществ, на кафедре органической химии РГПУ им. Герцена были синтезированы ряд композиций фенибута с органическими кислотами.

Таблица 11

Структуры производных фенибута с органическими кислотами

Структура фенибута	Кислота	Соотношение фенибута и кислот	Шифр соединения	Доза, мг/кг
	 яблочная	2:1	РГПУ-150	50
	 никотиновая	2:1	РГПУ-151	50
	 глутаминовая	2:1	РГПУ-152	50
	 щавелевая	2:1	РГПУ-153	45
	 салициловая	2:1	РГПУ-189	30

[§] Исследование выполнено совместно Д.В. Куркиным

	 глицин	2:1	РГПУ-192	43
	 Салициловая кислота + L-аргинин	1:1:1	РГПУ-257	27
	 L-аргинин	1:1	РГПУ-224	21
		1:2	РГПУ-258	30

В этой серии экспериментов максимальная гибель животных была также отмечена в контрольной группе. Суммарные данные о динамики выживаемости животных представлены в табл.12.

Таблица 12.

Влияние производных фенибута на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	85	80	65*	50*	30*
РГПУ-150	10	90	70	70	60	60
РГПУ-151	10	100	100	100	80	80#
РГПУ-152	10	100	100	80	80	80#
РГПУ-153	10	80	80	70	60	50
РГПУ-189	10	100	90	80	80	80#
РГПУ-192	10	90	80	80	70	60
РГПУ-224	10	80	80	60	40	40
РГПУ-257	10	80	80	80	60	60
РГПУ-258	10	90	80	70	70	60

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Исследуемые производные фенибута уменьшали количество летальных исходов у животных с двусторонней окклюзией ОСА, однако их эффективность была не одинакова (табл.12). Соединения под лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-151, РГПУ-152 оказывали церебропротекторное действие, о чем свидетельствовало достоверное снижение числа летальных исходов у животных данных групп.

Моделирование ишемии головного мозга путем одномоментной билатеральной окклюзии ОСА приводило к формированию у животных явлений стойкого неврологического дефицита, проявлявшегося вялостью животных, замедленностью их движений и реакций на внешние стимулы, наличием одно- и двусторонних птозов, параличей и парезов конечностей, тремора, манежных движений крыс, появлением судорог, развитием коматозного состояния (табл.13). При этом у животных контрольной группы, получавших физиологический раствор, неврологический дефицит был более выражен на протяжении всего периода наблюдения (от $8,3 \pm 0,3$ до $8,9 \pm 0,77$).

Таблица 13

Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) животных после двусторонней необратимой окклюзии ОСА

Группа животных	Время после окклюзии общих сонных артерий				
	6 часов	12 часа	24 часа	48 часа	72 часа
Контроль-ишемия	$8,3 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,5$
РГПУ-150	$6,5 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,8$	$6,0 \pm 0,9^*$	$5,5 \pm 1,2^*$	$5,3 \pm 1,3^*$
РГПУ-151	$6,2 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,4^*$	$5,3 \pm 0,5^*$	$4,7 \pm 1^*$	$4,3 \pm 1^*$
РГПУ-152	$5,8 \pm 0,5^*$	$5,6 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,8^*$	$4,6 \pm 1^*$	$4,2 \pm 1^*$
РГПУ-153	$7,0 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,8$	$6,7 \pm 0,9$	$6,5 \pm 1,2$
РГПУ-189	$6,4 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,6^*$	$5,2 \pm 0,9^*$	$4,6 \pm 1^*$	$4,1 \pm 1^*$
РГПУ-192	$6,8 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,8^*$	$5,9 \pm 1,1$	$5,8 \pm 1,2$
РГПУ-224	$7,1 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,9$	$7,8 \pm 0,9$	$7,8 \pm 0,9$
РГПУ-257	$7,2 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,7$	$6,4 \pm 1$	$6,0 \pm 1,1$
РГПУ-258	$6,6 \pm 0,4$	$6 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,9$	$5,8 \pm 1^*$	$5,7 \pm 1,1^*$

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * -

достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Исследуемые производные фенибута (за исключением РГПУ-224) уменьшали выраженность неврологического дефицита, при этом наиболее выраженным церебропротективным действием обладали соединения РГПУ-189, РГПУ-151, РГПУ-152 и несколько меньшим соединения РГПУ-150 и РГПУ-258. Балл неврологического дефицита в данных группах через 72 часа после окклюзии ОСА в среднем составлял от 4,1 до 5,7 балла и был наименьшим среди животных, участвующих в эксперименте (табл.13).

Дополнительно у всех животных оценивались в тесте ОП – двигательная, ориентировочно-исследовательская активности, в УРПИ и ТЭИ – состояние мнестических функций.

При исследовании через 72 часа ориентировочно-исследовательской и двигательной активности животных было отмечено, что крысы, получавшие соединения РГПУ-151, РГПУ-152 РГПУ-189, РГПУ-258 были более подвижны и проявляли большую исследовательскую активность, чем животные контрольной группы (табл.14).

Таблица 14.

Показатели животных в тестах ОП, ТЭИ, УРПИ через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий.

Группа	ОП		ТЭИ	УРПИ
	Количество пересечённых квадратов	Количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки	Латентный период решения экстраполяционной задачи, с	Латентный период захода в тёмный отсек теста УРПИ, с
ЛО	23±0,8	15,1±0,9	10,6±1,4	180
Контроль-ишемия	6,5±1,2*	4±0,9*	73,5±21,4*	44,5±27,1*
РГПУ-150	17,2±1,8	6,7±1,1	67,8±22,6	150,2±12,2#
РГПУ-151	18±1,5	13,1±0,6#	22,1±2#	159,9±13,2#
РГПУ-152	20,9±1,3#	13,9±0,6#	22,3±1,8#	131,1±23,9#
РГПУ-153	13,4±1,3	9,6±1,1	43,2±2,8	149,2±21,4#
РГПУ-189	19,5±1,2#	12,9±0,4#	19,4±1,3#	162,5±11,6#
РГПУ-192	16,3±1,9	10,2±1,2	56,0±27,9	115,3±29,1

РГПУ-224	14,8±1,5	10±1,7	49,4±7,4	110±41,6
РГПУ-257	17,7±1,3	12,5±1,3	39±5	157,3±14,3#
РГПУ-258	19±1,2	13,8±0,6#	20,9±3#	176,8±3,2#

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; # - $p < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

При анализе сохранности мнестической функции животных с окклюзией ОСА в тесте решения задачи экстраполяционного избавления и при оценке сохранности памятного следа в тесте УРПИ выявлено, что РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258 и несколько в меньшей степени РГПУ-257 способствовали достоверному сохранению памяти по отношению к группе, получавшей физиологический раствор (табл.14).

При исследовании уровня мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии у крыс через 72 часа после окклюзии ОСА было отмечено, что у контрольной группы животных МК был достоверно ниже, чем в группе ложноперирированных животных более чем в два раза. В группе ложноперирированных животных эндотелийзависимая вазодилатация, вызванная введением ацетилхолина, привела к увеличению МК на 28%, в то время как увеличение кровотока в группе контрольных животных с ишемией составило 6%.

В группах животных, получавших РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189 и РГПУ-258 уровень локального мозгового кровотока и ЭЗВД были значительно выше относительно наблюдаемого в группах негативного контроля (табл.15). Таким образом, у животных контрольной группы после двусторонней перевязки ОСА через 72 часа регистрируется более низкий МК, очевидно обусловленный не только окклюзией ОСА, но и ЭД, связанной с уменьшением стимулируемой и базальной продукции оксида азота. Отмеченные четыре субстанции в значительной мере улучшали вазодилатирующую функцию эндотелия.

Таблица 15.

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение модуляторов эндотелиальной нитроксид синтазы животных через 72 часа после двусторонней окклюзии ОСА

Группы животных	Фоновые значения, у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (в %) при введении анализаторов		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,8±0,16	28±2,6	-31,1±2,1	43,1±1,7
Контроль Ишемия	2,1±0,11*	6±0,6*	-12±2*	44,3±1,1
РГПУ-150	2,8±0,2	16±1,1	-14±2,3	43,3±3,8
РГПУ-151	3,6±0,18#	20±1,5#	-25,8±1,6#	49,4±1,6
РГПУ-152	3,9±0,18#	20,1±1,5#	-22,7±1,1#	42±2,7
РГПУ-153	2,9±0,23	17±1,7	-17±1	44,4±2,9
РГПУ-189	3,9±0,06#	22,5±1,1#	-24±0,9#	45,6±2,2
РГПУ-192	2,9±0,35	14±1,2	-17±0,6	41±4
РГПУ-224	2,7±0,12	7,3±0,6	-15±0,5	43,9±1,5
РГПУ-257	2,8±0,14	15±0,8	-18±0,8	41,6±1,3
РГПУ-258	4,0±0,12#	21±1,2#	-21±0,6#	42,7±4

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

Сохранность уровня МК и близкой к нормальной вазодилатации на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, наблюдаемых в группах РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258 позволяют судить о высокой эндотелиопротекторной активности соединений.

Проведенное исследование показало, что добавление к фенибуту различных кислот (никотиновой – РГПУ-151, глутаминовой – РГПУ-152, салициловой – РГПУ-189, L-аргинина – РГПУ-258) позволяет найти соединения, оказывающие выраженное церебропротекторное действие. При этом введение в структуру двух кислот (салициловой и L-аргинина – РГПУ-257) не приводило к потенцированию их действия.

Таким образом, по совокупности оказываемых эффектов для изучения зависимости доза-действие были выбраны соединения РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258.

3.1.2.2 Изучение зависимости церебро- и эндотелиотропного действия от дозы соединений РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258.

Композиции фенибута РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258 во всех исследуемых дозах уменьшали количество летальных исходов при моделировании ишемии головного мозга, однако их эффективность была не одинакова для всех изученных доз. Соединения РГПУ-189 (30 мг/кг), РГПУ-151 (50 мг/кг), РГПУ-152 (50 мг/кг), РГПУ-258 (30 мг/кг) в большей степени способствовали выживаемости животных (табл.16) и препятствовали развитию неврологических отклонений (табл.17) у животных после необратимой окклюзии ОСА. Другие дозы исследуемых соединений оказались менее эффективны.

Таблица 16.

Выживаемость (%) животных после необратимой окклюзии ОСА

Группа животных	N	Доза, мг/кг	Выживаемость (%) животных после ОСА,				
			6 ч	12 ч	24ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	—	100	100	100	100	100
Контроль - ишемия	20	—	90	67	50	40	35
РГПУ-151	12	25	92	92	70	60	60
	12	50	90	90	80	80*	80*
	12	75	100	80	70	50	50
РГПУ-152	12	25	90	70	60	50	50
	12	50	100	90	90	70	70
	12	75	80	80	80	70	70
РГПУ-189	12	15	90	70	60	60	60
	12	30	100	90	90	80*	80*
	12	45	100	80	70	60	60
РГПУ-258	12	15	75	75	67	58	50
	12	30	92	83	67	67	67
	12	60	83	83	75	67	67

Примечание:

ЛО - группа ложнооперированных животных, N-число выживших животных; * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных.

Таблица 17.

Неврологический дефицит (балл по шкале McGraw) животных после неполной ишемии на фоне введения исследуемых соединений.

Группа животных	Доза, мг/кг	Время регистрации после ОСА, ч				
		6	12	24	48	72
Контроль Ишемия		7,8±0,4	8,2±0,4	8,4±0,4	8,9±0,4	9±0,4
РГПУ-151	25	7,6±0,5	6,8±0,6	7,4±0,7	6,9±1	5,9±1,1
	50	7,5±0,5	5,7±0,6*	6,2±0,7	4,9±0,9*	4,3±0,8*
	75	7,6±0,4	7,2±0,5	7,6±0,6	6,9±1	7±1
РГПУ-152	25	7,1±0,5	7,4±0,6	7,5±0,7	7,6±0,8	7,2±0,9
	50	5,9±0,4*	5,9±0,5*	5,8±0,5*	5,2±1,1*	4,8±1,1*
	75	7,7±0,45	7,5±0,5	7,2±0,5	6,5±0,8	5,4±1,0*
РГПУ-189	15	6,9±0,4	6,7±0,8	6,9±0,8	6,2±1	6,2±1,0
	30	6,6±0,3	5,5±0,5*	5,5±0,5*	4,7±0,8*	4,2±0,8*
	45	6,9±0,4	6,1±0,6	6,9±0,7	6,1±1,1	6±1,1
РГПУ-258	15	7,4±0,7	7±0,7	6,8±0,8	6±1,1	6,4±1,1
	30	6±0,6	5,8±0,6*	5,7±1,0*	5,6±1	5,1±1,1*
	60	5,9±0,7*	5,9±0,7*	5,8±0,9*	5,2±1*	5,2±1,1*

Примечание:

ЛО- группа ложнооперированных животных; * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных.

Тяжесть ишемического поражения структур мозговой ткани с последующей её деструкцией напрямую коррелирует со степенью и продолжительностью падения МК. Поэтому дополнительно оценивалось состояние МК и ЭЗВД.

Таблица 18.

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение модуляторов эндотелиальной нитроксид синтазы животных через 72 часа после двусторонней ОСА артерий

Группы животных	Доза, мг/кг	Фоновые значения, у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
			Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	–	4,9±0,1	27,3±1,3	-31,1±0,8	41,8±2,1
Контроль ишемия	–	2,2±0,13*	7,5±0,7*,	-11,4±0,7*	38,9±4,2
РГПУ-151	25	3,6±0,12#	11,7±2	-19,1±1,3	46,1±2,7
	50	4,0±0,31#	21,3±1,5#	-28±0,9#	43,5±3
	75	2,8±0,46	10,2±1,3	-15,2±1	41,7±3,4
РГПУ-152	25	3,9±0,31#	9,7±0,8	-22,4±0,8#	44±3,3
	50	4,1±0,57#	20,8±1,1#	-22,8±1,7#	43,2±2,1
	75	4,0±0,44	13,1±1,1	-18±1,2	45,7±2,9

РГПУ-189	15	3,8±0,51	13±0,9	-23,7±1,3#	42,7±2,8
	30	3,9±0,15#	20,2±0,9#	-24±0,6#	42,9±3,9
	45	2,8±0,22	8,9±0,7	-21,6±0,6	43,4±2,4
РГПУ-258	15	2,8±0,44	9,9±1	-11,8±0,7	38±3,8
	30	4,1±0,1#	22,6±1#	-21,7±1,2#	45,7±1,6
	60	3,8±0,11#	18,4±1,3#	-19,6±0,5	39,2±3,2

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Уровень МК контрольной группы животных в момент регистрации был достоверно ниже, чем в группе ложнооперированных животных более чем в два раза. Вазодилатирующий ответ эндотелия на введение ацетилхолина в группе ЛО животных выражался достоверным увеличением скорости мозгового кровотока, по отношению к исходным значениям, в среднем на 27,3%, в то время как увеличение кровотока в группе контрольных животных с ишемией мозга было незначительно (7,5%).

Таблица 19.

Суммарные данные об эффективных дозах, терапевтическом индексе и LD50 соединений РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258

Шифр соединения	ED ₃₀	ED _{max}	LD ₅₀	ТИ
РГПУ-151	34,4 мг/кг	50 мг/кг (↓43%)	750 мг/кг	21,8
РГПУ-151	50 мг/кг	50-75 мг/кг (↓30%)	750 мг/кг	15
РГПУ-189	20,8 мг/кг	30 мг/кг (↓40%)	1000 мг/кг	48
РГПУ-258	30 мг/кг	27-54 мг/кг (↓30)	>2000	74

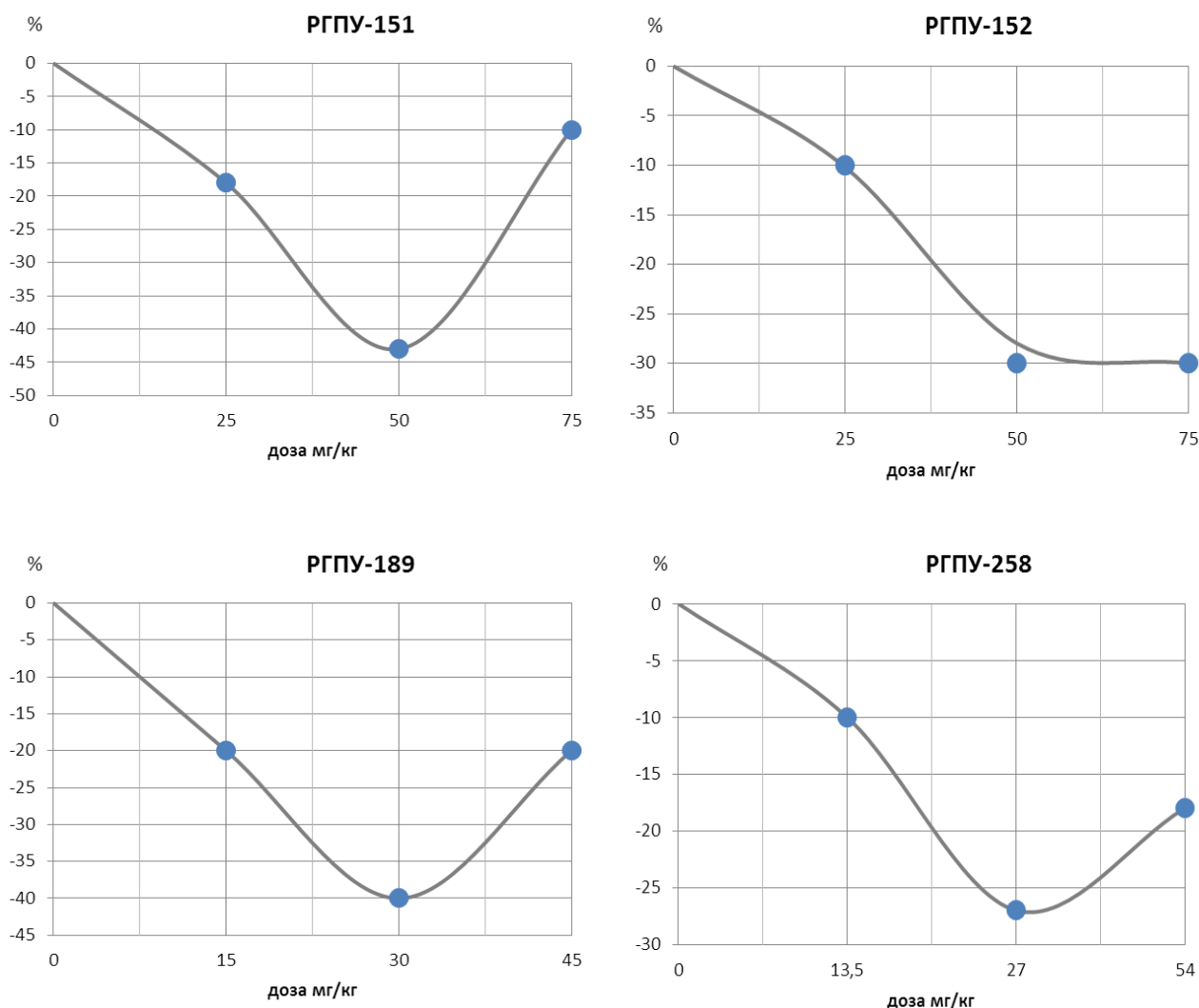


Рис. 3. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединений РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258

Обозначения:

по оси ОХ – исследуемые дозы; по оси ОУ – процент выживших животных

В группах животных, получавших исследуемые соединения РГПУ-189 в дозе 30 мг/кг, РГПУ-151 в дозе 50 мг/кг, РГПУ-152 в дозе 50 мг/кг, РГПУ-258 в дозе 27 мг/кг интенсивность локального мозгового кровотока была значительно выше относительно наблюдаемого в группах негативного контроля. При этом и ЭЗВД сохранялась лучше у животных, получавших исследуемые соединения в указанных дозах (табл.18).

Таким образом, для дальнейшего углубленного изучения были выбраны соединения РГПУ-189 в дозе 30 мг/кг, РГПУ-151 в дозе 50 мг/кг, РГПУ-152 в дозе 50 мг/кг, РГПУ-258 в дозе 30 мг/кг, оказывающих

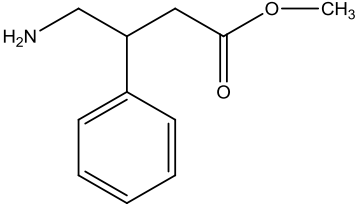
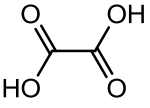
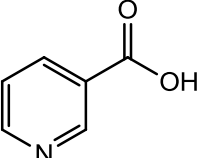
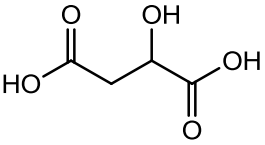
максимально выраженный церебро- и эндотелиопротекторный эффект (табл.19, рис.3).

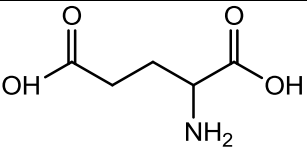
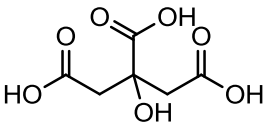
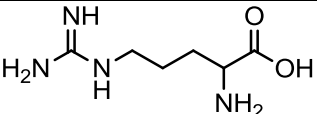
3.1.3 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием среди производных мефебута с органическими биологически активными кислотами.

Мефебут (метиловый эфир фенибута) был синтезирован химиками РГПУ им. А.И. Герцена с целью улучшения фармакокинетических свойств исходной молекулы. В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ было показано, что он обладает выраженными ноотропными, нейропротекторными, противосудорожными, антигипертензивными и актопротекторными свойствами [Багметова В.В., 2013]. Чтобы расширить спектр действия мефебута, снизить его токсичность были созданы композиции с различными кислотами (щавелевой, никотиновой, яблочной, глутаминовой, лимонной, L-аргинином) (табл.20).

Таблица 20

Структуры производных мефебута с органическими кислотами

Структура мефебута	Кислота	Соотношение мефебута и кислот	Шифр соединения	Доза, мг/кг
	 щавелевая	2:1	РГПУ-176	27
	 никотиновая	2:1	РГПУ-178	29
	 яблочная	2:1	РГПУ-179	30

	 глутаминовая	2:1	РГПУ-180	30
	 лимонная	2:1	РГПУ-181	32
	 L-аргинин	1:1	РГПУ-260	22
		1:2	РГПУ-261	32

3.1.3.1 Скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности производных мефебута с органическими, биологически активными кислотами

Моделирование церебральной ишемии у крыс путем билатеральной окклюзии сонных артерий приводило к гибели части животных (табл. 21), при этом максимальная летальность крыс была отмечена в контрольной группе и составила 70% к концу третьих суток после ОСА.

Таблица 21

Влияние производных мефебута на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	80	70	50*	40*	30*
РГПУ-176	10	80	60	50	40	40
РГПУ-178	10	80	70	70	50	40
РГПУ-179	10	90	70	70	70	60
РГПУ-180	10	70	70	60	40	40
РГПУ-181	10	70	60	60	60	60
РГПУ-260	13	100	77	69	69	69#
РГПУ-261	13	77	69	62	54	54

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Исследуемые производные мефебута уменьшали количество летальных исходов на фоне неполной ишемии головного мозга, однако их эффективность была не одинакова (табл.21). Наиболее выраженное церебропротекторное действие оказывало соединение РГПУ-260 (табл.21).

Динамика развития неврологического дефицита у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий представлена в табл.22.

Из исследуемых производных мефебута, только соединение РГПУ-260 достоверно по сравнению с контрольной группой уменьшало выраженность неврологического дефицита (балл неврологического дефицита в данной группе колебался от $5,6 \pm 1,2$ до $7 \pm 0,7$ (табл.22).

Таблица 22

Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) у животных после двухсторонней необратимой окклюзии ОСА.

Группа животных	Время после окклюзии общих сонных артерий				
	6 часов	12 часа	24 часа	48 часа	72 часа
Контроль	$8,7 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,3$	$9 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,4$
РГПУ-176	$8,2 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,7$	$8 \pm 0,8$
РГПУ-178	$7,8 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,9$
РГПУ-179	$8 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,7$
РГПУ-180	$8,8 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,5$	$8,4 \pm 0,7$	$7,8 \pm 0,9$
РГПУ-181	$7,7 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,8$	$7,4 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1$
РГПУ-260	$6,5 \pm 0,3^*$	$7 \pm 0,6$	$6,3 \pm 0,8\#$	$6,2 \pm 0,9\#$	$5,6 \pm 1\#$
РГПУ-261	$7,5 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,6$	$6,9 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,9\#$	$6,7 \pm 1$

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая физиологический раствор; * - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор ($p < 0,05$).

Смертность при острых НМК является интегрированным показателем поражения головного мозга и, соответственно, уменьшение смертности, неврологического, поведенческого (двигательного и ориентировочно-исследовательского), когнитивного дефицита может расцениваться как защитное терапевтическое действие исследуемых веществ.

Протективное действие соединения РГПУ-260 при ишемии головного мозга также отчетливо проявилось в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ.

Так двигательная активность животных группы контроль-ишемия в тесте ОП также была снижена относительно группы ложнооперированных животных, а в группе, получавшей РГПУ-260, была лишь незначительно ниже, чем у ЛО и достоверно превосходила показатели контрольной группы (табл.23). Соединения РГПУ-181 и РГПУ-261 повышали двигательную активность животных после окклюзии ОСА, но не влияли на их исследовательское поведение.

Таблица 23

Показатели животных через 72 часа после окклюзии ОСА в тестах ОП, ТЭИ и УРПИ

Группа	ОП		ТЭИ	УРПИ
	Количество пересечённых квадратов	Количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки	Латентный период решения экстраполяционной задачи, с	Латентный период захода в тёмный отсек теста УРПИ, с
ЛО	35,4±3,3	17±1,6*	5,2±0,9*	180*
Контроль-ишемия	18,8±0,6*	8±1	114,5±26,4	58,8±20,2
РГПУ-176	20±2,7	10,1±1,3	94,1±16,3	68,8±18,2
РГПУ-178	19,3±2,2	8,5±1,4	99,6±22,3	81,2±20
РГПУ-179	18,2±3	9±1,6	104,2±22,3	66,2±17,2
РГПУ-180	22±1,7	8,6±1,3	101±18,4	86,4±19,9
РГПУ-181	24,2±2,4	10,5±1,1	92±20,2	76,1±22,1
РГПУ-260	27,9±1,3#	11±1,7*	80,9±19,6*	111,7±16,2*
РГПУ-261	23,4±2	7±1	93,8±21,8*	90,4±20,4*

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных.

При оценке когнитивно-мнестических функций животных на третьи сутки после окклюзии ОСА было отмечено, что крысы контрольной группы не могли решить экстраполяционную задачу или им требовался больший промежуток времени, чем группе ЛО, тогда как животные, получавшие РГПУ-260, значительно быстрее решали данную задачу (табл.23).

Результаты проведенного исследования показали, что уровень МК после ОСА у животных контрольной группы (2,52 у.е.) был достоверно ниже, чем ЛО (4,6 у.е.) (табл.24). Профилактическое введение соединения РГПУ-260 способствовало сохранению МК на более высоком уровне ($3,54 \pm 0,18$ у.е.) по сравнению с таковым в контрольной группе.

Таблица 24

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение модуляторов эндотелиальной нитрооксидсинтазы животным после двусторонней окклюзии ОСА

Группы животных	Фоновые значения, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	$4,6 \pm 0,2^*$	$36,9 \pm 1,9$	$-38,2 \pm 1$	$43 \pm 1,3$
Контроль -ишемия	$2,52 \pm 0,2$	$17 \pm 0,8$	$-9,6 \pm 0,9$	$39 \pm 1,8$
РГПУ-176	$2,8 \pm 0,4$	$19,1 \pm 1,1$	$-13,4 \pm 1,1$	$44 \pm 1,4$
РГПУ-178	$2,6 \pm 0,3$	$20,3 \pm 1,1$	$-12,3 \pm 1,3$	$41 \pm 1,4$
РГПУ-179	$2,9 \pm 0,3$	$19,6 \pm 0,9$	$-16,8 \pm 1,4$	$42 \pm 1,5$
РГПУ-180	$2,7 \pm 0,3$	$22,8 \pm 1,3$	$-10,9 \pm 0,8$	$40 \pm 1,9$
РГПУ-181	$3 \pm 0,4$	$23,4 \pm 1,2$	$-18,4 \pm 0,9$	44 ± 2
РГПУ-260	$3,54 \pm 0,2^*$	$31,4 \pm 1,7$	$-30,9 \pm 1,7$	$42 \pm 1,5$
РГПУ-261	$2,9 \pm 0,2$	$22,2 \pm$	$-26,4 \pm 1,2$	$39 \pm 1,7$

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

При введении ацетилхолина у ЛО животных наблюдался прирост мозгового кровотока на 36.9% от исходного, у крыс контрольной группы почти в два раза меньше – 17%, а у животных получавших РГПУ-260 при введении ацетилхолина наблюдалось увеличение МК на 31.4% по сравнению с исходными показателями, что выше, чем у крыс контрольной группы 2 (табл.24).

При введении нитро-L-аргинина (блокатора синтеза NO) у ЛО крыс наблюдалось значительное снижение на ($38.2 \pm 1\%$) скорости МК от исходного уровня, у контрольной группы – на $9.6 \pm 0.9\%$, по сравнению с исходными данными (табл.24). В группе животных, получавших РГПУ-260, после введения нитро-L-аргинина наблюдалось наиболее значимое снижение МК (на 30.9%), а у остальных групп этот показатель снижался в меньшей степени – от 10 до 26,4% (табл.24).

Для оценки эндотелийнезависимой вазодилатации животным вводился нитроглицерин. При введении нитроглицерина увеличение МК было статистически сопоставимым во всех экспериментальных группах животных (табл.24).

Таким образом, по совокупности полученных результатов наиболее выраженным церебро- и эндотелиотропным действием среди исследуемых производных мефебута обладает соединение под лабораторным шифром РГПУ-260, имеющее в составе L-аргинин.

3.1.3.2 Изучение зависимости церебро- и эндотелиотропного действия от дозы соединения РГПУ-260

Поскольку по результатам проведенных исследований была выявлена церебро- и эндотелиотропная активность композиции мефебута с L-аргонином (РГПУ-260), то на следующем этапе была изучена зависимость между выраженностью его действия и используемой дозой.

Влияние различных доз РГПУ-260 на выживаемость животных, развитие у них неврологического дефицита состояние МК, ЭЗВД и ЭНВД представлено в табл.25-27.

Таблица 25

Влияние РГПУ-260 в различных дозах на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии ОСА

Группы животных	Доза, мг/кг	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
			6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	-	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	-	20	80	70	50*	40*	30*
РГПУ-260	2,75	10	92	92	83	67	67
	5,5	10	100	83	83	75	75
	11	10	92	83	67	67	67
	22	13	92	75	67	67	67
	33	13	75	67	58	50	50

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% NaCl ($p < 0,05$).

Таблица 26

Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) животных после двусторонней необратимой окклюзии ОСА.

Группа животных	Доза, мг/кг	Время после окклюзии общих сонных артерий				
		6 часов	12 часа	24 часа	48 часа	72 часа
Контроль ишемия	-	8,7±0,3	8,7±0,4	8,9±0,4	9±0,5	9,1±0,5
РГПУ-260	2,75	8±0,4	7,4±0,5	7,4±0,5	7,2±0,6	6,7±0,4
	5,5	7,5±0,5	6,3±0,5	6,0±0,4	6,2±0,5	5,6±0,6
	11	7,5±0,5	7,4±0,7	7,4±0,8	7,2±1	6,6±1,2
	22	6,5±0,5	7±0,7	6,4±0,8#	6,2±1#	5,8±1,2#
	33	7,5±0,4	7,6±0,7	6,9±0,8	6,5±0,9	6,7±1,2

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% NaCl ($p<0,05$).

Таблица 27

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение модуляторов эндотелиальной нитрооксидсинтазы животным после двусторонней окклюзии общих сонных артерий

Группы животных	Доза, мг/кг	Фоновые значения, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
			Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	-	4,8±0,3*	32,5±1,4*	-36,1±1,1*	40±2,1
Контроль ишемия	-	2,52±0,2	17±1,1	-10±1	44±2,6
РГПУ-260	2,75	3,2±0,2	28,4±1,5	-22±1,3	42±2,1
	5,5	3,6±0,2	25,6±1,3	-24±1,1	44±2,2
	11	2,9±0,3	23,2±1,4	-28±1,4	40±2,5
	22	3,5±0,2*	31±1,2*	-30,9±*	42±2,8
	33	2,9±0,2	22±1,1	-26,4±1,5	39±2,9

Примечание:

* - $p<0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

Как видно из приведенных данных, в условиях ишемии головного мозга соединение РГПУ-260 усиливало церебропротекторную активность с уменьшением дозы с 22 мг/кг до 5,5 мг/кг. Последующее уменьшение до 2,75 мг/кг не приводило к усилению его активности. Для дальнейших

исследований наиболее целесообразным представлялось остановить выбор на дозе РГПУ-260 5,5 мг/кг (табл.28, рис.4).

Таблица 28.

Суммарные данные об эффективных дозах, терапевтическом индексе и LD₅₀ соединения РГПУ-260

Шифр соединения	ED ₃₀	ED _{max}	LD ₅₀	ТИ
РГПУ-260	1,8 мг/кг	5,5 мг/кг (↓45%)	503 мг/кг	279

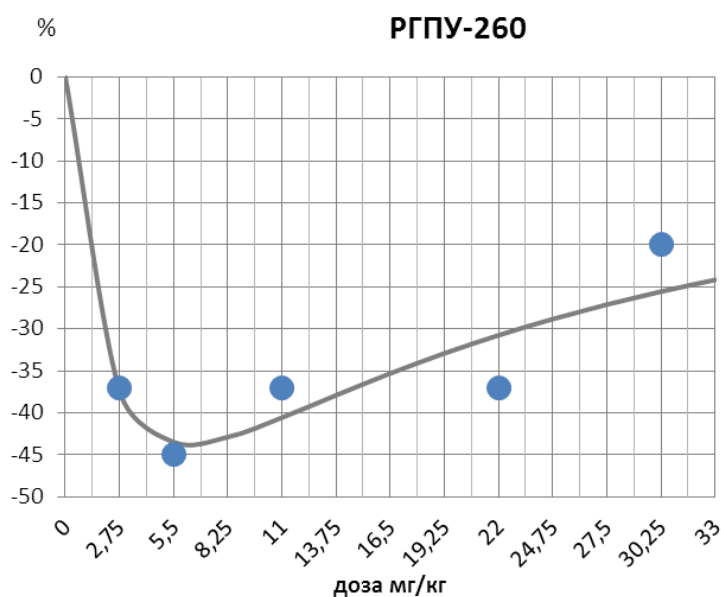


Рис. 4. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединения РГПУ-260

Обозначения:

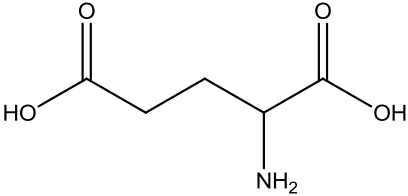
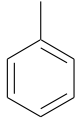
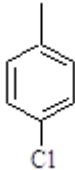
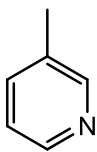
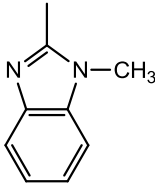
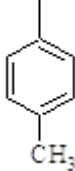
по оси ОХ – исследуемые дозы; по оси ОУ – процент выживших животных

3.2 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием в ряду производных глутаминовой кислоты с гетероциклическими и ароматическими заместителями^{**}.

^{**} Исследование выполнено совместно Н.В. Мaziной

Таблица 29

Структуры производных глутаминовой кислоты с гетероциклическими и ароматическими заместителями в β -положении

Структура	β -заместитель	Шифр соединения
 Глутаминовая кислота		РГПУ-135
		РГПУ-146
		РГПУ-198
		РГПУ-199
		РГПУ-202

3.2.1 Скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности производных глутаминовой кислоты с гетероциклическими и ароматическими заместителями

Данные о динамике гибели животных после билатеральной окклюзии общих сонных артерий представлены в табл.30. Все исследуемые вещества, но в большей степени соединение РГПУ-135, уменьшали гибель крыс после перевязки сонных артерий (табл.30).

Таблица 30.

Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии ОСА

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	85	70	65*	40*	30*
РГПУ-135	20	75	75	70	65	65#
РГПУ-146	10	70	70	60	50	50
РГПУ-198	12	67	67	58	58	50
РГПУ-199	10	70	60	60	50	50
РГПУ-202	20	75	70	65	60	60

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

При анализе неврологических нарушений по шкале McGraw было отмечено, что у животных контрольной группы в условиях моделируемой ишемии головного мозга отмечалось нарастание неврологического дефицита к концу вторых суток ($7,8\pm 0,8$), который сохранялся и через трое суток наблюдения (табл.31). У данной группы животных после моделирования патологии наблюдались маневные движения, парезы одной из конечностей, односторонний и двусторонние блефароптозы, тремор. На протяжении последующих двух суток неврологический дефицит у них практически не менялся.

Неврологический дефицит (индекс McGraw) у животных, получавших РГПУ-135, нарастал незначительно только в первые 12 часов и, по сравнению с показателями контрольной группы, был существенно ниже на протяжении всего периода наблюдения (табл.31). Среди неврологических симптомов наблюдались преимущественно маневные движения, гиподинамия животного, а также слабость одной или нескольких конечностей.

Таблица 31

Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) животных после двухсторонней необратимой ОСА (неполной ишемии).

Группа животных	Время после окклюзии общих сонных артерий				
	6 часов	12 часа	24 часа	48 часа	72 часа
Контроль	5,9±0,32	6,9±0,47	7,3±0,71	7,8±0,77	7,8±0,93
РГПУ-135	4,8±0,7#	4,7±0,7#	5±0,8#	5,1±0,8#	4,9±0,9#
РГПУ-146	5,5±0,4	5,4±0,5	5,4±0,5	5,5±0,6	5,5±0,6
РГПУ-198	5,9±0,4	6,1±0,5	6±0,5	5,9±0,6	5,8±0,5
РГПУ-199	5,7±0,4	5,9±0,5	5,8±0,5	5,7±0,6	5,6±0,4
РГПУ-202	5,3±0,5	6±0,5	6,1±0,7	6,2±0,6	5,9±0,4

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Как уже ранее отмечалось, неврологический дефицит и изменения в поведенческом статусе животных с острой ишемией головного мозга отражают тяжесть нарушений, вызванных недостаточностью кровообращения. При билатеральной окклюзии ОСА крыс соединение РГПУ-135 оказывало выраженное церебропротективное действие, о чем свидетельствовало сохранение показателей психоневрологического статуса: двигательной, суммарной ориентировочно-исследовательской активности, а так же способности к решению экстраполяционной задачи. Так в тесте ОП показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в группе животных, получавших РГПУ-135, составляли $17,6\pm0,8$ $11,9\pm1,1$, и достоверно отличались от показателей группы контроль-ишемия ($6,7\pm1,1$).

При исследовании мнестической функции животных было установлено, что введение соединения РГПУ-135 улучшало сохранность памятного следа при экспериментальной ишемии мозга. Так как при воспроизведении теста УРПИ латентный период захода в темный отсек у животных выше указанной группы составил $138\pm11,9$ с, что сопоставимо с таковым в группе ЛО и значительно продолжительнее, чем у группы контроль-ишемия (табл.32). Кроме того, на фоне введения РГПУ-135

показатель скорости воспроизведения навыка подныривания в тесте ТЭИ у животных составил $89,4 \pm 17,4$ с и достоверно отличался от аналогичного у животных негативного контроля ($148,7 \pm 18,7$).

Таблица 32.

Показатели животных после ОСА в тестах ОП, ТЭИ и УРПИ.

Группа	ОП		ТЭИ	УРПИ
	Количество пересечённых квадратов	Количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки	Латентный период решения экстраполяционной задачи, с	Латентный период захода в тёмный отсек теста УРПИ, с
ЛО	$25 \pm 1,1^{**}$	$23,5 \pm 1,2^{**}$	$4,8 \pm 0,55^{**}$	180^{**}
Контроль-ишемия	$6,7 \pm 1,1$	$6 \pm 0,9$	$148,7 \pm 18,7$	$41,3 \pm 11,3$
РГПУ-135	$17,6 \pm 0,8^{*}$	$11,9 \pm 1,1^{*}$	$89,4 \pm 17,4^{*}$	$138 \pm 11,9^{*}$
РГПУ-146	$17,2 \pm 1,1$	$9 \pm 0,4$	$111,1 \pm 21,1$	$98 \pm 13,4$
РГПУ-198	$12,9 \pm 1,6$	$8,3 \pm 0,6$	$121 \pm 18,2$	$104,8 \pm 17,2$
РГПУ-199	$15,3 \pm 1,5$	$10,1 \pm 0,5$	$112 \pm 21,2$	$88 \pm 19,3$
РГПУ-202	$12,1 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,6$	$130 \pm 17,4$	108 ± 27

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; ** - $p < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

Перевязка ОСА у крыс приводила к значительному снижению уровня мозгового кровотока. Так у животных группы негативного контроля через 72 часа после ОСА уровень локального мозгового кровотока был достоверно ниже в 1,82 раза, чем в группе ЛО (табл.33). При этом у крыс контрольной группы наблюдалось менее выраженное увеличение кровотока на введение ацетилхолина и менее выраженное его снижение при введении нитро-L-аргинина в сравнении с ЛО животными, тогда как введение нитроглицерина вызывало сопоставимые изменения у животных всех исследуемых групп, что свидетельствует о сохранении независимого от состояния эндотелия и реализуемого при участии гуанилатциклазы миогенного механизма дилатации сосудов (табл.33).

Таблица 33

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина у животных после двусторонней окклюзии ОСА.

Группы животных	Фоновые значения. у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,10±0,13*	30%	-34%	34%
Контроль Ишемия	2,25±0,2	7%	-11%	38%
РГПУ-135	2,93±0,18	20%	-30%	40%
РГПУ-146	2,51±0,5	16%	-13%	40%
РГПУ-198	2,6±0,6	18%	-13%	39%
РГПУ-199	2,36±0,3	14%	-17%	40%
РГПУ-202	2,45±0,4	13%	-18%	42%

Примечание:

* - $p \leq 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных

У животных, профилактически однократно получавших РГПУ-135, МК был, соответственно, на 30,2% выше, чем у животных группы негативного контроля. При оценке ЭЗВД путем введения ацетилхолина животным установлено, что прирост кровотока у крыс, получавших данное соединение, был более выраженный по сравнению с аналогичным у контрольных животных (табл.33).

Таким образом, введение фенильного производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135) в большей мере, чем другие ее производные, оказывало церебро- и эндотелиопротективное действие, снижая степень неврологического дефицита и выраженность мнестических и когнитивных нарушений, улучшая функциональное состояние эндотелиальной системы.

3.2.2 Изучение зависимости церебро- и эндотелиотропного действия от дозы соединения РГПУ-135.

Суммарные данные о выживаемости животных и развитию у них неврологических нарушений представлены в табл.34 и табл.35.

Таблица 34

Влияние РГПУ-135 в разных дозах на выживаемость животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Группа животных	Доза, мг/кг	N	Выживаемость (%) животных после окклюзии ОСА				
			6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	-	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	-	20	75	70	60	40	30
РГПУ-135	13	20	80	75	65	55	45
	26	20	75	75	70	65	65
	52	20	80	65	55	45	40
	78	20	80	60	50	40	40

Примечание:

n – количество животных в группе; N – количество выживших животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО группой ($p<0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p<0,05$).

Таблица 35

Балл неврологического дефицита по шкале McGraw у животных после необратимой окклюзии сонных артерий на фоне однократного профилактического введения РГПУ-135 ($M\pm m$)

Группа животных	Доза, мг/кг	Время после необратимой окклюзии ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	-	5,9±0,63	6,9±0,53	7,3±0,56	7,8±0,64	7,8±0,79
РГПУ-135	13	5,2±0,62	6±0,61	6,1±0,71	6,8±0,7	7,2±0,72
	26	4,8±0,71	4,7±0,74 [#]	5±0,79 [#]	5,1±0,84 [#]	4,9±0,88 [#]
	52	4,8±0,68	6,2±0,7	6,4±0,79	7,0±0,8	6,8±0,92
	78	4,8±0,61	6,4±0,75	6,7±0,79	7,2±0,8	6,8±0,91

Примечание: # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p<0,05$).

Применение соединений РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг к концу 3-их суток достоверно уменьшало гибель крыс после перевязки ОСА по сравнению с контрольной группой животных на 35% (табл.34). Введение животным РГПУ-135 в дозах 13, 52 и 78 мг/кг оказывало менее выраженное протекторное действие.

При оценке неврологического статуса у животных группы контроль-ишемия (негативный контроль) в условиях моделируемого НМК отмечался постепенный рост неврологического дефицита с 5,9±0,63 (через 6 часов) до 7,8±0,64 балла (через 48 часов), который сохранялся в последующем до конца третьих суток наблюдения (табл.35). На фоне однократного профилактического введения соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг

выраженность неврологического дефицита у животных была наименьшей по сравнению с крысами, получавшими другие исследуемые дозы (13, 52, 78 мг/кг) данного соединения и физиологический раствор (группа контроля-ишемия) (табл.35).

Таким образом, профилактическое введение животным соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг уменьшает степень неврологических нарушений после необратимой окклюзии ОСА.

На фоне введения РГПУ-135 (26 мг/кг) уровень МК у животных после окклюзии ОСА сохранялся на более высоком уровне по сравнению с животными контрольной группы (табл.36).

Таблица 36

ЭЗВД и ЭНВД у животных через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий

Группа	Доза, мг/кг	МК (у.е) исходный	Прирост кровотока (в %) на введение		
			Ацетилхолина	N-L-аргинин	Нитроглицерина
ЛО	-	4,11±0,21	28±2,6	-34%±1,2	39,9±3,6
Контроль-ишемия	-	2,25±0,24*	6±2,8*	-11%±1	38±2
РГПУ-135	13	2,59±0,15	6,81±1,28	-22%±1,3	35,3±2,0
	26	2,93±0,18#	21,8±1,28#	-28%±1,4	40±2,3
	52	2,64±0,18	8,4±2,2	-19%±1,5	36,1±2,0
	78	2,62±0,15	6,5±1,6	-16%±1,2	37,8±1,4

Примечание:

МК – мозговой кровоток; *,# – $p < 0,05$ – различия достоверны соответственно по сравнению с ложнооперированными (ЛО) или контрольной группой животных.

При оценке ЭЗВД путем введения ацетилхолина установлено, что прирост кровотока у крыс, получавших исследуемое соединение РГПУ -135 в дозе 26 мг/кг, был более выраженным по сравнению с аналогичным у контрольных животных. В группах, получавших соединение РГПУ-135 в дозах 13 мг/кг, 52 мг/кг, 78 мг/кг, и у контрольной группы введение ацетилхолина вызывало значительно меньший прирост кровотока (табл.36). Полученные данные, позволяют считать, что при необратимой билатеральной окклюзии ОСА снижается синтез NO и его выброс, стимулированный введением ацетилхолина.

Введение нитроглицерина вызвало увеличение МК, сопоставимое у всех крыс, что свидетельствует о сохранности эндотелийнезависимого механизма вазодилатации.

Таким образом, среди производных глутаминовой кислоты с гетероциклическими производными для дальнейшего исследования было выбрано РГПУ -135 в дозе 26 мг/кг.

3.3 Поиск веществ с церебро - и эндотелиотропным действием в ряду производных амидов бензойной кислоты.

Производные бензойных кислот используются для создания лекарственных препаратов с 1827 года, когда впервые из коры ивы был выделен гликозид салицин, из которого в последующем в 1869 году была синтезирована ацетилсалициловая кислота (аспирин). Аспирин достаточно давно и с успехом как антиагрегант применяется при вторичной профилактике ишемического инсульта. В ходе прямых сравнительных исследований были получены доказательства одинаковой эффективности малых, средних и высоких доз аспирина у больных с перенесенным инсультом или преходящим нарушением мозгового кровообращения [Лагута П. С., 2003]. В ходе двух крупных исследований CAST и IST, включавших более 40 тыс. больных, была подтверждена целесообразность использования аспирина при лечении острого ишемического инсульта [Лагута П. С., 2003], его немедленное назначение позволяет снизить риск повторного нефатального инсульта.

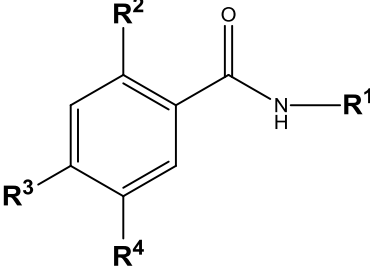
Производные бензойных кислот нашли свое применение в различных областях медицины, так, например, на их основе были разработаны: антагонист ванилоидного рецептора, предназначенный для профилактики и лечения заболеваний, связанных с активностью transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1), в том числе острой и хронической боли, нейродегенерации, инсульта, диабетической нейропатии [Ким Сун-Янг, 2012]; препарат для лечения заболеваний, обусловленных персистирующим

ангиогенезом [Хут А., 2009], злокачественных новообразований [Стоукс Э.С.Э., 2009]; для лечения и профилактики предсердных аритмий, как, например, мерцание предсердий (мерцательная аритмия) или трепетание предсердий (предсердное трепетание)[Брендель Й., 2008]; противорвотное средство [Ильин Л.А., 2003].

Однако учитывая, что введение в структуру одного биологически активного соединения другого может повысить активность вновь синтезированного соединения, расширив его спектр действия, увеличив биодоступность, снизив токсичность, уменьшив число и выраженность побочных эффектов исходных средств [Тюренов И.Н., 2007, 2010; Бородкина Л.Е. , 2009; Перфилова В.Н. , 2011; Самоутруева М.А., 2012]. В этой связи были синтезированы новые амиды бензойной кислоты, в состав которых входили ГАМК (C5, C18, C38, C39), глицин (C9, C10, C22, C23, C24, C40) или различные ароматические заместители (C4, C14, C37) (табл.37).

Таблица 37

Структуры исследуемых соединений

Амиды бензойной кислоты					
					
Шифр соединения	Доза, мг/кг	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
C5	8	CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	OH	H	H
C18	8	CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	H	H	OH
C38	9	CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOLi	H	CH ₃ (O)CO	H
C39	10	CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOK	H	CH ₃ (O)CO	H
C9	8	CH ₂ COONa	NaO	H	H
C10	9	CH ₂ COONa	H	CH ₃ (O)CO	H
C22	9	CH ₂ COOK	H	KO	H
C23	7	CH ₂ COOLi	H	LiO	H
C24	9	CH ₂ COOK	KO	H	H
C40	9	CH ₂ COOK	H	CH ₃ (O)CO	H
C4	8	C ₄ H ₈ O	H	NaO	H
C14	7	C ₄ H ₈ O	H	LiO	H
C37	8	C ₄ H ₈ O	H	H	NaO

3.3.1 Скрининг церебро - и эндотелиопротекторной активности производных амидов бензойной кислоты.

При моделировании церебральной ишемии у крыс путем билатеральной окклюзии сонных артерий введение соединений под лабораторными шифрами С4, С9, С18, С36, С38, С40 уменьшало количество летальных исходов на фоне неполной ишемии головного мозга, однако их эффективность была не одинакова. Наиболее выраженным защитным эффектом обладали соединения С40, С18 (табл.38). Так первые летальные исходы в данных группах были зафиксированы в промежутке между 24 и 48 часами, и к 72 часу наблюдения показатель летальности возрастал лишь до 15% и 20 % соответственно, что достоверно ниже по сравнению с группой контроля, аналогично получавшей эквивалентный объем физиологического раствора.

Таблица 38.

Влияние производных хиназолина на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	30	93	70	57*	47*	33*
С4	20	90	80	80	70	70
С5	20	100	90	70	50	40
С9	20	85	80	70	65	60
С10	20	80	75	70	55	50
С14	20	70	60	60	50	50
С18	20	100	100#	90#	90#	80#
С22	20	100	90	80	70	50
С23	20	100	50	50	40	30
С24	20	100	100	80	60	40
С36	20	100	90	75	70	60
С37	20	90	60	40	40	40
С38	20	95	90	75	70	65
С39	20	60	50	40	40	40
С40	20	100	100#	95#	90#	85#

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Оценка влияния изучаемых соединений на степень выраженности неврологического дефицита животных позволила установить, что исследуемые соединения в разной степени снижали выраженность неврологического дефицита у животных с неполной ишемией головного мозга (табл.39). Так, по результатам подсчета индекса McGraw, наиболее положительная динамика наблюдалась в группах, получавших исследуемые соединения C40>C18>C4 (достоверно относительно контроля при $p<0,05$).

Таблица 39.

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА.

Группы животных	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	8,5±0,3	9±0,3	9,4±0,2	9,4±0,2	9,4±0,2
C4	7,4±0,4	6,9±0,6#	7±0,5#	6,6±0,7#	6,4±0,8#
C5	8±0,2	8±0,4	8,6±0,3	8,6±0,5	8,6±0,5
C9	8,5±0,2	8,2±0,4	8,1±0,4	8,1±0,4	7,7±0,5
C10	8,0±0,5	8,0±0,5	8,1±0,5	8,5±0,6	8,1±0,8
C14	8±0,4	8±0,4	8,1±0,4	8,5±0,4	8,1±0,5
C18	7,2±0,4#	6,7±0,4#	6,7±0,5#	6,4±0,6#	6±0,7#
C22	8,1±0,4	8,3±0,3	7,8±0,5	7,7±0,6	7,6±0,8
C23	7,3±0,5	9,3±0,3	8,9±0,4	8,9±0,5	8,7±0,7
C24	8±0,3	8,4±0,2	8,3±0,4	8,9±0,3	9,3±0,3
C36	7,4±0,2	8,1±0,3	8,5±0,3	8,6±0,3	7,9±0,6
C37	8,2±0,4	9±0,3	9,5±0,2	9,5±0,2	8±0,8
C38	8,1±0,2	8,2±0,2	8,5±0,3	8,3±0,3	8,2±0,4
C39	9,1±0,3	9,3±0,3	9,5±0,2	9,5±0,2	8,3±0,7
C40	7,1±0,2#	6,5±0,2#	5,8±0,3#	6±0,4#	5,3±0,6#

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Исследование нарушений поведенческих и когнитивных функций животных проводилось через 72 часа после окклюзии ОСА с помощью стандартных психотропных тестов «открытое поле», «условный рефлекс пассивного избегания» и «тест экстраполяционного извлечения».

Исследуемые соединения оказали позитивное влияние на показатели двигательной и исследовательской активности, т.е. уменьшали двигательный и когнитивный дефицит у ишемизированных животных. Соединения с лабораторными шифрами C40 и C18 наиболее значимо повышали

двигательную и исследовательскую активности (рис.5). Наименьшую эффективность в данном тесте проявляли соединения C5, C23, C37, C39.

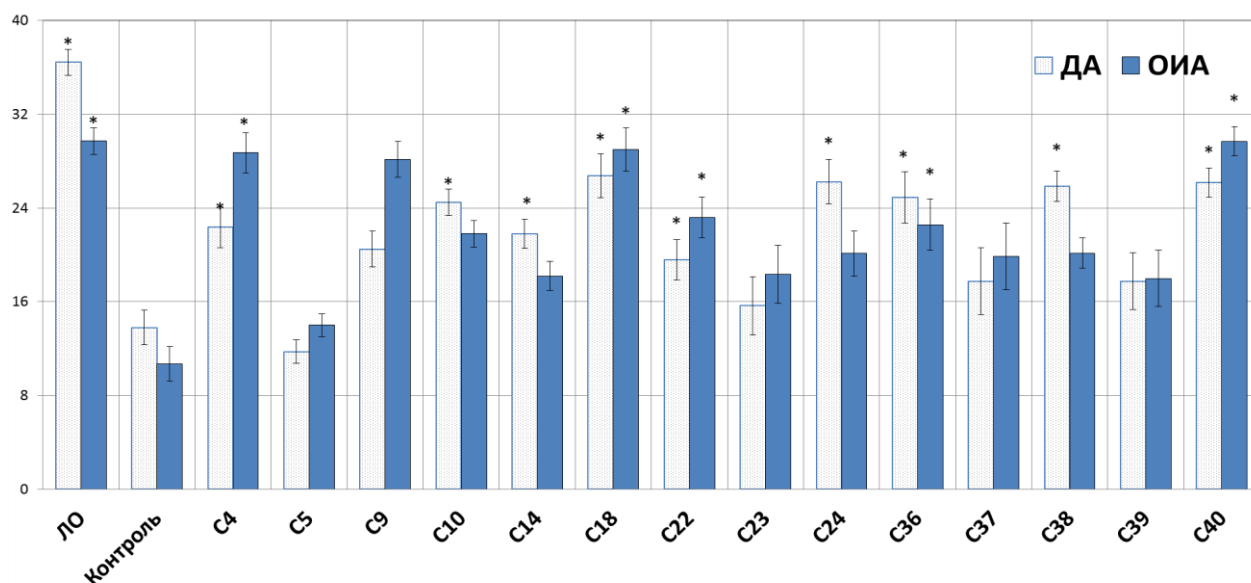


Рис. 5. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после окклюзии общих сонных артерий (ОСА).

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

При анализе сохранности мнестической функции оперированных животных, получавших исследуемые соединения, в тесте решения задачи экстраполяционного избавления выявлено, что введение соединений C40, C18, C4 приводило к сохранению памятного следа у животных после окклюзии ОСА (рис.6). Другие соли амидов бензойных кислот (C5, C14, C22, C23, C37, C39) не оказывали статистически значимого влияния на этот параметр.

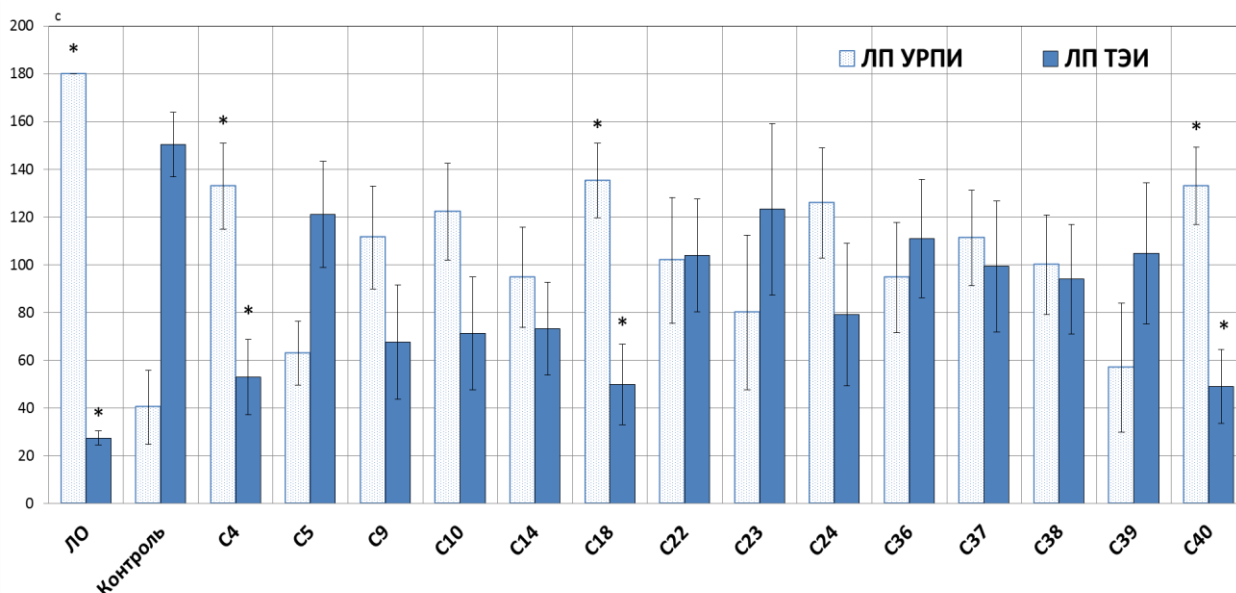


Рис. 6. Латентный период подныривания (ЛП) животных с ОСА в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; ЛП в ТЭИ – латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ; * - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Таким образом, в результате проведенной оценки влияния амидов бензойных кислот на психоневрологический статус лабораторных животных с неполной ишемией головного мозга, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерии, было установлено, что соединения в разной степени влияют на степень выраженности неврологического дефицита и способствуют сохранению двигательной и мнестической функции у животных с ишемией головного мозга. По общей картине исследуемые соединения С40, С18, С4 обладают большим протективным действием, проявляющимся в достоверном снижении гибели животных после окклюзии ОСА и в нивелировании неврологического дефицита и улучшении психоневрологического статуса.

Также было проведено исследование уровня локального мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии оперированных крыс через 72 часа после создания ишемии головного мозга и тестирование эндотелийзависимой вазодилатации.

Уровень локального мозгового кровотока контрольной группы животных в момент регистрации был достоверно ниже, чем в группе ложнооперированных животных почти в два раза.

Интенсивность локального мозгового кровотока и реакция на введение модификаторов оксида азота (ацетилхолина и Нитро-L-аргинина) была значительно выше у животных, получавших исследуемые соединения С40, С18 и чуть в меньшей степени С4, относительно наблюдаемого в группах негативного контроля (табл.40).

Таблица 40.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии ОСА.

Группы животных	Исходный МК. у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,44±0,19	23,2±1,9	-24,9±1,69	43,3±1,88
Контроль-ишемия	2,33±0,32*	10,6±1,8*	-14,2±0,77*	42,8±1,92
С4	3,23±0,22#	26,1±2,1#	-20±0,84	47,7±2,61
С5	2,34±0,31	12,6±0,7	-15,3±0,67	47,4±1,70
С9	3±0,28#	18,7±1,2	-14,8±1,67	46,1±1,39
С10	2,69±0,72	16,1±2,3	-17,5±1,45	46,3±2,09
С14	2,73±0,61	15,4±3,1	-16,8±1,76	45,4±2,08
С18	3,34±0,23#	21,7±1,9#	-24,1±1,46#	41,2±2,20
С22	2,85±0,29	19,3±3,7	-16±1	43,1±1,69
С23	2,44±0,36	13,2±1,7	-15,8±1,78	40±2,52
С24	2,55±0,67	14,1±1,9	-15,1±0,99	45,3±2,36
С36	2,88±0,52	18,7±1,4	-14,7±1,75	41,2±3,14
С37	2,78±0,81	13,4±1,0	-13,5±1,23	40,4±2,86
С38	2,63±0,76	17,0±1,9	-19,3±1,68	42,4±2,09
С39	2,34±0,47	11,4±0,7	-15,8±1,12	48±1,73
С40	3,54±0,74#	25,8±1,4#	-24,4±0,86#	40,6±1,61

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - $p \leq 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

Таким образом, было изучено 13 амидов бензойной кислоты, при этом 4 из них имели ГАМК остаток, 6 – глицин, 3 –ароматические заместители. В каждой из подгрупп найдены соединения, оказывающие выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие. Так среди ГАМК производных наиболее перспективным оказалось соединение С18, имеющее в R¹ –

положении остаток ГАМК, а в R^4 – гидроксильную группу. Следует отметить, что перемещение радикала OH в R^2 положение (соединение C5) приводило к исчезновению церебропротекторных свойств у вещества. К повышению активности веществ не приводило и введение в структуру ГАМК-остатка молекул K (C39) или Li (C38).

Среди соединений, содержащих остаток глицина в структуре (C9, C10, C22, C23, C24, C40), наиболее выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами обладало соединение C40. Наиболее близкое по структуре к C40 – соединение C10, которое в отличие от C40 в глициновом остатке содержало Na, а не K, значительно уступало по эффективности соединению C40.

Среди амидов бензойной кислоты с гетероциклическими радикалами (C4, C14, C37) наиболее активным оказалось соединение C4, имеющее в R^1 C_4H_8O и в R^3 Na-O радикалы. Перемещение Na-O в R^4 (C14) или его замена на Li-O (C37) приводило к ослаблению церебропротекторных свойств веществ.

Таким образом, среди производных амидов бензойных кислот наиболее выраженным церебро- и эндотелиопротективным действием обладали соединения C40, C18, C4. В связи с чем, у данных веществ была проанализирована зависимость выраженности их протективного действия от используемой дозы.

3.3.2 Изучение зависимости церебро- и эндотелиотропного действия от дозы соединений C4, C18, C40.

Для анализа зависимости доза-эффект первоначальные дозы исследуемых соединений были увеличены и уменьшены в 2 и 4 раза и составили для соединений C4 и C18 от 2 до 16 мг/кг, для соединения C40 от 2,25 до 18 мг/кг.

Результаты оценки влияния различных доз соединений C4, C18, C40 на выживаемость животных после ОСА и степень выраженности

неврологического дефицита ишемизированных животных представлены в табл.41, табл.42, влияние различных доз соединений С4, С18, С40 на сохранность МК и состояние ЭЗВД и ЭНВД у животных после ОСА – в табл.43.

Таблица 41.

Влияние соединений С4, С18, С40 на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	Доза, мг/кг	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
			6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	-	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	-	20	90	75	55	50	35
С4	2	12	92	83	67	58	67
	4	12	92	83	83	75	75
	8	12	83	83	83	75	67
	16	12	83	75	67	58	50
С18	2	12	83	83	75	75	67
	4	12	92	92	92	83	83
	8	12	92	92	83	83	83
	16	12	92	83	75	67	58
С40	2,25	12	92	83	83	75	50
	4,5	12	100	100	92	83	83
	9	12	100	92	92	92	83
	18	12	83	67	67	67	58

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Таблица 42.

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА.

Группы животных	Доза, мг/кг	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	-	7±0,3	8±0,3	8,4±0,4	8,5±0,2	8,3±0,2
С4	2,5	7,1±0,3	7,7±0,5	7,9±0,4	8±0,7	6,7±0,5
	5	7±0,3	7,7±0,6	7±0,3	6,5±0,4	6,2±0,6#
	10	7,4±0,4	6,8±0,7	7,1±0,4	6,6±0,6	6,3±0,5#
	20	7,5±0,4	7,9±0,6	8±0,5	8,2±0,7	7,8±0,7
С18	2,5	7,4±0,4	7,1±0,4	7,3±0,4	6,5±0,5	6,4±0,4
	5	7,2±0,3	6,8±0,4	6,3±0,3	6,3±0,6	5,8±0,4#
	10	7,2±0,4#	6,7±0,5	6,8±0,6	6,4±0,5	6±0,7#
	20	7,3±0,4	7±0,5	7,3±0,4	7,5±0,7	7,6±0,4
С40	2,25	7±0,3	7,1±0,6	7±0,3	6,7±0,6	6,5±0,5

	4.5	6,5±0,3	6,5±0,4	6±0,4	6,2±0,5	5,5±0,3#
	9	6,4±0,3	6,6±0,3	5,8±0,3	6±0,5	5,3±0,6#
	18	7,4±0,5	8,2±0,7	8,3±0,6	7,9±0,6	7,7±0,6

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Таблица 43.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии ОСА.

Группы животных	Доза, мг/кг	Исходный МК, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
			Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	-	4,5±0,6	25,1±2,1	-28±1,9	43,3±1,88
Контроль-ишемия	-	2,5±0,4*	13,1±1,6*	-16±1,2*	42,8±1,92
C4	2.5	3±0,5	18,9±1,1	-19,3±1,4	44,1±1,9
	5	3,3±0,4#	23,1±1,4#	-22,3±1,5#	42,9±2,3
	10	3,1±0,4#	21,9±1,7#	-21,3±0,84#	45,7±2,61
	20	2,6±0,5	12,5±0,4	-17,4±1,3	44,8±2,7
C18	2.5	2,9±0,5	16,9±1,4	-18,2±1,3	43±1,9
	5	3,4±0,5#	22,3±1,6#	-25,1±1,6#	42,9±1,6
	10	3,2±0,4#	20,2±1,5#	-22,7±1,3#	44±2,3
	20	2,71±0,4	14,5±1,4	-17,3±1,7	45,2±2,9
C40	2.25	3,0±0,5	18,5±1,3	-21,6±1,5#	43,2±2,1
	4.5	3,7±0,6#	24,1±1,8#	-27,3±1,8#	42,6±1,9
	9	3,5±0,5#	23,1±1,5#	-23,4±0,9#	43,6±1,9
	18	2,75±0,5	15,3±1,8	-17,2±1,9	42,3±1,9

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p<0,05$); # - $p<0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

Было установлено, что C4, C18, C40 при профилактическом введении оказывали достоверно выраженный церебропротекторный эффект, проявляющийся в повышении выживаемости животных, и снижении у них степени выраженности неврологического дефицита, сохранении МК на более высоком уровне, лучшей ЭЗВД.

Таблица 44.

Суммарные данные об эффективных дозах, терапевтическом индексе и LD50 соединений С4, С18, С40

Шифр соединения	ED ₃₀	ED _{max}	LD ₅₀	ТИ
С4	2,5 мг/кг	5 мг/кг (↓40%)	2300 мг/кг	920
С18	2,5 мг/кг	5-10 мг/кг (↓48%)	2800 мг/кг	1120
С40	3мг/кг	4,5-9 мг/кг (↓48%)	2543 мг/кг	847

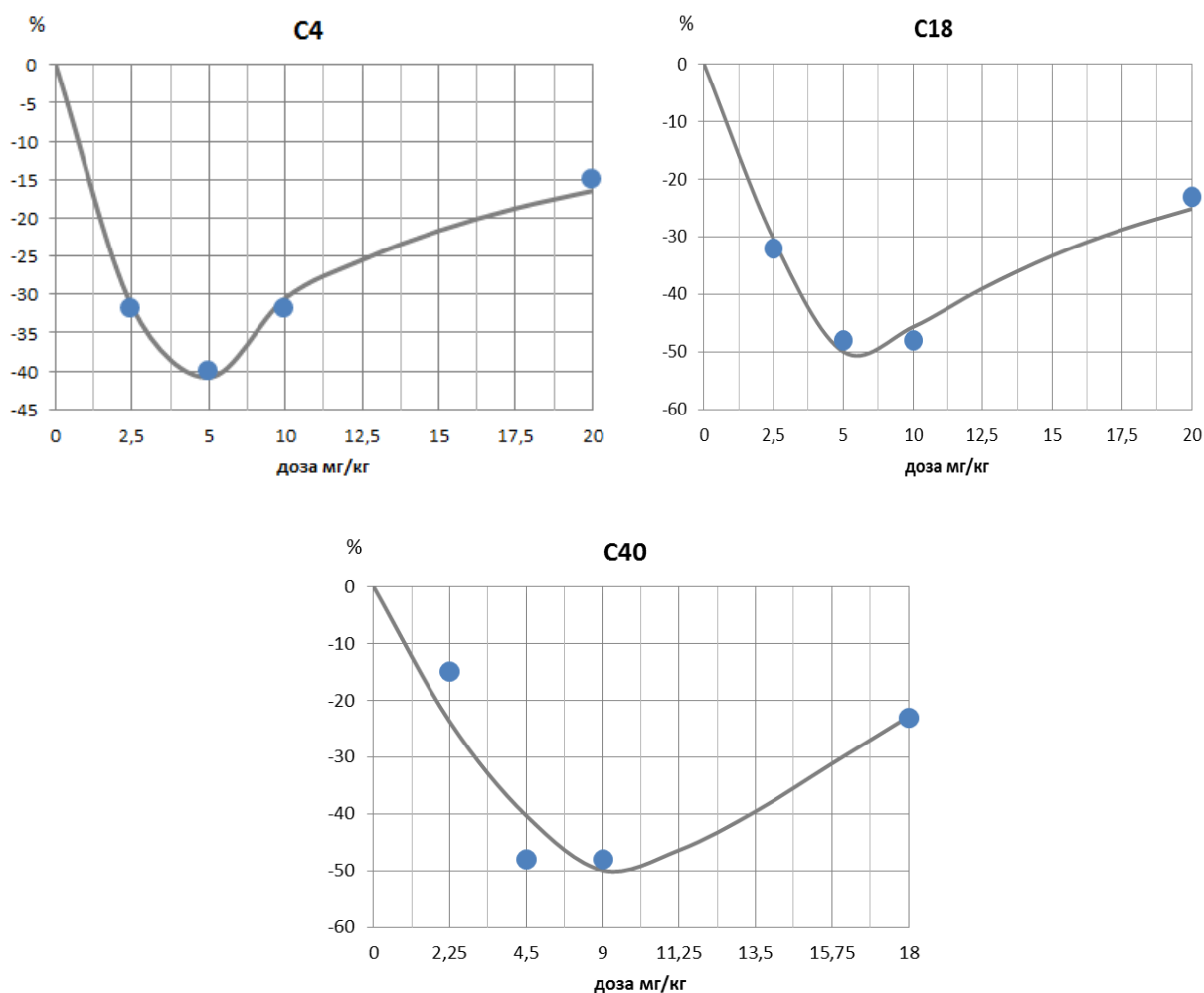


Рис. 7. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединений С4, С18, С40

Обозначения:

по оси ОХ – исследуемые дозы; по оси ОУ – процент выживших животных

При этом, как видно из данных представленных в табл.44 и на рис.7 зависимость церебропротекторного действия у соединения С4 проявлялась в нарастании эффекта в диапазоне доз от 2 мг/кг до 8 мг/кг, достигая максимально выраженного эффекта в дозе 4 мг/кг. Соединения С18 и С40

оказывали сопоставимый эффект, при этом их ED₃₀ составляла соответственно 2 мг/кг и 3 мг/кг, а ED max – от 4 до 8 мг/кг и от 4,5 до 9 мг/кг (табл.44, рис.7).

Для дальнейшего изучения веществ С4, С18, С40 были выбраны их максимально эффективные дозы 4; 4 и 4,5 мг/кг соответственно.

3.4 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием в ряду производных хиназолина.

Природные и синтетические производные хиназолина проявляют разнообразную и выраженную фармакологическую активность (нейротропную, кардиотропную, антибактериальную, противовирусную и др.); они представлены практически во всех классах современных лекарственных веществ [Маттей П., 2006; Берли Р., 2007; Абрахам С., 2014; Алльгайер Х., 2011, 2014; Бембенек С.Д., 2014; Петров В.И., 2014]. Высокая биологическая активность многих производных хиназолинов наряду с разносторонними химическими свойствами самой конденсированной гетероциклической системы позволяют предполагать эффективный поиск инновационных лекарственных средств хиназолиновой природы.

Среди веществ хиназолинового ряда были изучены два ряда соединений: хиназолиновые производные ациланилида и хиназолиновые производные ацилгуанидина (Рис. 8).

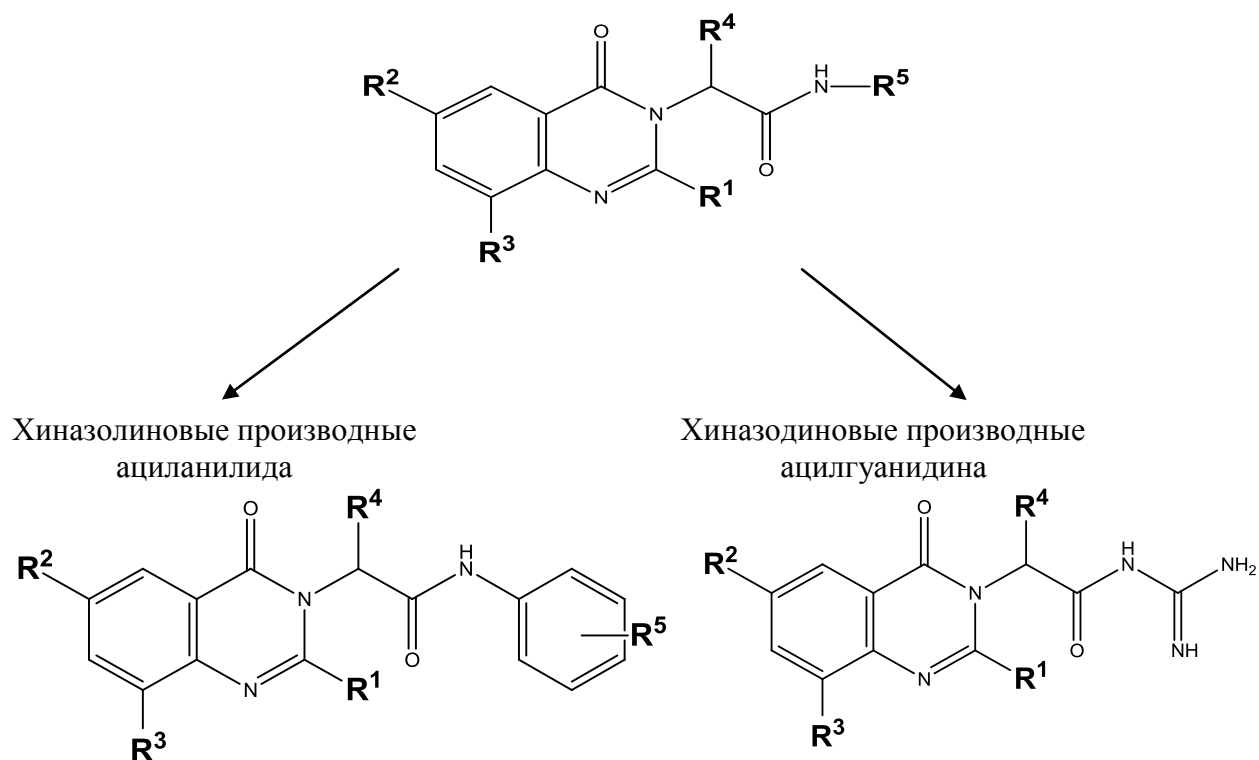


Рис. 8. Химические структуры хиназолиновых производных

3.4.1 Скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности в ряду хиназолинов производных ациланилида.

В рамках данного исследования были изучены 7 новых хиназолиновых производных ациланилида (табл.45).

Таблица 45

Структуры исследуемых соединений						
Хиназолиновые производные ациланилида						
Шифр соединения	Доза, мг/кг	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
VMA10-18	10	H	H	H	H	4-OCH ₃
VMA10-07	10	H	H	H	H	2-CH ₃ , 6-CH ₃
VMA10-19	10	H	H	H	H	2-CH ₃ , 4-NO ₂
VMA10-16	10	H	H	H	H	2,3-фенилен
VMA10-12	10	H	H	H	CH ₃	H
VMA10-15	10	H	H	H	CH ₃	4-CH ₃
VMA10-17	10	H	Br	H	H	2,3-фенилен

3.4.1.1 Поиск веществ с церебро- и эндотелиотропным действием в ряду хиназолиновых производные ациланилида

Первоначально был выполнен скрининг веществ, обладающих церебро- и эндотелиопротекторным действием, при моделировании экспериментально вызванного НМК. Все исследуемые новые производные хиназолины изучались в дозе 10 мг/кг и вводились профилактически однократно за 40 минут до оперативного вмешательства. Далее, определив соединения-лидеры, была проанализирована зависимость выраженности их действия от дозы.

В качестве модели НМК была выбрана перевязка общих сонных артерий (ОСА) у крыс.

Суммарные результаты исследований представлены в табл.46, табл.47 и на рис.9, рис.10. Необратимая билатеральная окклюзия общих сонных артерий к концу 3-х суток приводила к гибели 70 % животных контрольной группы (табл.46), развитию у них неврологического дефицита (средний балл по шкале McGraw $7,63 \pm 0,83$ (табл.47)), нарушению двигательных, ориентировочно-исследовательских и когнитивных функций (рис.9, рис.10)

Таблица 46.

Влияние производных хиназолина на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	90	70	50*	40*	30*
VMA 10-07	10	100	100	80	70	60
VMA 10-12	10	100	100	80	70	60
VMA 10-15	10	90	90	80	80	70
VMA 10-16	10	90	80	70	70	60
VMA 10-17	10	100	90	90	90#	80#
VMA 10-18	10	80	70	60	50	30
VMA 10-19	10	90	90	90	80	70

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

Таблица 47.

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА.

Группы животных	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	6,1±0,5*	6,45±0,84*	6,23±0,88*	7,03±0,84*	7,63±0,83*
VMA-10-07	6,6±0,8	6,40±0,56	5,1±1,2	4,75±1,39	5,3±1,3
VMA-10-12	6,85±0,61	5,45±0,56	5,75±1,1	5,05±1,32	5,9±1,41
VMA-10-15	5,85±1,05#	4,6±0,89#	4±1,21#	4,2±1,16#	4,4±1,24
VMA-10-16	6,9±0,94	4,85±1,13	4,95±1,34	4,7±1,4	4,65±1,48
VMA-10-17	5,1±0,29#	4,45±0,88#	4,45±0,88#	4,1±0,92#	4,25±1,13#
VMA-10-18	6,95±1,03	6,25±1,28	6,15±1,35	5,95±1,36	7,55±1,25
VMA-10-19	6,25±0,95	5,60±0,89	5,1±0,85	4,75±1,03	4,85±1,15

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Производное хиназолина под номерами VMA10-17 и, несколько меньше, VMA10-15 проявили церебропротективную активность, что подтверждалось в достоверно большей, по отношению к негативному контролю, выживаемостью животных (табл.46), меньшим неврологическим дефицитом (суммарный балл неврологического дефицита $4,25\pm1,13$ и $4,4\pm1,24$ соответственно), большей двигательной и ориентировочно-исследовательской активностью, менее выраженной постишемической амнезией у животных (рис.9, рис.10).

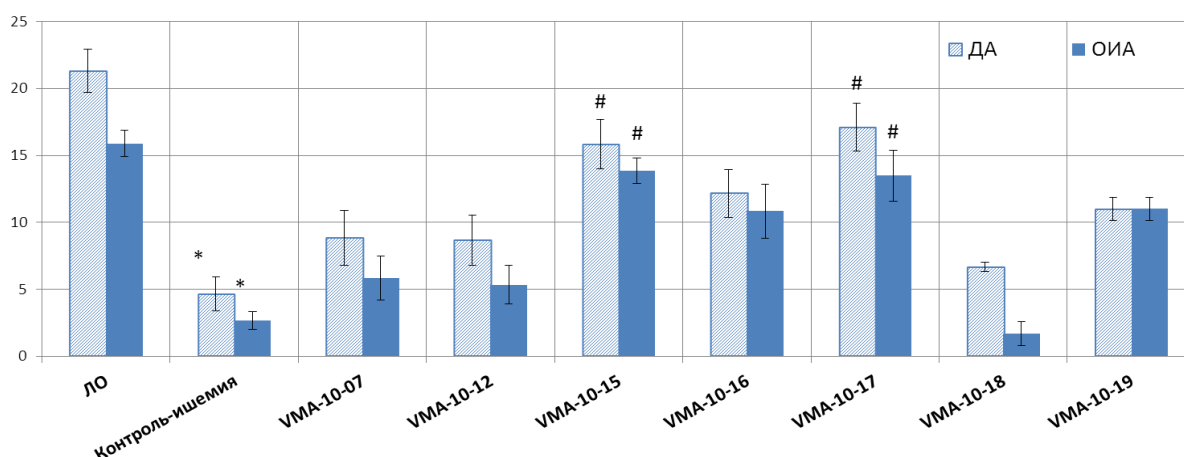


Рис. 9. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после окклюзии общих сонных артерий (ОСА).

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по

отношению к группе ЛО животных ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

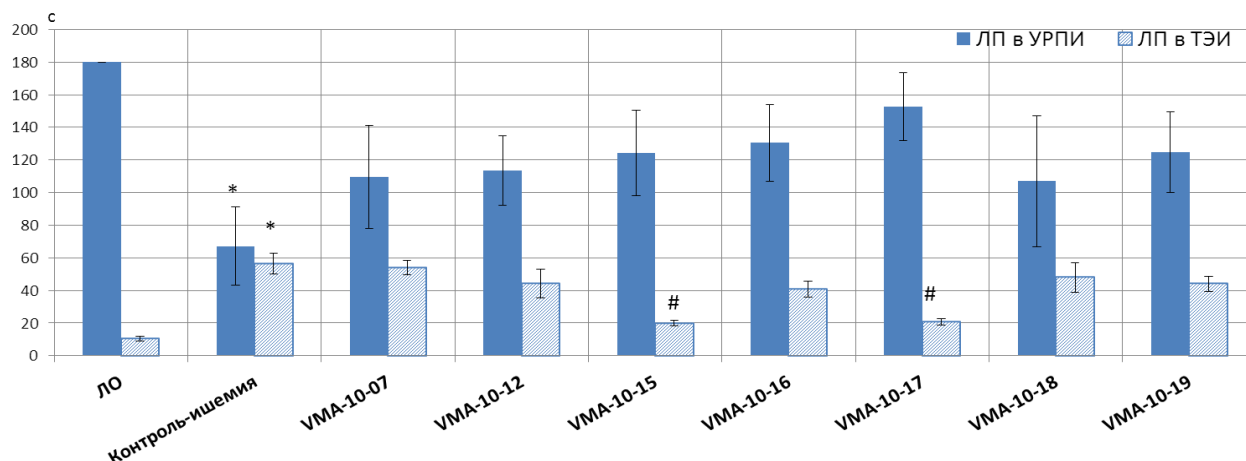


Рис. 10. Латентный период подныривания (ЛП) животных с ОСА в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая физиологический раствор; ЛП в ТЭИ - латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ.

Поскольку одним из механизмов церебропротективного действия веществ в условиях недостаточности мозгового кровообращения может являться следствием положительного влияния на МК, на данном этапе исследований проведен анализ уровня МК через 3 дня после ОСА и вазодилатирующей функции эндотелия по ответу мозгового кровотока на введение модификаторов синтеза оксида азота, как основного мессенджера эндотелиальной системы.

Соизмеримо с выраженностью неврологических отклонений, у животных контрольной группы в сравнении с группой ЛО животных МК был на 46,7% ниже. Введение хиназолинов способствовало его сохранению на более высоком уровне (на 39%, 51% выше показателей группы контроль-ишемия у животных, получавших VMA10-15, VMA-10-17) (табл.48).

Таблица 48.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии ОСА.

Группы животных	Исходный МК, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,26±0,22	26,37±1,42	-32,61±2,66	45,63±3,32
Контроль-ишемия	2,27±0,35*	9,15±0,76*	-12,43±5,71*	43,9±4,05
VMA-10-07	2,49±0,09	12,35±2,22	-16,46±1,66	41,51±2,77
VMA-10-12	2,45±0,17	16,56±1,38	-16,95±1,72	41,93±4,27
VMA-10-15	3,15±0,13#	22,56±2,21#	-12,84±1,72	41,97±3,50
VMA-10-16	2,95±0,14	19,19±2,38#	-7,35±2,67	41,87±3,48
VMA-10-17	3,42±0,17#	22,86±1,22#	-24,36±3,04#	42,37±3,75
VMA-10-18	2,37±0,26	12,59±0,75	-17,10±1,19	46,3±3,44
VMA-10-19	2,40±0,18	17,44±1,47	-18,82±2,57	43,04±2,29

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

Используемый подход в оценке эндотелиальной дисфункции по данным функционирования NO-синтазной активности, включающий регистрацию реакции сосудов мозга на введение ацетилхолина (оценка стимулированной секреции NO) и нитро-L-аргинина (оценка базальной секреции NO), позволил установить, что в условиях недостаточности мозгового кровотока, у животных, получавших VMA10-17, отмечался больший прирост кровотока в ответ на введение как ацетилхолина, так и большее его падение на введение нитро-L-аргинина (табл.48).

Таким образом, введение в общую структуру производного хиназолина (табл.45) брома в положение R^2 и 2,3- фенилена в положение R^5 (соединение VMA10-17); CH_3 в положение R^4 и 4 – CH_3 в положение R^5 (соединение VMA10-15) позволило выделить два вещества, оказывающие в условиях экспериментально вызванного НМК, выраженное церебро - и эндотелиопротекторное действие. Отсутствие брома в положении R^2 , но при сохранении 2,3- фенилена в положение R^5 (соединение VMA10-16) приводило к снижению церебропротекторной активности. Наименьшую активность проявили соединения, имеющие в R^4 - положении группу CH_3 (VMA10-12) и в R^5 -положении группу 4- OCH_3 (VMA10-18). Соединение

VMA10-19, у которого в R⁵ группы 2-CH₃ и 4-NO₂, лишь незначительно по эффективности уступало соединениям лидерам VMA10-15 и VMA10-17.

3.4.1.2 Изучение зависимости церебро - и эндотелиотропного действия от дозы соединений VMA10-15 и VMA10-17

Поскольку в ряду хиназолиновых производные ациланилида были выявлена два соединения (VMA10-15 и VMA10-17), проявившие наиболее выраженные церебро - и эндотелиопротекторные свойства, на следующем этапе была изучена зависимость выраженности их действия от дозы.

Первоначальные дозы исследуемых веществ (10 мг/кг) были увеличены (до 20 мг/кг) и уменьшены (5 мг/кг) в два раза.

Проведенное исследование позволило установить, что церебро - и эндотелиопротекторное действие у соединений VMA10-15 и VMA10-17 наиболее выражены в дозе 10 мг/кг, тогда как введение данных веществ в дозах 5 мг/кг и 20 мг/кг оказалось менее эффективным. Так среди животных, получавших VMA10-15 и VMA10-17 в дозах 10 мг/кг, была отмечена большая выживаемость после ОСА (табл.49), менее выраженные неврологические нарушения (табл.50), более высокие показатели МК и функционального состояния эндотелия по сравнению с животными, получавшими в тех же условиях физиологический раствор (табл.51).

Таблица 49.

Влияние соединений VMA10-15 и VMA10-17 на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии ОСА

Группы животных	Доза, мг/кг	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
			6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	—	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	—	20	80	80	50*	40*	35*
VMA 10-15	5	10	80	70	60	50	50
	10	10	90	90	80	80	70
	20	10	90	80	70	70	60
VMA 10-17	5	10	70	70	60	60	50
	10	10	100	90	90	90#	80#
	20	10	90	80	70	60	60

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Таблица 50.

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА.

Группы животных	Доза, мг/кг	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	—	6,2±0,6*	6,6±0,7*	6,4±0,7*	7,1±0,8*	7,7±0,7*
VMA-10-15	5	6,6±0,7	6,5±0,7	5,9±1,1	6,05±1,5	6,9±1,6
	10	5,85±1,05#	4,6±0,89#	4±1,21#	4,2±1,16#	4,4±1,24
	20	6,9±0,94	5,85±1,3	5,95±1,5	5,5±1,6	5,65±1,48
VMA-10-17	5	6,95±1,03	6,25±1,28	6,15±1,35	5,95±1,36	7,55±1,25
	10	5,1±0,29#	4,45±0,88#	4,45±0,88#	4,1±0,92#	4,25±1,13#
	20	6,5±0,9	5,7±0,9	5,5±1,05	5,6±1,03	5,85±1,15

Примечание:

ЛО – ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Таблица 51.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий.

Группы животных	Доза, мг/кг	Исходный МК, у.е.	Изменения кровотока при введении анализаторов от исходного уровня, в %		
			Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	—	4,4±0,4	28,1±1,5	-35,2±2,8	45,2±3,4
Контроль-ишемия	—	2,3±0,3*	10,1±0,8*	-13,2±4,2*	44,2±4,05

VMA 10-15	5	2, 5±0,4	18,2±1,4	-11,9±2,2	41,3±3,4
	10	3,15±0,13#	22,56±2,21#	-15,84±1,72	41,97±3,50
	20	2,75±0,2	17,2±2,4#	-15,5±2,7	45,2±3, 8
VMA 10-17	5	2,40±0,3	17,1±1,47	-16,3±2, 7	44±2,3
	10	3,42±0,17#	22,86±1,22#	-24,36±3,04#	42,37±3,75
	20	2,57±0,26	14,9±0,75	-16,1±2,2	45,3±2,44

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - $p \leq 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

Как видно из данных, представленных на рис.11, соединение VMA10-15 способно снижать летальность животных после ОСА на 35% в дозе 10 мг/кг, оказывая максимально выраженный эффект. Соединения VMA10-17 снижает количество летальных исходов на 35% в диапазоне доз от 8,4 мг до 17,1 мг/кг, при этом максимально эффективной дозой этого соединения являлась 10 мг/кг, о чем свидетельствовало снижение летальности животных на 45% относительно контрольной группы животных.

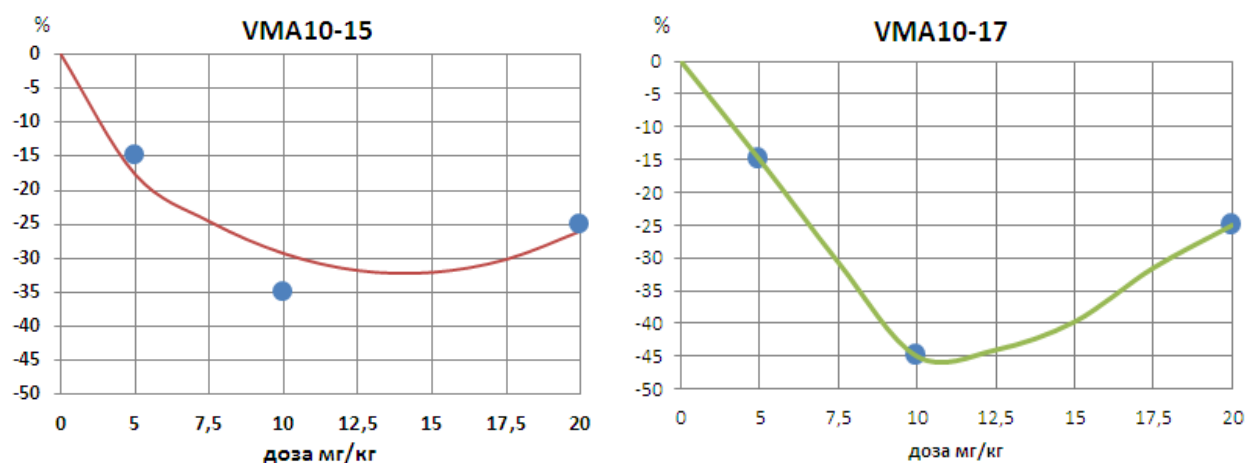


Рис. 11. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединений VMA10-15 и VMA10-17

Обозначения:

по оси ОХ – исследуемые дозы (мг/кг); по оси ОУ – разница выживаемости животных опытных групп по отношению к контрольной группе

Таким образом, целесообразным являлось дальнейшее изучение веществ VMA10-15 и VMA10-17 в дозе 10 мг/кг.

3.4.2 Скрининг церебро - и эндотелиопротекторной активности в ряду хиназолиновых производных ацилгуанидина.

В данном блоке исследований изучены гуанидиновые производные хиназолина, общая формула представлена в табл.52.

Таблица 52

Структуры исследуемых соединений					
Хиназолиновые производные ацилгуанидина					
					
Шифр соединения	Доза, мг/кг	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
VMA13-10	2,5	H	H	H	H
VMA13-15	2,5	H	H	H	CH ₃
VMA13-16	2,5	CH ₃	H	H	H
VMA13-17	3,5	H	Br	H	H
VMA13-21	2,5	H	Br	H	CH ₃
VMA13-22	2	H	Br	Br	H
VMA13-23	3	H	Cl	H	H

3.4.2.1 Поиск веществ с церебро - и эндотелиотропным действием в ряду хиназолиновых производных ацилгуанидина.

Суммарные результаты исследований представлены в табл. 53, табл.54 и на рис.12, рис.13. Из всех исследуемых гуанидиновых производных хиназолина наиболее выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами обладали соединения VMA13-15 и VMA13-17. Данные соединения повышали выживаемость животных после окклюзии ОСА на 58% и 45% по сравнению с контрольной группой животных (табл.53).

Соединение VMA13-23 увеличивало выживаемость животных, снижая выраженность неврологический нарушений и повышая двигательную активность, но при этом практически не влияло на развитие постишемической амнезии у животных после окклюзии ОСА (табл.53, табл.54, рис.13, рис.14).

У животных данных групп неврологический (по шкале McGraw, табл.54) и когнитивный дефицит (рис.13) был наименьшим, а двигательная и ориентировочно-исследовательская активность (рис.12) была выше, чем у группы негативного контроля и сопоставима с таковой у ЛО животных.

Таблица 53.

Влияние производных хиназолина на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА				
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	10	100	100	100	100	100
Контроль-ишемия	20	80	70	55*	40*	30*
VMA13-10	12	92	83	75	58	25
VMA13-15	8	100	88	88	88	88#
VMA13-16	12	92	83	75	75	67
VMA13-17	12	100	92	92#	83#	75#
VMA13-21	10	90	60	60	50	50
VMA13-22	10	100	70	50	50	50
VMA13-23	8	88	75	75	75	63

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

Таблица 54.

Динамика неврологического дефицита (по McGraw) у животных после ОСА.

Группы животных	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	4,5±0,4	5,5±0,5	5,8±0,5	6,2±0,6	6,5±0,6
VMA13-10	4,2±0,9	4,2±1,1	4,3±1,1	6,2±1,2	7,6±1,2
VMA13-15	3±0,9	3,1±1,0#	3,4±1,1#	3,9±1,0#	3,6±1#
VMA13-16	3,1±1	3,8±1	3,9±1,1	4,2±1,1	4,5±1,3
VMA13-17	3,5±0,7	3,6±0,8#	3,7±0,8#	3,8±1,0#	4±1,1#
VMA13-21	3,3±0,9	5,5±1,3	5,5±1,3	5,9±1,4	5,5±1,5
VMA13-22	4,1±1,1	4,5±1,3	5,6±1,5	5,6±1,5	5,6±1,5
VMA13-23	5±1,1	5,1±1,2	4,6±1,2	4,5±1,3	4,7±1,5

Примечание:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО животных ($p<0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$).

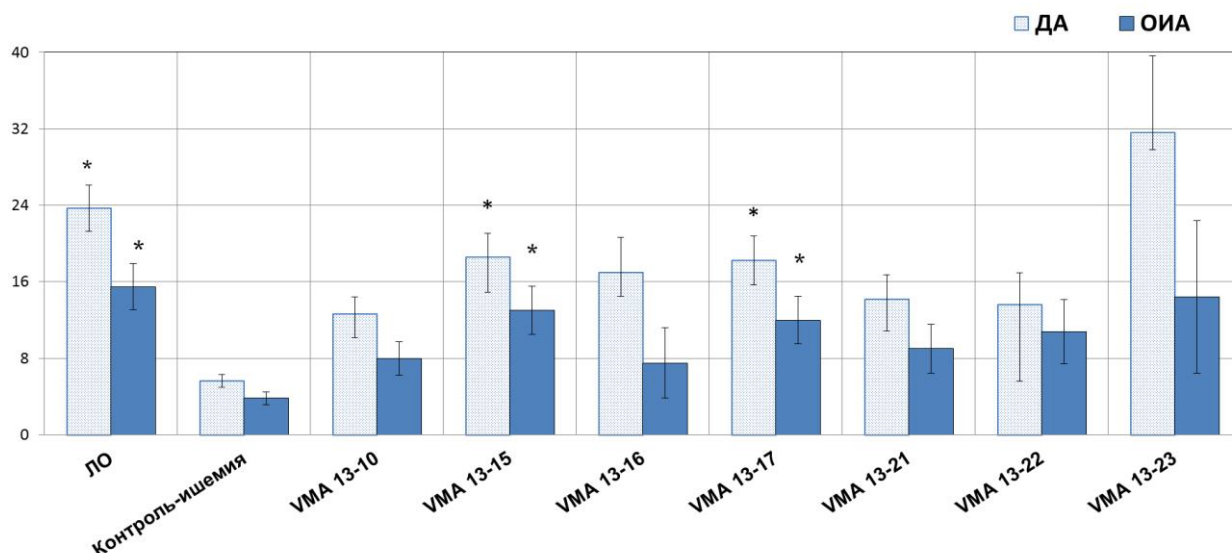


Рис. 12. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после окклюзии общих сонных артерий (ОСА).

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; ДА (двигательная активность) – сумма пересеченных квадратов; ОИА (ориентировочно-исследовательская активность) – сумма заглядываний в норки и стоек; * - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

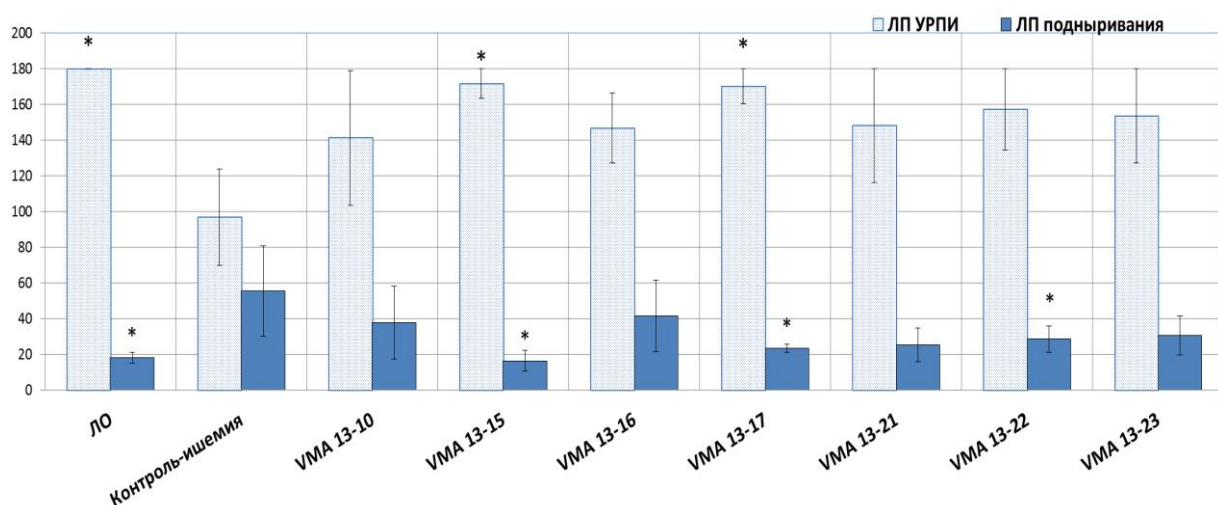


Рис. 13. Латентный период подныривания (ЛП) животных с ОСА в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9% раствор NaCl; ЛП в ТЭИ - латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ.

Учитывая, что выживаемость животных и развитие у них неврологических нарушений напрямую зависит от сохранности адекватного уровня МК, было изучено состояние мозгового кровообращения у выживших

животных после окклюзии ОСА. У животных контрольной группы уровень церебрального кровотока был ниже на 41,9% относительно ложнооперированных животных. Введение хиназолинов VMA13-15, VMA13-17 способствовало его сохранению на более высоком уровне на 43,3%, 47,7% выше показателей группы контроль-ишемия (табл.55).

Таблица 55.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии ОСА.

Группы животных	Исходный МК. у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
		Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,08±0,3	28,87±2,1	-31,72±2	45,63±3,3
Контроль-ишемия	2,37±0,2*	11,16±1,3*	-12,06±2,6*	44,9±3,3
VMA13-10	2,27±0,2	16,74±2,4	-18,86±0,8	43,37±2,6
VMA13-15	3,39±0,3#	22,66±2,0#	-29,9±3,3#	41,93±4,3
VMA13-16	2,86±0,1	17,1±1,7	-18,6±1,7	41,97±3,5
VMA13-17	3,35±0,2#	23,45±1,7#	-26,72±1,4#	41,87±3,5
VMA13-21	2,77±0,3	18,6±	-20,53±1,1	43,04±2,9
VMA13-22	2,78±0,2	17,4±2,4	-16,46±1,5	43,37±2,6
VMA13-23	2,97±0,3	18,65±1,8	-13,76±1,9	41,93±4,3

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - $p \leq 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

При исследовании функционального состояния эндотелия установлено, что в условиях недостаточности мозгового кровотока, у животных, получавших VMA13-15, VMA13-17, отмечался больший прирост кровотока в ответ на введение как ацетилхолина, так и большее его падение на введение нитро-L-аргинина (табл.55).

Таким образом, наиболее перспективными из производных хиназолинов являются соединения VMA13-15 (CH_3 группа в положении R^4), VMA13-17 (бром в положении R^2), которые у животных с экспериментально вызванным нарушением мозгового кровообращения достоверно повышали выживаемость животных, улучшали их психоневрологическое состояние (когнитивные функции, двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность), улучшали вазодилатирующую функцию эндотелия, усиливая как базальную, так и стимулированную выработку оксида азота. Для данных

веществ далее была проанализирована зависимость от дозы их церебро - и эндотелиопротекторной активности.

Введение же в структуру соединения VMA13-17 дополнительного атома брома в положении R³ (соединение VMA13-22) или CH₃-группы в положении R² (соединение VMA13-21), а также замена брома в положении R² (соединение VMA13-23) на хлор не приводило к повышению активности исходного соединения.

3.4.2.2 Изучение зависимости церебро - и эндотелиотропного действия от дозы соединений VMA13-15 и VMA13-17.

При исследовании зависимости доза-эффект у соединений VMA13-15 и VMA13-17 установлено, что при моделировании у экспериментальных животных неполной ишемии головного мозга, к 72-му часу после перевязки ОСА показатель летальности был достоверно ниже у тех животных, которым вводили VMA13-15 в дозе 5 мг/кг и VMA-13-17 в дозе 1,75 и 3,5 мг/кг по отношению к группе животных, получавших физиологический раствор (табл.56).

Таблица 56

Влияние исследуемых соединений на выживаемость (%) животных при необратимой билатеральной окклюзии ОСА.

Группы животных	Доза, мг/кг	n	Выживаемость животных (%) после ОСА				
			6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
ЛО	-	10	0	0	0	0	0
Контроль-ишемия	-	28	92	75	57	46	43
VMA13-15	1,25	8	88	63	63	63	50
	2,5	12	83	75	67	67	67
	5	8	100	88	88	88*	88*
	10	10	90	70	60	50	50
VMA13-17	0,875	10	80	80	70	60	40
	1,75	8	100	88	88	88*	75
	3,5	12	100	92	92*	83*	75
	7	8	75	75	63	50	38

Примечание:

контроль-ишемия – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая физиологический раствор; * - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор (p<0,05).

При оценке неврологического дефицита у животных с экспериментально вызванной ишемией головного мозга, получавших соединения VMA13-15 в дозе 5 мг/кг и VMA-13-17 в дозе 1,75 и 3,5 мг/кг, наблюдали меньший неврологический дефицит по шкале McGraw (табл.57). Менее выраженные неврологические отклонения через 72-часа после моделирования патологии были отмечены у животных, получавших VMA13-15 в дозе 5 мг/кг и VMA-13-17 в дозе 1,75.

Таблица 57.

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА

McGraw	Группы животных								
	Конт- роль	VMA13-15				VMA13-17			
		1,25 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	0,875 мг/кг	1,75 мг/кг	3,5 мг/кг	7 мг/кг
6 час	4,5± 0,4	4,1± 1,1	3,4± 1,1	3,0± 0,9	4,6± 0,5	4,7± 0,4	3,1± 0,6	3,5± 0,7	3,9± 1,4
12 ч	5,5± 0,5	5,1± 1,5	3,8± 1,1	3,1± 1,0*	5,3± 0,4	5,1± 0,5	3,0± 1,2*	3,6± 0,8*	5,5± 1,1
24 ч	5,8± 0,5	5,4± 1,4	4,0± 1,3	3,4± 1,1*	5,9± 0,6	6± 0,6	3,5± 0,9*	3,7± 0,8*	6,3± 1,2
48 ч	6,2± 0,6	5,3± 1,5	4,1± 1,3	3,9± 1,0*	6,0± 0,7	6,1± 0,7	3,8± 0,9*	3,8± 1,0*	6,4± 1,4
72 ч	6,5± 0,6	5,8± 1,6	4,0± 1,3*	3,6± 1*	6,3± 0,5	6,6± 0,5	3,1± 1,5*	4,0± 1,1*	6,9± 1,5

Примечание:

контроль – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9 % раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе контрольных животных ($p < 0,05$)

На фоне применения соединений VMA13-15 в дозе 5 мг/кг и VMA-13-17 в дозе 1,75 у животных, перенесших окклюзию ОСА, уровень МК был выше по сравнению с животными контрольной группы и получавшими данные соединения в других дозах, при это также регистрировали более высокую эндотелийзависимую вазодилатацию, что свидетельствует о лучшем функциональном состоянии эндотелия (табл.58).

Таблица 58.

Исходный уровень мозгового кровотока (МК) и при модификации синтеза NO у животных через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий.

Группы животных	Доза, мг/кг	Исходный МК, у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
			Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	–	4,2±0,4	26,5±2,3	-29,4±2,4	45,1±3,6
Контроль-ишемия	–	2,18±0,5*	9,2±0,8*	-11,4±2,7*	46,1±4,4
VMA13-15	1.25	2,3±0,4	12,4±1,9	-12,4±1,1	44,9±2,9
	2.5	3,27±0,3#	20,1±2,1#	-25,9±2,3#	44,7±4,1
	5	3,6±0,4#	26,57±1,6#	-27,22±2,4#	45,1±4,6
	10	2,2±0,6	10,8±0,7	-13,6±2,2*	43,9±4,2
VMA13-17	0.875	2,4±0,7	8,8±0,7	-12,9±1,8*	45,1±4,4
	1.75	3,5±0,5#	25,5±2,2#	-28,1±3,1#	46,1±4,4
	3.5	3,05±0,3#	24±1,9#	-22,7±1,7#	45,4±4,3
	7	2,43±0,5	14,9±0,9	-15,1±1,1	46,1±4,1

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных ($p < 0,05$); # - $p \leq 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия.

Как видно из данных, представленных на рис.14соединение VMA13-15 способно снижать летальность животных после ОСА на 30% уже в дозе 2,5 мкг/кг, при этом повышение дозы до 5 мг/кг увеличивает выживаемость животных на 45%. Диапазон эффективных доз соединения VMA13-17 составил от 2,3 мг/кг до 4,5 мг/кг, при этом максимально выраженное действие VMA13-17 оказывает в дозах от 1,8 мг/кг до 3,5 мг/кг, о чем свидетельствовало снижение летальности животных на 32% относительно контрольной группы животных.

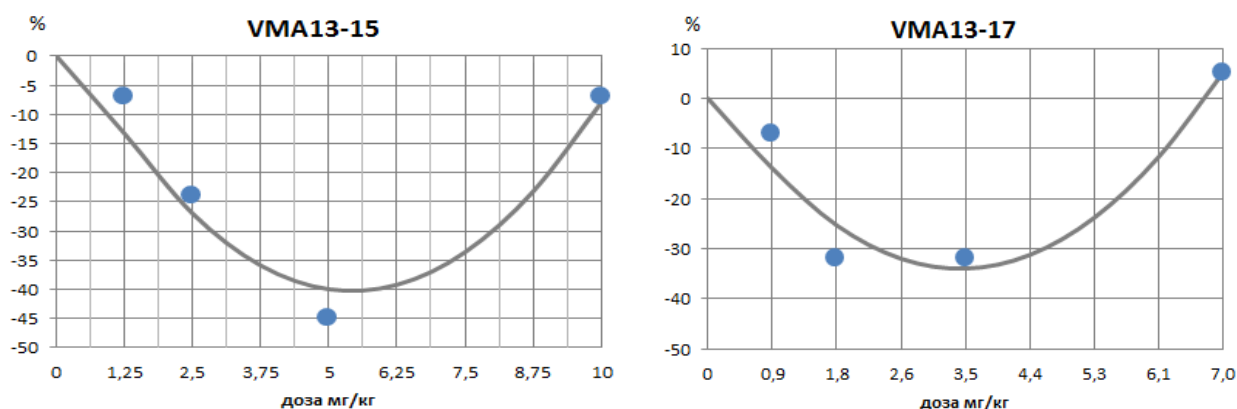


Рис. 14. Зависимость выживаемости животных при ОСА от дозы соединений VMA13-15 и VMA13-17

Обозначения:

по оси ОХ – исследуемые дозы; по оси ОУ – процент выживших животных

Таким образом, соединения VMA13-15 в дозе 5 мг/кг и VMA-13-17 в дозе 1,8 мг/кг проявляют наиболее выраженные церебро- и эндотелиопротекторные эффекты.

3.4.3 Заключение

Проведенное исследование ряда производных хиназолинов позволило выявить четыре соединения: два хиназолиновых производных ациланилида (VMA10-15 и VMA10-17) и два хиназолиновых производных ацилгуанидина (VMA13-15 и VMA-13-17), способные оказывать церебро- и эндотелиопротекторное действие в условиях ишемии мозга на животных безотягощенного преморбидного фона (табл.59).

Таблица 59.

Суммарные данные об эффективных дозах, терапевтическом индексе и LD50 соединений VMA10-15, VMA10-17, VMA13-15, VMA13-17

Шифр соединения	ED ₃₀	ED _{max}	LD ₅₀	ТИ
VMA10-15	9мг/кг	10 мг/кг (↓35%)	>2000мг/кг	200
VMA10-17	7,5мг/кг	10 мг/кг (↓45%)	>2000мг/кг	238
VMA13-15	2,8мг/кг	5 мг/кг (↓45%)	>1500мг/кг	535
VMA13-17	2,3мг/кг	1,8мг/кг (↓32%)	>1500мг/кг	652

3.5 Сравнительное исследование церебро- и эндотелиопротективной активности соединений- лидеров, магния сульфата, кавинтона, цитиколина.

В ходе проведенного фармакологического скрининга веществ, обладающих церебро- и эндотелиотропным действием среди производных хиназолина, амидов бензойных кислот, фенибута, мефебута, ГАМК и глутаминовой кислоты, были выделены следующие соединения как наиболее перспективные: среди производных хиназолина – VMA10-15, VMA10-17, VMA13-15, VMA13-17; среди производных амидов бензойной кислоты – С4, С18, С40, среди производных фенибута с органическими биологически активными кислотами – РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258, среди композиций мефебута – РГПУ-260, среди производных ГАМК – РГПУ-195,

среди производных глутаминовой кислоты – РГПУ-135. Далее было проведено сравнительное изучение церебро- и эндотелиотропного действия соединений- лидеров в наиболее эффективных дозах (по результатам скрининга) с клинически апробированными препаратами (магнием сульфатом, кавитноном, цитиколином) при моделировании острого НМК. Указанные лекарственные средства были выбраны поскольку магния сульфат рекомендован при ХНМК и ОНМК, кавинтон помимо влияния на мозговое кровообращение обладает эндотелиотропной активностью, не вызывает эффект обкрадывания, цитиколин – один из немногих препаратов, который доказал свою эффективность при НМК в клинических исследованиях.

Как и в ранее проведенных исследованиях все соединения, выбранные как наиболее перспективные, оказывали церебро- и эндотелиопротекторное действие на животных с окклюзией ОСА без отягощенного преморбидного фона, что отражалось в их влиянии на выживаемость животных в условиях ОСА (табл.60), динамику развития неврологического дефицита (табл.61), уровень локального мозгового кровотока в проекции средней мозговой артерии и его изменении в ответ на введение ацетилхолина и нитро-Л-аригинина у животных после двусторонней окклюзии общих сонных артерий (табл.63). Однако, стоит обратить внимание, что из всех соединений наиболее выраженным протективным действием обладали следующие: С18, С40, РГПУ-151, РГПУ-189, их эффекты были сопоставимы с таковыми у цитиколина и кавинтона, превосходя по активности магния сульфат. Соединения РГПУ-152, РГПУ-260, РГПУ-135, РГПУ-195 оказывали равное с кавинтоном церебро- и эндотелиопротекторное действие.

Таблица 60.

Влияние исследуемых соединений на выживаемость животных при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (ОСА)

Группы животных	N	Выживаемость животных (%) после ОСА					Шанс выживаемости
		6 ч	12ч	24 ч	48 ч	72 ч	
ЛО	10	100	100	100	100	100	-
Контроль-ишемия	20	90	65	55	40	35	-
VMA10-15	10	90	90	80	80	70	4.33±0.8

VMA10-17	10	100	90	90	90#	80#	7.43±0.9 p<0.05
VMA13-15	9	100	88	88	88*	78*	6,5±0,9 p<0.05
VMA13-17	8	100	88	88	88*	75	5.57±0.9
C4	11	91	82	82	73	64	3,25±0,8
C18	11	100	91	91	82	82	8,36±0,9 p<0,05
C40	11	100	100	91	82	82	8,36±0,9 p<0,05
РГПУ-151	11	100	100	91	82	82	8,36±0,9 p<0,05
РГПУ-152	11	100	91	82	82	73	4,85±0,82 p<0,05
РГПУ-189	11	100	91	82	82	82	8,36±0,9 p<0,05
РГПУ-258	11	91	82	82	73	64	3,25±0,78
РГПУ-260	11	100	82	73	73	73	4,85±0,82 p<0,05
РГПУ-195	11	91	91	73	73	73	4,85±0,82 p<0,05
РГПУ-135	11	82	73	73	73	73	4,85±0,82 p<0,05
Магния сульфат	11	82	73	73	64	64	3,25±0,78
Кавинтон	11	100	91	82	82	73	4,85±0,82 p<0,05
Цитиколин	11	100	100	91	91	82	8,36±0,9 p<0,05

Примечание:

N – количество животных в группе; ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая физиологический раствор; * - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных (p<0,05); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор (p<0,05).

Таблица 61

Динамика неврологического дефицита у животных после ОСА

Группы животных	Средний балл неврологического дефицита после ОСА				
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	7,8±0,3	8,2±0,8	8,4±0,7	8,6±0,7	8,8±0,4
VMA10-15	7,7±0,6	6,6±0,8	6±0,7	6,2±0,6	6,4±0,9
VMA10-17	7,0±0,4	6,4±0,7	6,2±0,7	5±0,6*	5,9±0,9*
VMA13-15	6,8±0,6	6,5±0,4	5,9±0,8	5,7±0,6	5,8±0,9
VMA13-17	7±0,6	6,8±0,4	6,04±0,7	5,9±0,8	5,8±1,2
C4	6,6±0,4	6,6±0,7	6,4±0,6	6,4±0,7	6,0±1

C18	6,6±0,5	6,1±0,5	6,0±0,7	6,1±0,6*	5,6±0,8*
C40	6,5±0,7	5,9±0,4	5,2±0,5*	5,7±0,6*	4,1±0,9*
РГПУ-151	5,9±0,6*	5,3±0,3*	5,1±0,4*	5,7±0,6*	5,2±0,9*
РГПУ-152	5,5±0,5*	5,7±0,4*	5,2±0,4*	5,6±0,5*	5,9±0,8*
РГПУ-189	6,1±0,6	5,5±0,5*	5,2±0,5*	5,6±0,4*	5,3±0,8*
РГПУ-258	6,2±0,5	6,1±0,5	6,0±0,5	5,8±0,5*	6,1±1
РГПУ-260	5,8±0,6*	6,6±0,5	6,0±0,5	5,7±0,5*	5,6±0,9*
РГПУ-195	5,4±0,7*	5,3±0,4*	5,2±0,5*	5,3±0,4*	5,2±1*
РГПУ-135	6,3±0,6	5,6±0,5*	5,8±0,4*	5,8±0,4*	5,7±0,9*
Магния сульфат	6,9±0,5	6,4±0,4	6,5±0,4	6,9±0,6	6,4±0,9
Кавинтон	6,3±0,4	5,9±0,6	5,9±0,5*	5,5±0,7*	5,3±1*
Цитиколин	5,9±0,4*	5,4±0,4*	5,0±0,4*	4,3±0,4*	4,2±1*

Примечание:

контроль-ишемия – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p<0,05$)

Таблица 62

Показатели животных после ОСА в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ.

Группы животных	Показатели животных в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ после ОСА			
	ДА	ОИА	ЛП ТЭИ. с	ЛП в УРПИ.с
ЛО	36,3±6,5	23,8±7,2	27,2±4,1	180±0
Контроль-ишемия	15,1±4,5#	8±2,4#	140±34,2#	40±12,2#
VMA10-15	18,1±4,5	16,4±2,1	88,1±7,1	157,4±30,5
VMA10-17	22,4±5,1	25,4±3,3	64,1±5,8*	165,1±28,1
VMA13-15	28,4±2,4	24,5±4,4	49,1±5,3*	107±30,1
VMA13-17	23,7±6,9	16,4±5,1	90±22,4*	90,6±26,6
C4	20,3±5,4	19,4±5,4*	79±6,5*	131,6±32,1
C18	29,1±7,5*	18,7±5,2	46,2±5,4*	134±30,3
C40	28,5±6,1*	20,2±6,5*	46,2±7,1*	151,6±26,3
РГПУ-151	34,6±7,4*	24±7,4*	57,7±5,8*	153,7±31,7
РГПУ-152	38,3±8,1*	21,6±8*	58,1±5,2*	157,8±30,4
РГПУ-189	34,6±7,2*	20,6±7,4*	50,5±5,8*	166,1±33,7
РГПУ-258	33,8±7,5*	18,6±4,5	84,5±21,4*	158,9±28,5
РГПУ-260	28,3±6,3*	19,2±7,1*	71±27,2	166,0±29,7
РГПУ-195	40,4±12,2*	19,6±5,3*	77,3±25,1*	159,8±31,2
РГПУ-135	39,5±11,2*	20,8±4,3*	74,1±26,2*	163,6±41,2
Магния сульфат	22,1±6,5	14,2±3,7	120,5±36,2	83,2±12,2
Кавинтон	25,3±7,5*	19,9±4,9*	65,4±18,3*	145,2±34,2
Цитиколин	34,1±9,7*	21,1±6,1*	40,6±13,2*	156,8±42,1

Примечание:

ДА (двигательная активность) – сумма пересеченных квадратов в тесте ОП; ОИА (ориентировочно-исследовательская активность) – сумма заглядываний в норки и стоек в тесте ОП; ЛП ТЭИ – латентный период подныривания животного в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ; # - $p<0,05$ – различия достоверны по сравнению с ЛО группой; * - $p<0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl.

Таблица 63

Уровень локального мозгового кровотока в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина животным после двусторонней окклюзии ОСА

Группы животных	Фоновые значения. у.е.	Введение ацетилхолина % прироста	Введение нитро-L-аргинина % прироста	Введение нитроглицерина % прироста
ЛО	4,4±0,1	30,5±2,1	-36,3±0,7	39,2±4,3
Контроль-ишемия	2,5±0,2*	11,4±0,9*	-14,1±0,7*	45,6±4,1
VMA10-15	3,2±0,4	22,3±1,2#	-15,9±0,7	41,9±3,5
VMA10-17	3,4±0,1#	23,3±1,5#^	-24,8±2,1#^	42,4±3,8
VMA13-15	3,6±0,4#	26,7±1,3#^	-26,5±0,8#^	45,1±4,6
VMA13-17	3,5±0,2#	25,5±1,8#	-21,2±5,4	46,1±4,4
C4	3,5±0,2#	20,3±1,9	-21,2±1,8	42,1±5,1
C18	3,6±0,3#	21,7±1,9#	-22,3±1,5#	48,0±3,8
C40	3,8±0,2#	25,6±1,5#^	-26±1,2#^	45,3±3,9
РГПУ-151	4,3±0,4#^	23,6±1,3#^	-27±0,9#^	44,6±4,2
РГПУ-152	4,1±0,3#^	24,5±1,1#^	-28±0,9#^	42,1±3,4
РГПУ-189	4,3±0,1#^	22,6±1,0#	-26,7±0,9#^	44,3±5,1
РГПУ-258	4,0±0,5#	18,2±0,6	-23,7±1#	48,5±4,6
РГПУ-260	3,5±0,3#	31,2±1,7#^!	-33±0,7#^	39,1±5,1
РГПУ-195	3,3±0,3#	25,6±1,3#^	-29,9±0,5#^	41,6±4,8
РГПУ-135	3,3±0,2#	24,8±0,5#^	-26,5±0,7#^	48,5±4,9
Магния сульфат	2,9±0,1	17,3±1,0	-18,9±0,7	48,8±4,1
Кавинтон	4,3±0,3	23,2±1,9#	-29±0,7#^	48,0±4,3
Цитиколин	4,4±0,2	27,1±0,4#^	-31±0,8#^	49,2±4,4

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ЛО группой; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон

3.6 Заключение.

Проведенный блок исследований позволил выбрать из четырех химических рядов (производных хиназолинов, гиброксibenзойных кислот, ГАМК, глутаминовой кислоты) 10 соединений (VMA10-17, VMA13-15, C18,

С40, РГПУ-135, РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) для их дальнейшего углубленного изучения в качестве возможных корректоров НМК. Учитывая имеющиеся литературные данные о значении преморбидного фона на эффективность проводимой терапии основного заболевания, в том числе НМК, а также неудачи в экстраполяции данных доклинических исследований в клиническую практику, на следующем этапе был выполнен блок исследований по изучению церебро- и эндотелиопротекторного действия соединений-кандидатов при моделировании острых НМК в условиях отягощенного преморбидного фона.

ГЛАВА 4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА.

Несмотря на огромные затраты государства на лечение и реабилитацию больных с НМК, результативность терапии остается низкой, и выбор препаратов, которые могли бы положительно повлиять на прогноз, остановить прогрессирование нейродегенеративных изменений, весьма ограничен. К сожалению, большая часть разработанных лекарственных препаратов, показавших на доклиническом этапе высокую церебропротективную активность, в клинических испытаниях оказались малоэффективными. Данная проблема неоднократно поднималась представителями академических учреждений и фармацевтических компаний (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, STAIR), которые рассматривают доклинические испытания эффективности лекарственных препаратов, вопросы улучшения планирования и выполнения исследований методов терапии острого инсульта. Был выявлен ряд причин сложившейся ситуации, одна из которых заключается в том, что используемая в настоящее время методология поиска лекарственных средств для терапии НМК на этапе доклинических разработок не учитывает ряд факторов, оказывающих существенное влияние на развитие, прогрессирование и исход заболевания. К таким факторам можно отнести отсутствие у экспериментальных животных преморбидного фона, который оказывает существенное влияние на течение и исход НМК в клинических условиях. Ведь у пациентов с недостаточностью мозгового кровообращения имеется ряд сопутствующих заболеваний (например, артериальная гипертония, сахарный диабет, ожирение, дислипидемия и т.п.), и как показывает статистика, НМК чаще возникают у лиц старшей возрастной группы. Существующий преморбидный фон у данной категории больных существенно снижает функциональные резервы сердечно-сосудистой системы, приводит к структурно-функциональным

изменениям сосудистой стенки, десквамации эндотелиоцитов. В настоящее время установлено, что такие заболевания, как артериальная гипертензия, ожирение, дислипидемия, сахарный диабет, недостаточность половых гормонов, во многом реализуют свое патологическое влияние на развитие и течение НМК, именно, через эндотелиальную дисфункцию. При наличии инсулинорезистентности происходит снижение продукции оксида азота, вследствие чего формируется повышенная чувствительность сосудистой стенки к действию сосудосуживающих веществ, нарушаются процессы эндотелийзависимой вазодилатации. На сегодняшний день установлено, что эндотелий сосудистого русла не только доставляет метаболитические субстанции к тканям, но и индуктивный сигнал к органогенезу (нейрогенезу) [Lammert E, 2001; Matsumoto K., 2001; Воробьева О.В., 2014]. Эндотелиальная дисфункция, вследствие снижения продукции NO, приводит к снижению МК, а возникновение гипоксии приводит к развитию оксидативного стресса, что может значительно влиять на степень поражения мозговой ткани при ишемии. В тоже время оксидантный стресс – один из важнейших предиспозиционных факторов в развитии и прогрессировании множества заболеваний, включая болезни позднего возраста, в частности нейродегенеративные, диабет, атеросклероз [Воробьева О.В., 2014].

Таким образом, если разработка новых лекарственных препаратов осуществляется при моделировании патологии на здоровых молодых животных, то в клинической практике данная категория пациентов имеет отягощенный преморбидный фон, что затрудняет экстраполяцию данных, полученных в доклинических условиях, на людей.

Поэтому на следующем этапе исследований была изучена эффективность церебропротекции соединениями-лидерами при моделировании нарушений мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции.

4.1 Эффективность соединений-лидеров при нарушениях мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной недостаточностью половых гормонов.^{††}

Одной из распространённых моделей эндотелиальной дисфункции в доклинических исследованиях является гипоестрогениндуцированная. Эстрогены являются вазоактивными субстанциями, влияющими на все слои артериальной стенки. Так было показано, что с наступлением менопаузы снижается эндотелийзависимая вазодилатация, что связывают со снижением продукции оксида азота [Kotchen J. M., 2003]. Кроме того, дефицит эстрогенов увеличивает агрегацию тромбоцитов, адгезию клеток, воспаление артериальной стенки, способствует высвобождению факторов пролиферации гладкомышечных клеток [Аничков Д. А., 2005]. Наряду с этим наступление менопаузы четко ассоциируется с увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний у женщин.

Поэтому в качестве одной из моделей ЭД была выбрана гипоестрогениндуцированная, воспроизводимая путем экстирпации матки с придатками у крыс самок.

Для моделирования недостаточности мозгового кровообращения нами была выбрана методика окклюзии среднемозговой артерии (ОСМА) у крыс. Эта модель позволяет воспроизвести унилатеральное очаговое повреждение головного мозга, течение которого в значительной степени отражает клиническую ситуацию, обусловленную инсультом.

^{††} *Исследование выполнено совместно с А.А. Литвиновым, Н.В. Мазиной*

4.1.1 Оценка эндотелиальной дисфункции у животных с экспериментальновызванной недостаточностью половых гормонов

Через 28 дней после операции по экстирпации матки с придатками у всех животных забирали кровь для определения количества десквамированных эндотелиоцитов, повышение концентрации которых является высокоспецифичным маркером эндотелиальной дисфункции [Hladovec J., 1977]. Наряду с этим у части животных мы оценили функциональное состояние эндотелия по состоянию мозгового кровотока и его изменению при введении модификаторов синтеза эндогенного оксида азота для тестирования эндотелийзависимой (ацетилхолин, нитро-L-аргинин) и эндотелийнезависимой (нитроглицерин) вазодилатации. Все полученные показатели у крыс, перенесших оперативное вмешательство, сравнивались с группой ЛО животных, которые подвергались введению наркоза, вскрытию брюшной полости с последующим ее ушиванием, но без удаления матки и придатков.

Данные об эндотелийзависимой и независимой вазодилатации, концентрации циркулирующих эндотелиоцитов у животных после операции по экстирпации матки с придатками через 28 дней представлены на табл.64. Операция по моделированию недостаточности половых гормонов приводила к значительному повышению содержания циркулирующих эндотелиоцитов в 1,9 раза по сравнению с группой ЛО ($p < 0,05$), что свидетельствует о выраженной ЭД у данных животных.

Исходный МК в проекции средней мозговой артерии у самок с НПГ составил $2,6 \pm 0,5$ у.е. и был значительно меньше, чем у ЛО животных.

Развитие гипоэстрогениндуцированной ЭД подтверждалось и при исследовании функционального состояния эндотелия мозговых сосудов. Так если исходный уровень кровотока у ЛО самок и с НПГ статистически значимо не отличался, то его реакции при введении модификаторов синтеза оксида азота была разной. Введение ацетилхолина ЛО крысам вызывало достоверное повышение мозгового кровотока в среднем на 36,4% по

отношению к исходным значениям, что свидетельствует о сохранности стимулируемой секреции NO. При введении нитро-L-аргинина данным животным наблюдалось снижение МК от исходного уровня на 24,7%. Введение прямого донатора NO – нитроглицерина приводило к увеличению МК на 37,5% у ложнооперированных животных (Таблица 64).

Таблица 64

Изменение МК ЛО и животных с НПП при введении модификаторов оксида азота.

Группа	Фоновые значения, у.е.	Введение ацетилхолина % прироста	Введение нитро L-аргинина % падения	Введение нитроглицерина, %прироста	ЦЭК, кл/100мкл
ЛО	2,8±0,7	36,4	-24,7	37,7	3,13
НПП	2,6±0,5	19,3*	-9,95*	39,1	5,9*

Примечание:

ЛО – ложнооперированные животные; НПП (недостаточность половых гормонов) – животные, подвергшиеся экстирпации матки с придатками; ЦЭК – количество циркулирующих эндотелиоцитов; *- $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ЛО группой

Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных с НПП повышается содержание циркулирующих эндотелиоцитов, отмечается вдвое меньшая реакция на ацетилхолин и нитро-L-аргинин, чем у ЛО животных, тогда как реакция на нитроглицерин практически не отличалась у животных опытных и контрольных групп. Такие данные позволяют говорить о выраженной ЭД, снижении базальной и стимулируемой продукции NO, вызванной гормональной патологией, что согласуется с литературными данными [Петрищев Н.Н., 2003].

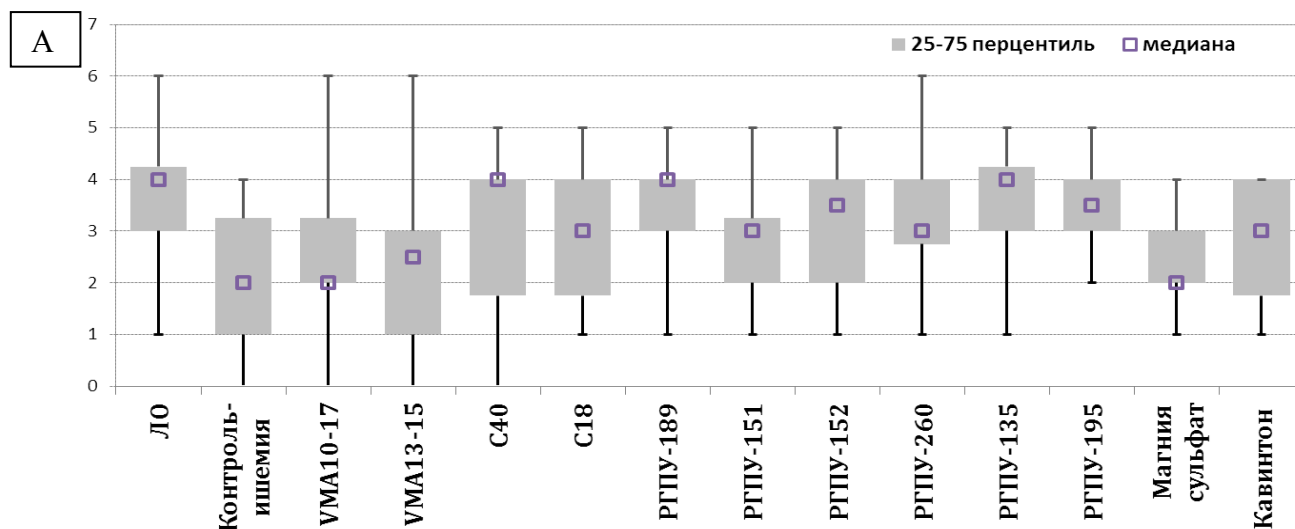
4.1.2 Влияние лечебного курсового введения соединений лидеров на неврологический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.

Через 28 дней после операции по экстирпации матки с придатками у животных моделировали фокальную ишемию путем внутрисосудистой окклюзии внутренней сонной артерии.

Оценка неврологического дефицита у животных на данной модели осуществлялась с помощью двух неврологических шкал – Combs и D'Alecy и

Garcia, которые позволяли комплексно подойти к оценке степени нарушений двигательных функций, чувствительной сферы и координации движений у животных. Анализ показателей по неврологическим шкалам производился через 1, 3, 7 суток после моделирования ОСМА, в «тесте-лестница» до и на 7 сутки после моделирования ОСМА.

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у животных приводило к формированию стойкого неврологического дефицита, который проявлялся в снижении баллов по шкале Combs и Garcia. Из данных представленных на рис.15 видно, что показатели по шкале Combs у всех животных с ОСМА имеют приблизительно одно значение от 2 до 4, при этом происходит перекрывание значений медиан в пределах межквартильного размаха в каждой группе. На рис.15 Б и В показана сравнительная картина показателей через 3 и 7 суток после моделирования ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов у животных.



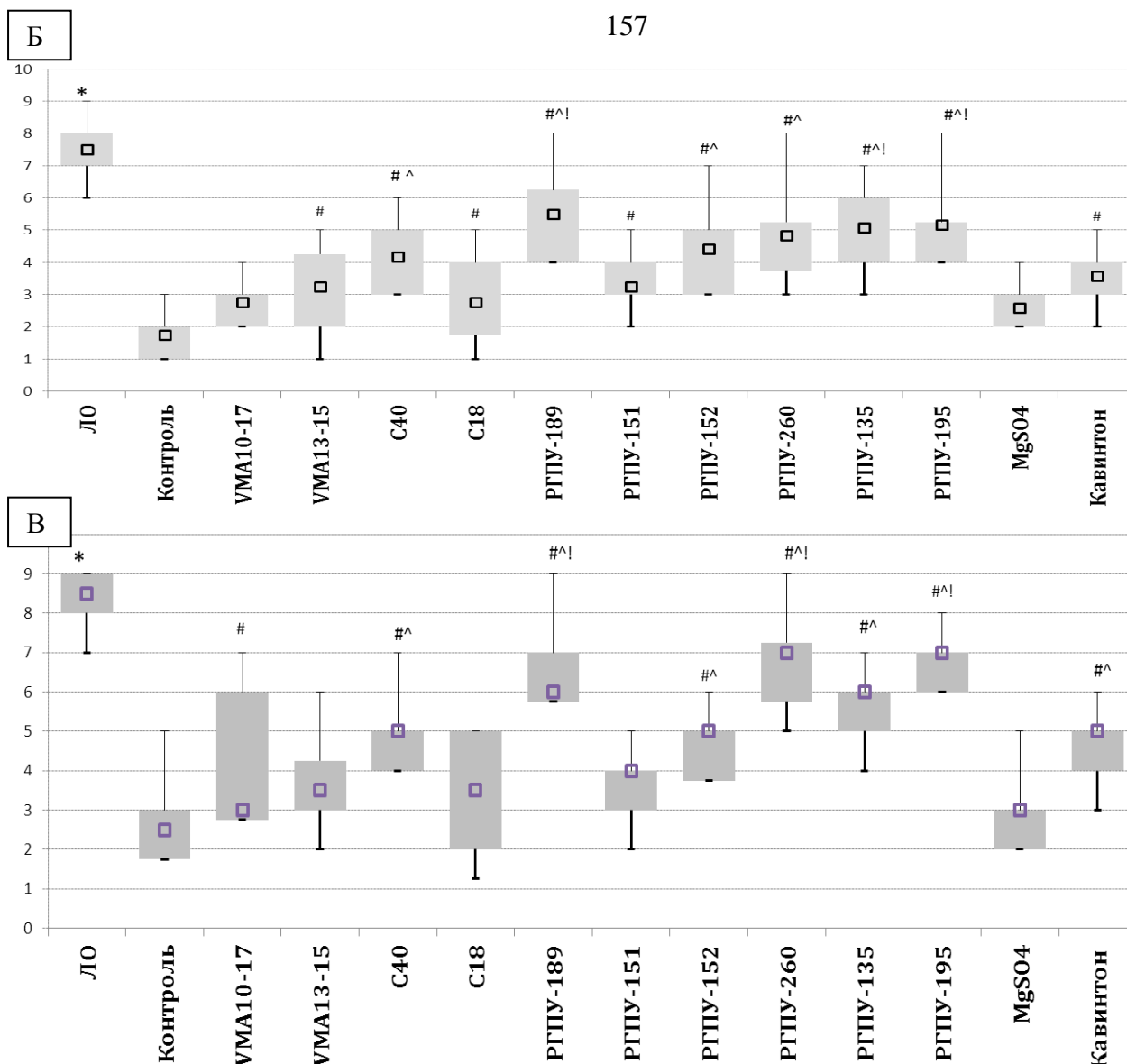


Рис. 15. Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 (В) суток после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений.

Обозначение

– различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$); ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Шкала Garsia позволила выявить двигательные, чувствительные нарушения и снижение активности у животных с ОСМА, начиная с 1-х суток после операции. Менее выражены они были у животных, получавших VMA10-17, РГПУ-135, РГПУ-260, РГПУ-189, кавинтон (рис.16).

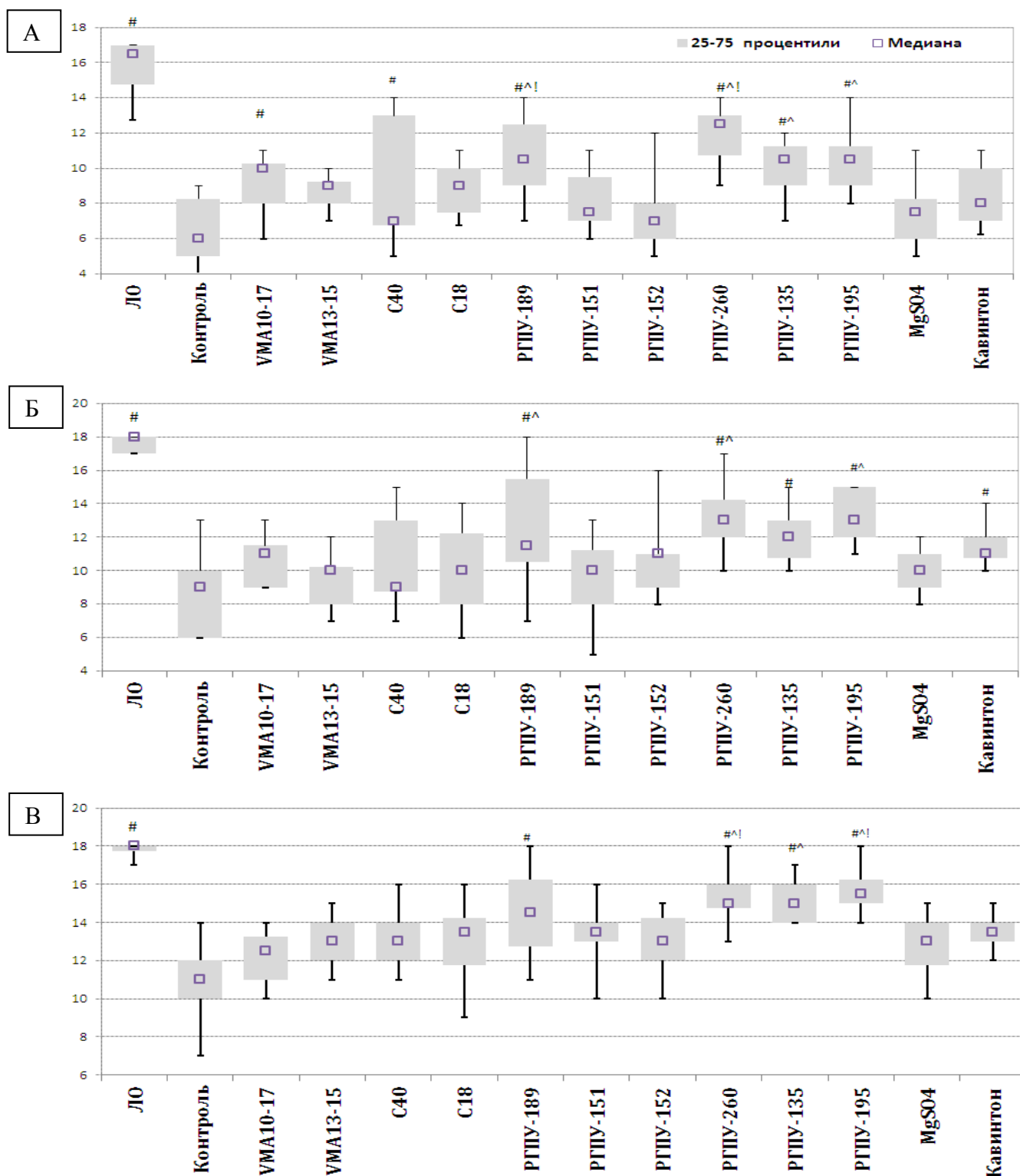


Рис. 16. Выраженность неврологического дефицита по шкале Garsia у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 (В) суток после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений.

Обозначения:

– различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$); ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Начиная с 3-х суток после моделирования ОСМА во всех группах животных отмечалось постепенное угасание негативной неврологической симптоматики. Однако у крыс, получавших РГПУ-260, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-189, положительная динамика была более выражена (неврологический дефицит по шкале Garcia составил от 11,5-13 (на 3-и сутки) до 14,5-15,5 баллов (на 7-е сутки), что говорит о меньшей ассиметрии конечностей. Баллы групп животных, получавших VMA10-17, РГПУ-152, магния сульфат и кавинтон, находились в пределах от 10-11 (на 3-и сутки) до 13-15,5 (на 7-е сутки).

Таким образом, при моделировании ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов наименее выраженные моторные нарушения отмечались у животных, получавших РГПУ-260, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-135, что говорит о более выраженном церебропротекторном действии этих соединений.

4.1.3 Влияние лечебного курсового введения соединений-лидеров на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

Для оценки сенсомоторного дефицита на 3-й и 7-й день после ОСМА были выполнены тест «сужающаяся дорожка» (позволяет оценить моторный дефицит задних конечностей) и «Staircase test» (для оценки нарушения мелкой моторики передних конечностей у животных). Результаты осмотра животных на наличие признаков моторной дисфункции конечностей представлены в табл.65 и на рис.17 .

Таблица 65

Процент ассиметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 3 и 7 сутки после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне овариоэктомии у крыс при лечебном курсовом введении исследуемых соединений, %.

День	Участок дорожки	Группы													
		ЛО	Контроль-ишемия	VMA 10-17	VMA 13-15	C40	C18	РГПУ-189	РГПУ-151	РГПУ-152	РГПУ-260	РГПУ-135	РГПУ-195	Магния сульфат	Кавинт он
3 сутки	Широкая часть	-1± 1,0*	20± 2,8	21± 2,6	14.3± 3.0	12± 2,3	15± 1,6	6± 1,1*	13± 2,2	16± 3,0	14± 3,0	9± 2,0	8± 1,8	15± 1,6	11± 1,9
	Средняя часть	-2± 0,8*	25± 2,4	23± 1,8	23.3± 4.1	11± 2,8*	16± 2,0	6± 1,4*	19± 2,4	20± 2,7	23± 4,1	5± 2,2*	3± 1,9*	16± 2,6	18± 2,7
	Узкая часть	-1± 1,3*	54± 3	55± 7,3	46.8± 4.3	47± 4,3	46± 7,7	27± 4,0*	42± 4,1	43± 4,2	47± 5,2	20± 1,3*	32± 2,2*	37± 3,6	32± 3,4*
7 сутки	Широкая часть	0± 1,2*	25± 3,6	19± 3,1	23,2± 3,8	22± 3,0	18± 3,1	12± 2,1	18± 4,0	14± 2,8	23± 3,8	13± 1,6	12± 1,3	18± 2,4	14± 1,9
	Средняя часть	-2± 0,6*	30± 5,7	22± 2,0	22,5± 5,4	19± 4,5	21± 4,0	11± 2,7*	17± 2,3	18± 2,9	23± 5,4	12± 3,5*	11± 2,1*	15± 1,9	16± 2,4
	Узкая часть	-1± 1,0*	47± 3,7	45± 6,1	40,5± 4,53	38± 3,6	37± 6,8	25± 4,0*	34± 3,6	36± 3,8	41± 4,5	18± 1,3*	24± 3,3*	35± 3,6	24± 3,5*

Примечание

* – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

В тесте «Сужающаяся дорожка» (табл.65) у крыс с ОСМА отмечено появление моторной дисфункции задних лап уже на третьи сутки с момента моделирования НМК. Так в сравнении со значениями группы ЛО, крысы с ОСМА совершали большее количество соскальзываний задними лапами, при этом количество контралатеральных ошибок было больше, чем ипсилатеральных (коэффициент асимметрии в группе контроль-ишемия составил от 20% в широкой части до 55% в узкой части «Сужающейся дорожки»).

Курсовое введение соединений РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260 способствовало восстановлению моторных функций задних конечностей у животных, перенесших НМК при недостаточности половых гормонов, о чем свидетельствовал меньший коэффициент асимметрии и меньшее количество ошибок задних лап в данных группах по сравнению с группой контроль-ишемия (табл.65).

В «лестничном» тесте (рис.17), являющимся высокочувствительным тестом, позволяющим оценить незначительные нарушения в работе конечностей, у крыс с ОСМА отмечено появление дисфункции «мелкой моторики» передних лап на 7-е сутки с момента моделирования НМК, в сравнении с исходным значением до моделирования и в сравнении с группой ЛО, что выразилось в значимом уменьшении общего числа собранных зерен в паллетах справа и слева. При этом, как и в тесте «Сужающейся дорожки», в контралатеральных конечностях крыс моторный дефицит был более выражен, чем в ипсилатеральных (количество зерен собранных с правых паллет было значительно меньше, чем с левых).

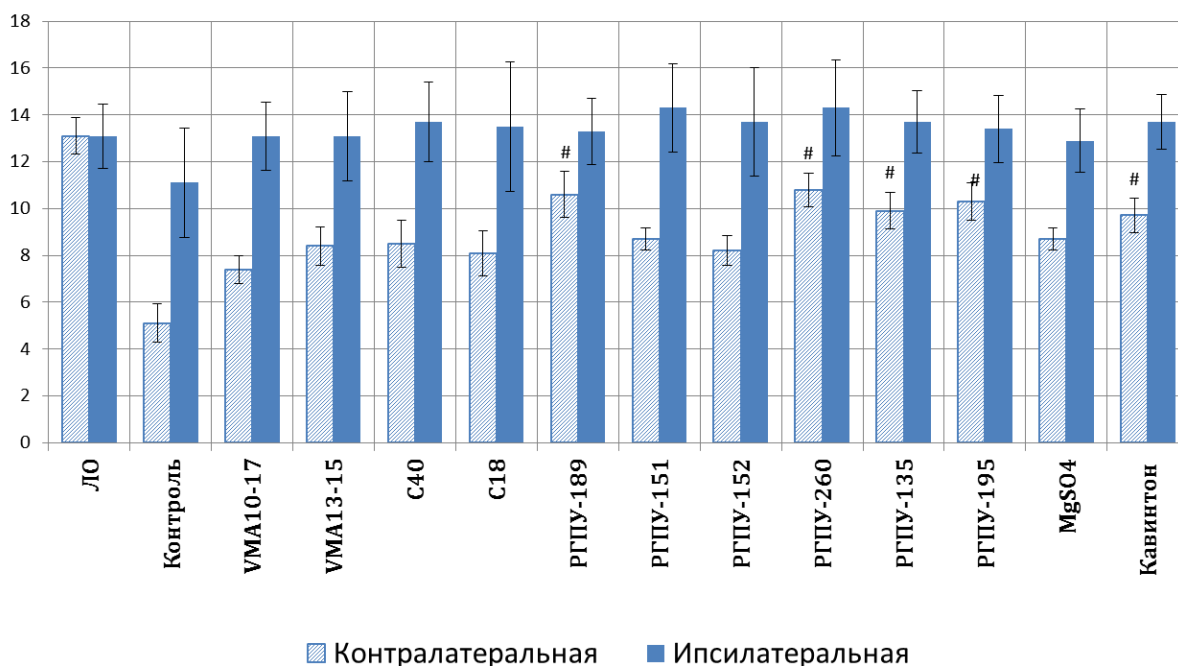


Рис. 17. Количество зерен, собранных животными контралатеральной и ипсилатеральной конечностью через 7 суток после ОСМА.

Обозначения:

– различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

У животных, получавших РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-135, РГПУ-195 и препарат сравнения кавинтон, общее количество собранных зерен, а также количество зерен, собранных с правых паллет, было выше в 2,12; 2,1; 1,9; 2 и 1,9 раза, соответственно, по сравнению с группой контроль-ишемия. При этом действие РГПУ-189 и РГПУ-195 на моторную функцию передних конечностей (по результатам данного теста) превосходило эффекты других исследуемых соединений и практически достигала уровня ЛО животных. (рис.17).

Таким образом, можно сделать заключение, что соединения РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195 в большей степени, чем другие исследуемые «соединения-лидеры» способны восстанавливать (сохранять) нарушенную моторику передних и задних конечностей у крыс с ОСМА.

4.1.4 Влияние курсового лечебного введения «соединений-лидеров» на поведенческий и мнестический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

Комплексное изучение неврологической картины предполагает оценку поведенческих, когнитивных нарушений и позволяет более полно судить о масштабах поражения отделов нервной системы с возможностью в той или иной мере экстраполяции полученных данных в клиническую практику. Исследование нарушений поведенческих функций животных, а также когнитивных, осуществляли через 7 дней после операции ОСМА.

Ориентировочно-исследовательская активность животных, как неотъемлемый компонент неврологических отклонений при нарушении адекватного функционирования ЦНС, достоверно снижалась у крыс при моделировании фокальной ишемии головного мозга относительно животных без создания ишемического повреждения (рис.18).

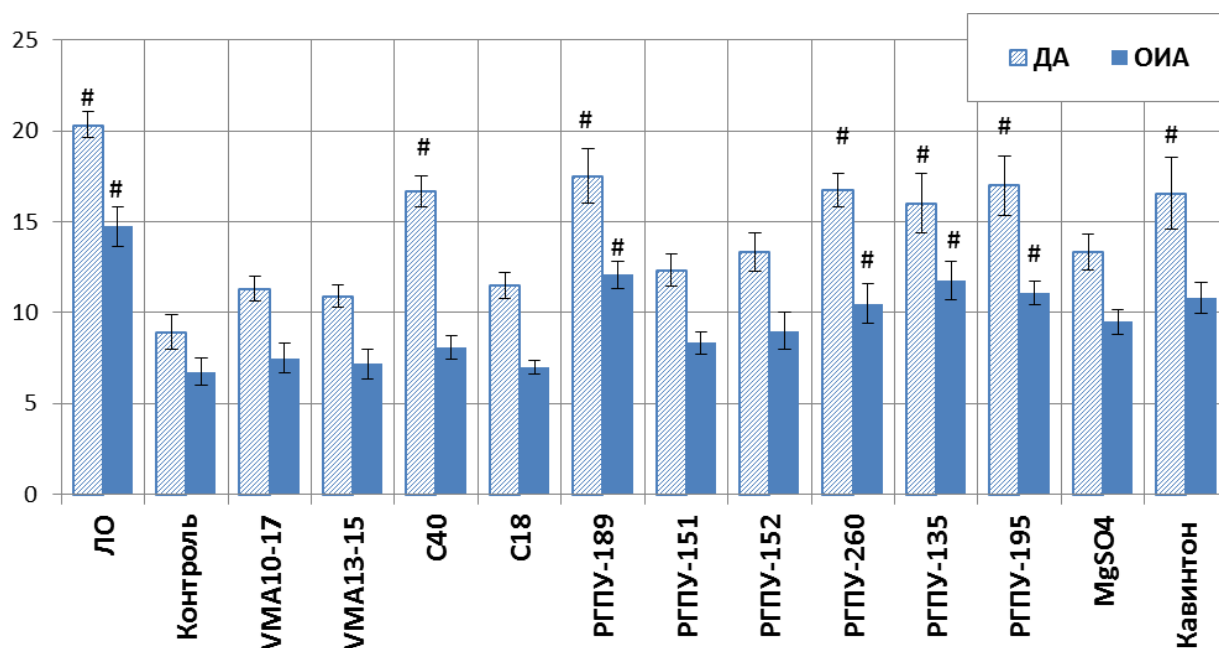


Рис. 18. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных с фокальной ишемией на фоне курсового лечебного введения исследуемых веществ.

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с ОСМА, получавшая физиологический раствор; # - достоверно по отношению к группе животных с ОСМА, получавшая физиологический раствор ($p < 0,05$).

Двигательная активность животных группы контроль-ишемия в тесте «ОП» также была снижена относительно группы ложнооперированных животных (рис.18).

Соединения С40, РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, кавинтон при их курсовом лечебном введении оказывали достоверно выраженный протективный эффект и сопоставимо увеличивали показатели локомоторной и исследовательской активности животных с фокальной ишемией и превосходили препарат сравнения магния сульфат (рис.18). Препарат позитивного контроля магния сульфат и соединения РГПУ-151, РГПУ-152, С18 оказывали слабовыраженное нейропротекторное действие, проявившееся в незначительном увеличении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных (не достигавшим уровня статистической значимости).

Сохранность памяти является одним из важных показателей, позволяющих оценить тяжесть неврологической картины и прогноза заболевания. В результате обучения и первого тестирования животных всех групп на уровень освоенности навыка пассивного избегания практически не различался.

Через 7 суток после ОСМА в тесте ТЭИ отмечалось увеличение времени экстраполяционного избавления, а в тесте УРПИ – количество заходов и укорочение времени латентного периода захода в темную камеру, что свидетельствует об ослаблении памятного следа у животных с экспериментальным нарушением мозгового кровообращения. Анализ сохранности мнестической функции оперированных животных, получавших соединения РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, по результатам двух тестов (УРПИ и ТЭИ) показал, что их введение приводило к лучшему сохранению памяти после ОСМА по отношению к группе контроля (рис.19).

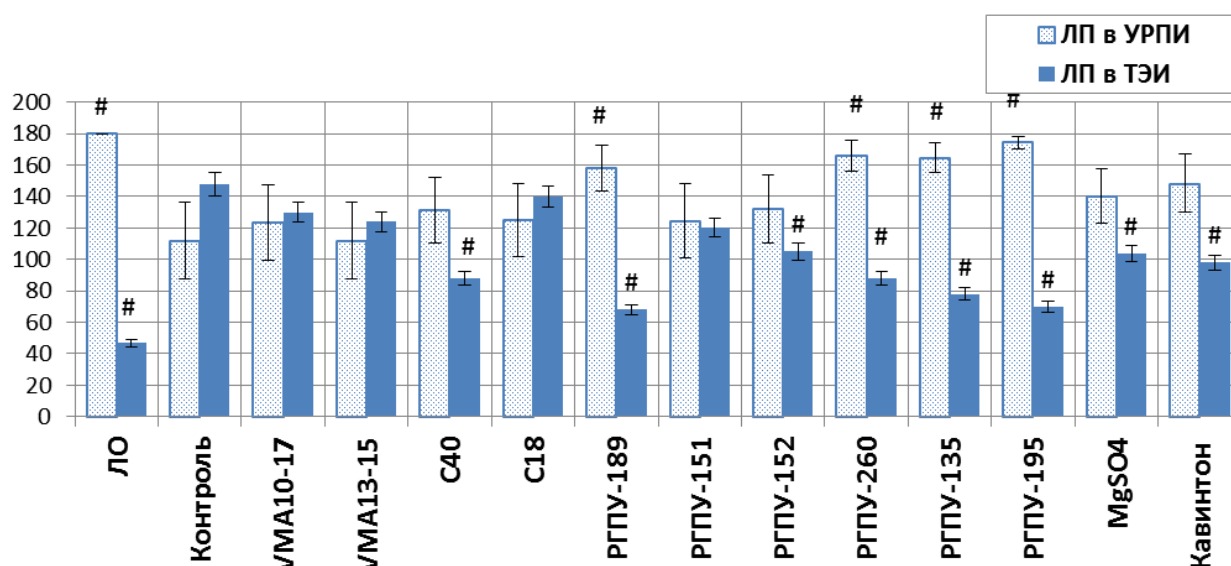


Рис. 19. Латентный период подныривания (ЛП) в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ животных через 7 суток после ОСМА

Обозначения:

ЛО - ложнооперированные животные; Контроль-ишемия – группа животных с ОСМА, получавшая физиологический раствор; ЛП в ТЭИ - латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период

Таким образом, среди исследуемых веществ наиболее выраженное уменьшение неврологических нарушений у животных с фокальной ишемией вызывали соединения РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260.

4.1.5 Влияние курсового лечебного введения соединений-лидеров на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

Известно, что влияние эндотелия на сосудистый тонус осуществляется за счет высвобождения вазоактивных веществ, оказывающих как сосудорасширяющее, так и сосудосуживающее действие [Титов В.Н., 2008]. С одной стороны, при недостаточности половых гормонов наблюдается нарушение равновесия между релаксирующими и сосудосуживающими факторами, в пользу последних, что является неотъемлемым признаком эндотелиальной дисфункции. Кроме этого, существенным маркером прогрессирования эндотелиальной дисфункции при гормональных

патологиях различного генеза является снижение уровня и доступности оксида азота, окисление его до пероксинитрита в условиях окислительного стресса [Башкирова Ю.В., 2008; Amanda J., 2008; Воронков А.В., 2011].

Поэтому изучение функционального состояния эндотелиальной системы мозговых сосудов в постишемический период у животных, курсом принимавших исследуемые вещества, позволит оценить один из возможных механизмов их церебропротекторного действия.

Исходный мозговой кровоток у группы ЛО составил $4,8 \pm 0,2$ у.е. (рис.20), у животных контроль-ишемия в зоне проекции СМА, которая подвергалась внутрисосудистой окклюзии – $1,2 \pm 0,1$ у.е. ($p < 0,05$). Исходный мозговой кровоток у групп животных, получавших все исследуемые соединения, был выше, чем у группы контроль-ишемия, но более высокие значения мозгового кровотока были в группах, получавших РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260.

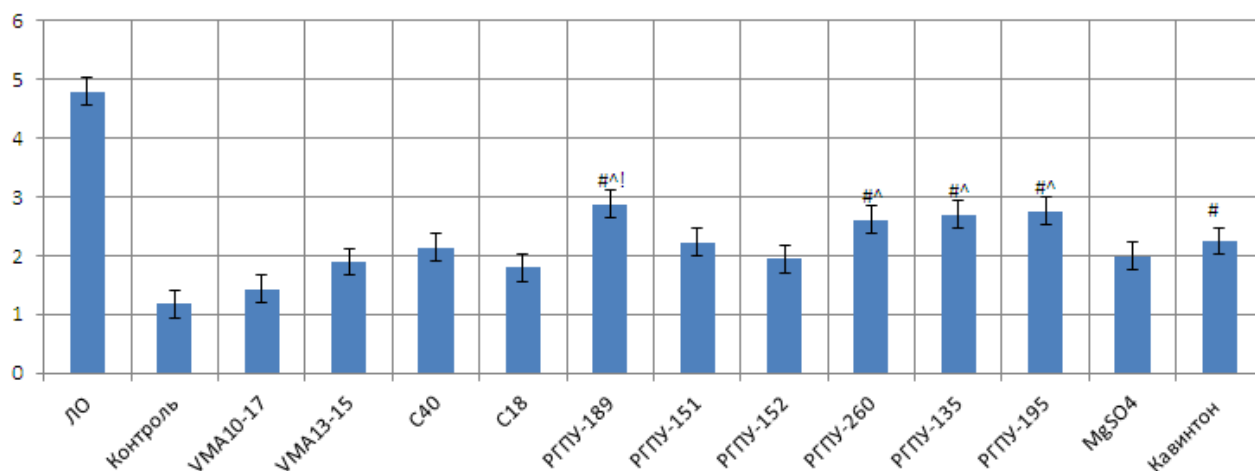


Рис. 20. Уровень мозгового кровотока (у.е.) у крыс с ОСМА и НПГ.

Обозначения:

Контроль-ишемия – группа животных с ОСМА на фоне НПГ; ЛО - ложнооперированная группа животных; # - достоверно по отношению к группе ЭСД+ОСМА ($p < 0,05$); ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Классическим маркером эндотелиальной дисфункции является ослабление сосудорасширяющей реакции на введение ацетилхолина или ее извращение. Сопоставляя полученные эффекты на животных с ОСМА и ЛО, мы можем судить об эндотелийзависимой вазодилатации и выраженной ЭД.

Введение ацетилхолина группе ЛО животным вызывало увеличение кровотока на 25,7% от исходного уровня. Через 3 - 5 минут кровотока возвращался к исходному уровню и стабилизировался. Введение ацетилхолина группе животных с ОСМА (контроль-ишемия) вызвало повышение скорости кровотока только на 11,3%, что было достоверно ниже ($p < 0,05$) по отношению к группе ЛО. На рис.21 представлены результаты, свидетельствующие о том, что у группы животных с ОСМА наблюдается меньшее увеличение кровотока в ответ на введение ацетилхолина, т.е. снижается стимулированная выработка NO эндотелием, что позволяет говорить о развитии эндотелиальной дисфункции у овариоэктомизированных животных с недостаточностью мозгового кровообращения.

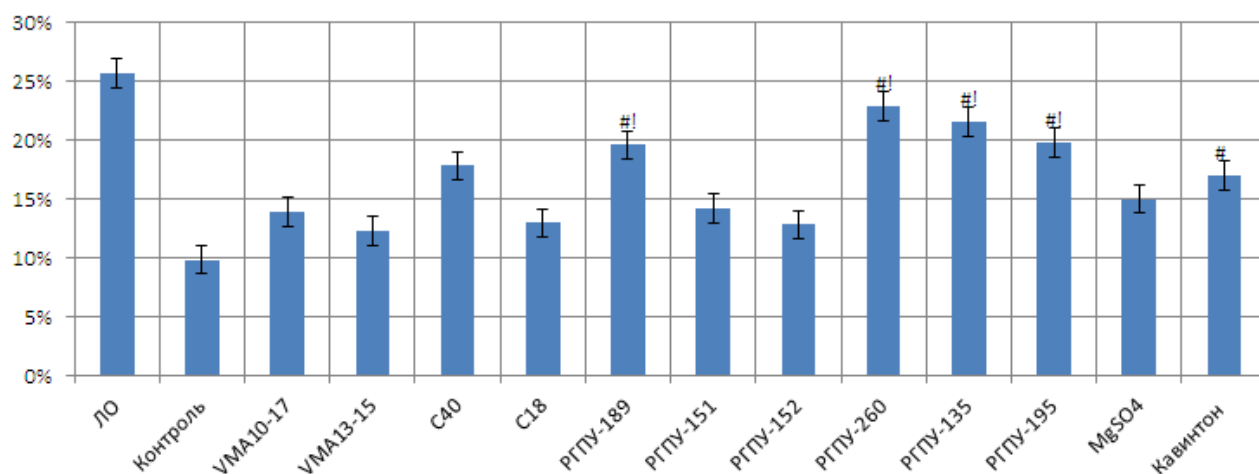


Рис. 21. Изменение локального мозгового кровотока (%) при введении ацетилхолина у животных с ОСМА.

Обозначение:

- достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p < 0,05$); ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Введение ацетилхолина животным, которым вводились соединения РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, наблюдалось достоверно большее повышение МК (на 19,6%, 21,6%, 19,8%, 23% соответственно), что свидетельствует о более высокой эндотелийзависимой вазодилатации и более высоком потенциале увеличения стимулируемой выработки NO, чем у животных контрольной группы.

Для оценки эндотелинезависимой вазодилатации (ЭНВД) использовался нитроглицерин, как донатор NO, позволяющий оценить чувствительность сосудов к NO (рис.22).

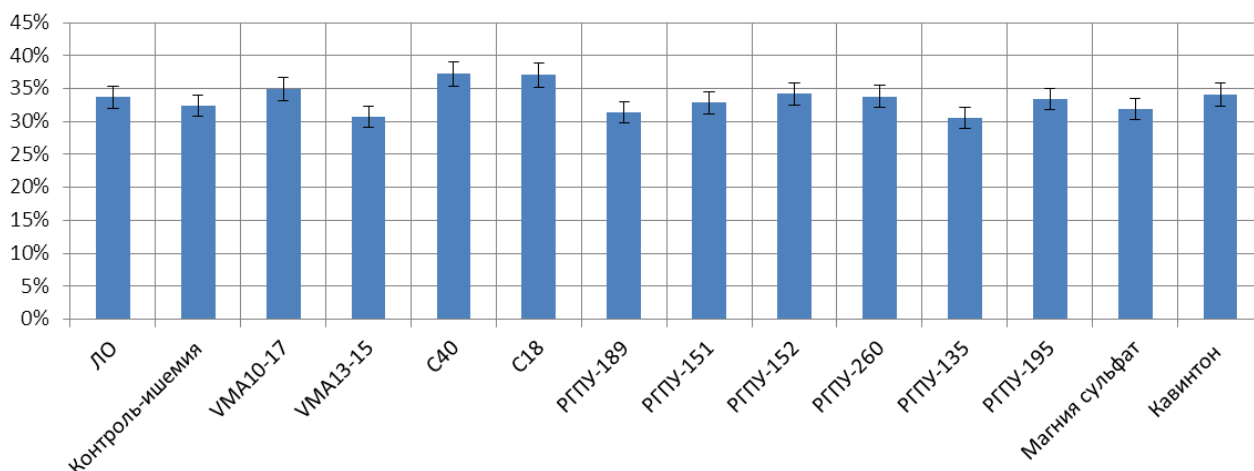


Рис. 22. Изменение локального мозгового кровотока (%) при введении нитроглицерина животным с ОСМА.

Обозначение:

- достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p < 0,05$)

Введение нитроглицерина ЛО животным и крысам с ОСМА приводило к сопоставимому увеличению скорости церебрального кровотока на 33,7% и 32,4% соответственно, что свидетельствует о сохранении ЭНВД у животных с ОСМА.

Нитроглицерин вызывал сопоставимые изменения мозгового кровотока во всех экспериментальных группах, что свидетельствует о сохранности эндотелийнезависимой вазодилатации при моделировании НМК в условиях гипоестрогенемии.

Дополнительным тестом, отражающим базальный синтез NO эндотелием и ЭД, является реакция мозговых сосудов на введение нитро-L-аргинина. Сопоставляя изменения кровотока в ответ на введение нитро-L-аргинина (ингибитора нитроксид синтазы), т.е. ответ на блокаду eNOS, животных опытной и контрольных групп (ЛО и контроль-ишемия), мы можем судить о базальной продукции NO эндотелием, чем больше прирост кровотока в ответ на введение нитро-L-аргинина, тем выше уровень базальной продукции NO и наоборот.

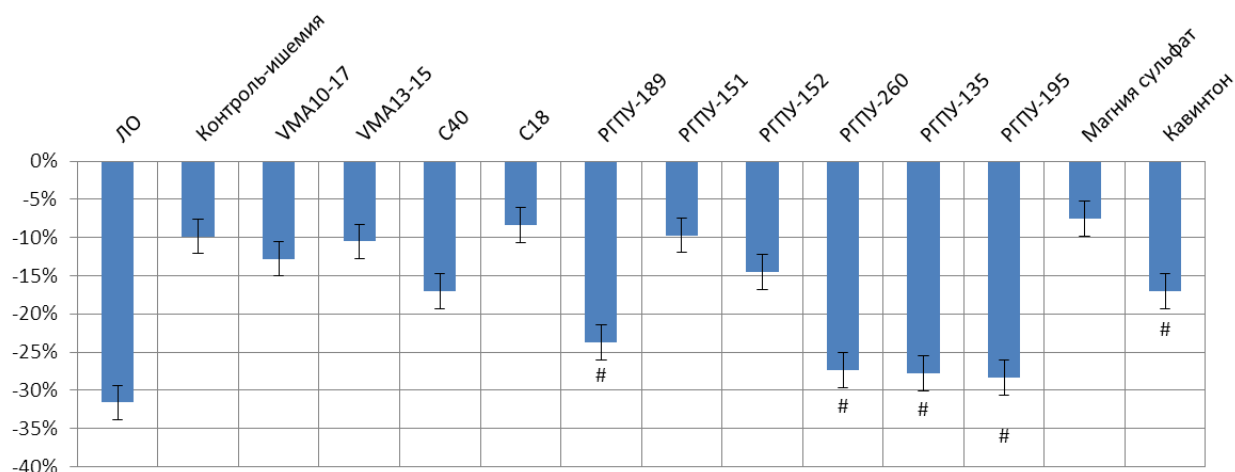


Рис. 23. Изменение локального мозгового кровотока (%) при введении нитро-L-аргинина.

Обозначение:

- достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p < 0,05$)

При введении нитро-L-аргинина ЛО животным наблюдалось значительное снижение кровотока от исходного уровня на 31,6%, тогда как у крыс с ОСМА, МК снижался лишь на 9,9%, что достоверно меньше, чем у группы контроля ($p < 0,05$; рис.23).

После введения нитро-L-аргинина наблюдалось наиболее выраженное падение МК в группах, получавших кавинтон (на 17%), С40 (на 17,1%), РГПУ-189 (на 23,7%), РГПУ-135 (на 27,8%), РГПУ-195 (на 28,4%), РГПУ-260 (на 27,4%).

Полученные результаты дают возможность считать, что соединения РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260 обладают выраженной эндотелиопротективной активностью при недостаточности половых гормонов.

4.1.6 Заключение.

Таким образом, среди соединений-лидеров, проявивших церебропротективное действие на животных без отягощенного преморбидного фона (по результатам первого этапа исследований), в условиях гипоестрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции наиболее эффективными оказались соединения РГПУ-260, РГПУ-195, РГПУ-

135, РГПУ-189. Курсовое введение данных соединений способствовало развитию меньшего неврологического дефицита (менее выражены были психоневрологические, мнестические и сенсомоторные нарушения). При их применении у животных с ОСМА в ее проекции уровень МК был выше, чем при применении других веществ.

4.2 Эффективность соединений-лидеров при нарушениях мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной экспериментальным сахарным диабетом.

К настоящему времени показана роль СД типа 2 в возникновении сосудистой патологии головного мозга [Ярек-Мартынова И. Р., 2010]. Согласно «Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke or Transient Ischemic Attack» (2011) распространенность сахарного диабета среди лиц, перенесших нарушения мозгового кровообращения ишемического генеза, колеблется от 15% до 30% [Kernan W. N., 2015]. При этом сердечно-сосудистые осложнения могут присутствовать намного раньше установления диагноза СД [Schramm et al 2008, Krempf et al 2010]. Повышение риска возникает с участием нескольких механизмов, ведущими из которых являются развитие эндотелиальной дисфункции, нарушения фибринолиза, повышения вязкости крови, активности факторов свертывания крови и усиления реактивности тромбоцитов. Поэтому у больных с диагностированными и недиагностированными заболеваниями сердечно-сосудистой системы СД заметно повышает риск инфарктов миокарда, НМК, летальных исходов [Preis S. R., 2009].

Учитывая важную роль эндотелиальной системы в развитии и прогрессировании как макро-, так и микрососудистых осложнений сахарного диабета, в качестве второй модели ЭД был выбран экспериментальный сахарный диабет, на фоне которого моделировали недостаточность мозгового кровообращения ишемического генеза.

4.2.1 Гликемический профиль животных с экспериментальным сахарным диабетом.

На данном этапе исследований первоначально у животных был смоделирован экспериментальный сахарный диабет путем введения стрептозотоцина на фоне предварительного введения никотинамида. В результате к 7-суткам после введения цитотоксина уровень гликемии животных составлял от 10,4 до 13,6 ммоль/л, что достоверно превышало уровень гликемии интактных животных ($p < 0,05$) (табл.66).

Таблица 66.

Уровень гликемии (ммоль/л) у животных с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа

Группы	Глюкоза, ммоль/л
<i>На 7 сутки после введения стрептозотоцина с никотинамидом</i>	
Интакт	3,6±1,1
ЭСД	10,4-13,6*
<i>На 7 сутки после ОСМА</i>	
ЛО (интакт)	4,0±0,9
ЭСД+ОСМА	11,4±1,1
VMA10-17	10,8±1,2
VMA13-15	11,6±1,2
C40	12±1,3
C18	10,8±1,1
РГПУ-189	10,2±0,9
РГПУ-151	11±1,1
РГПУ-152	11,2±1,2
РГПУ-260	10,2±1,5
РГПУ-135	11,4±1,2
РГПУ-195	10,8±1,5
Магния сульфат	11,6±1,1
Кавинтон	10,8±1,2

Примечание

Интакт - интактная группа животных; ЛО (интакт) – ложнооперированные животные без сахарного диабета; ЭСД – группа животных с экспериментальным сахарным диабетом без лечения; ЭСД+ОСМА – группа животных с экспериментальным сахарным диабетом с окклюзией средней мозговой артерии; * - достоверно по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$).

Через 7-мь дней после индукции ЭСД у животных экспериментальных групп была проведена операция по созданию фокальной ишемии путем внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии. Все исследуемые соединения вводились через 3 часа после ОСМА и далее 1 раз в сутки на протяжении 7 дней.

На 8-ой день после ОСМА производилось повторное измерение уровня сахара в крови. Установлено, что ни одно из исследуемых соединений достоверно по отношению к контрольной группе ишемизированных животных не снижало уровень гипергликемии. Однако, на фоне применения соединений РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195, С18, кавинтона уровень глюкозы в крови был наименьшим.

Через семь дней после индукции ЭСД у животных экспериментальных групп была проведена операция по созданию фокальной ишемии путем внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии. Все исследуемые соединения вводились через 3 часа после ОСМА и далее 1 раз в сутки на протяжении 7 дней.

На 8-ой день после ОСМА производилось повторное измерение уровня сахара в крови. Установлено, что ни одно из исследуемых соединений достоверно по отношению к контрольной группе ишемизированных животных не снижало уровень гипергликемии. Однако, на фоне применения соединений РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195, С18, кавинтона уровень глюкозы в крови был наименьшим.

4.2.2 Влияние лечебного курсового введения соединений-лидеров на неврологический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Как и при моделировании фокальной ишемии на фоне гипострогенемии, неврологический дефицит животных с ОСМА в условиях экспериментального сахарного диабета определяли с помощью шкал – Coombs и D'Alecy и Garcia через 1, 3, 7 суток после проведенной операции.

Формирование фокальной ишемии приводило к развитию неврологического дефицита у животных, что проявлялось в низком уровне суммарного балла по шкалам Coombs (рис.24) and Garsia (рис.25). Наименее выражены неврологические отклонения были у животных, получавших

соединения РГПУ-189, РГПУ-195 и РГПУ-260 и препарат сравнения кавинтон (рис.25).

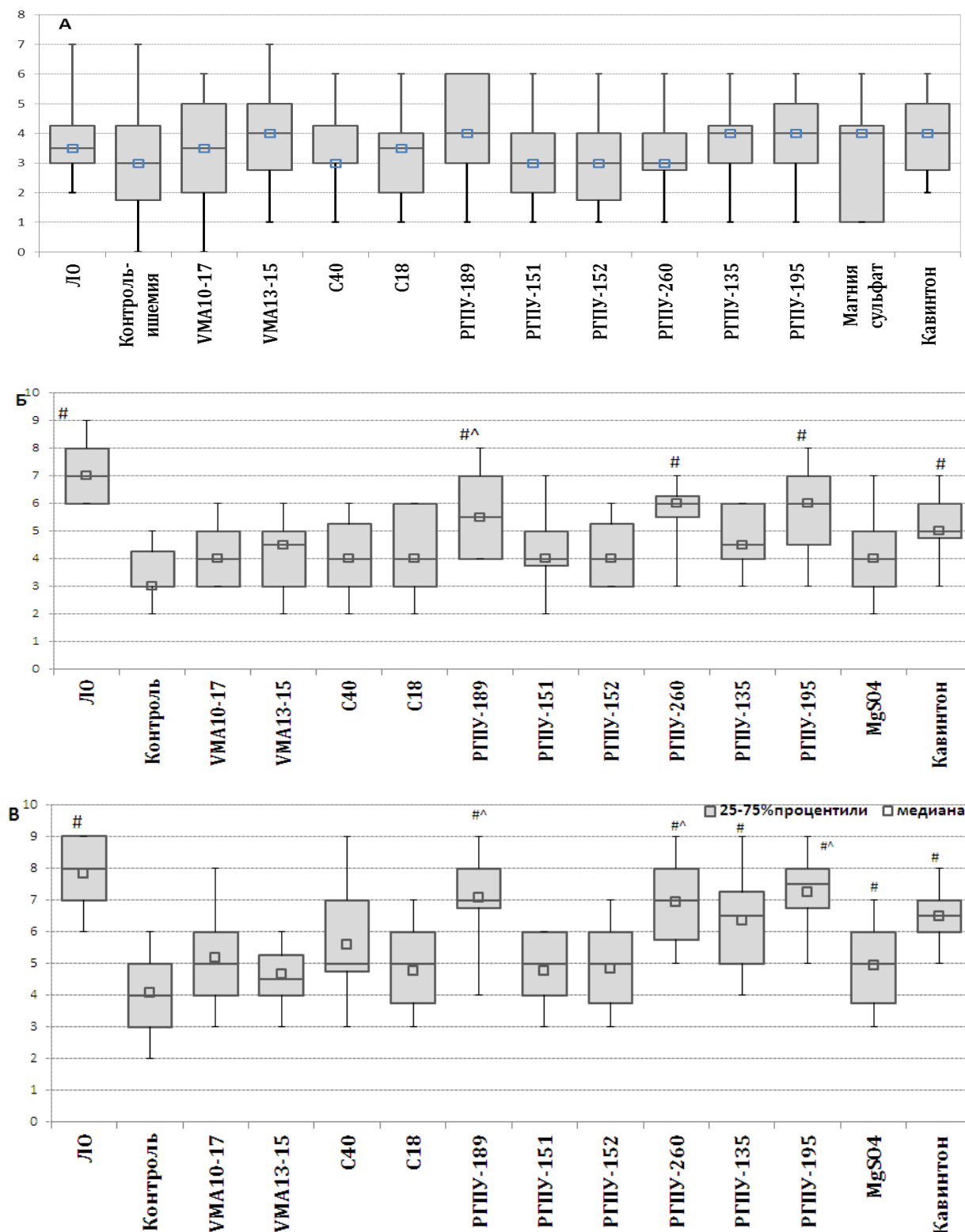


Рис. 24. Выраженность неврологического дефицита по шкале Coombs и D'Alecy у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 (В) суток после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений.

Обозначения: # - достоверно по отношению к группе контроль-ишемия ($p < 0,05$); ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат.

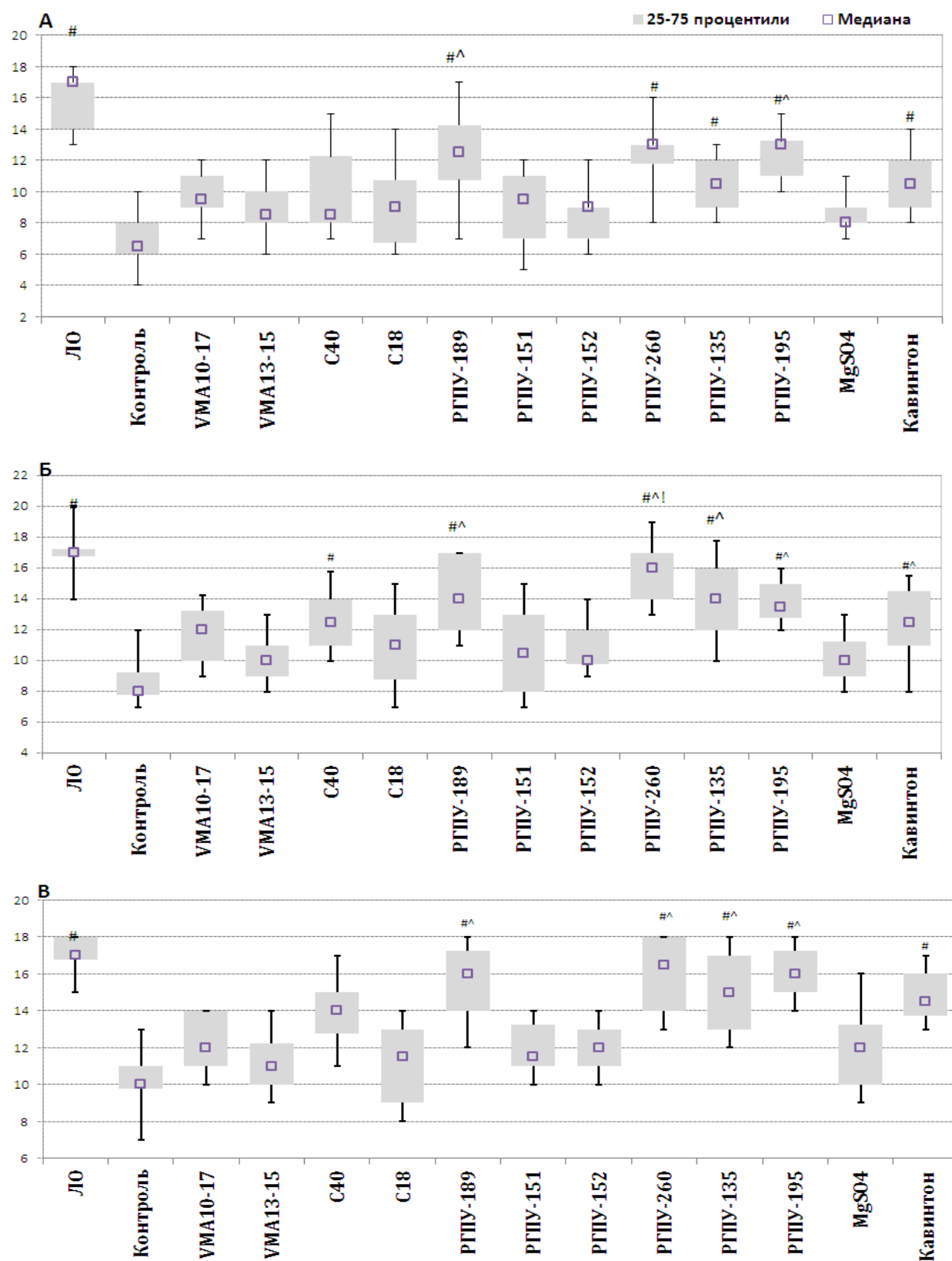


Рис. 25. Выраженность неврологического дефицита по шкале Garsia у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 (В) суток после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений.

Обозначения: как на рис. 24.

4.2.3 Влияние лечебного курсового введения соединений-лидеров на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием фокальной ишемии головного мозга у крыс экспериментальным сахарным диабетом.

Результаты теста Balance-beam представлены в табл.67. У животных контрольной группы наблюдался моторный дефицит задних и передних лап, о чем свидетельствовало большое количество ошибок (соскальзываний) задних лап в тесте «сужающаяся дорожка» и уменьшение общего числа съеденных зерен в паллетах справа и слева в «лестничном» тесте. При этом в обоих тестах моторные нарушения были более выражены в контралатеральных конечностях.

Применение исследуемых соединений РГПУ-195 (в большей степени) и РГПУ-189 (несколько в меньшей степени) способствовали сохранению моторики передних и задних конечностей как на ипсилатеральной, так и на контралатеральной стороне. Из препаратов сравнения более эффективным был кавинтон, однако его эффект был менее выражен, чем при моделировании фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов (см. главу 3).

Таблица 67

Процент асимметрии (%) у животных через 3 и 7 сутки после моделирования фокальной ишемии головного мозга у крыс с экспериментальным сахарным диабетом при лечебном курсовом введении исследуемых соединений в тесте Balance-beam на различных участках пути дорожки

День	Участок дорожки	Группы													
		ЛО	Контроль-ишемия	VMA 10-17	VMA 13-15	C40	C18	РГПУ -189	РГПУ-151	РГПУ -152	РГПУ -135	РГПУ -260	РГПУ -195	Магния сульфат	Кавинтон
3 сутки	Широкая часть	-5± 2,3	17± 2,4	12± 3,1	19± 5,4	19± 3,7	19± 3,3	16± 1,9	10± 3,9	12± 4,1	26± 5,0	26± 5,0	1± 1,5*	11± 5,6	7± 2,4
	Средняя часть	-10± 2,3	21± 3,0	14± 2,5	20± 4,6	12± 3,0	14± 2,9	7± 3,4	16± 3,3	15± 3,0	12± 2,7	12± 2,7	8± 2,6*	16± 3,0	19± 2,5
	Узкая часть	-7± 2,8	59± 4,1	37± 4,9	32± 4,0	38± 4,9	36± 5,4	16± 4,4*	36± 5,6	38± 4,8	40± 4,7	39,1± 4,2	19± 3,8*	42± 7,5	40± 5,3
7 сутки	Широкая часть	0± 2,3	18± 3,3	16± 3,1	17± 3,4	22± 3,0	18± 7,5	14± 3,6	18± 4,1	13± 3,9	21± 3,3	15,3± 3,0	14± 3,4	20± 6,7	16± 3,1
	Средняя часть	1± 2,8	21± 3,1	17± 2,9	15± 4,6	20± 5,8	24± 6,0	9± 3,2	18± 3,9	23± 3,4	15± 5,4	16,1± 2,8	11± 3,2*	19± 2,7	20± 2,6
	Узкая часть	3± 2,2	52± 4,0	34± 4,4	40± 5,1	51± 6,3	43± 7,2	23± 3,4*	46± 5,5	53± 5,8	42± 4,9	32± 3,4	21± 3,5*	46± 4,7	29± 4,3

Примечание

* – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

4.2.4 Влияние курсового лечебного введения «соединений-лидеров» на поведенческий и мнестический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

На 7-ые сутки после моделирования фокальной ишемии у животных отмечалось снижение спонтанной двигательной и исследовательской активности по сравнению с группой ЛО (рис.26), что свидетельствует о дезинтеграции отдельных компонентов поведенческой реакции и нарушении ее целостности [Зарубина И.В., Шабанов П.Д., 2011].

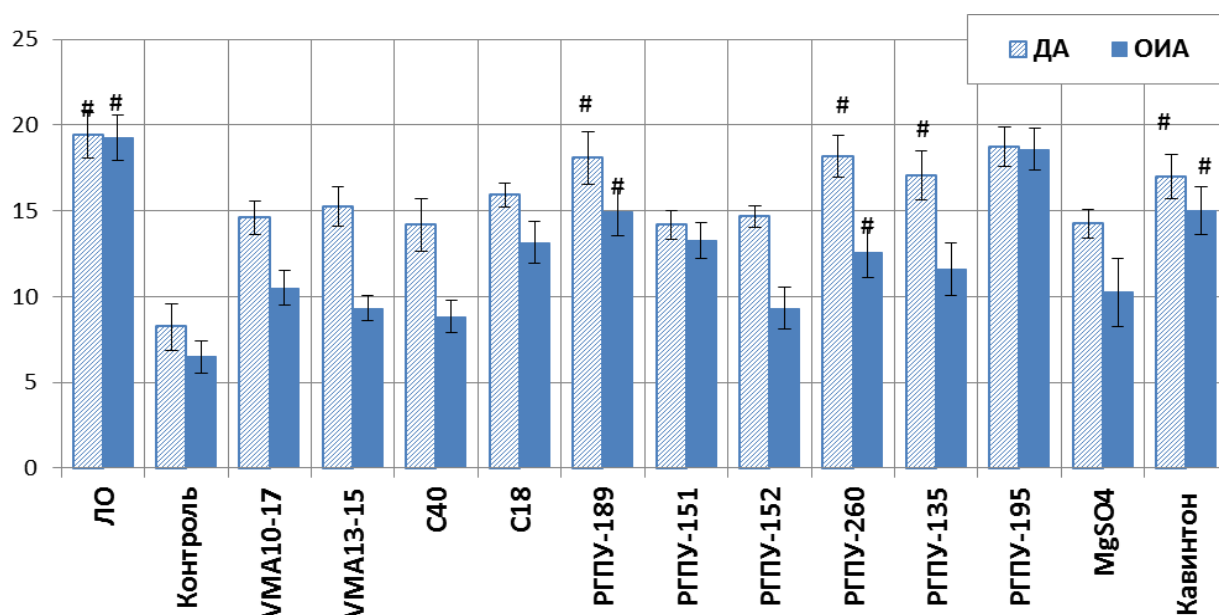


Рис. 26. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных с фокальной ишемией.

Обозначение:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Контроль (контроль-ишемия) – группа животных с ОСМА, получавшая 0.9% раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе животных с ОСМА, получавшая физиологический раствор ($p < 0,05$).

У животных, которым в течение 7 дней вводились соединения РГПУ-189 и РГПУ-195, локомоторная и исследовательская активность была выше, чем у животных, получавших другие исследуемые вещества и препараты сравнения (рис.26). Применение РГПУ-135, РГПУ-260 повышало

двигательную активность, в то же время в меньшей степени влияло на ориентировочно-исследовательское поведение крыс.

На данном этапе было показано, что ОСМА приводит к значительному уменьшению латентного периода выполнения условного рефлекса пассивного (в тесте УРПИ) и увеличению ЛП активного (в тесте ТЭИ) экстраполяционного избегания (подныривания) (рис.27), что свидетельствует о нарушении сохранности памятного следа.

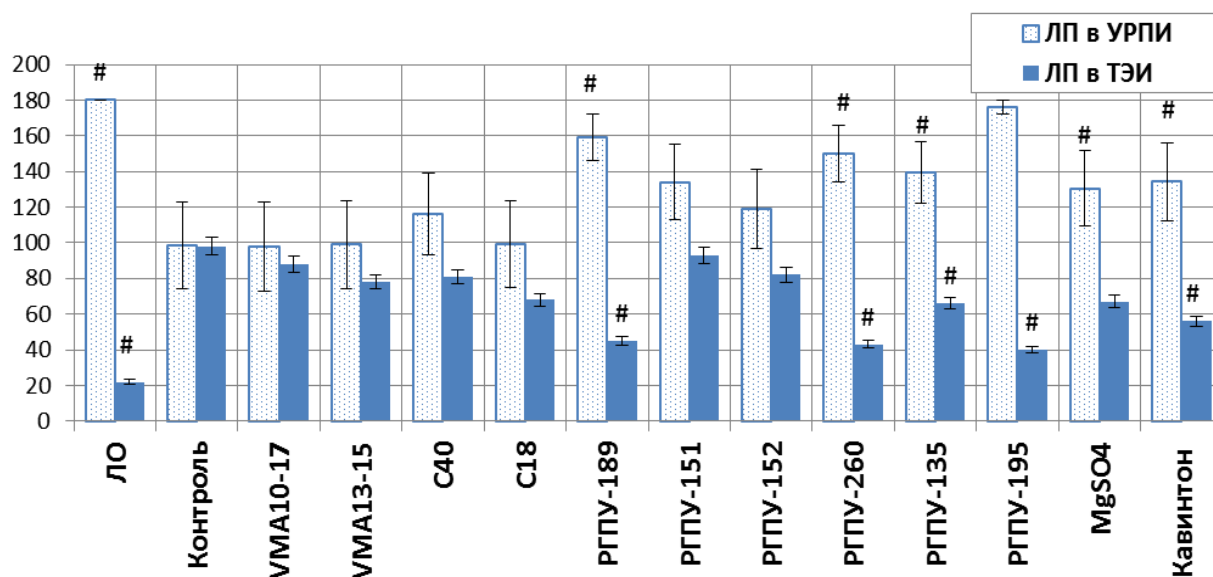


Рис. 27. Латентный период подныривания (ЛП) животных с ОСМА в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ

Обозначения:

ЛО - ложнооперированные животные; Контроль – группа животных с ОСМА, получавшая физиологический раствор; ЛП в ТЭИ - латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период

Введение в течение 7 суток соединений РГПУ-195, РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-135 и препарата сравнения кавинтона способствовало лучшему сохранению условного рефлекса пассивного и активного избегания у крыс с фокальной ишемией по сравнению с группой контроль-ишемия.

4.2.5 Влияние курсового лечебного введения соединений-лидеров на уровень мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных с экспериментальным сахарным диабетом при моделировании фокальной ишемии головного мозга.

При оценке уровня мозгового кровотока у крыс с ОСМА на фоне экспериментального сахарного диабета на 7-й день введения исследуемых соединений установлено, что уровень МК у ЛО животных составил $4,53 \pm 0,3$ у.е., тогда как у животных с ОСМА на фоне сахарного диабета (контроль-ишемия) он был снижен на 51,5 % ($p < 0,05$). Введение исследуемых веществ РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и несколько в меньшей степени РГПУ-135 способствовало сохранению более высокого уровня мозгового кровотока в ишемизированном полушарии животных (рис.28).

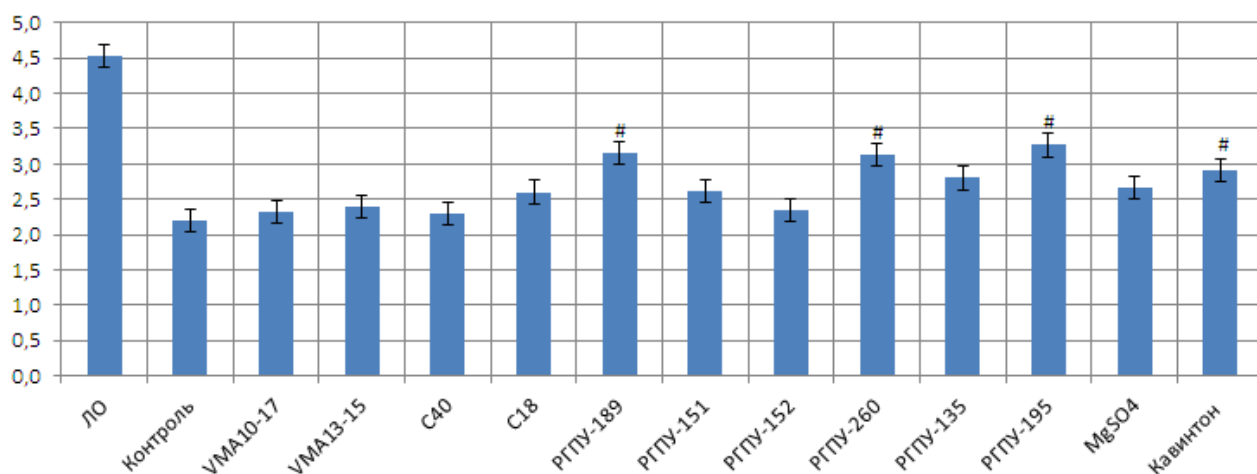


Рис. 28. Уровень мозгового кровотока (у.е.) у крыс с ОСМА на фоне сахарного диабета в полушарии на стороне поражения.

Обозначения:

ЭСД+НМК – группа животных с ОСМА на фоне экспериментального сахарного диабета без лечения; ЛО - ложнооперированная группа животных; # - достоверно по отношению к группе ЭСД+ОСМА ($p < 0,05$).

Литературные данные последних лет, со всей очевидностью, свидетельствуют о том, что при сахарном диабете всегда отмечается ЭД, сердечно-сосудистые осложнения и, в частности НМК, которые в свою очередь приводят к развитию цереброваскулярной патологии [Capes S. E., 2001; Micha R., 2010; Rydén L., 2010]. Эндотелий играет ключевую роль в регулировании сосудистого тонуса за счет продукции вазоактивных веществ, наиболее важным из которых является оксид азота – «маэстро»,

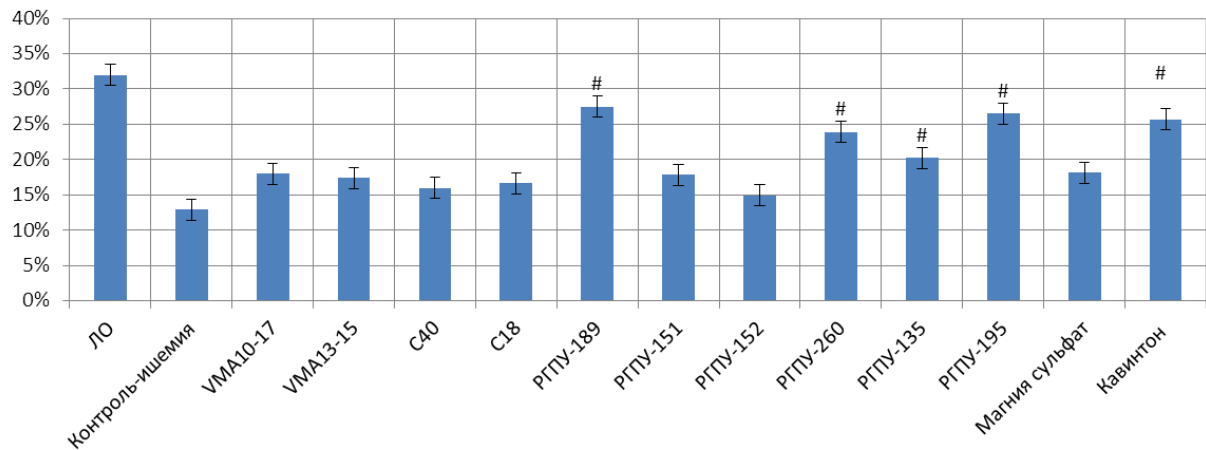
управляющий продукцией всех эндотелиальных факторов [Тюренков И.Н., 2011]. ЭД проявляется в первую очередь нарушением эндотелиозависимой вазодилатации, которую в условиях эксперимента, возможно оценить по степени изменения показателей мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза эндогенного оксида азота.

Вазодилатирующая функция эндотелия была оценена в условиях модификации синтеза эндогенного NO при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина. Эндотелий независимая вазодилатация была оценена с помощью введения нитроглицерина.

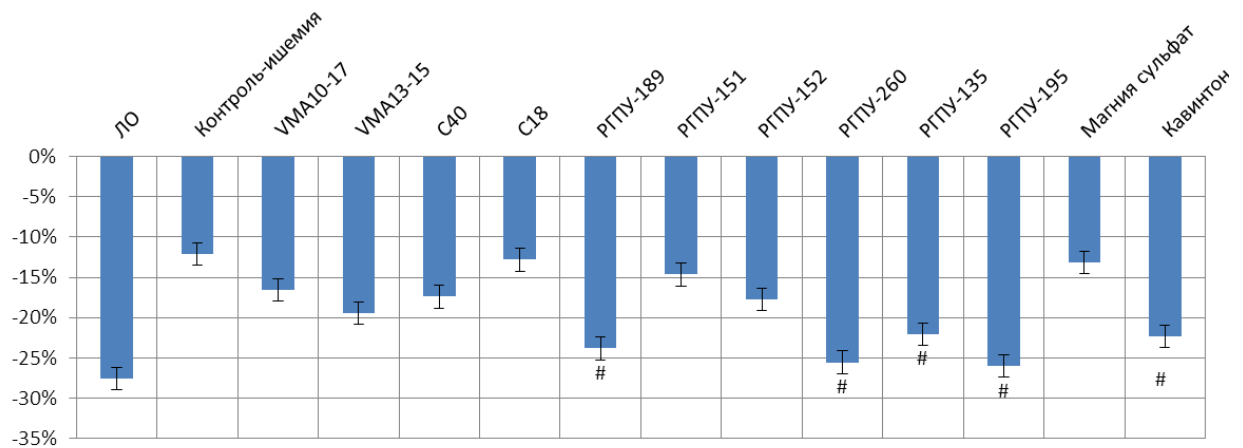
В ходе исследования было установлено, что у животных ЭСД+ОСМА статистически менее значимая реакция на введение ацетилхолина (рис.29А) и нитро-L-аргинина (рис.29Б), чем у интактных животных, тогда как реакция на нитроглицерин во всех экспериментальных группах практически не отличалась друг от друга (рис.29В).

Введение ацетилхолина животным с ОСМА, получавшим на фоне экспериментального сахарного диабета исследуемые вещества РГПУ-189, РГПУ-195, вызывало увеличение кровотока на 27,5% и на 26,5% соответственно ($p < 0,05$) (рис.29 А). Это в два раза больше, чем у животных контрольной группы и больше, чем у препарата сравнения – магния сульфат. Введение нитро-L-аргинина данным животным способствовало более выраженному снижению церебрального кровотока по сравнению с животными с ЭСД+ОСМА без лечения (рис.29Б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что под действием РГПУ-189, РГПУ-195 у животных с ОСМА увеличивается стимулируемая и базальная продукция оксида азота в большей степени, чем у животных, получавших другие исследуемые вещества.

А



Б



В

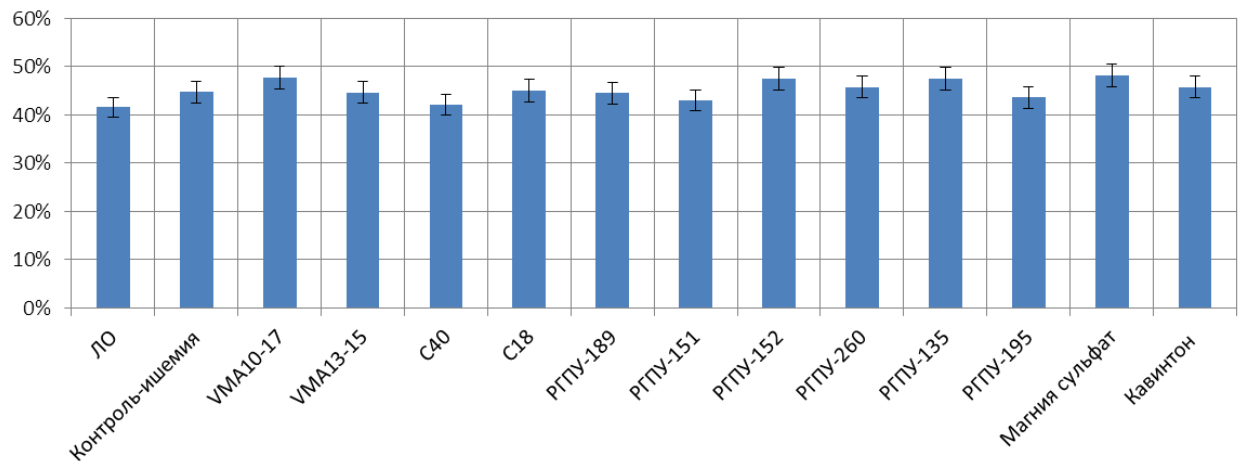


Рис. 29. Изменение мозгового кровотока (%) в проекции средней мозговой артерии при введении ацетилхолина (А), нитро-L-аргинина (Б), нитроглицерина (В) у животным с ОСМА.

Примечание:

ЭСД+НМК – группа животных с ОСМА на фоне экспериментального сахарного диабета без лечения; ЛО - ложнооперированная группа животных; # - достоверно по отношению к группе ЭСД+ОСМА ($p < 0,05$).

4.2.6 Заключение

Таким образом, при моделировании НМК на фоне экспериментального сахарного диабета наиболее выраженными церебро- и эндотелиотропными свойствами обладали соединения РГПУ-189 и РГПУ-195.

4.3 Влияние соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на размер зоны повреждения головного мозга при фокальной ишемии.

Для комплексной оценки церебропротекторного действия наиболее активных соединений была определена зона инфаркта у животных, перенесших ОСМА на фоне СД и НПГ.

Определение зоны инфаркта мозга проводили трифенилтетразолиевым методом [Трофименко А. И. и др., 2013]. Трифенилтетразолия хлорид присоединяет водород, который, проходя через всю систему переносчиков, соединяется с молекулярным кислородом. Ферментативное окисление субстрата сопровождается образованием НАДН или НАДФН. На втором этапе реакции трифенилтетразолия хлорид в сопряженной «индикаторной реакции» восстанавливается при участии НАДФН-дегидрогеназы до водонерастворимого формазана, который имеет красную окраску. При этом НАДН или НАДФН снова окисляются. Образование формазана, таким образом, происходит в месте локализации НАДФН-дегидрогеназы и, как правило, в митохондриях. Интенсивность окраски окрашиваемой ткани зависит от количества образующегося формазана и свидетельствует об активности фермента. Некротизированные ткани не окрашиваются.

В контрольной группе с ОСМА зона инфаркта составила $308 \pm 70,8$ (при СД) и $263,7 \pm 68,5$ (при НПГ) мм³. Введение исследуемых соединений (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) уменьшило объем повреждения в среднем на 19,4-29,2% (при СД) и 22,4-34,1% (при НПГ) (рис.30).

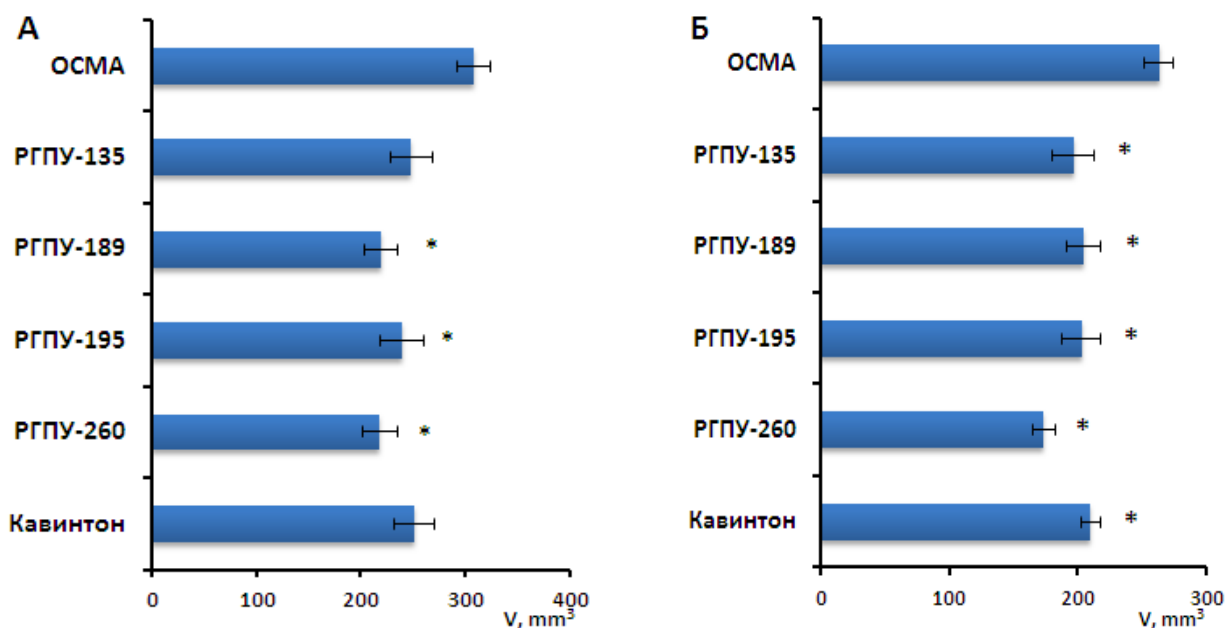


Рис. 30. Влияние исследуемых соединений на размер объема инфаркта у животных, перенесших фокальную ишемию на фоне СД(А) и НПГ(Б).

Обозначения:

ОСМА – животные с фокальной ишемией мозга без лечения; * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p < 0,05$).

4.4 Заключение.

Таким образом, проведенное исследование доказывает, что выраженность церебро- и эндотелиотропного действия веществ в разной степени проявляется при моделировании НМК на условно здоровых животных (см. главу 3) и животных, отличающихся по возрасту и преморбидному фону (см. главу 4) (рис.31). Так у животных 4-6 мес возраста без отягощенного преморбидного фона многие исследуемые соединения оказывали выраженное и сопоставимое церебропротекторное действие, то в условиях метаболических нарушений (НПГ и СД) более эффективными были соединения РГПУ-260 и РГПУ-189 (при НПГ и СД) и РГПУ-135 (при НПГ).

На основании этих данных для дальнейшего углубленного изучения возможных механизмов церебропротекторного действия при НМК были выбраны РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.

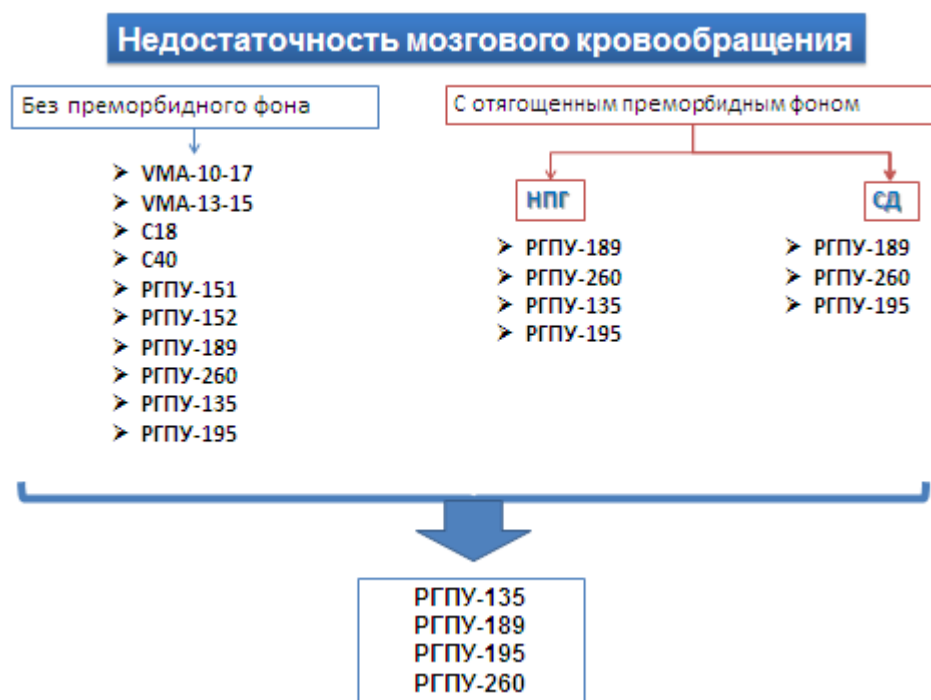


Рис. 31. Эффективность соединений при моделировании НМК на интактных животных и животных с отягощенным преморбидным фоном

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ.

Следующим этапом работы явилось изучение соединений - лидеров РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях хронической недостаточности мозгового кровообращения, которая моделировалась путем 28-дневного гравитационного воздействия в каудо-краниальном векторе экспериментальных животных. Из литературных источников известно, что гравитационные перегрузки как один из физических факторов, оказывающих существенное влияние на систему кровообращения и деятельность головного мозга, уже давно привлекает внимание многих исследователей [Гаевый М.Д., 2000; Сергеев А.А., 1967]. На сегодняшний день, на основе воздействия перегрузок в кранио-каудальном направлении, предложена модель преходящей ишемии у экспериментальных животных [Гаевый М.Д., 2000]. Однако перегрузки, вектор которых направлен в каудо-краниальном направлении, не свойственны условиям гравитации Земли и поэтому можно предполагать, что они могут вызывать более сильные повреждения церебральной системы, чем нагрузки в кранио-каудальном векторе. Это связано с тем, что защитные адаптационные механизмы млекопитающих при данном типе перегрузок малоэффективны. Из литературных данных известно [Сергеев А.А., 1967], что перегрузки в данном направлении сопровождаются подъемом артериального давления в бассейне сонной артерии и развитием нарушений мозгового кровообращения. В ранее проведенных нами исследованиях [Литвинов А. А., 2012] было установлено, что однократное воздействие перегрузок в каудо-краниальном направлении сопровождается развитием когнитивных и поведенческих нарушений, однако при отсутствии повторных воздействий наблюдалось постепенное их затухание. Поэтому используя многократно-повторяющиеся перегрузки в каудо-краниальном векторе (в течение 28 дней), у животных возможно смоделировать

нарушение мозгового кровообращения, имеющее место при гипертонических кризах у больных артериальной гипертензией и сопровождающееся симптомами хронической недостаточности мозгового кровообращения. Исследуемые соединения (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) и препараты сравнения вводились в течение 14 дней по окончании 28-ми дневного воздействия гравитационных перегрузок в каудо-краниальном направлении. После курсового введения исследуемых веществ для подтверждения наличия или отсутствия когнитивных и поведенческих нарушений были использованы тесты открытого поля (ОП), приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), экстраполяционного избегания (ТЭИ), условной реакции пассивного избегания (УРПИ), радиального 8-лучевого лабиринта, Rota-rod, также оценивалась физическая работоспособность животных, изучались мозговое кровообращение и функциональное состояние эндотелия (дизайн исследования представлен в гл.2).

5.1 Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на психоэмоциональный статус животных с хроническим НМК.

Развитие и прогрессирование хронических НМК в клинической практике зачастую сопровождаются эмоциональными нарушениями у больных с преобладанием тревожных и депрессивных компонентов [Дамулин И.В., 2010; Гусев Е.И., Боголепова А.Н., 2013; Камчатнов П. Р., 2014]. Их наличие снижает приверженность пациентов к проводимой терапии, негативно влияет на эффективность проводимых лечебных и профилактических мероприятий. Вместе с тем коррекция указанных нарушений нередко осложнена вследствие того, что пациенты с хроническими НМК вынуждены одновременно принимать несколько лекарственных препаратов с риском развития нежелательного лекарственного взаимодействия [Камчатнов П. Р., 2014]. Поэтому наличие у церебропротекторного средства плеiotропных эффектов (анксиолитических,

антидепрессивного и др.) позволит снизить риск полипрогмазии у таких пациентов.

Исследование психоэмоционального состояния животных, получавших в течение 14 дней после 28-ми дневного гравитационного воздействия исследуемые соединения и препараты сравнения, проводилось с использованием тестов «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Установлено, что экспериментальная хроническая ишемия мозга, вызванная 28-ми дневным гравитационным воздействием, приводит к выраженным нарушениям поведения у крыс. Выявлено снижение двигательной активности и ориентировочно-исследовательской активности (табл.68), повышение тревожности, эмоционального напряжения (табл.68, табл.69), характеризующие стрессовую реакцию и уменьшение компенсаторно-приспособительных возможностей у животных, подвергшихся гравитационному воздействию по сравнению с интактными крысами.

Таблица 68

Влияние исследуемых соединений на поведение животных с хронической недостаточностью мозгового кровообращения в тесте «Открытое поле»

Группы	Исследуемые показатели (M±m)				
	ДА	ОИА	ЦЗ	АГ	ФБ
1	2	3	4	5	6
Интакт	37,8±1,5	15,4±2	0,2±0,2	3±0,5	0,3±0,13
Контроль-ишемия	14,4±1,7	6,5±0,9	0,1±0,1	6,1±0,9	0,6±0,2
РГПУ-135	20±1,9*	12,5±1,7*	0,7±0,2*	1,6±0,5*	0,1±0,1*
РГПУ-189	31,1±2,7*	16,5±1,5*	0,2±0,11	3,6±0,9	0,3±0,2
РГПУ-195	27,1±3*	13,9±1,2*	0	3,2±1,1	0,5±0,3
РГПУ-260	21,1±2,4*	10,6±1,1*	0,2±0,17	4,8±1,5	0,3±0,1
Цитиколин	26,8±2,1*	11,3±1,1*	0,1±0,1	3,8±1	0,5±0,2
Глиатилин	28,9±3,4*	12,3±2,2*	0,2±0,11	4,3±1,1	0,5±0,3

Примечание:

ДА (двигательная активность) – (количество пересеченных квадратов); ВС – вертикальные стойки; ЦО – заглядывания в отверстия; ОИА – суммарная ориентировочно-исследовательская активность (сумма количества стоек и заглядываний в отверстия); ЦЗ – центральная зона (количество заходов); АГ – акты груминга (количество); ФБ – фекальные болюсы (количество); * - $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных

Исследуемые соединения (РГПУ-189>РГПУ-195>РГПУ-135, РГПУ-260) и препараты сравнения (цитиколин, глиатилин) статистически значимо

по сравнению с контролем увеличили локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность животных с хроническим НМК в тесте «открытого поля» (табл.68). При этом исследуемое соединение РГПУ-135 увеличивало количество выходов в центральную зону поля (подавляли страх перед новым ярко освещенным пространством) и уменьшало количество фекальных болюсов и актов кратковременного груминга (вегетативных показателей эмоционального напряжения) у животных с хроническим НМК, что также свидетельствует о его анксиолитических свойствах.

Таблица 69.

Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на параметры поведения животных с хроническим НМК в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Группы	Значение показателей $M \pm m$			
	V_{OP}	KZ_{OP}	$V_{Ц}$	$\Sigma КП$
1	2	3	4	5
Интакт	95,4±5,4 *	4,3±0,2	28,9±2,7 *	6,7±0,2*
Контроль-ишемия	13,1±1,9	1,14±0,1	7,9±2,2	3,0±0,6
РГПУ-135	53,4±3,7 *	3,6±0,4 *	21,7±3,3 *	7,7±0,8 *
РГПУ-189	44,86±3,9*	3,2±0,3 *	23,4±3,3 *	8,7±0,5 *
РГПУ-195	29,9±2 *	2,0±0,3	28,4±2,6 *	6,4±0,5 *
РГПУ-260	26,3±2,4	2,2±0,4	22,8±3,2	5,1±0,4*
Цитиколин	27,0±1,9	2,4±0,2	20,6±2,4*	4,9±0,7 *
Глиатилин	28,6±2,3	1,9±0,3	23,6±2,4*	5,2±0,5 *

Примечание:

V_{OP} - время в открытых рукавах (сек.); KZ_{OP} – количество заходов в открытые рукава; $V_{Ц}$ - время в центральной зоне (сек.); $\Sigma КП$ – количество переходов между рукавами (суммарная двигательная активность);* - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы

В тесте ПКЛ (табл.69) введение животным соединений РГПУ-135>РГПУ-189 > РГПУ-260, РГПУ-195 приводило к увеличению количества заходов в открытые рукава лабиринта, времени нахождения в них, а также число переходов между рукавами.

Таким образом, курсовое введение исследуемых соединений (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) животным с хроническим НМК способствует повышению у них локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности, предотвращает развитие тревожности и эмоционального напряжения.

5.2 Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на физическую выносливость и координацию животных с хроническим НМК.

НМК в зависимости от тяжести течения вызывают, помимо снижения двигательной активности, нарушения координации различной степени выраженности и снижение физической выносливости. Поэтому в данном блоке исследований при моделирования хронического НМК оценивали функциональное состояние нервной системы у животных, тестируя координацию движений и мышечный тонус в тесте Rota-Rod, физическую выносливость – в тесте плавания животных с грузом до предела.

При исследовании координации движений и мышечного тонуса в тесте Rota-Rod установлено уменьшение латентного периода первого падения животного и суммарного времени удержания на вращающемся стержне у животных с хроническим НМК, что говорит о значительном нарушении координации движений и снижении мышечного тонуса у животных с НМК (табл.70).

Таблица 70

Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на координацию движений и мышечный тонус в тесте Rota-Rod и физическую работоспособность животных с хроническим НМК

Группы	тест Rota-Rod		Продолжительность плавания животных с грузом, с
	ЛП первого падения, с	Время удержания на стержне, с	
1	2	3	4
Интакт	40,1±7,7	110,1±12,3	103,2±21
Контроль-ишемия	15,4±2,3	45,4±2,1	67,3±8,7
РГПУ-135	28,1±4,5*	90,2±10,2*	87,2±7,6*
РГПУ-189	31,4±6,1*	67,4±7,3	90,2±8,3*
РГПУ-195	35,9±3,2	99,2±8,1	98,2±8,4*
РГПУ-260	23,1±2,4	78,3±6,7*	72,4±12,1*
Цитиколин	20,8±5,4	83,9±7,8*	82,2±6,1*
Глиатилин	21,5±2,9	78,1±6,3*	76,1±7,7

Примечание:

ЛП – латентный период первого падения; время удержания – суммарное время удержания на вращающемся стержне; * - $p < 0,05$ – различия статистически значимы по отношению к показателю контрольной группы

При исследовании физической выносливости отмечено ее снижение у животных с хроническим НМК по отношению к интактной группе в 1,5 раза ($p < 0,05$; табл.70).

Курсовое введение исследуемых соединений РГПУ-195, РГПУ-135 и РГПУ-189 животным с хроническим НМК улучшает координацию движений и повышает толерантность к физической нагрузке по сравнению с показателями контрольной группы (табл.70). Их действие было сопоставимо с таковым у цитиколина.

5.3 Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 на когнитивные функции животных с хроническим НМК.

5.3.1 Влияние курсового введения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 на обучаемость животных с хроническим НМК в тестах УРПИ и ТЭИ

С целью оценки когнитивных функций у животных с хроническим НМК использованы тесты УРПИ и ТЭИ. Для этого у животных с хроническим НМК через 14 дней после введения исследуемых веществ вырабатывали рефлекс пассивного (УРПИ) и активного избегания (ТЭИ), а через 24 часа повторяли тесты, чтобы оценить способность животных к запоминанию.

Проведенное исследование установило, что животные контрольной группы с хроническим НМК обладают меньшей способностью к обучению по сравнению с интактными крысами, о чем свидетельствовало большее количество не решивших задачу экстраполяционного избегания в ТЭИ и зашедших в темный отсек в УРПИ (табл.71).

Курсовое введение соединений РГПУ-135, РГПУ-189 и РГПУ-195 (в большей степени) животным с хроническим НМК повышало обучаемость животных в тестах УРПИ и ТЭИ, при этом оказываемое соединением РГПУ-195 действие было сопоставимо с таковым у препарата сравнения глиатилина (табл.71).

Таблица 71.

Латентный период захода животных в темный отсек в тесте УРПИ и решения ими экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ при воспроизведении рефлекса.

Группа	ТЭИ		УРПИ	
	ЛП решения экстраполяционной задачи, с	% решивших задачу	ЛП захода в темный отсек теста УРПИ, с	% зашедших в темный отсек
Интакт	10,8±0,8*	100	180*	0
Контроль-ишемия	97,8±21	58	127,9±22,3	33
РГПУ-135	63,3±16,1	83	166±14	8
РГПУ-189	66,3±15,8	83	180*	0
РГПУ-195	42,8±4,9*	100	180*	0
РГПУ-260	81,3±21,2	67	150,5±19,9	17
Цитиколин	75,4±22,5	67	167±13	8
Глиатилин	51,0±12,3	92	180*	0

Примечание:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия»

5.3.2 Влияние курсового введения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на формирование рабочей и референтной пространственной памяти животных с хроническим НМК

Как видно из данных, представленных на рис.32, при исследовании когнитивных функций животных в радиальном (8-лучевом) лабиринте ухудшение памяти было выявлено у крыс с хроническим НМК. Так количество животных данной группы достигших критерия обучаемости составило 25 % от общего количества, что значительно ниже, чем в группе интактных животных (66,7%) ($p < 0,05$).

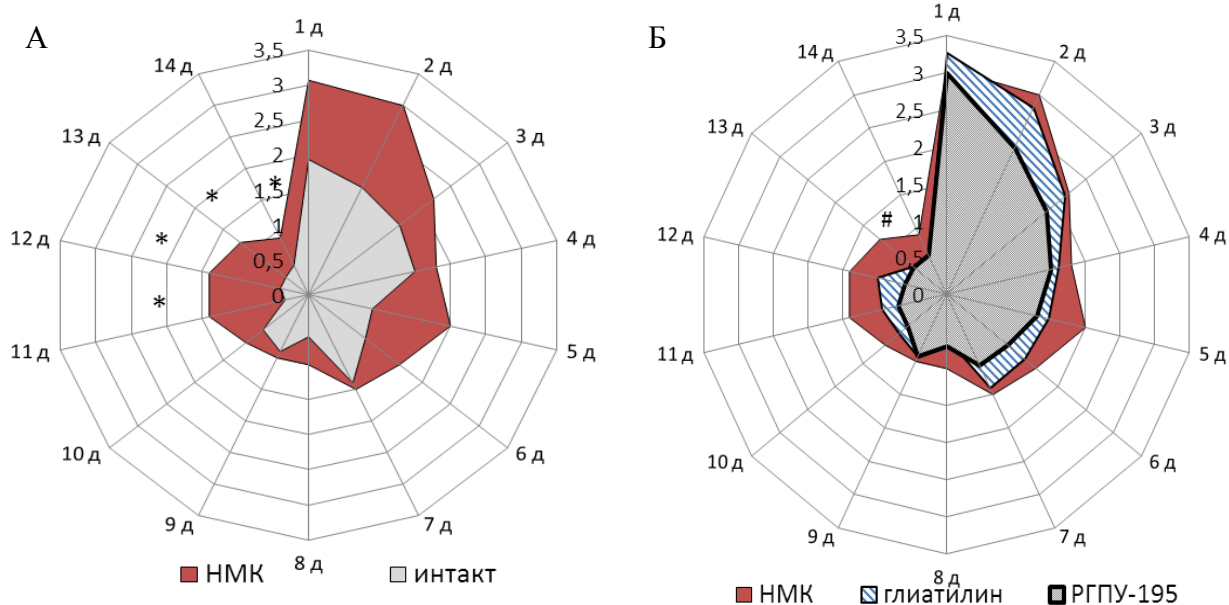


Рис. 32. Среднее число ошибок рабочей памяти (посещение рукава, в котором животное уже было) при выполнении теста «радиальный лабиринт».

Обозначения:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой интакт; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия» (НМК).

При этом животные с НМК чаще, чем интактные крысы проявляли пассивно-оборонительные реакции: непрерывный груминг (умывание), навязчивое чесание, а также заторможенность поведения, которая выражалась в длительном неподвижном нахождении на одном месте. Только курсовое применение РГПУ-195 и глиатилина у крыс с НМК увеличивало число животных, достигших критерия обучаемости, до 46,7%.

Большее число ошибок рабочей и референтной (долговременной) памяти у крыс НМК по сравнению с интактными животными может свидетельствовать о большем ишемическом повреждении головного мозга, что проявлялось в ослаблении у них внимания, зрительно-пространственной ориентации. Напротив, курсовое применение глиатилина и РГПУ-195 у крыс с НМК уменьшало выраженность когнитивных нарушений, что подтверждалось в меньшем числе ошибок рабочей и референтной (долговременной) памяти и лучшей пространственной ориентации животных в лабиринте по сравнению с крысами, получавшими физиологический раствор (рис.32, рис.33).

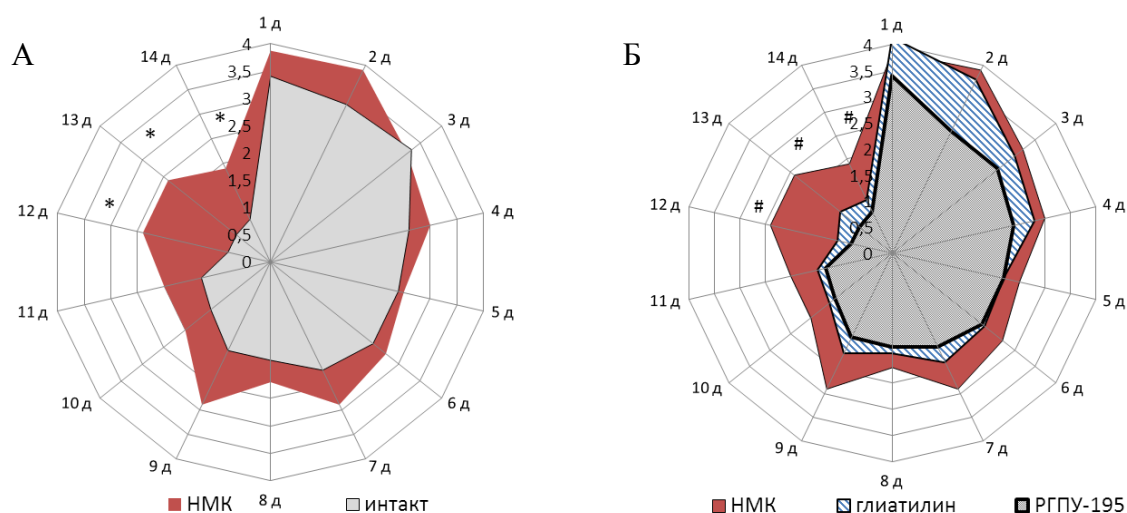


Рис. 33. Среднее число ошибок долговременной памяти (посещение рукава без пищи) при выполнении теста «радиальный лабиринт».

Обозначения:

* - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой интакт; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия» (НМК).

5.4 Влияние курсового введения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на мозговое кровообращение и вазодилатирующую функцию эндотелия животных с хроническим НМК.

Установлено, что уровень МК у животных с хроническим НМК был на 29% ниже, чем у интактных животных (табл.72). При этом у крыс данной группы реакция церебральных сосудов на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина была наименьшей, что указывает на ослабление ЭЗВД и нарушении функционального состояния эндотелия (табл.72).

Курсовое 14 дневное введение всех исследуемых соединений (но в большей степени РГПУ-195) улучшало мозговое кровообращение у крыс, повышая его уровень на 15,6-26,3% по сравнению с животными с ХНМК, получавшими физиологический раствор. Введение ацетилхолина вызывало повышение скорости кровотока у крыс, получавших РГПУ-135 на 19,6 %, РГПУ-189 – на 20,1 %, РГПУ-195 – на 24,2 %, РГПУ-260 – 20,6% ($p < 0,05$), т.е. ответ был выше, чем у животных с ХНМК без лечения (табл.72). После введения нитро-L-аргинина наблюдалось падение кровотока в сосудах мозга на -23,4% (РГПУ-135), -25,6% (РГПУ-189), -27,9% (РГПУ-195), -22,3%

(РГПУ-260). При введении нитроглицерина, отмечалось сопоставимое повышение МК во всех исследуемых группах.

Таблица 72

Уровень МК в проекции средней мозговой артерии и его изменения в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина животным с хроническим НМК

Группы животных	Фоновые значения, у.е.	Повышение МК на введение ацетилхолина, % прироста	Снижение МК на введение нитро-L-аргинина, % падения	Введение нитроглицерина, % прироста
Интакт	4,1±0,4	26,1%	-30,7%	44,2±4,3
Контроль-ишемия	3,2±0,3#	11,3%#	-14,2%#	45,6±4,1
РГПУ-135	3,9±0,4*	19,6%*	-23,4%*	44,6±4,2
РГПУ-189	3,87±0,3*	20,1%*	-25,6%*	42,1±3,4
РГПУ-195	4,04±0,3*	24,2%*	-27,9%*	44,3±5,1
РГПУ-260	3,7±0,4*	20,6%*	-22,3%*	44,2±5,4
Цитиколин	3,7±0,3*	19,8%*	-20,1%*	46,1±6,5
Глиатилин	3,91±0,4*	21,2%*	-25,1%*	40,3±3,8

Примечание:

- $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой интактных животных; * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия» (животные с ХНМК).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что под действием изучаемых веществ происходит коррекция эндотелиальной дисфункции, вызванная хроническим НМК.

5.5 Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что соединения РГПУ-195 (в большей степени) и РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-260 (несколько в меньшей) способны улучшать мозговое кровообращение при его хроническом нарушении и снижать выраженность эндотелиальной дисфункции, тем самым уменьшая выраженность когнитивных и мнестических нарушений. Соединение РГПУ-135 в условиях ХНМК оказывало анксиолитическое действие, что будет несомненно полезным при его применении у пожилых лиц с НМК, имеющих тревожно-депрессивные наложения.

ГЛАВА 6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ ПРИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВОЗРАСТНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ И ХРОНИЧЕСКИМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

Для понимания потенциальных патогенетических механизмов развития нарушений мозгового кровообращения и их целенаправленного лечения и профилактики чрезвычайно важно знание распределения факторов риска. Возраст и высокая коморбидность рассматриваются в качестве основных предикторов негативного исхода инсульта [Орлова А.С., 2014]. У пожилых людей вероятность развития инсульта существенно возрастает и продолжает прогрессивно увеличиваться по мере старения. Если в возрасте 25-29 лет частота инсультов – 0,09 на 1000 человек, то в возрасте 70 лет и старше – 15,05 на 1000. При этом в последней возрастной группе преобладают женщины [Путилина М. В., 2011]. С возрастом постепенно накапливается число заболеваний, особенно хронических, снижаются возможности адаптации как к экзогенным, так и к эндогенным воздействиям, отмечается «старение» различных систем организма, в том числе старение эндотелия. Значительное увеличение доли лиц пожилого и старческого возраста в структуре населения выдвигает на одно из первых мест в современной медицине задачу эффективной диагностики, лечения и профилактики как возрастзависимой патологии, так и коррекцию возрастных физиологических изменений, служащих фундаментом развития и манифестации основных заболеваний в гериатрической практике [Бурчинский С.Г., 2004; Mora F. Et al., 2007; Табеева Г. Р., 2015], в том числе и нарушений мозгового кровообращения. У лиц пожилого возраста снижается стрессустойчивость и различные стрессорные факторы могут спровоцировать развитие новой патологии или обострение уже имеющегося заболевания.

Учитывая выше сказанное, нам представлялось целесообразным оценить церебро- и эндотелиопротективные свойства РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 у старых животных.

6.1 Эффективность соединений-лидеров при НМК при эндотелиальной дисфункции, связанной с возрастными изменениями.

В настоящее время установлено, что с возрастом в сосудах происходят изменения, которые являются важными факторами риска развития и прогрессирования ССЗ. Было получено множество подтверждений тому, что развитие с возрастом ЭД, утолщение и повышение ригидности сосудистой стенки способствуют началу или прогрессированию заболевания сосудов. Чем сильнее выражены возрастные изменения в стенке сосуда, тем легче и быстрее развивается атеросклероз, артериальная гипертензия, НМК и другие патологические процессы, которые в свою очередь ускоряют возрастные изменения, образуя альянс с кардиоваскулярными факторами риска, тем самым существенно повышая риск развития ССЗ [Стражеско И. Д., 2012]. Поэтому в качестве дополнительной модели ЭД была выбрана модель естественного старения. Была выполнена серия экспериментов с использованием животных 24-х месяцев, которым воспроизводили недостаточность мозгового кровообращения путем перевязки сонных артерий (одной артерии полностью, другой – с ограничением кровотока до 50-60% от исходного значения). В качестве исследуемых веществ были выбраны соединения (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260), показавшие наиболее выраженную активность при моделировании НМК в условиях гипоестрогенемии и сахарного диабета. Соединения и препараты позитивного контроля вводили через 3 часа после операции и далее 1 раз в сутки на протяжении трех дней.

6.1.1 Влияние лечебного курсового введения соединений-лидеров на выживаемость животных и их неврологический статус при моделировании церебральной ишемии у 24-х месячных крыс.

Моделирование НМК путем полной окклюзии одной сонной артерии и ограничение до 50% от исходных значений по другой, приводило к гибели значительной части животных во всех группах (табл.73).

Введение соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 снижало количество летальных исходов животных при ишемии головного мозга, при этом выраженность этого эффекта была не одинакова. Наибольший шанс выжить, по сравнению с группой контрольных животных, через 72 часа после моделирования ишемии был у животных, получавших РГПУ-135, а также цитиколин. Относительный шанс для этих групп равен $13,2 \pm 0,8$ и $9,33 \pm 0,7$ соответственно, это означает, что шанс выживания в указанных группах статистически значимо выше, чем у контрольных животных (табл.73).

Таблица 73.

Летальность 24 месячных животных в условиях окклюзии сонных артерий на фоне введения исследуемых соединений

Группа	Число выживших	Число погибших	Шанс выживаемости	Отношение шансов
Контроль	6	14	0,43	-
РГПУ-135	17	3	5,67	$13,2 \pm 0,8^*$ $p < 0,01$
РГПУ-189	15	5	3	$7 \pm 0,7^*$ $p < 0,01$
РГПУ-195	14	6	2,33	$5,4 \pm 0,7^*$ $p < 0,05$
РГПУ-260	14	6	2,33	$5,4 \pm 0,7$ $p < 0,05$
Магния сульфат	12	8	2,33	$3,5 \pm 0,7^*$ $p < 0,05$
Кавинтон	14	6	2,33	$5,4 \pm 0,7^*$ $p < 0,05$
Цитиколин	16	4	4	$9,33 \pm 0,7^*$ $p < 0,01$

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе контроль ($p < 0,05$).

Анализ неврологического статуса животных, перенесших ишемическое повреждение головного мозга, по шкале McGraw позволил установить, что у крыс контрольной группы (получавшей на фоне ОСА физиологический раствор) развивались стойкие явления неврологического дефицита (наблюдались вялость, замедленность движений, наличие птозов век, частичных параличей и парезов конечностей, тремора, манежных движений животных, а также нарастание нарушений моторики и координации на стержне, у части животных появление судорог и наступление коматозного состояния).

Все исследуемые соединения и препараты позитивного контроля достоверно уменьшали выраженность неврологического дефицита у животных после окклюзии сонных артерий (табл.74). Нейропротективное действие соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 было сопоставимо с цитиколином и превосходили эффекты веществ РГПУ-195, РГПУ-260 и препаратов сравнения кавинтона и магния сульфата.

Таблица 74

Динамика неврологического дефицита у 24х месячных животных после ОСА.

Группы животных	Средний балл неврологического дефицита по шкале McGraw после ОСА				
	6ч	12ч	24ч	48ч	72ч
Контроль	5,9±0,73	7,4±0,55	7,6±0,59	8,3±0,62	8,4±0,6
РГПУ-135	3,7±0,3*	4,9±0,5*	4,3±0,7*	4,2±0,7*	3,7±0,67*
РГПУ-189	3,5±0,4*	4,8±0,5*	4,7±0,7*	4,5±0,7*	4,8±0,74*
РГПУ-195	4,3±0,5	5,4±0,6*	5,7±0,7*	5,5±0,7*	5,65±0,7
РГПУ-260	4,5±0,5	5,2±0,6*	5,4±0,7*	5,3±0,7*	5,5±0,8
Магния сульфат	5,1±0,6	5,8±0,7	5,7±0,8*	6,0±0,7	6,75±0,81*
Кавинтон	5,0±0,5	5,5±0,5*	5,4±0,6*	5,2±0,7*	4,9±0,82*
Цитиколин	4,5±0,4	5,1±0,5*	4,5±0,6*	4,4±0,7*	4,08±0,7*

Примечание:

* - достоверно по отношению к группе контроль ($p<0,05$).

Использование шкалы Combs при оценке неврологического дефицита позволило выявить постепенное нарастание неврологических нарушений у животных контрольной группы. Если в первые 6 часов неврологический дефицит во всех исследуемых группах был сопоставим (наблюдалось перекрывание значений медиан в пределах межквартильного размаха каждой группы), то уже к концу третьих суток в контрольной группе неврологический дефицит по шкале Combs составил 1,5 балла.

Исследуемые соединения и препараты позитивного контроля уменьшали выраженность неврологических нарушений, повышая мышечную силу, цепкость и равновесие животных с ОСА (рис.34). Наиболее выраженное протективное действие оказывали соединения РГПУ-135 и РГПУ-189, наименее выраженное – препарат сравнения магния сульфат.

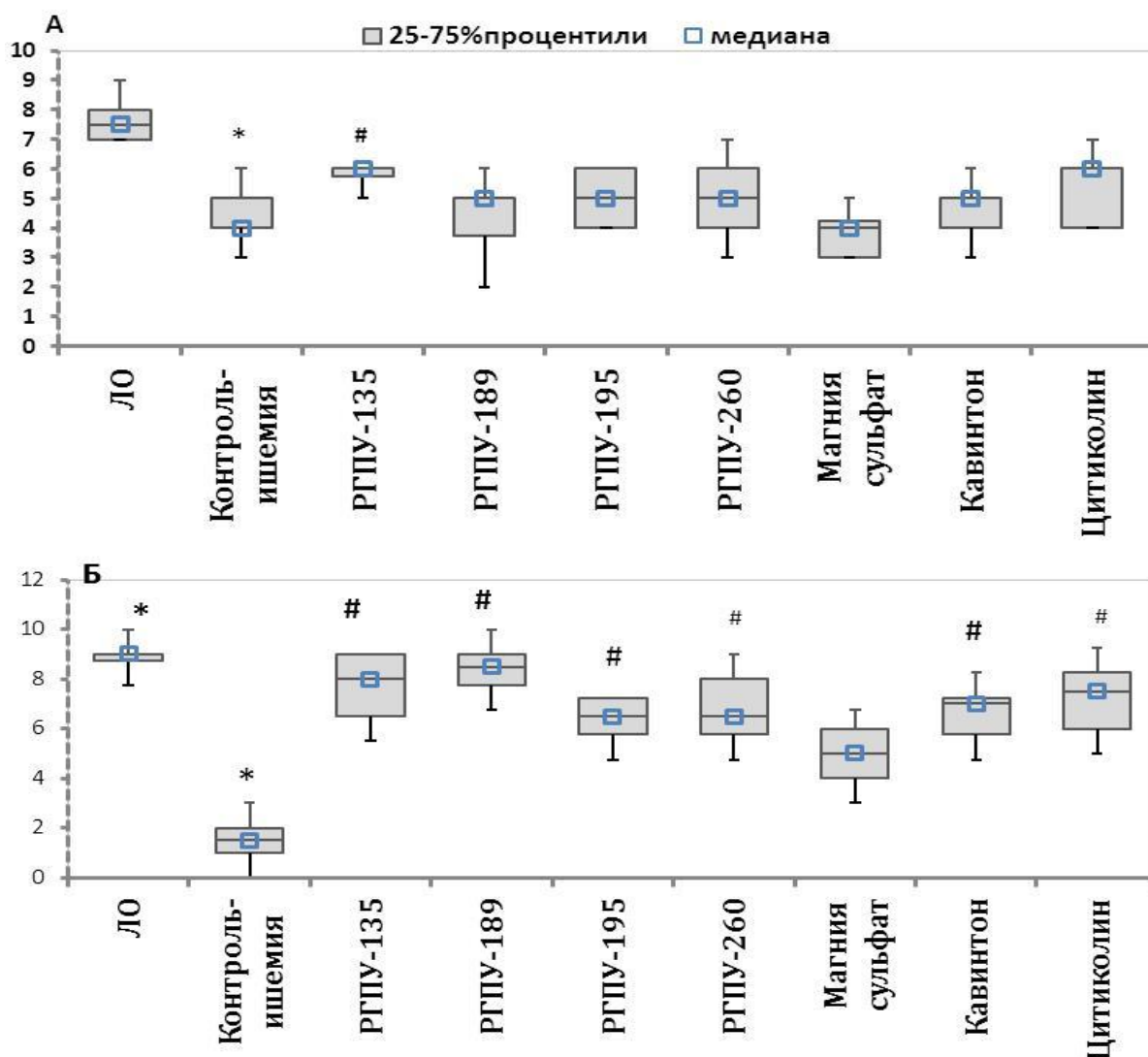


Рис. 34. Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs в баллах у 24-х месячных животных через 6 (А) и 72 (Б) часа после моделирования ОСА на фоне курсового введения исследуемых соединений

Обозначения:

ЛО - ложнооперированные животные; контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; * - достоверно по отношению к группе ЛО ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

6.1.2 Влияние лечебного курсового введения соединений-лидеров на поведенческий и мнестический статус 24-х месячных животных с церебральной ишемией.

Комплексная оценка эффективности исследуемых соединений в качестве корректоров недостаточности мозгового кровообращения у старых

животных включала в себя анализ поведенческих изменений и когнитивной функции в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ после окклюзии ОСА.

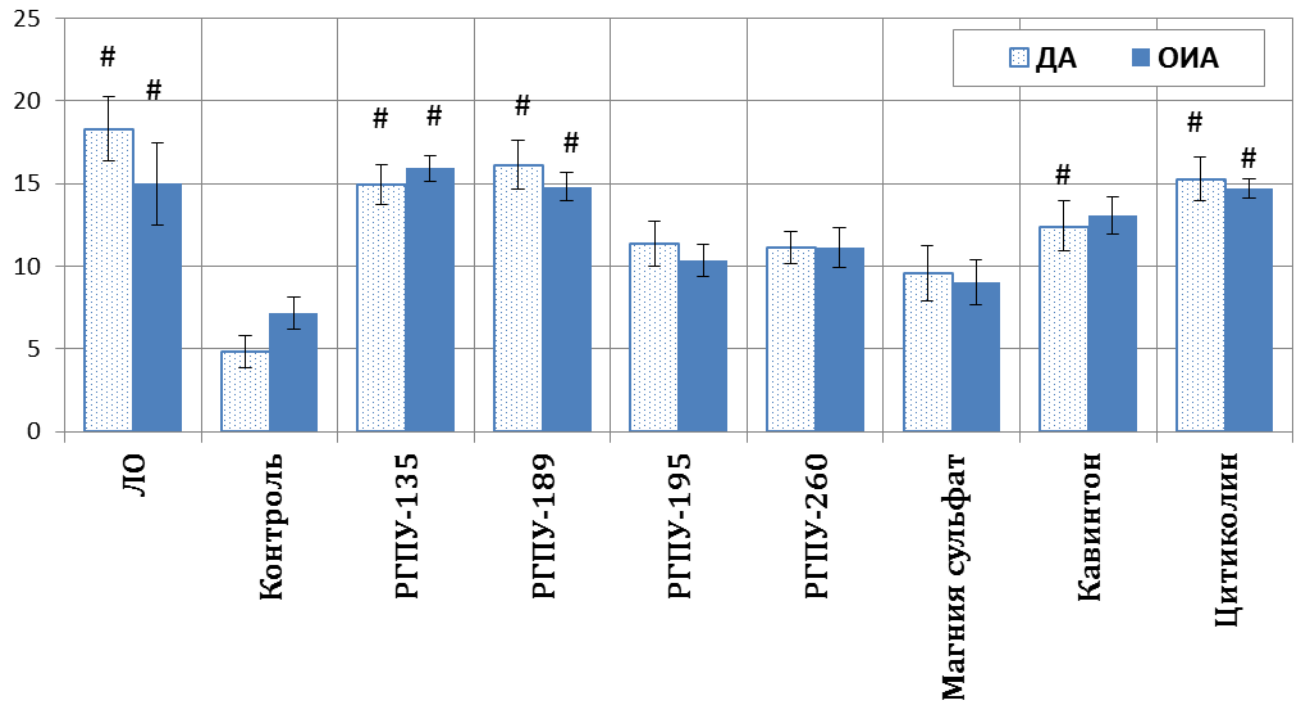


Рис. 35. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность 24-х месячных животных после окклюзии общих сонных артерий (ОСА).

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Контроль-ишемия – группа животных с окклюзией ОСА, получавшая 0,9% раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9% раствор NaCl ($p < 0,05$).

У контрольной группы ишемизированных животных, получавших физиологический раствор, через 72 часа после моделирования НМК путем необратимой окклюзии общих сонных артерий отмечен выраженный поведенческий и когнитивный дефицит по сравнению с группой ЛО (рис.35, рис.36).

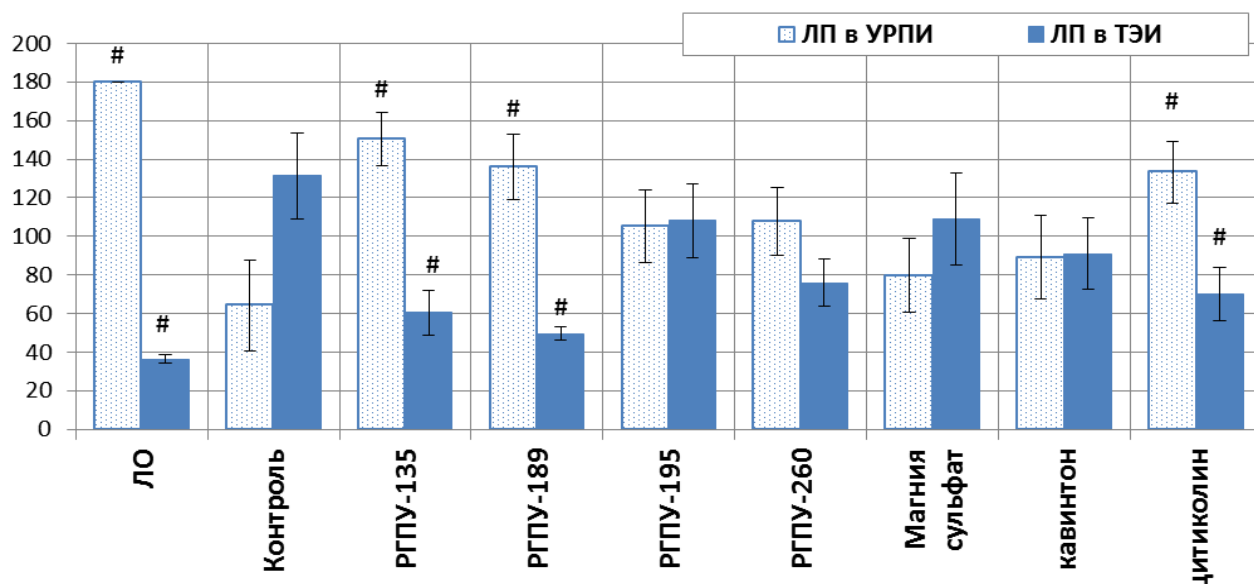


Рис. 36. Латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ и латентный период подныривания (ЛП) 24-х месячных животных с ОСА в тесте ТЭИ

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9 % раствор NaCl; ЛП в ТЭИ - латентный период решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ; ЛП в УРПИ – латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ; # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор ($p < 0,05$).

У старых животных соединения под номерами РГПУ-189, РГПУ-135 и препарат сравнения цитиколин, оказывали наиболее выраженную церебропротективную активность в сравнении с другими изучаемыми веществами, что подтвердилось более высокой двигательной и ориентировочно-исследовательской активностью, менее выраженной постишемической амнезии у животных после ОСА.

6.1.3 Влияние курсового лечебного введения соединений-лидеров на уровень мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у 24-х месячных животных при ишемии головного мозга.

Моделировании ишемии головного мозга у старых животных приводило к снижению МК относительно показателей группы ЛО в среднем на 42%. Курсовое введение исследуемых соединений, но в большей степени РГПУ-135 и РГПУ-189 способствовало сохранению кровотока на более высоком уровне (рис.37).

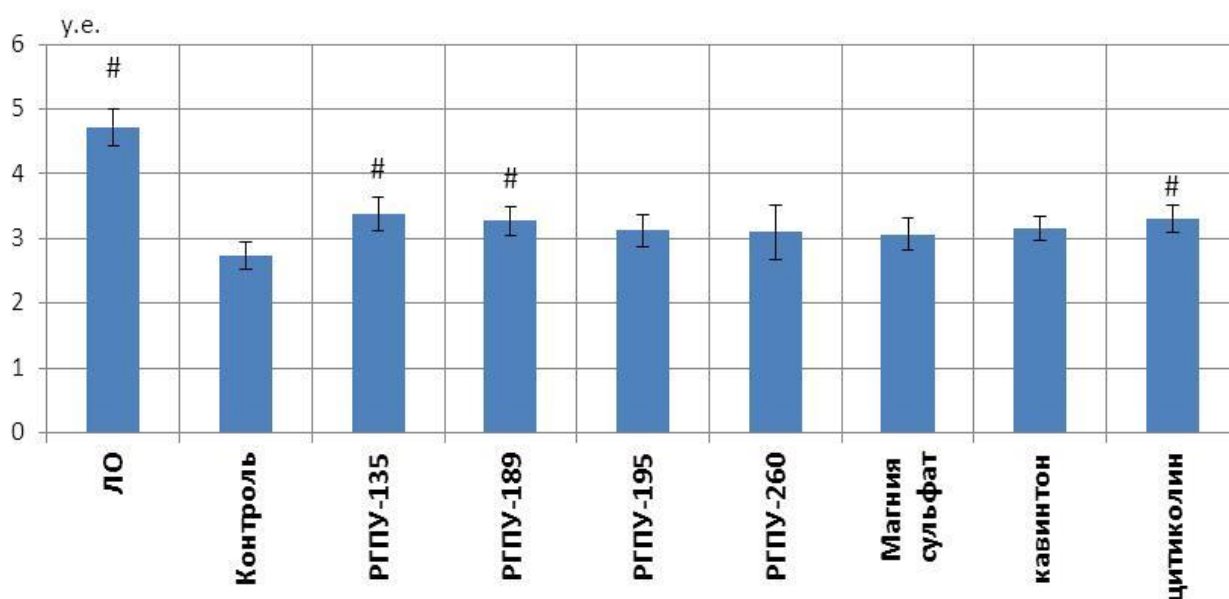


Рис. 37. Уровень мозгового кровотока у 24-х месячных животных после ОСА

Обозначения:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9 % раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9 % раствор NaCl ($p < 0,05$).

При оценке ЭЗВД было отмечено, что у старых животных после окклюзии ОСА реакция на введения модуляторов синтеза оксида азота (ацетилхолина и нитро-L-аргинина) менее выражена, чем у группы ЛО (табл.75). Курсовое введение соединения РГПУ-135 и РГПУ-189 улучшало ЭЗВД, о чем свидетельствовало больший прирост МК при введении ацетилхолина и более выраженное его снижение при введении нитро-L-аргинина (табл.75).

Таблица 75

Изменения МК в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина у 24-х месячных животных окклюзии ОСА.

Группы животных	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
	Ацетилхолин	N-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	11,8±1,9	-30,4±3,3	31,5±2,5
Контроль Ишемия	25,0±1,6	-14,5±1,4	30,9±2,4
РГПУ-135	21,9±2,2#	-28,8±1,8*	32,6±2,6
РГПУ-189	17,9±1,1#	-23,8±1,4*	33,0±2,8
РГПУ-195	17,3±0,9	-21,6±1,1*	33,0±1,7
РГПУ-260	16,8±2,1	-17,8±1,3	34,2±0,5
Магния сульфат	23,3±1,7	-21,0±2,0*	30,4±2,5
Кавинтон	25,6±2,7#	-22,4±1,8*	30,8±2,5
Цитиколин	11,8±1,9#	-27,3±2,3*	31,3±2,6

Примечание:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9 % раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9 % раствор NaCl (p<0,05).

Таким образом, проведенное исследование показывает, что выраженность церебропротекторного действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 зависит от возраста экспериментальных животных. У старых животных большей эффективностью обладали вещества РГПУ-189 и РГПУ-135.

Из литературных данных известно, что в процессе старения нарастают структурные и функциональные нарушения эндотелия, при этом скорость их развития и выраженность зависит от множества взаимодействий между возрастом, образом жизни, сопутствующими заболеваниями. Тем не менее можно предположить, что препараты обладающие эндотелиопротекторными свойствами будут оказывать и более выраженные церебропротекторные эффекты.

Далее для уточнения возможных механизмов протекторного действия наиболее активных соединений (РГПУ-189 и РГПУ-135) у старых животных было выполнено исследование их церебро- и эндотелиопротекторных свойств у животных двух возрастных групп (12-ти и 24-х месяцев) в условиях хронического стрессорного воздействия.

6.2 Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на поведенческий статус 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса.

В результате проведенных исследований установлено, что двигательная и ориентировочно-исследовательская активность старых крыс до начала комбинированного стрессирования была ниже, чем у 12-ти месячных животных. Комбинированное стрессорное воздействие вибрации, шума, света, иммобилизации и повышение температуры в равной степени снижало двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность у 12-ти и 24-х месячных животных (рис.38). Применение РГПУ-135, РГПУ-189 и фенибута уменьшало выраженность этих изменений.

При оценке мнестических функций в тесте УРПИ до начала стрессорного воздействия было отмечено, что у животных в возрасте 12-ти и 24-х месяцев наблюдаются значительные отличия в формировании и сохранении памятного следа. Так если животные 12-ти месяцев обучились в тесте УРПИ в 100% случаев, то старые животные (24-х месяцев) только в 83,5% (табл.76). При этом животным младшей возрастной группы (12-ти месяцев) даже на этапе обучения требовалось меньше времени для принятия решения и захода в темный отсек, чем животным старшей группы (табл.76).

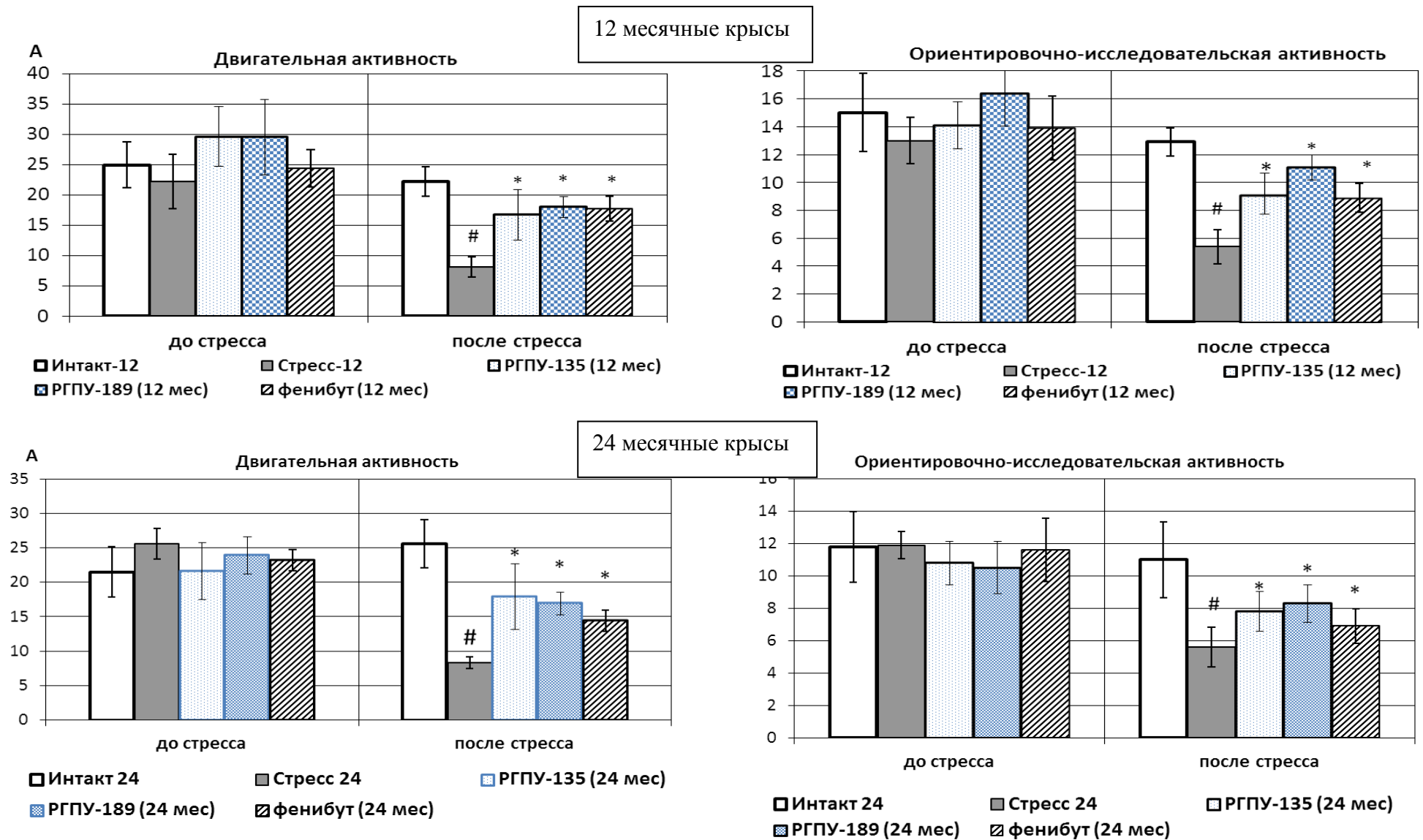


Рис. 38. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность 12-ти (I) и 24-х (II) месячных крыс до и после комбинированного стрессирования.

Обозначения: достоверность отличий: * - $p < 0,05$ – от «группы контроль-стресс», # $p < 0,05$ – от «группы контроль-интакт»

Комбинированное стрессорное воздействие вибрации, шума и света не приводило к развитию амнезии у животных 12-ти месяцев, тогда как у животных 24-х месяцев такие явления были отмечены. Так у животных группы «стресс 24» (24-х месячные крысы) латентный период первого захода в темный отсек в тесте УРПИ составил $110,7 \pm 27$ с, тогда как у группы «интакт 24», не подвергающиеся стрессу, ни одно животное не зашло в темный отсек. Применение РГПУ-189 (в большей степени), РГПУ-135 и фенибута увеличивало латентный период захода животных в темный отсек и снижало количество животных, зашедших в него (табл.76).

Таблица 76

Влияние соединений на условнорефлекторное обучение 12-ти и 24-х месячных крыс до и после стрессирования.

Группы		До стресса				После стресса	
		Обучение		Воспроизведение 1		Воспроизведение 2	
		ЛП	КЗ	ЛП	КЗ	ЛП	КЗ
Интакт	12 мес	$30,1 \pm 5,8$	1 ± 0	180	0	180	0
	24 мес	$54,5 \pm 11,7$	$1,3 \pm 0,2$	$149,2 \pm 20,6$	$0,2 \pm 0,1$	180	0
Контроль	12 мес	$43,9 \pm 12,5$	1 ± 0	180	0	180	0
	24 мес	$41,9 \pm 8,8$	$1,1 \pm 0,1$	$145,5 \pm 23$	$0,2 \pm 0,1$	$110,7 \pm 28,3$	$0,4 \pm 0,2$
РГПУ-135	12 мес	$32,3 \pm 10,7$	1 ± 0	180	0	180	0
	24 мес	$41,9 \pm 12,2$	1 ± 0	$165,6 \pm 13,7$	$0,1 \pm 0,1$	$150,4 \pm 18,8$	$0,2 \pm 0,2$
РГПУ-189	12 мес	$30,7 \pm 12,2$	1 ± 0	180	0	180	0
	24 мес	$40,1 \pm 8,6$	1 ± 0	$170 \pm 9,1$	$0,1 \pm 0,1$	180	0
Фенибут	12 мес	$47,4 \pm 12,4$	1 ± 0	180	0	180	0
	24 мес	$57,3 \pm 21,7$	$1,1 \pm 0,1$	$152 \pm 19,1$	$0,2 \pm 0,1$	$162,4 \pm 17,6$	$0,1 \pm 0,1$

Примечание:

ЛП – латентный период первого захода в темный отсек; КЗ – количество заходов в темный отсек; Обучение» и «воспроизведение 1» в тесте УРПИ проводились с интервалом 24 часа. «Воспроизведение 1» выполнялось за день до начала моделирования комбинированного стрессорного воздействия, «Воспроизведение 2» - через 24 часа после окончания стрессорного воздействия.

Таким образом, из представленных данных следует, что у старых животных (24-х месяцев) по сравнению с животными 12-ти месячного возраста наблюдается мнестический дефицит. Согласно литературных данных, в «возрастном мозге» накапливаются повреждения и выявляются существенные нейродегенеративные изменения в его различных структурах, нарушения метаболизма мозговой ткани, редукция плотности сети микрососудов и, как следствие, снижение микроциркуляторного кровотока и кислородного обеспечения ткани и многое другое [Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001]. Все эти изменения не могут не отразиться на рабочем потенциале мозга и сопряжены с его повышенной уязвимостью к различным экзогенным факторам. Одним из таких факторов может являться стресс, который в свою очередь способен ускорять и/или приводить к обострению когнитивных нарушений у пожилых, что согласуется с результатами, полученными в ходе данного исследования. У крыс старшей возрастной группы после окончания стрессорного воздействия отмечался когнитивный дефицит, проявившийся и в ухудшении формирования и сохранения памятного следа. Соединения РГПУ-189, РГПУ-135 и препарат сравнения фенибут улучшали сохранение памятного следа после воздействия хронического комбинированного стресса.

6.3 Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на уровень артериального давления 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса.

Поскольку установлено, что существует прямая связь между уровнем артериального давления (АД), выраженностью когнитивных нарушений и риском сердечно-сосудистых заболеваний (чем выше показатели систолического и/или диастолического АД, тем выше риск развития инсульта) [Суслина З. А., Варакин Ю. Я., 2004]. С другой стороны гемоперфузия головного мозга зависит от уровня АД и от функционирования механизмов ауторегуляции. Поэтому было изучено влияние соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на уровень артериального давления у крыс двух

возрастных групп (12-ти и 24-х месячных животных), подвергшихся хроническому стрессированию. Измерение АД производилось фотоплетизмографическим методом с хвоста крысы с помощью монитора давления и с использованием оригинального пакета компьютерных программ

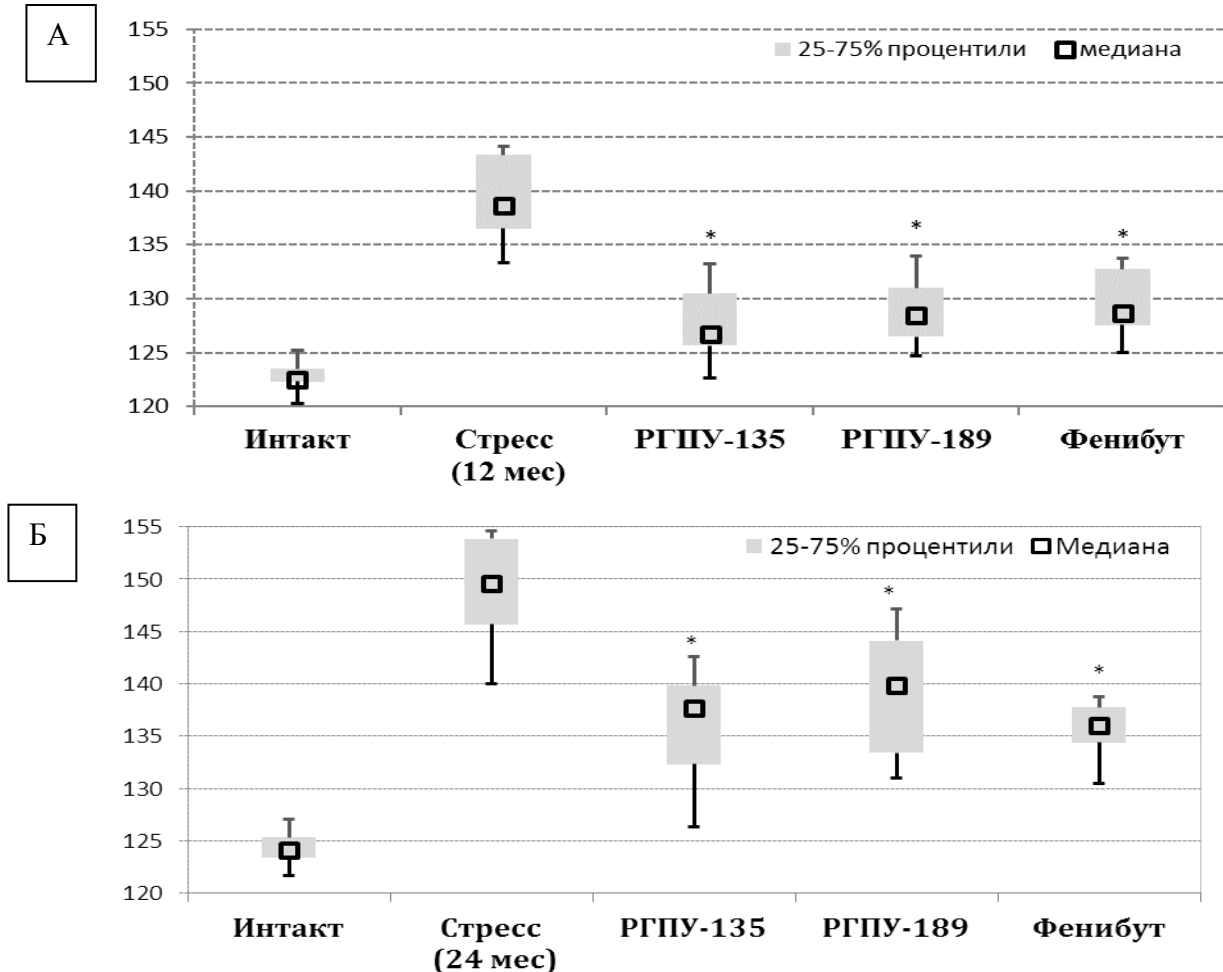


Рис. 39. Уровень артериального давления (мм рт.ст.) у крыс 12-ти (А) и 24-х (Б) месячного возраста после семидневного стрессирования.

Обозначение:

*- достоверно по отношению к группе стресс 12 мес/24мес ($p < 0,05$)

Исходный уровень артериального давления (до начала стрессорного воздействия) был сопоставимым у животных 12-ти и 24-х месячного возраста ($122,8 \pm 1,3$ мм рт. ст. и $124 \pm 2,2$ мм рт. ст., соответственно). Хроническое стрессорное воздействие приводило к повышению АД у экспериментальных животных (в большей степени у животных 24-х месячного возраста до $149,5 \pm 6,2$ мм рт. ст., что на 23,6% выше их исходного уровня, тогда как у крыс 12-мес возраста АД поднялось только до 139,5 мм рт.ст., т.е. на 13,2%) (рис.39).

На фоне применения исследуемых соединений РГПУ-135 и РГПУ-189, а также препарата сравнения фенибута наблюдалось менее выраженное повышение АД у стрессированных животных (рис.39), что может свидетельствовать как об их антистрессорном, так и о возможном влиянии на механизмы регуляции АД и сосудистого тонуса.

6.4 Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга 12-ти и 24-х месячных крыс в условиях хронического стресса.

Установлено, что при старении развивается дисфункция эндотелия, сопровождающаяся уменьшением синтеза эндотелием факторов вазодилатации и увеличением продукции вазоконстрикторных субстанций [Остроумова О. Д., 2004]. К настоящему времени получено все больше подтверждений тому, что связанные со старением эндотелиальная дисфункция, утолщение и повышение ригидности сосудистой стенки, способствует началу или прогрессированию заболевания сосудов, усугубляет прогноз у пожилых пациентов [Стражеско И. Д., 2012]. Поэтому в качестве средств, предупреждающих или уменьшающих возрастную эндотелиальную дисфункцию и тем снижающих риск возникновения НМК в пожилом возрасте, весьма интересны эндотелиопротекторные препараты.

В ходе проведенного исследования состояния эндотелиальной системы у животных различных возрастных групп при хроническом стрессорном воздействии установлено, что при сравнении интактных крыс 12 и 24 месяцев исходный уровень мозгового кровотока был ниже на 9,7% ($p > 0,05$) у старых крыс (24-х месяцев) по сравнению с животными 12-ти месячного возраста и на 27,4% ($p < 0,05$) выше при сравнении со стрессированными животными того же возраста (рис.40). Полученные данные можно объяснить тем, что у старых крыс отмечается «старение эндотелия» и снижение ЭЗВД резервов, нарушения метаболизма мозговой ткани, редукция плотности сети

микрососудов и, как следствие, снижение микроциркуляторного кровотока и кислородного обеспечения ткани.

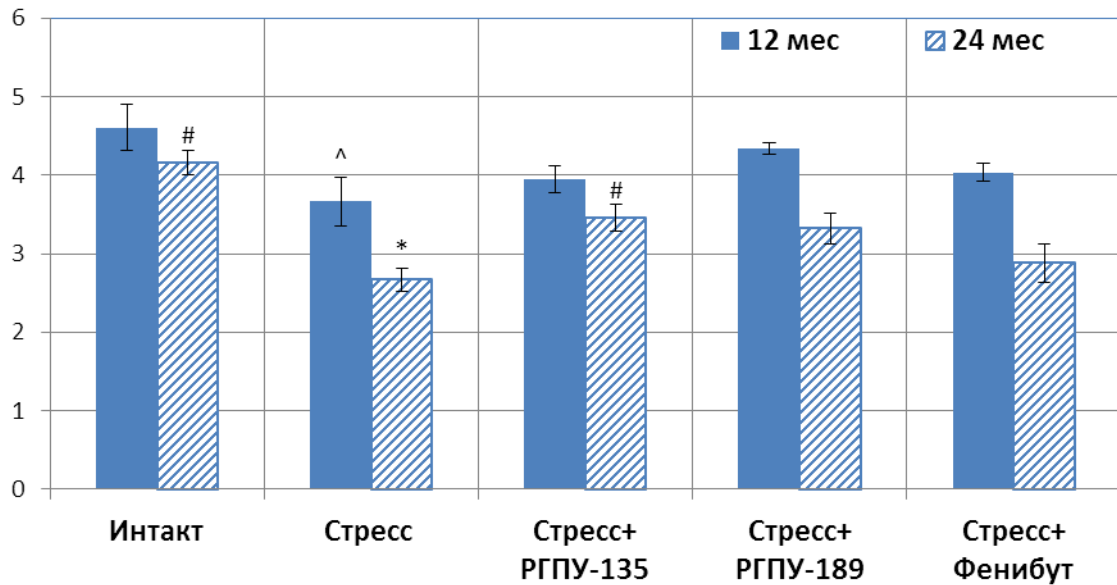


Рис. 40. Уровень мозгового кровотока (y.e.) у животных 12-ти и 24-х месячного возраста после семидневного стрессирования.

Обозначения:

^ - достоверно по отношению к группе интактных 12 мес крыс ($p < 0,05$); * - достоверно по отношению к группе стрессированных 12 мес крыс ($p < 0,05$); # - достоверно по отношению к группе стрессированных 24 мес крыс ($p < 0,05$)

У крыс старшей возрастной группы на фоне хронического стрессорного воздействия отмечалась менее выраженная сосудистая реакция на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, как по сравнению с интактными животными, так и стрессированными животными средней возрастной группы (рис.41).

Оба исследуемых вещества (РГПУ-135 и РГПУ-189) оказывали эндотелиопротекторное действие, улучшая мозговое кровообращение (рис.40) и функциональное состояния эндотелиальной системы (рис.41).

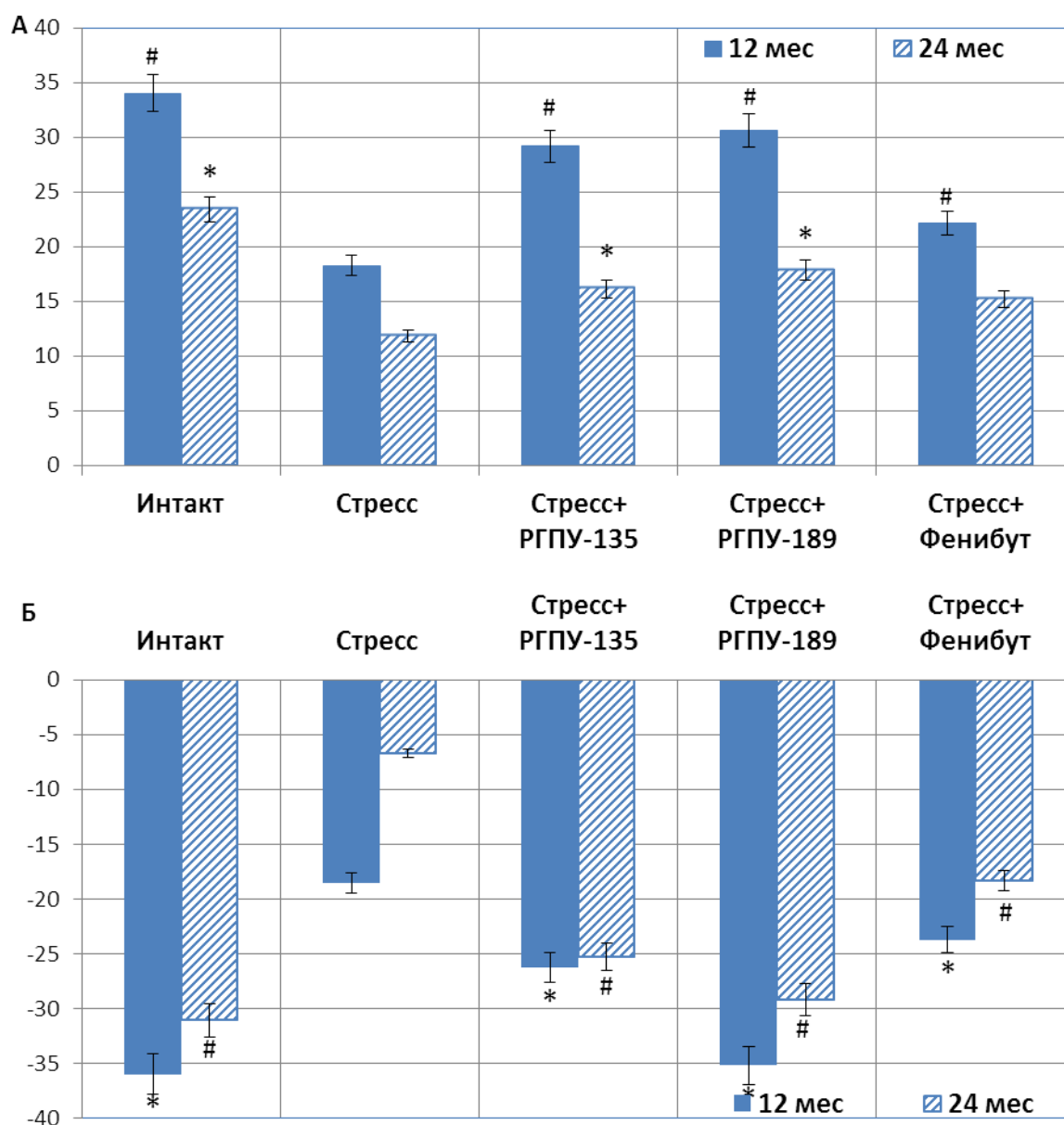


Рис. 41. Изменение локального мозгового кровотока (%) при введении ацетилхолина (А) и нитро-L-аргинина (Б) у животных двух возрастных групп (12-ти и 24-х мес).

При оценке эндотелийнезависимой вазодилатации (изменение МК на введение нитроглицерина) статистических различий выявлено не было, поскольку сосудистая реакция была сопоставима во всех исследуемых группах.

6.5 Влияние курсового 7-ми дневного введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на состояние иммунной системы и уровень про- и противовоспалительной цитокиновой регуляции после воздействия хронического комбинированного стресса.

В настоящее время установлено, что иммунный ответ может быть, как компонентом стресс-реакции, так и стресс-фактором, способным влиять как традиционные стрессоры на высвобождение кортикотропин-рилизинг гормонов гипоталамуса и на состояние других стресс-реализующих систем. Такие эффекты могут быть вызваны за счет влияния провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α на состояние нейроэндокринной системы, через регуляцию синтеза и рецепцию нейромедиаторов [Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., 2008]. Кроме того, есть данные о том, что стрессовые факторы и цитокины могут воздействовать синергично на биологические и поведенческие процессы, и это может иметь долгосрочные последствия через хронизацию процессов, связанных с реакцией на стресс [Brebner K., 2000].

Результатом воздействия неблагоприятных и повреждающих факторов на эндотелий является воспалительная реакция со стороны сосудистой стенки. В определенных условиях защитная реакция организма в ответ на различные виды повреждения может становится избыточной и может стать причиной развития патологических состояний. Нарушение функции эндотелиальных клеток или их деструкция приводят к агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и формированию внутрисосудистых тромбов. Кроме того, после активации воспалительными медиаторами сами эндотелиальные клетки являются продуцентами ряда биологически активных веществ (например, Р-селектина, VCAM-1), которые накапливаются и вызывают дополнительное высвобождение цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО- α) [Иванова С.В., 2014]. И хотя на сегодняшний день нельзя однозначно сказать, является ли повышенная концентрация

провоспалительных цитокинов в плазме крови одной из причин ЭД или ее следствием [Полякова А.Н., 2014], но тот факт, что оба эти состояния взаимосвязаны, уже не подвергается сомнению. В связи с этим, мы посчитали целесообразным оценить состояние иммунной системы и цитокиновой регуляции после воздействия хронического комбинированного стресса у животных, курсом получавших исследуемые соединения РГПУ-189 и РГПУ-135.

Исследование цитокинового профиля сыворотки животных позволило установить, что стрессирование 24-х мес крыс приводит к повышению уровня циркулирующих адгезивных молекул суперсемейства иммуноглобулинов VCAM-1 (табл.77), которые, как известно, [Черешнев В.А., 2002] вовлечены в регуляцию адгезии лейкоцитов к эндотелию и их миграции за пределы сосудистого русла в очаг воспаления. Следует отметить, что повышение уровня этих молекул происходило на фоне повышения уровня СРБ и снижения уровня IL-6 у стрессированных животных, что свидетельствует о снижении их провоспалительного потенциала.

Таблица 77.

Уровни цитокинов, адгезивных молекул, СРБ в сыворотке крови крыс (M±m).

Группы	VCAM-1, нг/мл		IL-6, пг/мл		СРБ	
	12 мес	24 мес	12 мес	24 мес	12 мес	24 мес
Интакт	1,26± 0,21	2,58± 0,6	3,01 ± 0,23	4,35± 0,32	156,8± 37,7	115± 22
Стресс	2,07± 0,31*	3,05± 0,1*	2,16 ± 0,12 *	2,39± 0,53*	228,6± 67*	445± 40,3*
Стресс+РГПУ-135	2,1± 0,09	2,13± 0,3#	2,71± 0,4#	3,44± 0,52#	194± 90	216± 53#
Стресс+РГПУ-189	1,97± 0,5	2,33± 0,25	2,57± 0,3	3,32± 0,36	160± 54#	136,4± 49,8#
Стресс+фенибут	1,95± 0,48	2,67± 0,38	2,79± 0,31#	2,89± 0,37	173± 18	235± 63,4

Примечание:

*- значимые различия ($p<0,05$) от интактных животных; #- значимые различия ($p<0,05$) от стрессированных животных.

Оба исследуемых соединения (РГПУ-189 и РГПУ-135) влияли на уровни цитокинов, адгезивных молекул и СРБ у стрессированных животных 12-ти и 24-х месячного возраста, снижая содержание VCAM-1, СРБ и

повышая уровень IL-6 по сравнению с контрольными группами стрессированных животных. Однако, соединения РГПУ-135 более значимо снижало уровень VCAM, а соединение РГПУ-189 – IL-6 и СРБ (табл.77).

Поскольку эндотелиальные клетки находятся в центре всех реакций, развивающихся при воспалении, а также учитывая результаты, полученные на данном этапе исследования, можно предположить, что соединения РГПУ-135 и РГПУ-189 способны оказывать эндотелиотропное действие, возможно и вследствие воздействия на реакции развития воспаления, обусловленные вовлечением в процесс провоспалительных цитокинов и значит повышением уровня маркеров воспаления – СРБ, который может быть и маркером повреждения эндотелия.

6.6 Влияние соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 на морфофункциональное состояние структур головного мозга 12-ти и 24-ти месячных животных, перенесших комбинированное стрессовое воздействие⁷

При гистологическом исследовании вентральных отделов гиппокампа 12- и 24-месячных контрольных (интактных) крыс в пирамидном слое поля СА3 отмечалось увеличение количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, удельное количество которых составило 12,5 (9,8; 15,0) и 25,9 (15,7; 52,7) %, соответственно. Среди клеток глии преобладали астроциты.

⁷ Исследование выполнено совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии ВолГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой, д.м.н., проф. А.В. Смирнову, к.м.н. М.В. Шмидт, М.Р. Эковой.

Нейроны
пирамидного
слоя

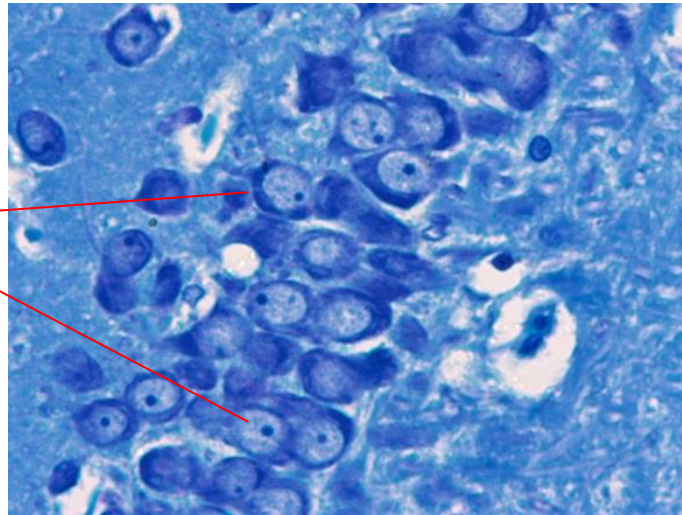


Рис. 42. Головной мозг (CA3 зона гиппокампа) 12-месячной крысы (интакт). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400

При гистологическом исследовании вентральных отделов гиппокампа у 12- и 24-месячных крыс, подвергнутых стрессорному воздействию, наиболее выраженные изменения отмечались в пирамидном слое СА3 зоны. Наблюдалось снижение, по сравнению с контрольными группами, ширины пирамидного слоя и плотности расположения нейронов, также отмечались участки очаговых выпадений нейроцитов и уменьшение размеров перикарионов части нейронов. При окраске по методу Ниссля в пирамидном слое выявляли нейроны с гиперхроматозом, хроматолизом и кариопикнозом.

Гиперхромные
нейроны
пирамидного
слоя

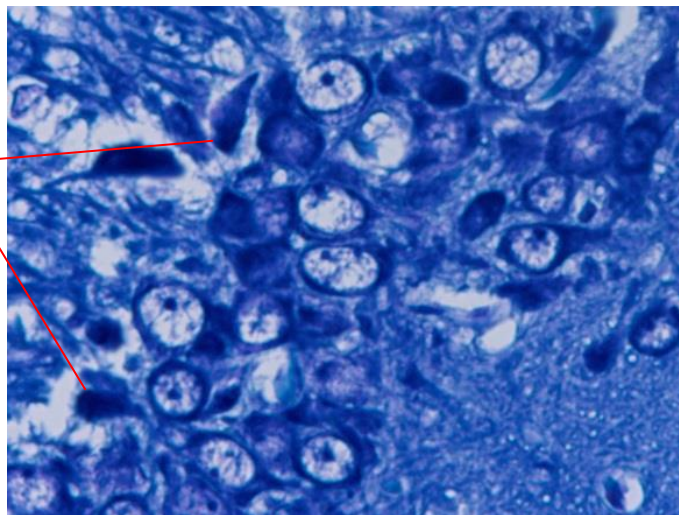


Рис. 43. Головной мозг (CA3 зона гиппокампа) 12-месячной стрессированной крысы. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400

Удельное количество сморщенных гиперхромных нейронов в группе 12-месячных крыс, подвергнутых стрессу, составило 32,7 [15,7; 56,9] %, что выше контрольных значений на 20,2 % ($p < 0,001$). Достоверных различий

удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы между 24-месячными контрольными (интактными) и животными, подвергнутыми стрессу, обнаружено не было. Также отмечалось достоверное увеличение данного параметра у контрольных старых крыс на 13,4 % ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными 12-месячными крысами. В сосудах микроциркуляторного русла наблюдались признаки нарушений кровообращения в виде очагового полнокровия капилляров, спазма артериол, стаза эритроцитов, а также признаки периваскулярного отека. Необходимо отметить, что у 24-месячных крыс, подвергнутых стрессу, патоморфологические изменения имели более выраженный характер.

В обеих возрастных группах экспериментальных животных, получавших исследуемое соединение РГПУ-135, интенсивность вакуолярной дегенерации была меньшей по сравнению с интактными крысами и животными, подвергшимся стрессовому воздействию. Обнаруживались единичные вакуоли в элементах нейропиля. У части животных данные изменения отсутствовали вовсе.

При изучении структур гиппокампа данных крыс наблюдались незначительные патоморфологические изменения нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 полей. В поле СА1 большинство нейронов характеризовалось нормальном гистологическим строением идентичным таковому интактных животных. Встречались лишь единичные гиперхромные нейроны с признаками гомогенизации цитоплазмы. Полуколичественный индекс, характеризующий степень повреждения нейронов составил $5,7 \pm 0,9\%$ в группе 24 месячных животных и $3,8 \pm 0,5\%$ - в группе 12 месячных.

Единичные
гиперхромные
нейроны

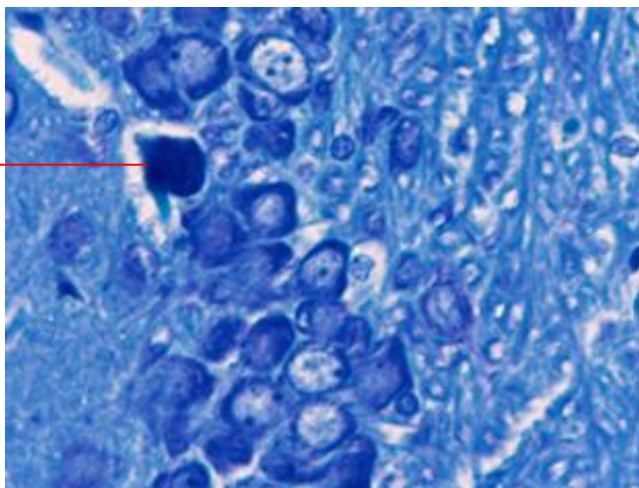


Рис. 44. Головной мозг (СА3 зона гиппокампа) 12-месячной стрессированной крысы на фоне применения РГПУ-135. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400

Аналогичная тенденция прослеживалась и в СА3 поле переднего и заднего отделов гиппокампа. Лишь небольшая часть клеток пирамидного слоя характеризовалась уменьшением размеров клеток и усилением базофилии цитоплазмы. Степень повреждения нейронов по Чубинидзе А.И. составила $4,2 \pm 0,7\%$ в группе 24 месячных животных, получавших соединение РГПУ-135. При этом изменения носили одинаковый характер в правом и левом полушарии.

У животных 12 месяцев на фоне применения РГПУ-135 выявлялось больше нейронов с признаками дистрофических изменений (рис.45). Индекс, характеризующий степень повреждения нейронов, составил $8,9 \pm 1,5\%$.

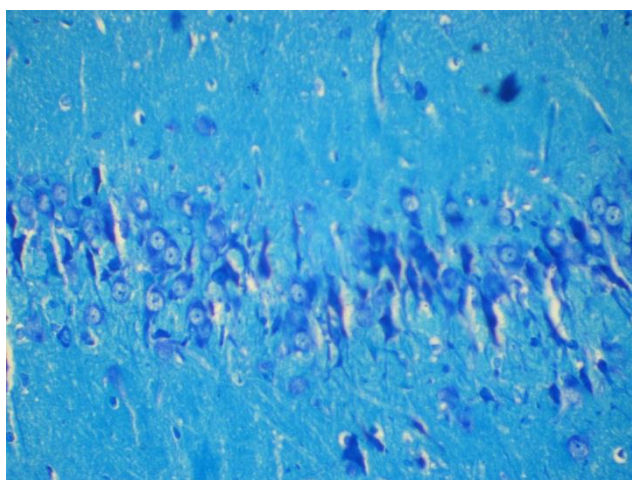


Рис. 45. Сморщенные гиперхромные нейроны пирамидного слоя гиппокампа (СА3 поле). Головной мозг 12-месячной стрессированной крысы на фоне применения РГПУ-135. Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400.

При гистологическом исследовании различных отделов головного мозга стрессированных крыс 12-ти и 24-х месяцев, получавших РГПУ-189, структурные изменения были менее выраженные по сравнению с группой стрессированных животных. В зубчатой извилине нейроны гранулярного слоя располагались компактно, имели полигональную форму. Признаки гиперхроматоза обнаруживались в небольшом количестве нейронов (рис.46, рис.47). Форма гиперхромных нейронов была вытянутой, извитой. Большая часть нейронов характеризовалась нормохромной цитоплазмой перикариона со светлым ядром. В субгранулярном слое обнаруживались признаки умеренно выраженного перицеллюлярного отека и споглиоза, единичные гиперхромные нейроны.

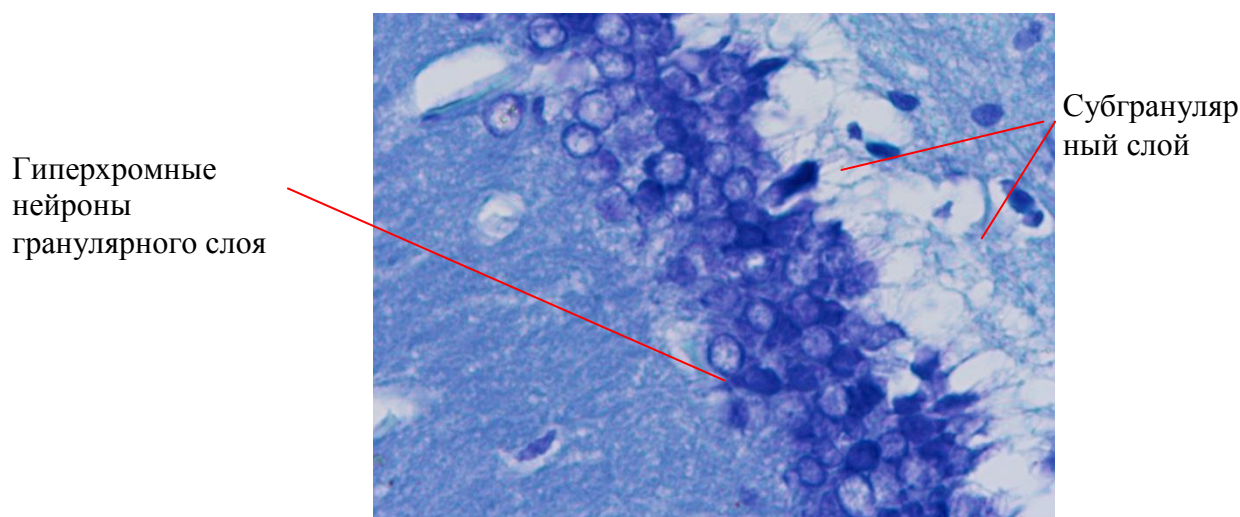


Рис. 46. Головной мозг (Зубчатая извилина) 12-месячной стрессированной крысы на фоне применения РГПУ-189. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

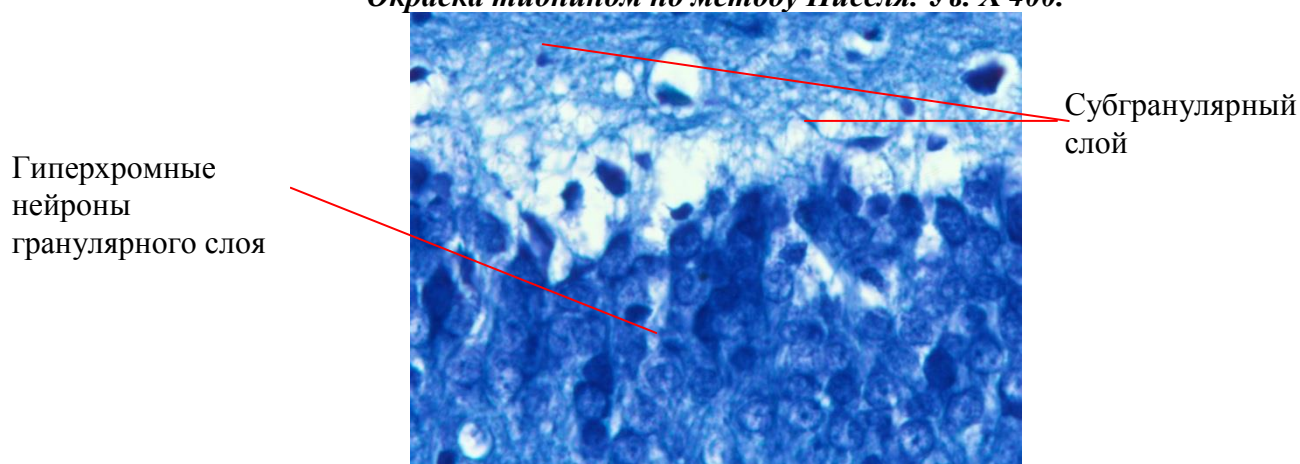


Рис. 47. Головной мозг (Зубчатая извилина) 24-месячной стрессированной крысы на фоне применения РГПУ-189. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

При микроскопическом исследовании препаратов головного мозга животных, получавших на фоне стрессорного воздействия препарат сравнения фенибут, обращает на себя внимание практически полное отсутствие признаков нейровакуолярной дегенерации, которые обнаруживались как у интактных так и стрессированных животных обеих возрастных групп.

Комплексное морфологическое, в т.ч. и морфометрическое изучение различных отделов гиппокампа не выявило существенных отличий от животных контрольной группы (интакт). Наблюдались слабо выраженные дистрофические изменения, в виде сморщивания тел и гиперхромии цитоплазмы отдельных нейронов. Данные нейроны расценивались нами как слабоизмененные. Таким образом, морфометрический анализ с использованием полуколичественной шкалы степени повреждения нейронов показал следующие результаты. В СА1 зоне гиппокампа данный показатель составил $5,8 \pm 0,5$ у 24-месячных крыс, и $3,3 \pm 0,2$ у 12-месячных животных.

У старых крыс (24 месяца), получавших фенибут, в СА3 поле выявлялось больше гиперхромных извитых нейронов, и степень повреждения составила $14,2 \pm 1,6\%$ в переднем отделе и $14,3 \pm 1,8\%$ в заднем отделе соответственно.

В группе взрослых крыс 12 месяцев, получавших фенибут, в СА3 поле гиппокампа обнаруживались единичные клетки с признаками дистрофических изменений. Степень повреждения нейронов составила $5,3 \pm 0,6\%$.

Полученные нами данные свидетельствуют о развитии патоморфологических изменений и нарушений citoархитектоники гиппокампа как у 24 месячных, так и 12 месячных крыс, в результате стрессового воздействия. При этом более выраженный характер изменения носили, в поле СА3 аммонова рога. Наблюдающаяся у отдельных животных асимметрия микроскопических изменений согласуется с литературными данными [Рыжавский Б. Я., 2013; Смирнов А.В., 2013; McLaughlin K. J., 2007], свидетельствующими о существовании межполушарной асимметрии

гистологического строения гиппокампа, как при нормальном старении, так и при развитии различных патологических процессов.

При изучении САЗ поля гиппокампа обращает на себя внимание более выраженный характер патоморфологических изменений у 24-месячных интактных животных по сравнению с 12 месячными крысами, что можно объяснить возрастным усилением нейродегенеративных процессов. Комбинированный стресс в обеих возрастных группах привел к увеличению степени повреждения нейронов. В группе 24-месячных животных оба исследуемых соединения (РГПУ-135, РГПУ-189) продемонстрировали свою эффективность в плане уменьшения выраженности морфологических изменений.

6.7 Иммуногистохимические исследования маркеров 12-ти и 24-х месячных животных, перенесших комбинированное стрессовое воздействие⁸

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа у 12ти-месячных крыс, подвергнутых стрессу, с использованием антител против iNOS в зубчатой извилине определялась слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного иммунореактивного материала (ИРМ) (1 балл) в перикарионах нейронов и в нейропиле (1 балл) гранулярного слоя. Отмечалась слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов субгранулярного слоя, а также отмечена умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балл) в нейропиле, т.е. отмечается увеличение экспрессии iNOS-позитивного материала при стрессе.

⁸ Исследование выполнено совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии ВолГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой , д.м.н., проф. А.В. Смирнову, к.м.н. М.В. Шмидт, М.Р. Эковой

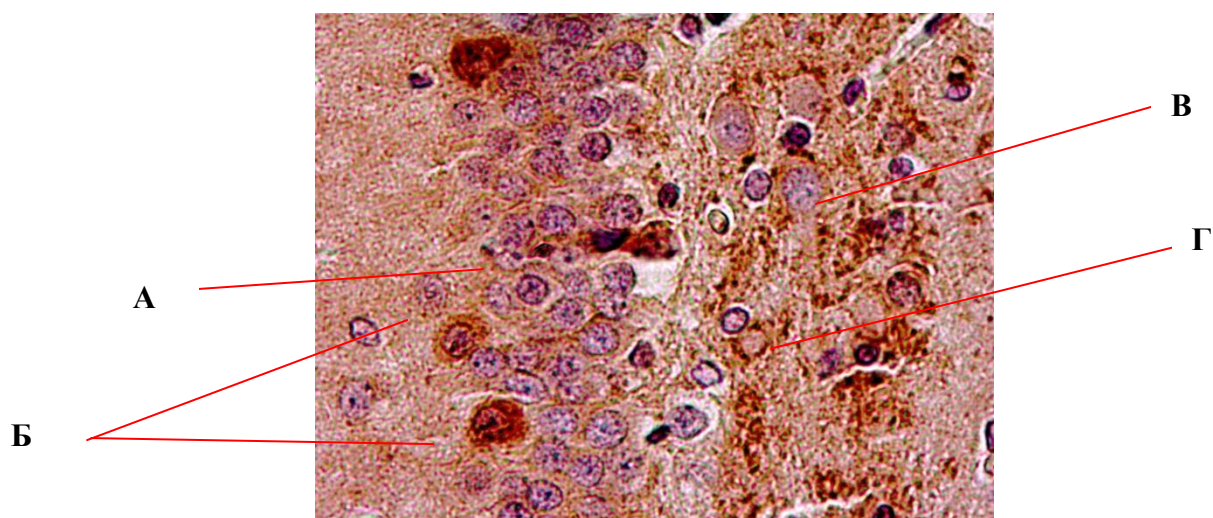


Рис. 48. Головной мозг (зубчатая извилина) 12-месячной стрессированной крысы
Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска
гематоксилин. Увеличение X 400.

Обозначения:

А –экспрессия иммунореактивного материала в перикарионах нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины; Б – единичные нейроны с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ; В – экспрессия иммунореактивного материала в нейропиле субграгранулярного слоя зубчатой извилины; Г – экспрессия ИРМ в перикарионах нейронов субгранулярного слоя.

В СА3 зоне гиппокампа обнаружено умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (2 балла) в большинстве перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа и в нейропиле радиального слоя (2 балла) (рис.49). В париетальной коре головного мозга 12-месячных стрессированных крыс определялось усиление экспрессии иммунореактивного iNOS-позитивного материала (выраженная экспрессия, 3 балла) в нейронах наружного зернистого слоя, в нейропиле обнаруживалась слабо выраженная экспрессия ИРМ (1 балл) (рис.50), т.е. отмечается увеличение экспрессии iNOS-позитивного материала при стрессе.

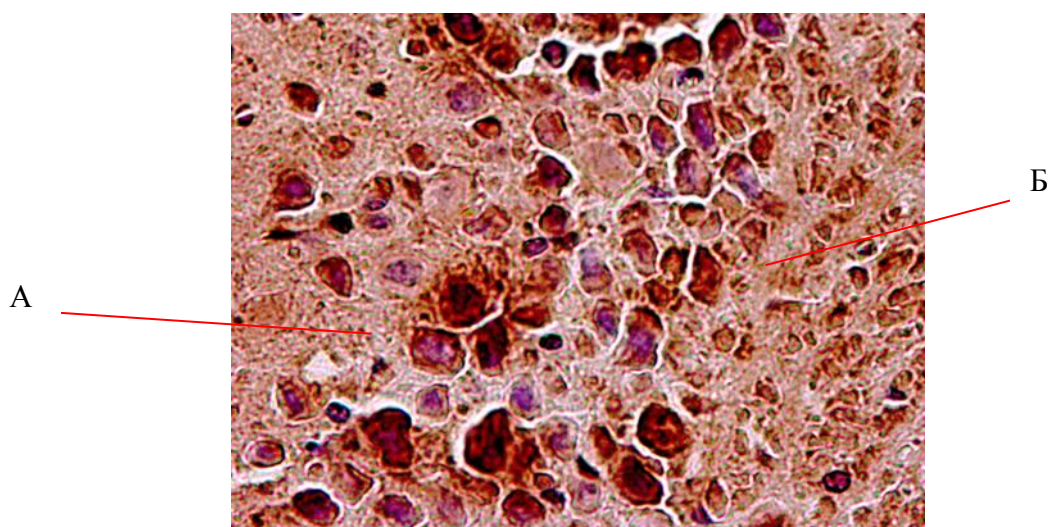


Рис. 49. Головной мозг (CA3 зона гиппокампа) 12-месячной стрессированной крысы. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Обозначения:

А - экспрессия иммунореактивного материала в нейронах пирамидного слоя; Б - экспрессия иммунореактивного материала в нейропиле радиального слоя

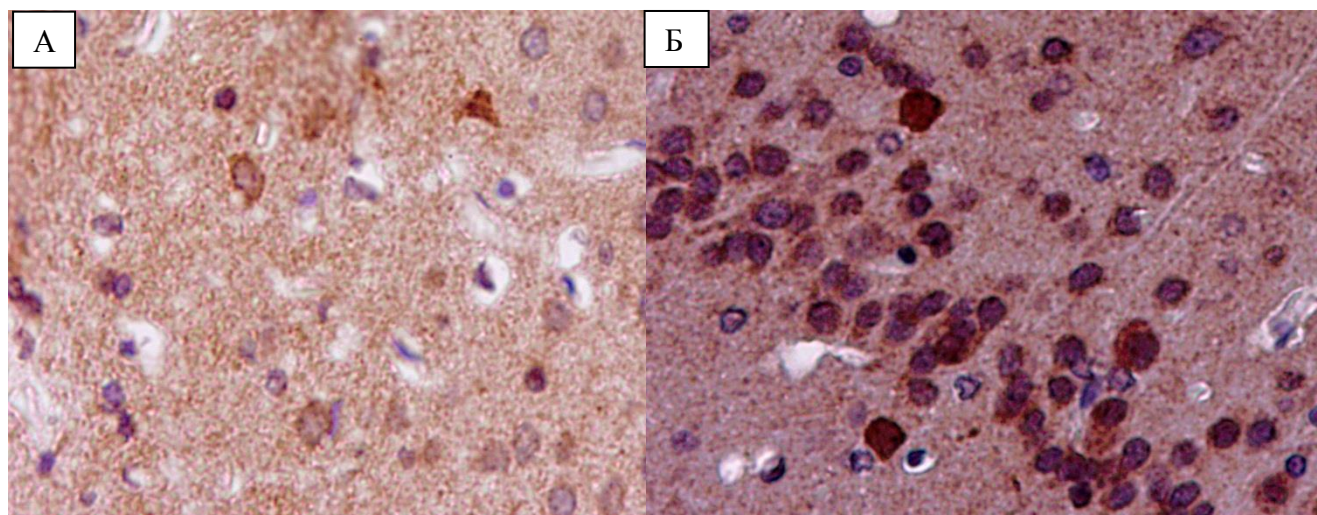


Рис. 50. Головной мозг 12-месячной стрессированной крысы. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Обозначения:

А - париетальная кора головного мозга; Б - наружный зернистый слой, париетальная кора головного мозга.

У стрессированных крыс в возрасте 24 месяцев в зубчатой извилине определялась слабо выраженная экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины, единичные нейроны характеризовались умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ в перикарионах (рис.51), в нейропиле - слабо выраженная пылевидная экспрессия (1 балл).

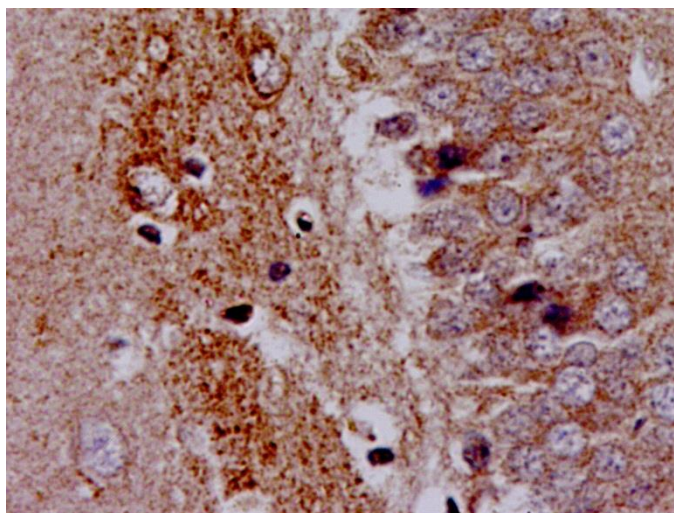


Рис. 51. Головной мозг (зубчатая извилина) 24-месячной стрессированной крысы
Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска
гематоксилин. Увеличение X 400.

Отмечалась умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов субгранулярного слоя, в нейропиле - умеренно выраженная экспрессия (2 балл). В СА3 зоне гиппокампа определялась слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (1 балл) в большинстве перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа (рис.52), возрастало количество нейронов с выраженной цитоплазматической экспрессией iNOS-позитивного иммунореактивного материала в перикарионах. Отмечена умеренно выраженная экспрессия в нейропиле радиального слоя (2 балла).

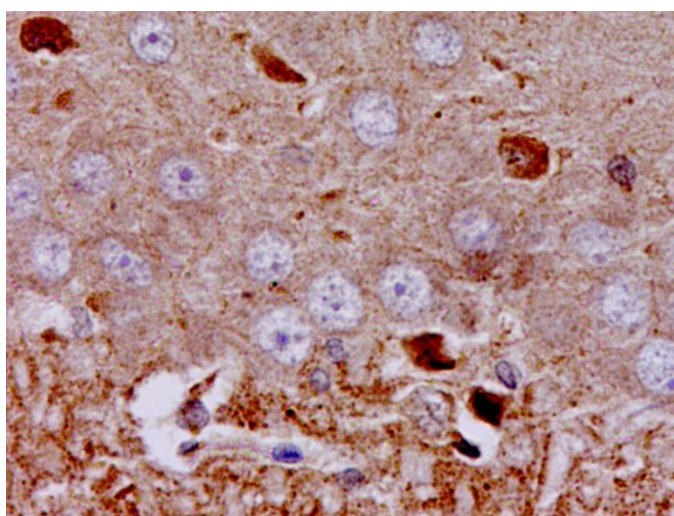


Рис. 52. Головной мозг (СА3 зона гиппокампа) 24-месячной стрессированной крысы
Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска
гематоксилин. Увеличение X 400.

У стрессированных крыс в возрасте 24 месяцев в париетальной коре головного мозга определялась выраженная экспрессия иммунореактивного iNOS-позитивного материала в нейронах нейропиле материала (3 баллов), в наружном зернистом слое умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла), в нейропиле определялась умеренно выраженная экспрессия иммунореактивного iNOS-позитивного материала (2 балла) (рис.53), т.е. отмечается увеличение экспрессии iNOS-позитивного материала при стрессе, а также в сравнении с животными 12 месяцев.

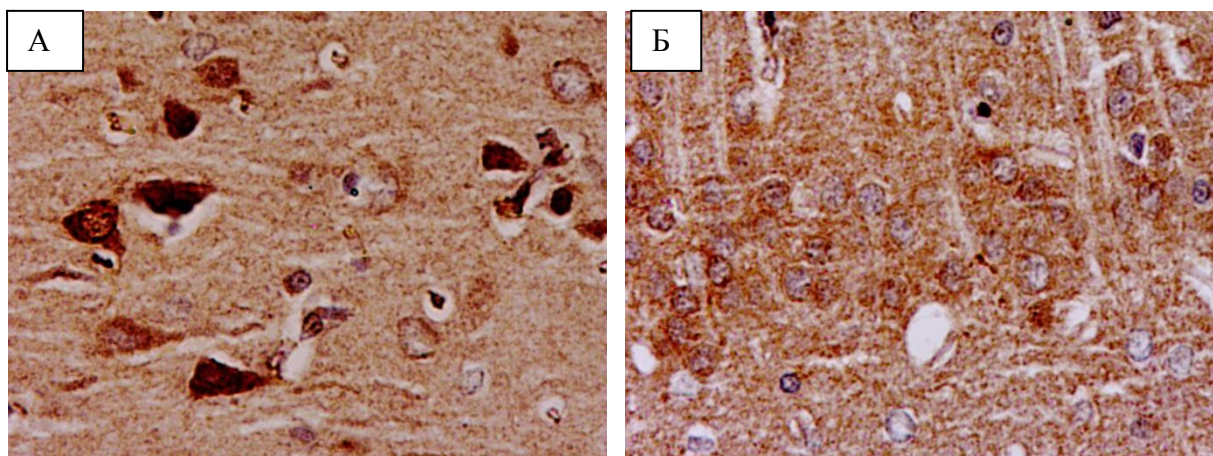


Рис. 53. Головной мозг 24-месячной стрессированной крысы Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Обозначения:

А Париетальная кора головного мозга; Б – Наружный зернистый слой.

При изучении гиппокампа с использованием антител против eNOSy 12-месячных крыс, подвергнутых комбинированному стрессорному воздействию, слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного ИРМ (1 балла) в перикарионах нейронов гранулярного слоя и практически отсутствовала (0 баллов) в нейропиле. Отмечалось отсутствие экспрессии ИРМ (0 баллов) в перикарионах нейронов субгранулярного слоя, в эндотелии капилляров париетальной, темпоральной коры головного мозга и базальных ганглиев (рис.54), а также отмечена слабо выраженная экспрессия ИРМ (1 балл) в нейропиле зубчатой извилины париетальной коре, т.е. отмечается снижение экспрессии eNOS-позитивного материала при стрессе.

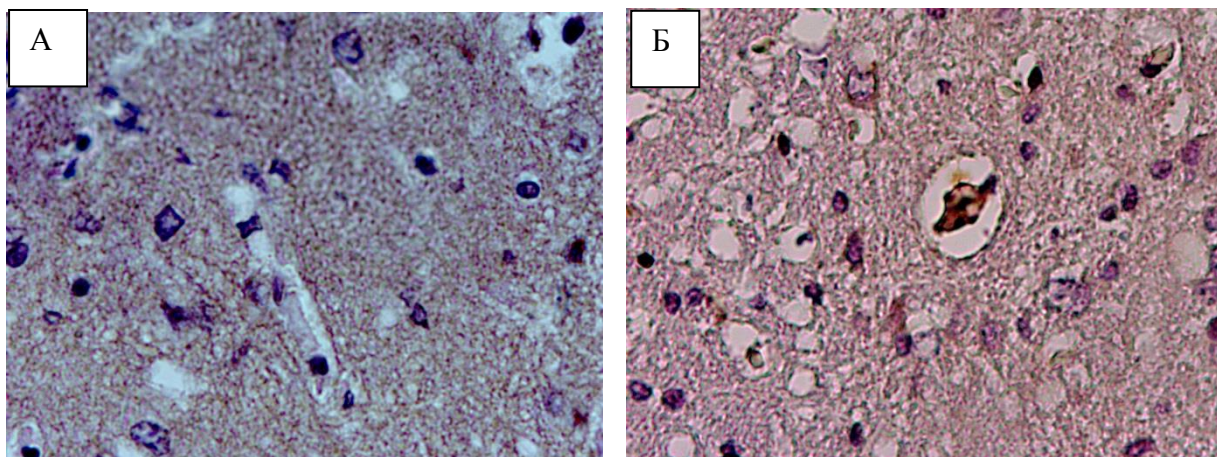


Рис. 54. Головной мозг 12-месячной стрессированной крысы. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Обозначения:

А – Стриатум. Отсутствие экспрессии иммунореактивного материала в эндотелии капилляров; Б – Pariетальная кора головного мозга. Отсутствие экспрессии иммунореактивного материала в нейропиле

У стрессированных крыс в возрасте 24 месяцев в зубчатой извилине наблюдалось отсутствие экспрессии eNOS-позитивного ИРМ (0 баллов) в перикарионах нейронов гранулярного, субгранулярного слоев, а также нейропиле (рис.55), в СА3 зоне гиппокампа определялась слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного иммунореактивного материала (1 балл) в большинстве перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа и отсутствовала в нейропиле (0 баллов), в парietальной коре головного мозга определялось отсутствие экспрессии иммунореактивного eNOS-позитивного материала (0 баллов) в нейропиле и нейронах, т.е. отмечается снижение экспрессии eNOS-позитивного материала при стрессе.

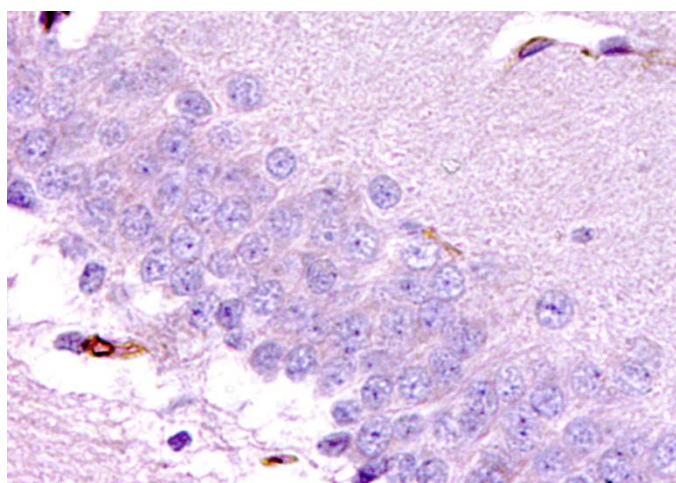


Рис. 55. Головной мозг (зубчатая извилина) 24-месячной стрессированной крысы. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

У стрессированных крыс в возрасте 12 месяцев, получавших РГПУ-135, в зубчатой извилине определялась слабо выраженная экспрессия цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного ИРМ (1 балла) в перикарионах нейронов гранулярного слоя (рис.56) и слабо выраженная экспрессия (1 балл) в нейропиле (рис.56). Отмечалось отсутствие ИРМ (0) в перикарионах нейронов и в нейропиле субгранулярного слоя зубчатой извилины. У стрессированных крыс в возрасте 24 месяцев, получавших РГПУ-135, в зубчатой извилине отмечается отсутствие экспрессии eNOS-позитивного ИРМ (0 баллов) в перикарионах нейронов гранулярного, субгранулярного слоёв и нейропиле (рис.56).

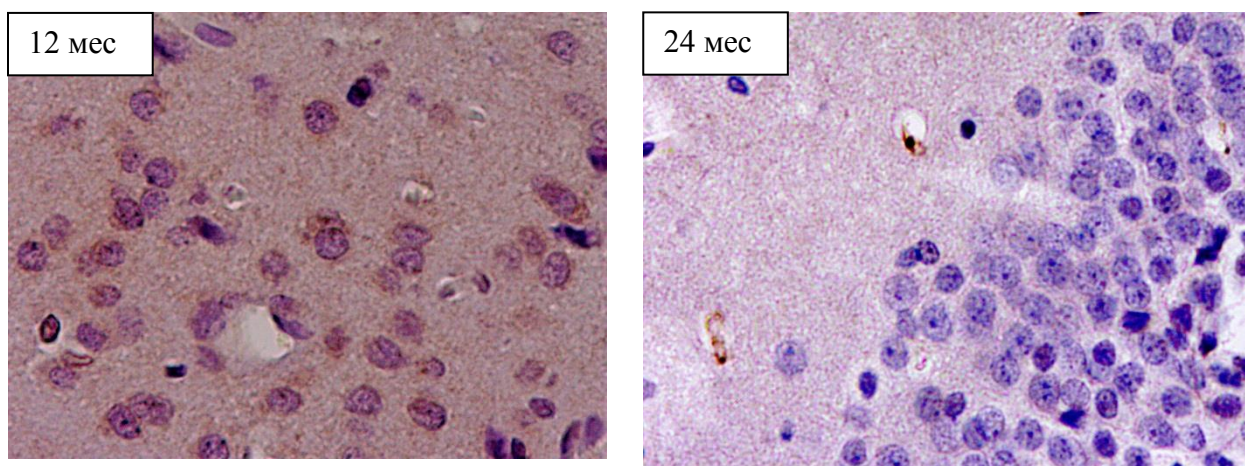


Рис. 56. Головной мозг (зубчатая извилина) 12 и 24 -месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-135. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Также у крыс в возрасте 12 месяцев, получавших РГПУ-135 при стрессе, в СА3 зоне гиппокампа определялась умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного иммунореактивного материала (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя гиппокампа (рис.) и отсутствие экспрессии ИРМ (0 баллов) в нейропиле радиального слоя гиппокампа, т.е. отмечается увеличение экспрессии eNOS-позитивного материала по сравнению со стрессом. СА3 зона гиппокампа. У стрессированных крыс в возрасте 24 месяцев, получавших РГПУ-135, в СА3 зоне гиппокампа определялась слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного иммунореактивного материала (1 балл) в

перикарионах нейронов пирамидного слоя гиппокампа (рис.57) и отсутствие экспрессии ИРМ (0 баллов) в нейропиле радиального слоя гиппокампа

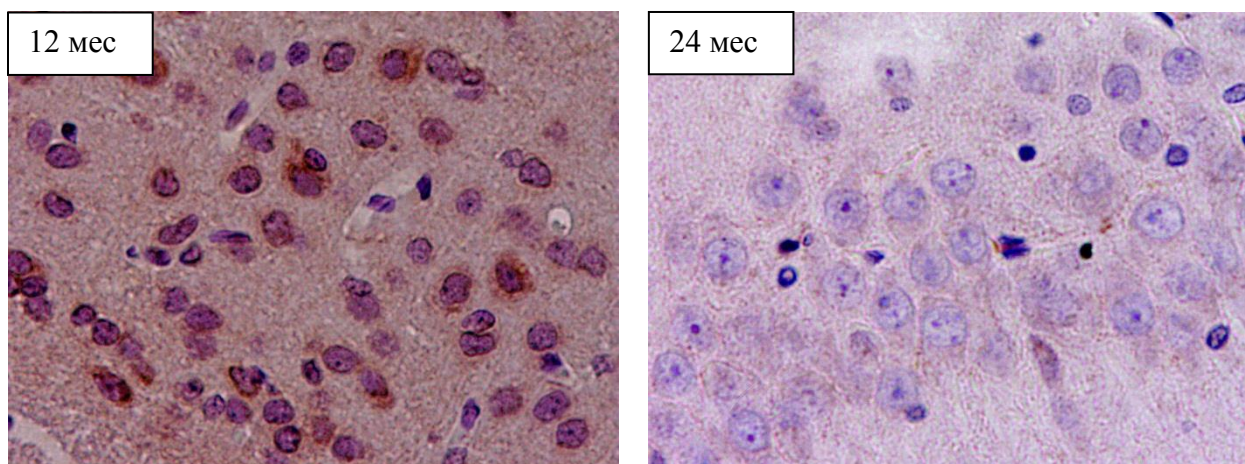


Рис. 57. Головной мозг (CA3 зона гиппокампа) 12 и 24 -месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-135. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

При исследовании эндотелия капилляров париетальной, темпоральной коры головного мозга и базальных ганглиев у стрессированных крыс, получавших РГПУ-135, в возрасте 12 и 24 месяцев отмечалось более выраженная цитоплазматическая экспрессия иммунореактивного eNOS-позитивного материала (рис.58) по сравнению со стрессом до значений интактных животных

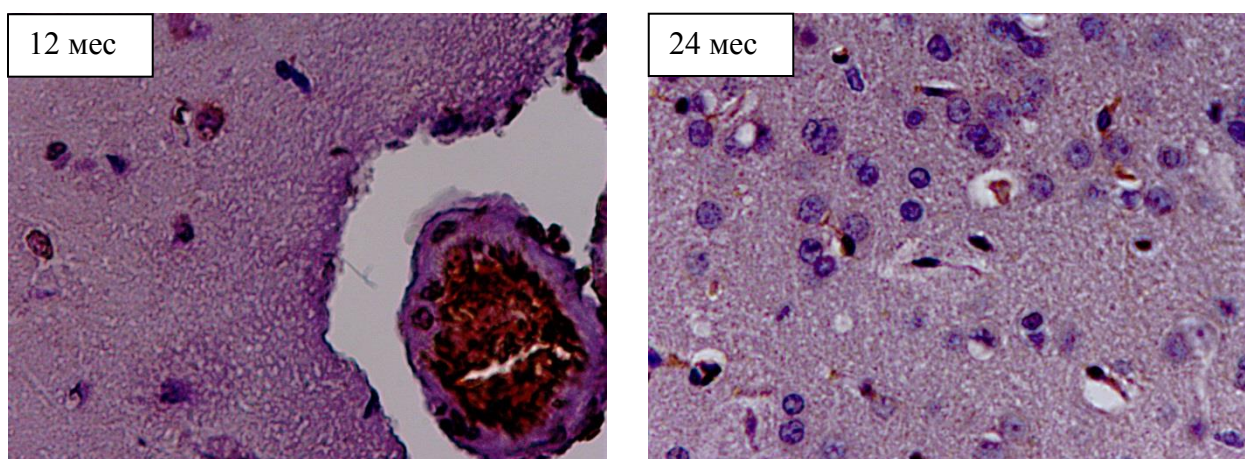


Рис. 58. Кора головного мозга (париетальная кора) 12 и 24 -мес стрессированных крыс, получавших РГПУ-135. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

У стрессированных крыс в возрасте 12 месяцев и 24 месяцев, получавших РГПУ-135, в зубчатой извилине определялась слабо выраженная

экспрессия цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов гранулярного слоя (Рис. 4) и слабо выраженная экспрессия (1 балл) в нейропиле (рис.59). Отмечалось отсутствие ИРМ (0) в перикарионах нейронов и в нейропиле субгранулярного слоя зубчатой извилины у 12 месячных крыс и умеренно выраженная экспрессия цитоплазматическая экспрессия iNOS-позитивного ИРМ (2 балла) у 24 месячных животных. При этом снижение экспрессии iNOS-позитивного материала по сравнению со стрессом до значений интактных животных отмечалось только у крыс 12 месяцев.

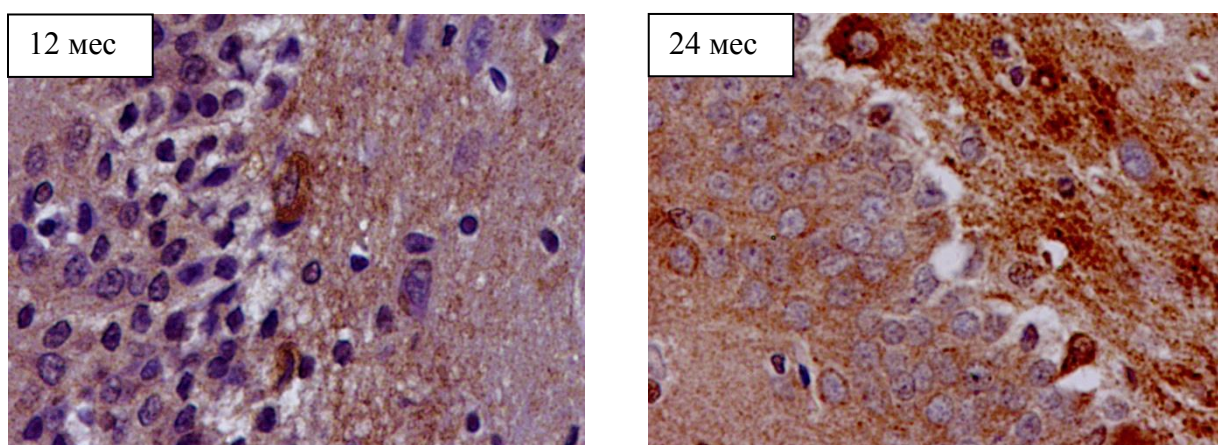


Рис. 59. Головной мозг (Зубчатая извилина) 12 и 24 -месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-135. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

В париетальной коре головного мозга у 12ти и 24х месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-135, определялась умеренно выраженная экспрессия иммунореактивного iNOS-позитивного материала (2 балла) в большинстве нейронов наружного зернистого слоя (рис.60), в нейропиле определялась слабо выраженная экспрессия ИРМ (1 балл), т.е. отмечается снижение экспрессии iNOS-позитивного материала по сравнению со стрессом.

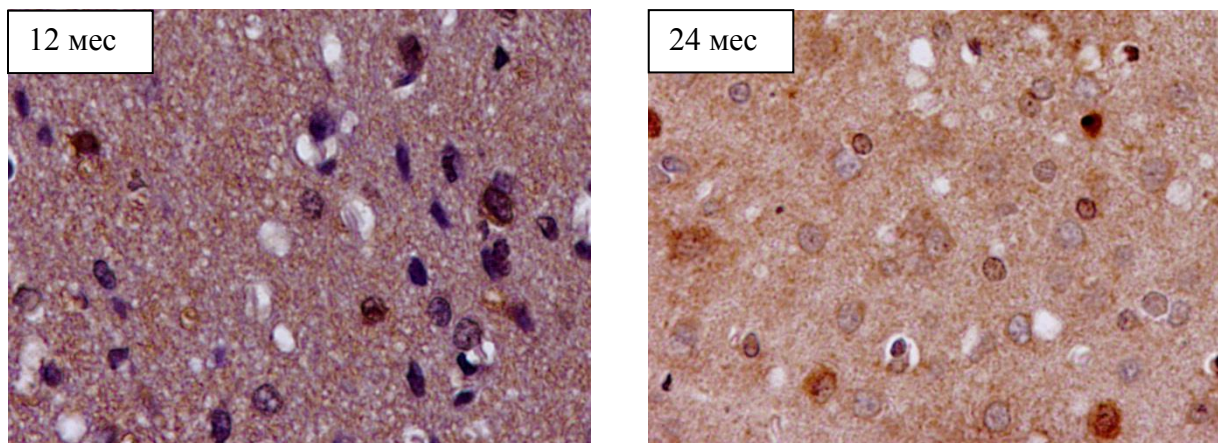


Рис. 60. Parietalная кора головного 12 и 24 -месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-135. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

У стрессированных крыс (12 месяцев и 24 месяцев), получавших РГПУ-189, цитоплазматическая экспрессия eNOS-позитивного ИРМ была более выражена в зубчатой извилине, париетальной коре, базальных ганглиях и артериолах по сравнению с соответствующими животными контрольных групп.

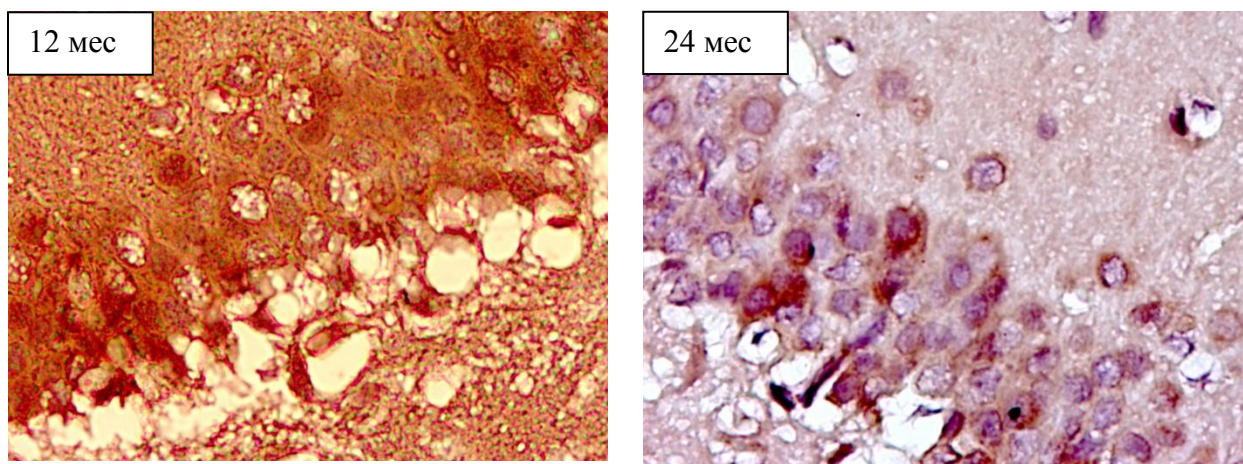


Рис. 61. Головной мозг (зубчатая извилина) 12 и 24 -месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-189. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против eNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

У стрессированных крыс (12 месяцев), получавших РГПУ-189, по сравнению с животными контрольной группы, получавшими физиологический раствор, менее выраженная экспрессия iNOS-позитивного ИРМ наблюдалась в перикарионах нейронах субгранулярного слоя зубчатой извилины, перикарионах нейронах пирамидного слоя гиппокампа, париетальной коре и базальных ганглиях. При этом у животных 24 месяцев,

получавших тоже вещество на фоне стресса, снижение экспрессии ИРМ отмечалось в нейропиле субгранулярного слоя зубчатой извилины и СА3 зона гиппокампа, париетальной коре и базальных гангиях.

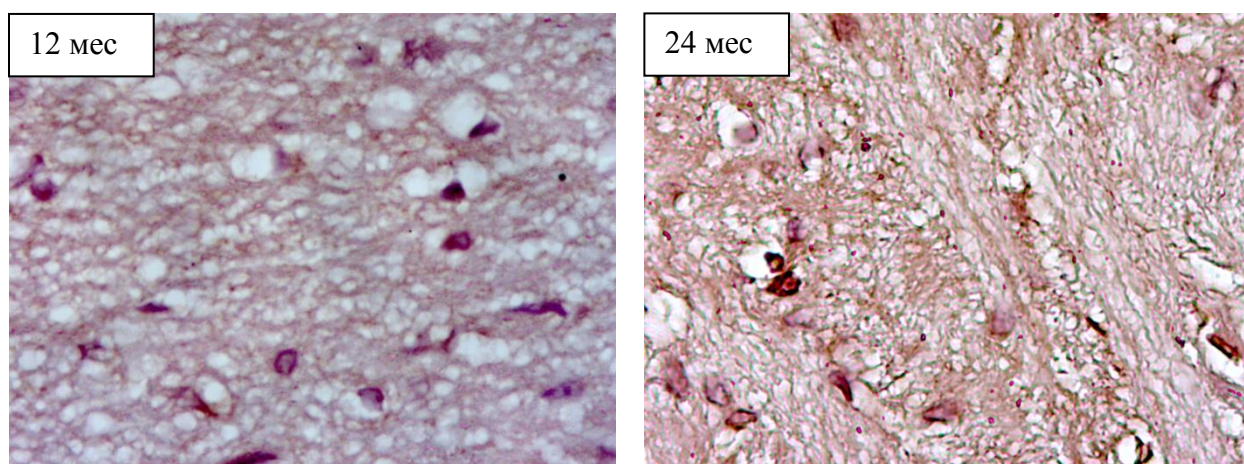


Рис. 62. Базальные ганглии 12 и 24-месячных стрессированных крыс, получавших РГПУ-189. Иммуногистохимическое окрашивание, антитела против iNOS, докраска гематоксилин. Увеличение X 400.

Таким образом, полученные данные иммуногистохимического исследования препаратов головного мозга крыс двух возрастных групп свидетельствуют о повышении экспрессии индуцибельной изоформы NOS и снижение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы как в процессе «нормального» старения (интактные животные), так и на фоне стрессового воздействия. При этом было выявлено более интенсивное окрашивание нервных волокон stratum lucidum и отростков нейронов радиального слоя СА3 поля гиппокампа животных подвергшихся стрессу. Данные волокна представлены базальными немиелинизированными аксонами гранулярных клеток зубчатой извилины, образуя параллельные пучки, покидают гранулярный слой, входят в хилус и далее в СА3, где образуют многочисленные синаптические контакты с дендритными отростками пирамидных клеток. По литературным данным, повреждение волокон и рецепторов данной области может приводить к развитию гиппокампальной дисфункции, проявляющейся нарушением поведения и пространственного обучения.

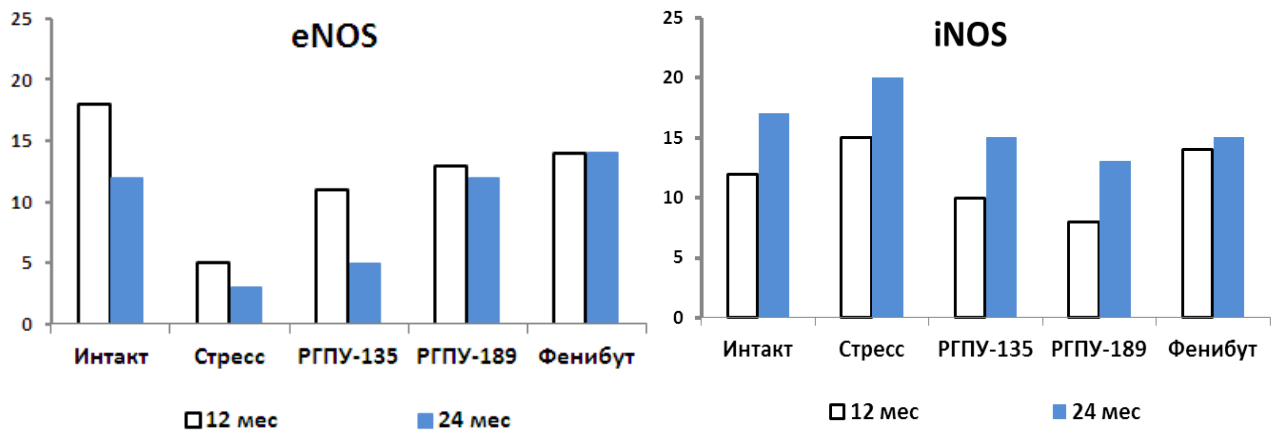


Рис. 63. Динамика изменения iNOS- и eNOS-иммунопозитивных нейронов головном мозге у стареющих крыс в условиях стресса (суммарный балл иммунореактивного материала).

Исследуемые соединения РГПУ-135 и, в несколько большей степени, РГПУ-189 способствовали увеличению экспрессии eNOS-позитивного материала и уменьшению iNOS-позитивного материала практически до значений интактных животных, что может лежать в основе их эндотелипротекторного действия.

6.8 Заключение

Таким образом, при хроническом стрессорном воздействии на крыс двух возрастных групп оба исследуемых соединения – РГПУ-135 и РГПУ-189 уменьшают выраженность постстрессорных нарушений, а именно – улучшают сохранение памятного следа, препятствуют стрессогенному повышению АД (в большей степени у животных старшей возрастной группы), улучшают мозговое кровообращение и функциональное состояние эндотелия (о чем свидетельствовал больший прирост кровотока в ответ на введение ацетилхолина и большее его падение на введение нитро-L-аргинина), уменьшают выраженность патоморфологических изменений в головном мозге, снижая степень повреждения нейронов.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ЖИВОТНЫХ НА ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РГПУ-135 И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА⁹

В настоящее время установлено, что нервная, иммунная и эндокринные системы задействованы в регуляции всех органов и систем в нашем организме как в норме, так и при различных патологических состояниях, поэтому разработка лекарственных препаратов с учетом понимания этих взаимодействий позволит оптимизировать тактику лечения больных с инсультом и другими формами поражения центральной нервной системы.

ЦНС модулирует активность иммунной системы через сложные нейрогуморальные пути, которые включают гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, блуждающий нерв и симпатическую нервную систему (рис.64).

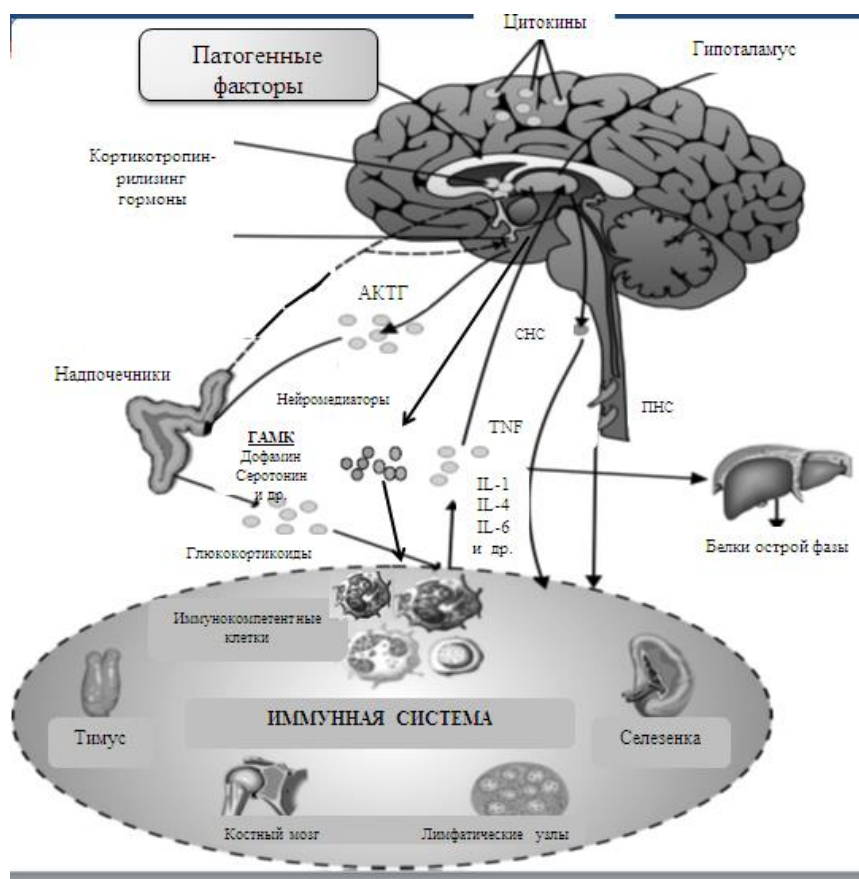


Рис. 64. Взаимодействие нервной, иммунной и эндокринной систем.

⁹ Исследование выполнено совместно с И.С. Филиной

Гипоталамус, включающий различные вегетативные центры, позволяет синхронизировать нейроэндокринные ответы, подавляя периферической выброс воспалительных цитокинов из Т-клеток, моноцитов и макрофагов, и содействуя высвобождению противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-10. Аналогичным образом, высвобождение норадреналина из плотной сети нейронов в головном мозге и из периферических органов, в том числе мозгового вещества надпочечников, печени и селезенки, вызывает выраженный противовоспалительный ответ лимфоцитов, моноцитов и макрофагов. Вместе эти механизмы ограничивают воспалительную реакцию в мозге [Kamel H., Iadecola C., 2012].

Однако атеросклероз, аутоиммунные заболевания, различные стрессоры могут провоцировать запуск воспаления, которое способствует повреждению сосудов и увеличивает риск развития НМК (рис.65). Кроме того, иммунная система активно участвует в патогенезе острого инсульта. Тромбоз и гипоксия являются триггерами к запуску внутрисосудистого воспалительного каскада и врожденной иммунной реакцией на клеточное повреждение в паренхиме [Ransohoff R. M., 2012].

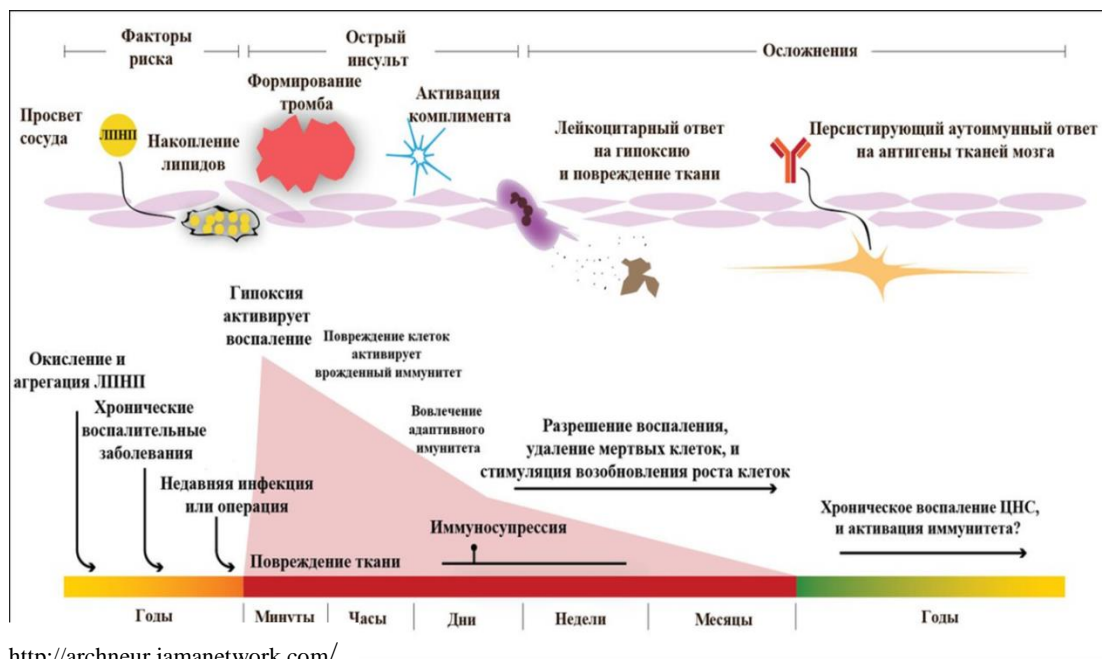


Рис. 65. Изменение иммунной системы при НМК.

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что соединение под лабораторным шифром РГПУ-135 обладает иммуотропными

свойствами [Патент РФ № 2429834]. Учитывая выше сказанное (о тесной связи нервной и иммунной систем и их роли в патогенезе нарушений мозгового кровообращения) было изучено церебропротективное действие РГПУ-135 в условиях ишемии головного мозга на животных с различным иммунным статусом.

Подавление иммунной системы животных осуществляли введением Циклоспорина А (препарат «Экорал», Чешская Республика) перорально в дозе 5 мг/кг ежедневно в первой половине дня [Homan W.P., 1980; Zijlstra G.S., 2009] на протяжении всего эксперимента. Активировали иммунитет животных внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС), выделенного из клеток *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал», Россия) в дозе 10 мкг/кг через день в первой половине дня на протяжении всего эксперимента.

7.1 Оценка выживаемости и психоневрологического статуса животных с различным иммунологическим статусом, получавших РГПУ-135 и препараты сравнения, при моделировании ишемии головного мозга.

Как видно из данных представленных в табл. 78, наименьшее количество летальных исходов было отмечено у животных, которым церебральную ишемию моделировали на фоне активированной иммунной системы, тогда как подавление иммунитета приводило к отягощению последствий НМК у экспериментальных животных, у которых летальность к концу 7-х суток составила 75%.

Таблица 78

Выживаемость животных после поэтапной необратимой окклюзии ОСА.

Состояние иммунной системы	Группа животных	N	Время после поэтапной окклюзии общих сонных артерий				
			12 часов	24 часа	48 часов	72 часа	7 суток
Интактная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	100%
	Ишемия	20	80%	75%	70%	65%#	45%##
	РГПУ-135	15	100%	100%	93,3%	93,3%	80%
	Фенибут	15	100%	93,3%	93,3%	86,7%	66,7%
	Церебролизин	15	100%	93,3%	93,3%	93,3%	80%
Подавленная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	93,3%
	Ишемия	20	80%	70%	60%#	50%#	25%#
	РГПУ-135	15	100%	93,3%	93,3%	86,7%	80%
	Фенибут	15	93,3%	86,7%	80%	80%	60%
	Церебролизин	15	100%	100%	100%	93,3%	80%
Активированная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	100%
	Ишемия	20	85%	80%	75%	75%*	60%#*
	РГПУ-135	15	100%	100%	86,7%	96,7%	80%
	Фенибут	15	100%	93,3%	93,3%	93,3%	80%
	Церебролизин	15	100%	86,7%	80%	73,4%	60%

Примечание:

N – общее количество животных в группе ; ЛО – ложнооперированная группа животных; # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных ($p<0,05$); ## - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных ($p<0,01$); *- различия достоверны по сравнению с группой животных ишемия с подавленной иммунной системой ($p<0,05$)

Показатели летальности во всех исследуемых группах коррелировали со степенью выраженности неврологического дефицита у животных. Так подавление иммунной системы перед моделированием НМК приводит к развитию более выраженного неврологического дефицита, а активация иммунитета наоборот способствовала развитию наименее выраженных неврологических отклонений (рис.66).

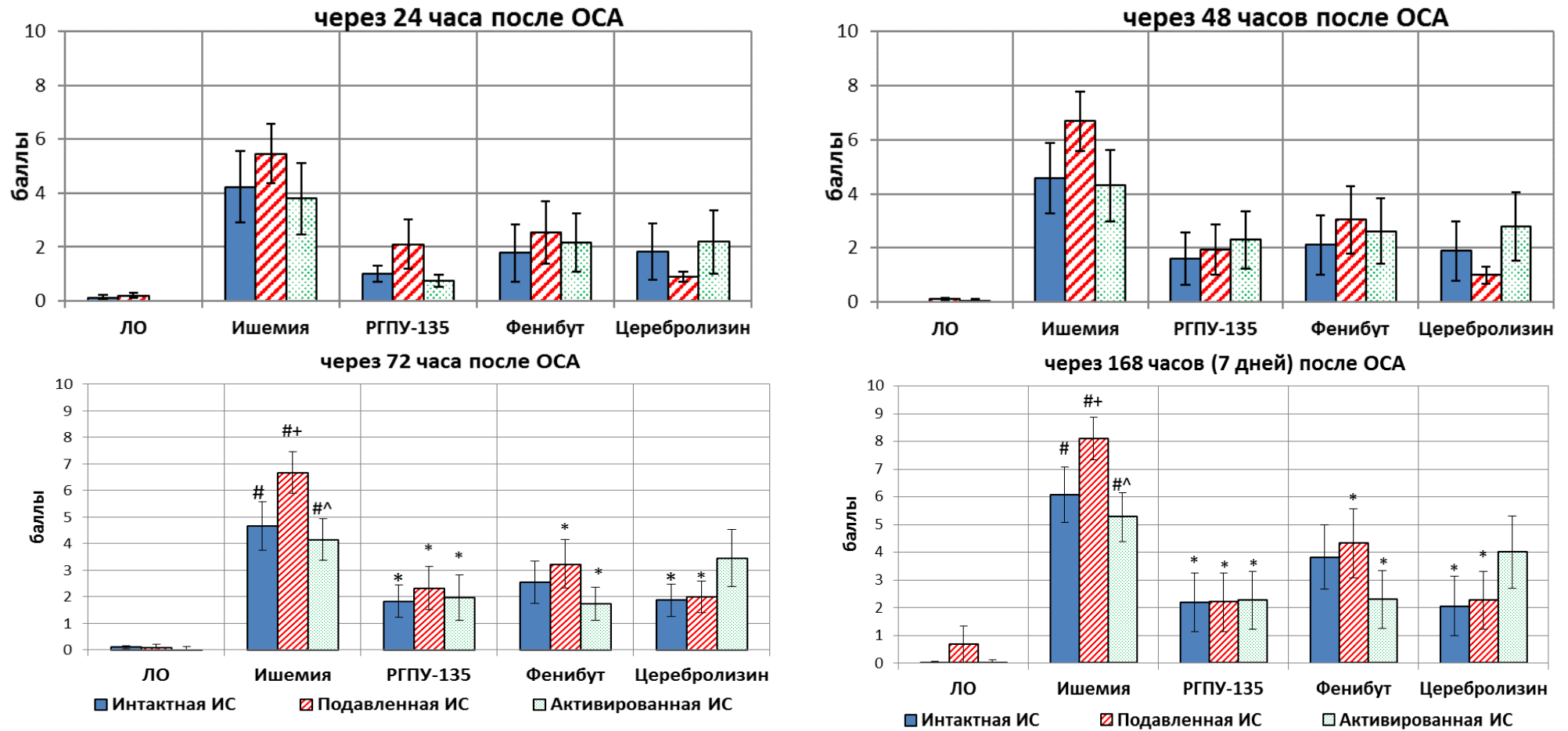


Рис. 66. Неврологический дефицит по шкале McGrow у животных после поэтапной окклюзии общих сонных артерий.

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа животных; # - по сравнению с ЛО группой животных; * - по сравнению с группой ишемия; + - по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой (различия достоверны при $p < 0,05$)

Исследуемое соединение РГПУ-135 уменьшало количество летальных исходов после окклюзии ОСА и степень тяжести неврологических отклонений у животных с интактной, подавленной и активированной иммунной системой (табл. 78, рис.66). При этом его эффект был сопоставим с таковым у препаратов сравнения фенибута (на фоне активированной иммунной системой) и церебролизина (у животных с интактной и подавленной иммунной системой).

Для оценки у животных с экспериментальным НМК двигательных функций и атаксии были использованы тесты Rota-Rod, ОП. В ОП также оценивали ориентировочно-исследовательскую активность по количеству заглядываний животными в норки и совершенных ими стоек.

Модуляция иммунной системы в группах ЛО животных не приводила к значимым отличиям между группами как в тесте Rota-Rod, так и в ОП (табл.79).

Таблица 79

Показатели животных в тестах «Открытое поле» и Rota-Rod через 7 суток после окклюзии общих сонных артерий.

Состояние иммунной системы	Группа животных	ОП		Rota-Rod	
		ДА	ОИА	ЛП падения	Время удержания
Интактная иммунная система	ЛО	29,1±1,7	20,3±1,4	38,1±3	117,4±5,9
	Ишемия	11,1±1,3 [#]	6,3±0,8 [#]	9,3±0,9 [#]	29,9±1,8 [#]
	РГПУ-135	19,5±1,8*	14,1±1,7*	28,1±2,1*	82,3±7*
	Фенибут	14,2±1,3	7,1±1,1	16,6±1,5*	50,5±4,2*
	Церебролизин	19,5±2*	13,4±1,5*	26,7±2*	79,2±5*
Подавленная иммунная система	ЛО	25,2±1,2 ⁺	16,1±1,6 ⁺	32,7±2,3	101,2±8,5
	Ишемия	6,3±1,2 ^{#+}	3,6±1 ^{#+}	7,5±0,9 [#]	24,3±1,4 ^{#+}
	РГПУ-135	16,5±1,8*	12,9±1,5*	25,8±1,2*	73,8±9,2*
	Фенибут	10,4±0,7* ⁺	6±0,6*	9,7±0,9 ⁺	36,3±6,1
	Церебролизин	17,9±1,2*	12,7±1,4*	24,6±2,4*	70,1±5,9*
Активированная иммунная система	ЛО	27,3±2,0	18,5±1,4	35,1±2,7	119,9±7,4
	Ишемия	15±1,5 ^{#+^}	4,5±0,8 [#]	11,3±1,2 [#]	44,1±4,7 ^{+^#}
	РГПУ-135	18,2±1,9	14,5±1,5*	27,3±1,7*	86,2±8,4*
	Фенибут	16,3±1,2 [^]	11,4±1,3 ^{+^}	23,7±1,8* ^{+^}	74±3,2* ^{+^}
	Церебролизин	13,7±1,7 ^{+^}	7,6±1,1* ^{+^}	18,2±1,3* ^{+^}	56,1±3,5* ^{+^}

Примечание:

подавленная иммунная система – введение Циклоспорино; активированная иммунная система – введение Липополисахарида; ЛО – ложнооперированная группа животных; ЛП – латентный период первого падения; Время удержания – суммарное время удержания на вращающемся стержне; # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; +

- различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой

После окклюзии ОСА у животных снижалась двигательная, ориентировочно-исследовательская активность и координация. При этом изменения в иммунном статусе влияли на течение ишемии, усугубляя ее последствия при подавлении иммунитета. Так в тесте ОП контрольные животные с подавленной иммунной системой совершали меньшее количество двигательных актов, стоек, заглядываний в норки, а в тесте Rotarod латентный период падения был наименьшим среди всех групп с ишемией (табл.79).

У животных с экспериментальным НМК, получавших соединение РГПУ-135, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность в тесте ОП и координация в тесте Rota-Rod были значительно лучше по сравнению с соответствующими группами контрольных животных с ишемией на фоне интактной, подавленной и активированной иммунной системы. Препараты сравнения проявляли церебропротективные свойства, однако защитное действие фенибута было более выражено у животных, которым моделировали ишемию на фоне активации иммунной системы, тогда как церебролизин был эффективен как при подавлении иммунитета, так и при не измененном иммунном статусе (табл.79).

7.2 Состояние мозгового кровообращения и степень гидратации мозговой ткани при церебральной ишемии у животных с различным иммунным статусом, получавших РГПУ-135 и препаратов сравнения.

У животных после моделирования НМК отмечалось значительное снижение уровня кровотока (в среднем на 39,5-44,3%) в проекции средней мозговой артерии на фоне повышения степени гидратации мозговой ткани (рис.67). При этом достоверных различий данных показателей у животных с различным состоянием иммунной системы выявлено не было.

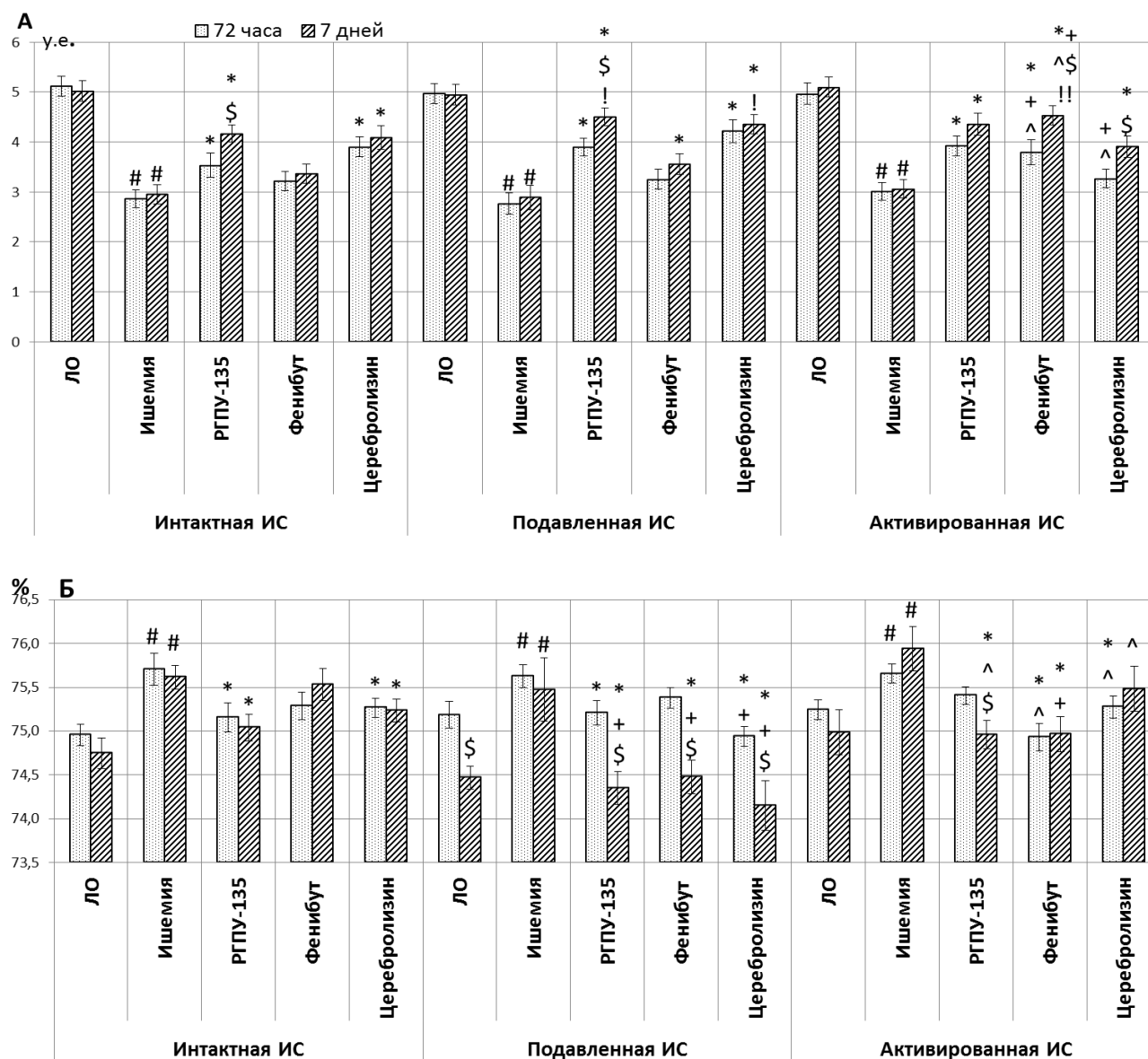


Рис. 67. Уровень локального мозгового кровотока (А) и процент гидратации мозговой ткани (Б) после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий (ОСА) у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой. Обозначения:

- различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с группой ишемией; + - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных; ! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой животных, получавшей фенибут

Влияние исследуемых соединений способствовало сохранению уровня мозгового кровообращения на более высоком уровне и снижению выраженности отека мозговой ткани (рис.67).

В группе животных с интактной, подавленной и активированной иммунной системой, получавших в качестве лечения НМК соединение РГПУ-135, уровень мозгового кровотока был выше, а отек головного мозга меньше, чем у соответствующих животных контрольной группы (рис.67). При этом сравнивая показатели животных, получавших данное соединение 3 и 7 дней, отмечено достоверное нарастание протективного эффекта РГПУ-135 с течением времени.

Препарат сравнения фенибут оказывал противоишемический эффект только на животных с НМК на фоне активированной иммунной системы, а церебролизин – при подавлении иммунитета (рис.67).

7.3 Содержание нейронспецифических белков и нейротрофинов при церебральной ишемии у животных с различным иммунным статусом, получавших РГПУ-135 и препараты сравнения.

Для дополнительной верификации динамики и степени повреждения головного мозга при НМК на фоне интактной, подавленной и активированной иммунной системы были определены NSE, MBP, BDNF в сыворотке крови (табл.80,табл.81).

Как можно видеть из данных, представленных в табл.80, изменения в иммунном статусе животных ЛО групп (подавление и активация) приводили в первые 3 дня к достоверному повышению уровня NSE по сравнению с ЛО животными с интактным иммунитетом, однако данные изменения носили обратимый характер и через 7 дней после операции на ОСА содержание NSE во всех группах ЛО не имели статистической значимости.

Моделирование НМК вело к достоверному повышению уровня NSE по сравнению с ЛО животными на 3-и сутки у животных контрольной группы с активированным иммунитетом, на 7-е сутки – у контрольных животных с интактным, подавленным и активированным иммунитетом ($p<0,05$) (табл.80).

Таблица 80

Содержание нейронспецифической енолазы (NSE) и основного белка миелина (MBP) в сыворотке крови через 3 и 7 дней после моделирования НМК ишемического генеза у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой.

Состояние иммунной системы	Группа животных	NSE, нг/мл		MBP, нг/мл	
		3 дня	7 дней	3 дня	7 дней
Интактная иммунная система	ЛО	1,19± 0,25	0,92± 0,16	1,5± 0,28	0,4± 0,12\$
	Ишемия	1,63± 0,28	2,88± 0,38\$#	1,8± 0,31	1,9± 0,3#
	РГПУ-135	1,66± 0,57	1,19± 0,27*	1,7± 0,31	0,4± 0,02*\$
	Фенибут	1,75± 0,3	1,72± 0,21*	1,7± 0,40	0,8± 0,2*\$
	Церебролизин	1,88± 0,71	1,64± 0,38*	2,0± 0,5	0,6± 0,17*\$
Подавленная иммунная система	ЛО	2,2± 0,41+	1,09± 0,28\$	1,5± 0,45	0,4± 0,1\$
	Ишемия	2,93± 0,5+	3,44± 0,4#	2,1± 0,32	2,4± 0,32#
	РГПУ-135	1,92± 0,34	1,47± 0,22*!	1,2± 0,19*	0,6± 0,08*\$
	Фенибут	3,61± 0,72+	2,16± 0,24*	3,0± 0,36+	1,1± 0,2*\$
	Церебролизин	2,35± 0,32	1,88± 0,17*	2,4± 0,16	0,6± 0,15*\$
Активированная иммунная система	ЛО	2,55± 0,35+	1,34± 0,2\$	2,3± 0,33	0,9± 0,2+^\$
	Ишемия	4,17± 0,61+##	2,41± 0,29#^\$	2,7± 0,38	1,4± 0,15#^\$
	РГПУ-135	2,06± 0,69*	1,74± 0,12*	1,2± 0,27*	1,1± 0,19+^
	Фенибут	3,29± 0,48+	1,38± 0,24*^\$	1,9± 0,24^	0,9± 0,2*\$
	Церебролизин	6,45± 1,3^+	2,53± 0,33\$	3,0± 0,48	1,3± 0,19+^\$

Примечание:

подавленная иммунная система – введение Циклоспорина; активированная иммунная система – введение Липополисахарида; ЛО – ложнооперированная группа животных, # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой с НМК, получавший физиологический раствор; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой, получавшей фенибут.

Исследуемое соединение РГПУ-135 на 3-и сутки после окклюзии ОСА снижало уровень NSE у животных с активированным иммунитетом, а на 7-ые – в равной степени у животных с интактной, подавленной и активированной

иммунной системой по сравнению с соответствующими контрольными группами.

Препарат сравнения фенибут снижал сывороточный уровень NSE в условиях ишемии головного мозга на 7-е сутки, при этом в большей степени у животных с активированной иммунной системой.

Животные, которые получали препарат сравнения церебролизин, на 3-и сутки после окклюзии ОСА имели самый высокий уровень NSE, что возможно связано с потенцированием иммуностимулирующих свойств церебролизина на фоне экзогенной активации иммунной системы (табл.80). На 7-ые сутки наблюдения уровень NSE снизился у всех животных, получавших данный препарат сравнения, однако у животных с активированной иммунной системой он оставался выше, чем у животных с интактным и подавленным иммунитетом.

Фоновый уровень МВР у животных ЛО групп на третьи сутки был несколько повышен, что возможно связано с операционной травмой, наносимой при моделировании НМК. При этом к 7-м суткам уровень данного белка у ЛО крыс значительно снижался, однако у животных с активированным иммунитетом он оставался достоверно выше, чем у животных с интактной иммунной системой.

При НМК у крыс контрольных групп к 7-м суткам наблюдения уровень МВР был в 4,5 (с интактным иммунитетом), 5,8 (с подавленным иммунитетом), 1,6 (с активированным иммунитетом) раза ($p < 0,05$) выше по сравнению с соответствующими группами ЛО животных, что может указывать на деструкцию белого вещества мозга при ишемии головного мозга.

РГПУ-135 в тех же условиях эксперимента на 7-й день снижал уровень данного белка на 79% (с интактным иммунитетом), на 21% (активированным иммунитетом), на 75% (с подавленным иммунитетом) по сравнению с животными контрольных групп. При этом его терапевтический эффект был

сопоставим с таковым у фенибута при активированном иммунитете и церебролизином при подавленном иммунитете (табл.80).

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), который в основном синтезируется нейронами, присутствует в больших количествах в структурах головного мозга, где он играет решающую роль в его пластичности [Pikula A., 2013].

Как видно из данных представленных в табл.81 через 3 дня после моделирования НМК происходит повышение сывороточного уровня BDNF у контрольных животных с интактной и активированной иммунной системой по отношению к ЛО крысам. На 7-ые сутки после операции было отмечено резкое снижение данного фактора в крови у животных всех исследуемых групп, однако при сравнении показателей ЛО крыс с ишемизированными животными у последних уровень BDNF был выше в среднем 2,7-5 раза.

Таблица 81

Содержание нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в сыворотке крови через 3 и 7 дней после моделирования НМК ишемического генеза у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой.

Состояние иммунной системы	Группа животных	BDNF, пк/мл	
		3 дня	7 дней
Интактная иммунная система	ЛО	615,3±165\$	102,3±31
	Ишемия	1254,7±135#	511,2±106#
	РГПУ-135	1124,8±156	282,7±84\$*
	Фенибут	970,8±156	313,2±64\$*
	Церебролизин	853,4±145*	234±32\$*
Подавленная иммунная система	ЛО	826,9±166	248,5±38\$+
	Ишемия	1078,6±156	943,2±41+ #
	РГПУ-135	964,8±201	523,4±45*+\$
	Фенибут	913,7±99	544,2±79*+\$
	Церебролизин	945,9±119	374,2±66*\$
Активированная иммунная система	ЛО	556,2±167^	219±19+\$
	Ишемия	1106,8±129#	597,4±97#^\$
	РГПУ-135	505,2±107*+^	386,7±66*
	Фенибут	907,8±90	390,3±68*+\$
	Церебролизин	1082,4±238	403,7±28+\$

Примечание:

подавленная иммунная система – введение Циклоспорина; активированная иммунная система – введение Липополисахарида; ЛО – ложнооперированная группа животных, # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой с НМК, получавший физиологический раствор; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных; ! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой, получавшей фенибут.

Исследуемое соединение РГПУ-135 у животных с активированным иммунитетом оказывало протективное действие уже через 3 дня, снижая концентрацию BDNF. Через 7 дней наблюдения у животных, получавших РГПУ-135, данный показатель снижался у всех животных (с интактным, активированным, подавленным иммунитетом).

Препараты сравнения фенибут более значимо снижал концентрацию BDNF у животных с активированным и интактным иммунитетом, а церебролизин у животных с подавленным и интактным иммунитетом.

7.4 Заключение.

Проведенное исследование позволило установить, что выраженность церебропротекторного действия соединения РГПУ-135, фенибута и церебролизина в значительной мере зависела от состояния иммунной системы. Основываясь на данных об общей выживаемости животных, выраженности неврологического дефицита, состояния мозгового кровотока, степени отека ткани головного мозга, концентрации в системном кровотоке маркеров повреждения дифференцированных нейронов (NSE), глиальных структур (MBP) и BDNF, установлено, что терапия ишемии головного мозга РГПУ-135 дала одинаково положительный результат при всех состояниях иммунной системы. Фенибут оказывал наибольший церебропротекторный эффект при НМК ишемического генеза на фоне активированной иммунной системы (следует отметить, что его терапевтическое действие было соизмеримо с применением РГПУ-135) и хуже проявлял лечебные свойства при иммуносупрессии. Церебропротективные свойства препарата церебролизин при НМК в большей степени проявились в условиях иммуносупрессии и на фоне интактного иммунитета, но при активации иммунитета его эффективность оказалась существенно ниже.

ГЛАВА 8. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.

8.1 Эндотелиопротекторное действие исследуемых веществ.

В настоящее время эндотелий рассматривается как высокоспециализированная, метаболически активная система, продуцирующая значительное число биологически активных веществ, являющихся конечным звеном нейрогенной и гуморальной регуляции, сосудистого тонуса, его антитромботической, противовоспалительной и антипролиферативной функции [Тюренков И.Н., 2012].

8.1.1 Влияние исследуемых соединений на антитромботическую функцию эндотелия.

Исследование антитромботической функции эндотелия включало в себя: изучение скорости образования тромба (артериальный тромбоз), оценку агрегации тромбоцитов, показателей коагуляционного гемостаза (тромбинового, протромбинового, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), содержание фибриногена), определение фактора Виллебранда.

8.1.1.1 Влияние соединений на скорость образования тромба, вызванного аппликацией хлорида железа (III) на адвентицию сонных артерий животных на фоне СД и НППГ.

В группе интактных и ЛО животных (позитивный контроль) образование тромба происходило в среднем на $19,66 \pm 0,61$ минуте. В группе крыс с экспериментальной патологией (СД, НППГ) – негативного контроля, образование тромба происходило значительно быстрее (в среднем в 1,9 раза), чем в соответствующей группе животных позитивного контроля (рис.68).

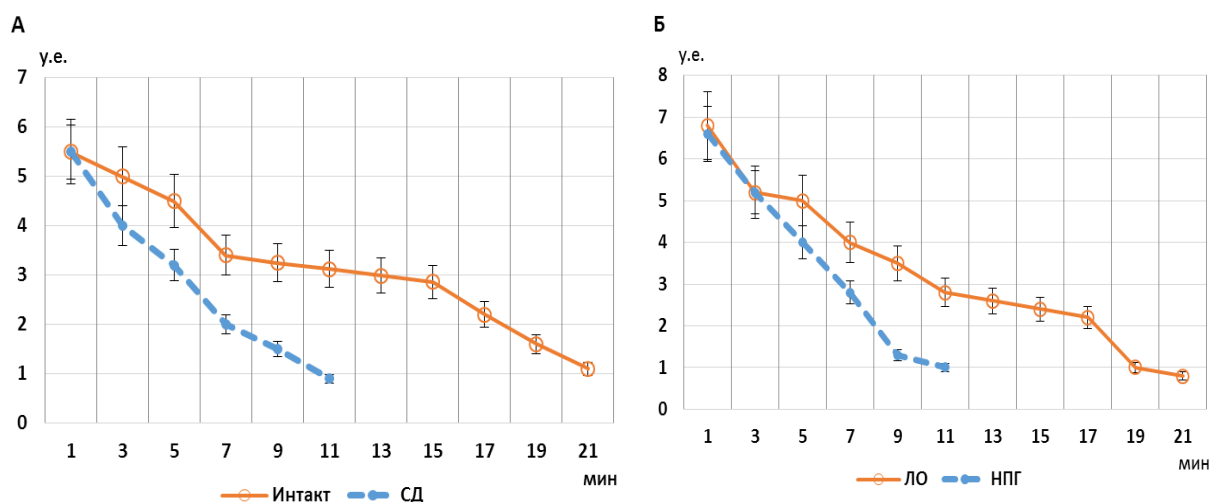


Рис. 68. Скорость образования тромба у интактных, ЛО животных и животных с СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

Интакт – интактная группа животных; ЛО – ложнооперированная группа по НПГ; СД, НПГ – группы животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов без лечения

У животных, получавших при ФИМ на фоне СД, НПГ в качестве лечения исследуемые соединения, увеличивалось время до прекращения кровотока (рис.69). Так, соединение РГПУ-135 замедляло процессы тромбообразования в 1,4 раза при СД, в 1,6 раза при НПГ, соединение РГПУ-189 – в 2 раза при СД и НПГ, соединение РГПУ-195 – в 1,8 раза при СД, 1,6 раза при НПГ, соединение РГПУ-260 – в 1,9 раза при СД, 1,7 раза при НПГ по сравнению с соответствующей группой животных с патологией, не получавших лечение. Полученные результаты об антитромботических свойствах производных ГАМК и глутаминовой кислоты согласуются с результатами других авторов [Перфилова В.Н., 2009, Робертус А.И., 2009; Воронков А.В., 2011; Резникова Л. Б., 2013].

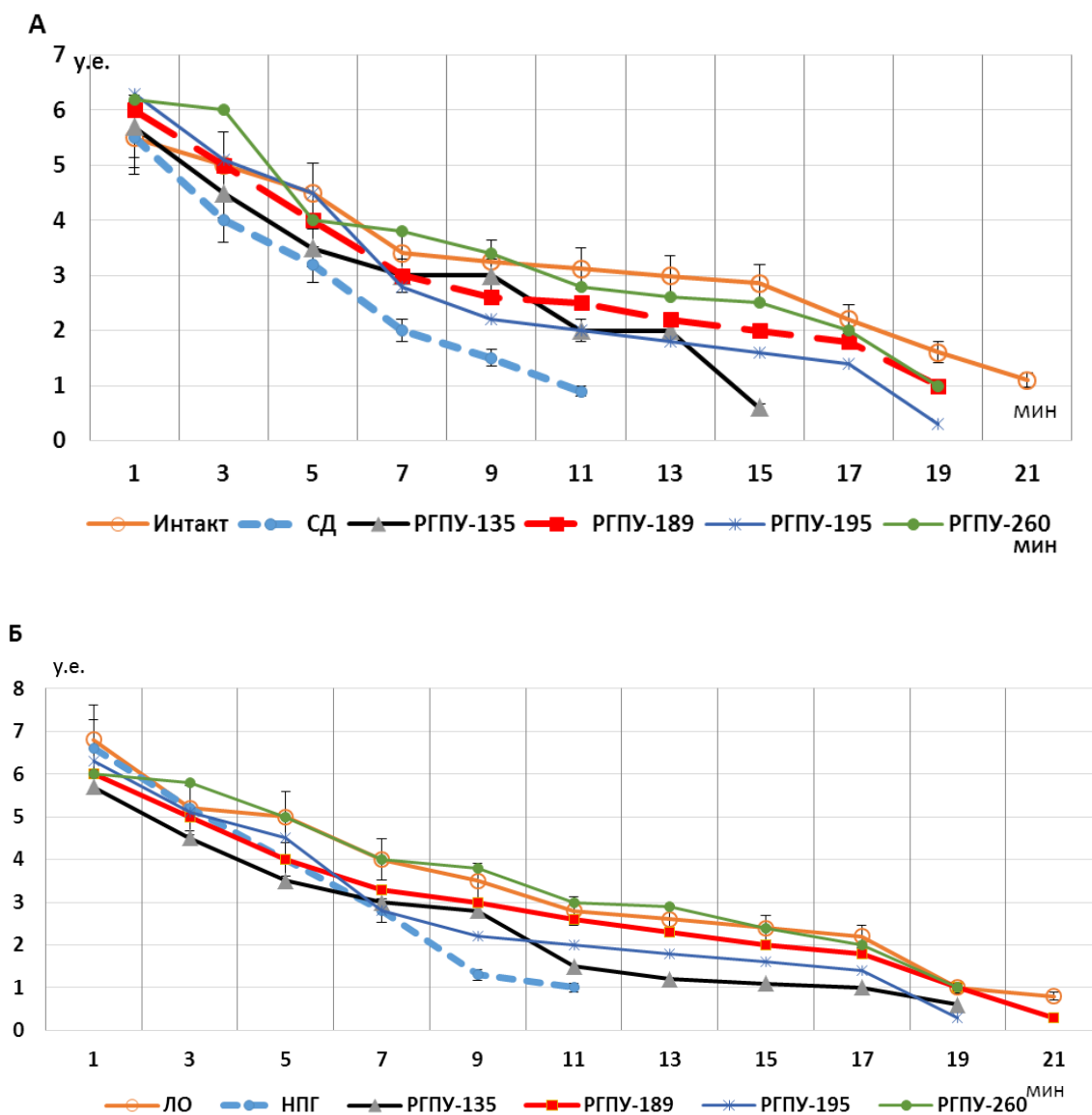


Рис. 69. Влияние исследуемых соединений на скорость образования тромба у животных с СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

Интакт – интактная группа животных; ЛО – ложнооперированная группа по НПГ; СД, НПГ – группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов без лечения

Таким образом, можно сделать заключение, что все изучаемые соединения обладают противотромбической активностью на модели артериального тромбоза, однако в большей мере это проявляется у соединения РГПУ-189, РГПУ-260 (при СД и НПГ) и соединения РГПУ-195 (при СД).

8.1.1.2 Влияние исследуемых соединений на основные параметры гемостаза животных с ЭД.

Развитие ЭД сопровождается изменением в системе гемостаза, сдвигом потенциала на тромбогенный, прокоагулянтный. В системе гемостаза принимают участие факторы свертывающей, противосвертывающей (антикоагулянтной) и фибринолитической систем крови. Изменение функционального состояния одной из систем сопровождается компенсаторными сдвигами в деятельности другой [Грицай Н.Н., 2006].

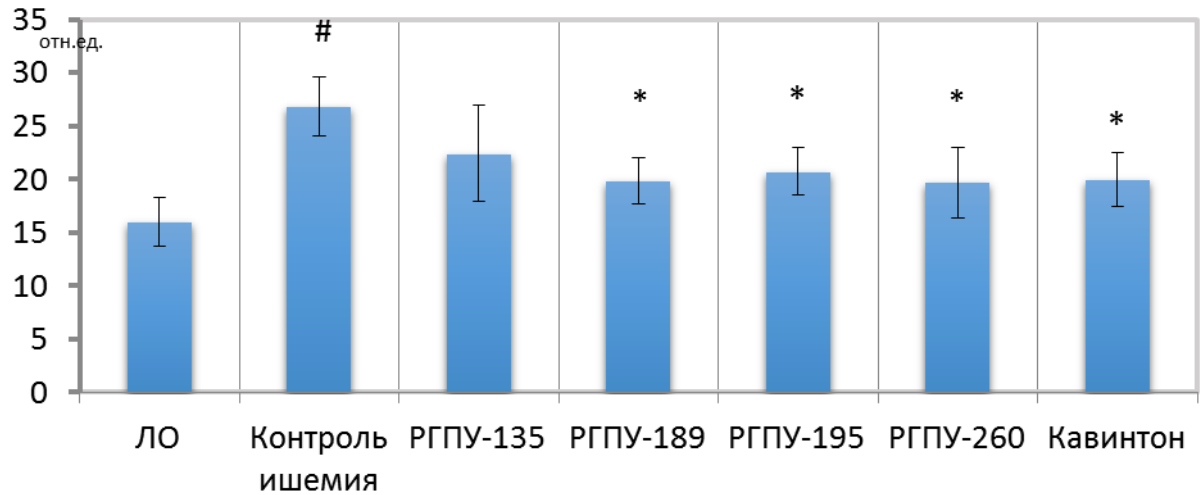
На данном этапе было изучено влияние соединений на показатели как клеточного (сосудисто-тромбоцитарного – АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов), так и плазменного (коагуляционного) гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время, тромбиновое время, концентрацию фибриногена в плазме, Фактор Виллебранда).

В качестве экспериментальных патологий, сопровождающихся развитием ЭД, были выбраны СД, НПГ.

Экспериментально вызванная ишемия головного мозга на фоне СД, НПГ приводила к повышению агрегации тромбоцитов, что проявляется в статистически значимом увеличении степени агрегации тромбоцитов на 61%, 68% (рис.70), соответственно ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждают усиление агрегационной активности тромбоцитов, увеличения скорости тромбообразования и снижение тромборезистентности сосудистой стенки у животных с различной патологией, сопровождающейся развитием ЭД.

Применение исследуемых соединений снижало степень агрегации тромбоцитов при НПГ в среднем на 36% (РГПУ-135), 26% (РГПУ-195), 28% (РГПУ-189), 25% (РГПУ-260) и при СД на 17% (РГПУ-135), 23% (РГПУ-195), 26% (РГПУ-189), 27% (РГПУ-260) (рис.70). При этом соединение РГПУ-135 было более эффективно при НПГ, РГПУ-189 при СД и НПГ.

А



Б

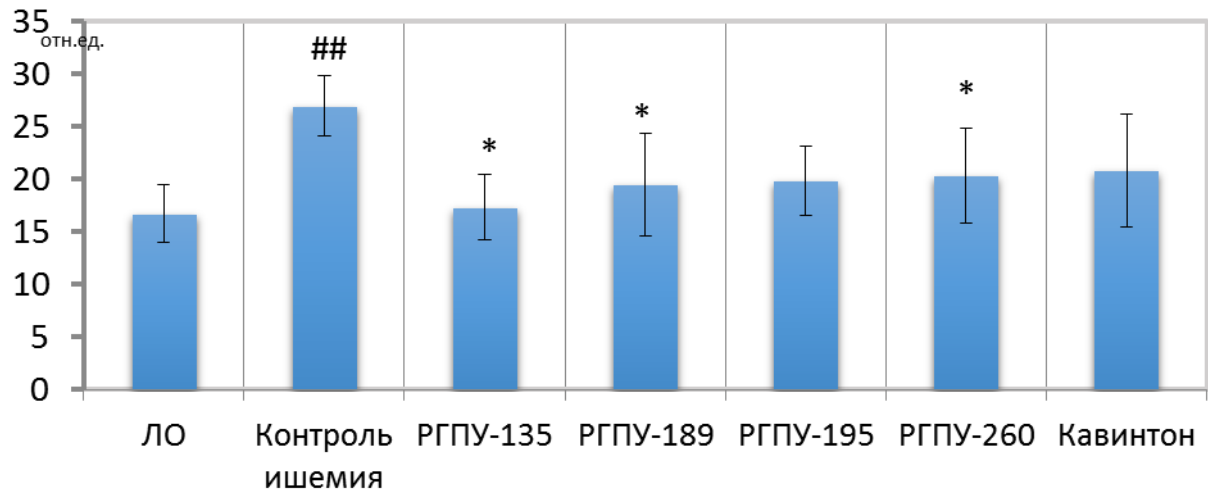


Рис. 70. Влияние исследуемых соединений на степень агрегации тромбоцитов у животных, перенесших ФИМ на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа; Контроль-ишемия– группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов, которым моделировали фокальную ишемию мозга; # - достоверно по отношению к группе ЛО животных (позитивного контроля) ($p < 0,05$); * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p < 0,05$).

В плазменном (коагуляционном) механизме свертывания крови, итогом которого является образование фибрина, основная роль принадлежит протеинам, именуемым плазменными факторами – это фибриноген, протромбин, тромбопластин, Фактор Виллебранда и др.

Показателем, характеризующим первую фазу, является активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – время образования сгустка в цитратной бестромбоцитной плазме после добавления суспензии синтетических фосфолипидов с микрокристаллическим кремнием и CaCl_2 .

По результатам проведенного исследования в группе животных, которым моделировали ФИМ на фоне СД и НПГ, наблюдалось достоверное снижение АЧТВ на 43,5% и 38,5% соответственно по отношению к группе интактных и ЛО животных, что свидетельствует о нарушениях в системе внутреннего каскада свертывания плазмы (рис.71 *Рис. 71*).

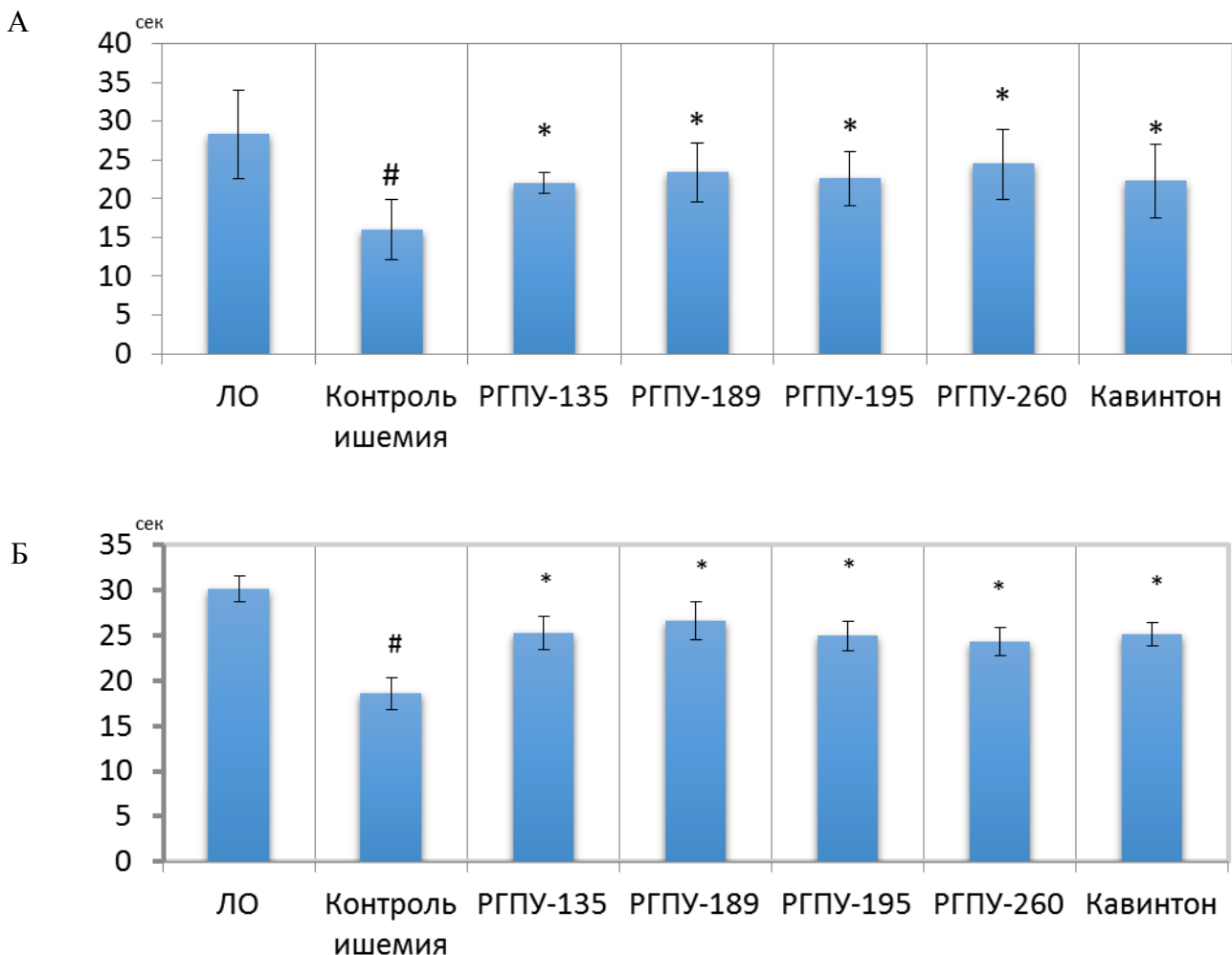


Рис. 71. Влияние исследуемых соединений на АЧТВ у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа; Контроль-ишемия– группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов, которым моделировали фокальную ишемию мозга; # - достоверно по отношению к группе ЛО животных (позитивного контроля) ($p < 0,05$); * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p < 0,05$).

Под влиянием исследуемых соединений у крыс, перенесших ФИМ на фоне СД и НПГ наблюдалось удлинение АЧТВ соответственно на 37% и 36,2% (РГПУ-135), на 40,9% и 34,5% (РГПУ-195), 46,1% и 43,6% (РГПУ-189), 52,9% и 31,3% РГПУ-260 по отношению к группе животных, не получавших лечения (рис.71). Таким образом, наиболее выраженное действие на данный показатель наблюдалось у РГПУ-189 и РГПУ-260, сопоставимое с таковым у препарата сравнения – кавинтона.

Вторая фаза плазменного гемостаза – тромбинообразование. Показателем, характеризующим ее, является протромбиновое время (ПВ), определяемое как время свертывания цитратной бестромбоцитной плазмы после добавления к ней тромбопластина с ионами кальция.

У группы животных с экспериментальной патологией по сравнению с группами животных без нее отмечалось уменьшение антикоагуляционного потенциала, о чем свидетельствовало достоверное снижение протромбинового времени на 39-45% (рис.72).

Исследуемые соединения повышали значения ПВ в среднем на 37-38% (РГПУ-135), на 36-48% (РГПУ-195), на 37-56% (РГПУ-189) на 44-72% (РГПУ-260)-по отношению к группе животных с НПГ или СД без лечения (рис.72).

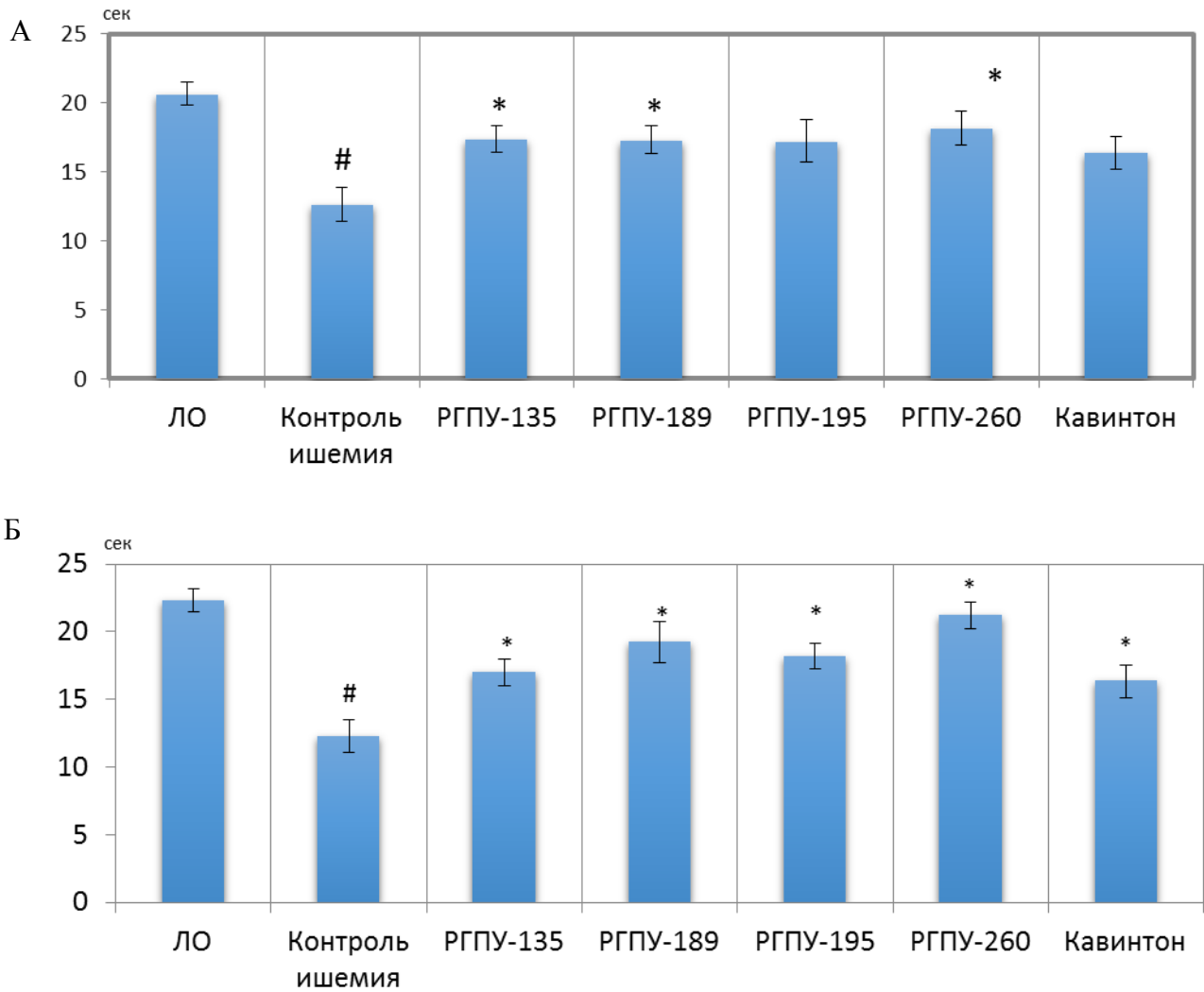


Рис. 72. Влияние исследуемых соединений на протромбиновое время у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа; Контроль-ишемия– группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов, которым моделировали фокальную ишемию мозга; # - достоверно по отношению к группе ЛО животных (позитивного контроля) ($p < 0,05$); * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p < 0,05$).

Третья фаза – фибринообразование. Показателями, характеризующими данную фазу, являются тромбиновое время (ТВ) и концентрация фибриногена в плазме.

На фоне развития эндотелиальной дисфункции как при СД, так и при НПГ наблюдалось достоверное укорочение ТВ и повышение концентрации фибриногена у группы животных с СД+ОСМА и НПГ+ОСМА без фармакологической поддержки на 22%, 18% и 19%, 17%, по сравнению с

соответствующими группами животных без патологии, что также свидетельствует об усилении прокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза.

Под влиянием исследуемых соединений происходит удлинение ТВ и снижение концентрации фибриногена, в большей степени у соединения РГПУ-189.

Важным маркером, отражающим функциональное состояние эндотелиальных клеток, является фактор Виллебранда (ФВ), представляющий собой сложный мультимерный адгезивный гликопротеин. При физиологических условиях эндотелий сосудов продуцирует большое количество биологически активных факторов, которые непрерывно связаны с гемостазом, фибринолизом, нарушением сосудистого тонуса и проницаемостью сосудов, синтезом факторов роста и т. п. Одним из таких веществ является ФВ. Он принадлежит к семейству адгезивных белков и представляет собой гетерогенную популяцию гликопротеиновых мультимеров, которые регулируют адгезию тромбоцитов к поврежденным тканям сосудов и агрегацию тромбоцитов при высоком напряжении сдвига. Наряду с этим ФВ действует как белок-носитель, защищающий фактор VIII от протеолиза *in vivo*. ФВ синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах [Зубаиров Д. М., 2000]. Повышенное содержание фактора Виллебранда отмечается при состояниях, сопровождающихся повреждением сосудистой стенки [Шмелева В. М., 2003], и поэтому является достаточно специфичным маркером нарушения ее целостности [Шмелева В. М. и др., 2009]. Связь повышения концентрации ФВ в крови со степенью повреждения сосудистого эндотелия была доказана в ряде экспериментов у крыс при эндотоксинемии и механическом повреждении эндотелия [Reldy M.A., 1989], у кроликов при нарушении целостности эндотелия сонной артерии [Kockx M.M., 1993]. В настоящее время ФВ является общепризнанным маркером эндотелиальной дисфункции.

При изучении данного параметра были получены следующие результаты: в группе животных с СД+ОСМА и НПГ+ОСМА без фармакологической коррекции наблюдалось значительное достоверное повышение уровня фактора Виллебранда в крови на 65,7% и 57,1% ($p<0,05$) по сравнению с животными без патологии (рис.73), что подтверждает наличие нарушений в коагуляционном гемостазе, повышении процессов адгезии и тромбообразования при развитии эндотелиальной дисфункции.

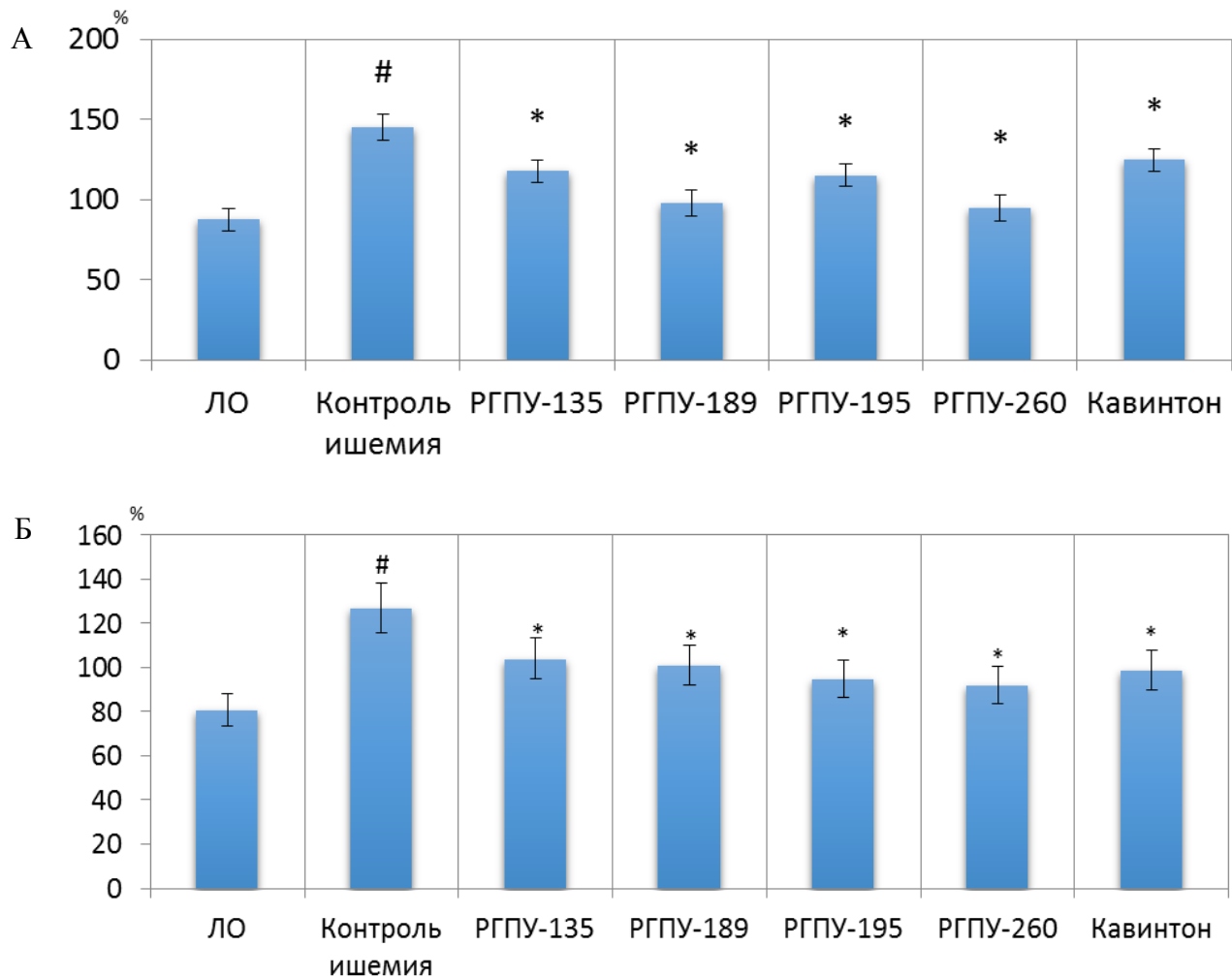


Рис. 73. Влияние исследуемых соединений на концентрацию Фактора фон Виллебранда у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа; Контроль-ишемия– группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов, которым моделировали фокальную ишемию мозга; # - достоверно по отношению к группе ЛО животных (позитивного контроля) ($p<0,05$); * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p<0,05$).

В результате применения изучаемых соединений у животных с СД+ФИМ и НПГ+ФИМ отмечалось снижение концентрации ФВ по отношению к аналогичным группам, не получавших лечения, при этом у животных с СД наиболее значимо под влиянием РГПУ-189 и РГПУ-260, с НПГ – РГПУ-195, РГПУ-260.

Таким образом, все исследуемые соединения оказывали антитромботическое действие при фокльной ишемии у животных с СД и НПГ, однако в большей степени оно было выражено у соединения РГПУ-260.

8.1.2 Влияние исследуемых соединений на противовоспалительную функцию эндотелия.

Воспаление является одним из ключевых патофизиологических моментов церебральной ишемии, а также геморрагического инсульта, черепно-мозговой травмы и других видов церебральной патологии [Elkind M. S., Cole J. W., 2006]. Возрастает количество данных о том, что вялотекущий воспалительный процесс, идентифицируемый, в частности, по повышению уровня С-реактивного белка (СРБ) и фибриногена, является дополнительным фактором риска развития инсульта или транзиторной ишемической атаки. Воспалительные механизмы играют важную роль в патогенезе инсульта даже в отсутствие атеросклеротической патологии [Борисов А. В., 2006].

СРБ – высокочувствительный показатель воспаления, его молекулярная масса составляет 118 кДа, образуется в гепатоцитах печени при воздействии ИЛ-6, ИЛ-1, ФНО- α , интерферона- γ , трансформирующего фактора роста- β . В условиях воспаления синтез СРБ постепенно увеличивается и уже через 12-48 ч от начала воспаления его уровень может быть повышен [Охтова Ф.Р., 2014]. Появившись в крови, СРБ циркулирует неопределенно долго. Предполагается, что СРБ активизирует процессы воспаления [Fernandez-Real J. M., 2001] и увеличивает продукцию потенциального вазоконстриктора эндотелина-1, что приводит к усилению экспрессии хемоаттрактанта-1 моноцитов и SICAM-1 [Sirén A. L., 1992],

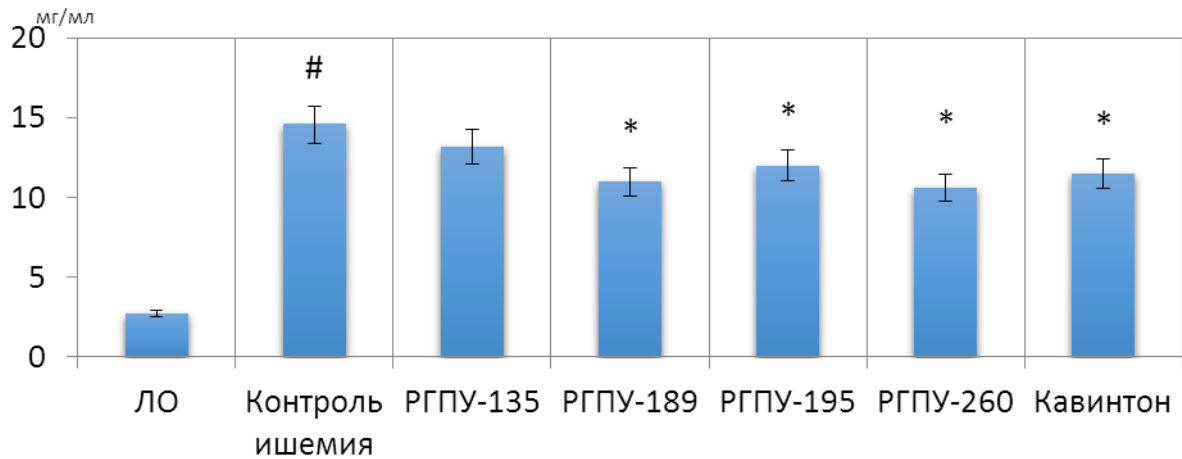
дисфункции эндотелия, вазоконстрикции. СРБ также активизирует процессы перекисного окисления липидов, участвует в развитии оксидативного стресса и оказывает негативное влияние на функцию эндотелия [Pasceri V., 2000; Kofler S., 2005; Cottone S., 2006]. Важную роль в процессе воспаления играют модифицированные формы СРБ, способные вызывать агрегацию тромбоцитов и активацию секреции ими серотонина, модификацию метаболитов арахидоновой эссенциальной полиеновой жирной кислоты, активацию нейтрофилов в стенке респираторного тракта [Милютин О. В., Чичерина Е. Н., 2011].

В настоящее время изучается значение СРБ не только как лабораторного маркера, но и как важного медиатора, модулирующего развитие воспаления [Борисов А. В., 2006].

В связи с этим представилось целесообразным изучить влияния РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 и препаратов сравнения кавинтона на данный показатель у животных с фокальной ишемией при экспериментальном сахарном диабете (СД) и экспериментально-вызванной недостаточности половых гормонов (НПГ).

Как можно видеть из данных, представленных на рис.74, у животных с ОСМА на фоне СД и НПГ наблюдается значительное достоверное повышение уровня СРБ в 5,3 раза ($p < 0,05$) при СД и 3,7 раза ($p < 0,05$) при НПГ по сравнению с группами интактных и ЛО животных, что свидетельствует о выраженном воспалительном процессе при сахарном диабете и, в меньшей степени, при НПГ. Соединения РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195, РГПУ-135 в тех же условиях эксперимента при СД и НПГ снижали уровень острофазного белка.

А



Б

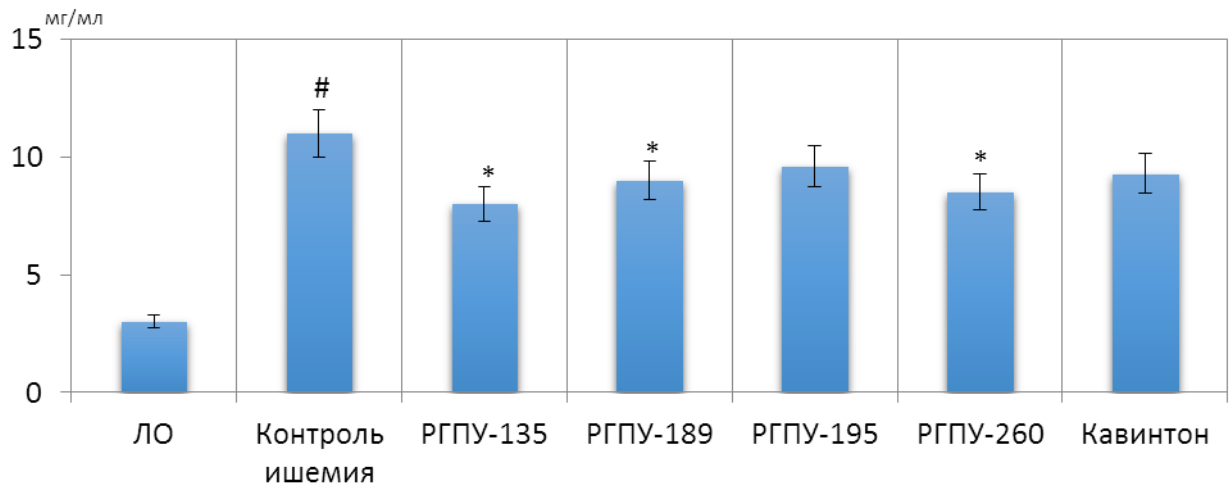


Рис. 74. Влияние исследуемых соединений на уровень СРБ у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения:

ЛО – ложнооперированная группа; Контроль-ишемия– группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, недостаточностью половых гормонов, которым моделировали фокальную ишемию мозга; # - достоверно по отношению к группе ЛО животных (позитивного контроля) ($p < 0,05$); * - достоверно по отношению к группе животных с патологией, не получавших «лечение» (негативного контроля) ($p < 0,05$).

Таким образом, под влиянием изучаемых веществ происходило снижение уровня провоспалительного маркера в крови, в большей степени под влиянием РГПУ-260.

8.1.3 Влияние исследуемых соединений на количество десквамированных эндотелиоцитов.

Одним из высокоспецифичных маркеров повреждения эндотелия является повышение в крови количества циркулирующих эндотелиоцитов, по изменению которого можно судить о степени повреждения или восстановления эндотелия [Петрищев Н. Н., 2001; Нечунаева Е. В., 2010; Гелетка А. А., 2015; Воробьева Е.Н., 2016]. Такого рода исследованиям посвящено много работ, в которых доказано, что повышение десквамации эндотелиоцитов происходит у больных сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца, инфарктом миокарда, атеросклерозом, хронической сердечной недостаточностью, гестозом беременных, недостаточностью половых гормонов и т.д. [Петрищев Н.Н., 2001; Burger D., Touyz R. M., 2012; Damani S., 2012; Woywodt A., 2012; Гелетка А. А., 2015; Турунцева О. Н., 2015; Sugimoto T., 2015].

В группах интактных и ложнооперированных животных количество циркулирующих эндотелиоцитов в крови находилось в пределах физиологической нормы, у животных, перенесших фокальную ишемию головного мозга на фоне СД и НПГ, отмечалось достоверное повышение количества циркулирующих эндотелиоцитов соответственно в 2,6 раза и в 2,3 раза ($p < 0,05$), что позволяет говорить об усилении десквамации эндотелиоцитов у животных данных групп.

У животных, перенесших ФИМ на фоне ЭСД и НПГ и получавших соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтон, количество циркулирующих эндотелиоцитов в плазме крови было значительно меньше, причем в большей степени – у животных при введении РГПУ-260 (рис.75).

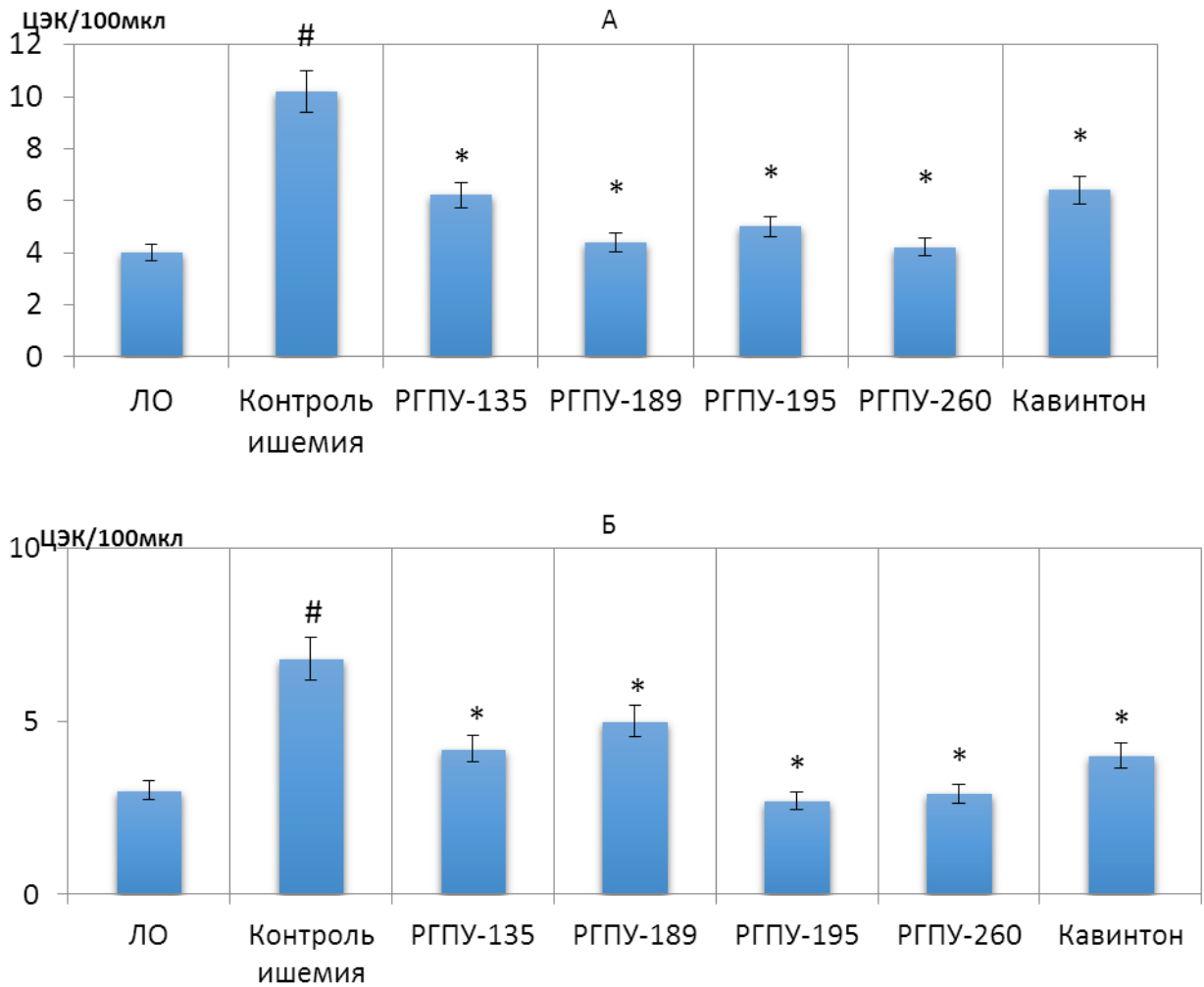


Рис. 75. Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтона на количество циркулирующих эндотелиоцитов у животных с ОСМА на фоне экспериментального сахарного диабета и недостаточности половых гормонов

Обозначения:

ЦЭ - циркулирующие эндотелиоциты; # - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе контроль-интакт и контроль-ЛО животных; * - $p < 0,05$; различия статистически значимы по отношению к группе животных с недостаточностью половых гормонов и сахарному диабету

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтон оказывают эндотелиопротективное действие у животных, перенесших ФИМ на фоне СД и НПП, более чем вдвое уменьшая десквамацию эндотелиоцитов.

8.1.4 Влияние РГПУ-260 на продукцию NO эндотелиальными клетками и фосфорилирование эндотелиальной NO-синтазы^{†††}

Далее на примере соединений РГПУ-260 было изучено влияние на продукцию NO эндотелиальными клетками и фосфорилирование эндотелиальной NO-синтазы

Корреляция продукции NO эндотелиальными клетками и фосфорилирования eNOS

Согласование протоколов анализа продукции NO и анализа содержания фосфорилированной eNOS в лизатах (клетки после первого пассажа) позволило для определенного количества проб оценить одновременно оба этих показателя для клеток из одной и той же лунки планшета. Результаты для этой серии экспериментов приведены на рис.76.

Анализ данных этой серии выявил высокую степень связи между содержанием ф-eNOS и приростом продукции NO при стимуляции клеток, как ацетилхолином, так и разрабатываемой субстанцией ($R^2=0,94$ для образцов, где лизаты готовили через 1 час после начала стимуляции).

Из общего ряда выпадают образцы, где лизаты готовили через 10 мин после начала стимуляции ацетилхолином, и результаты для стрессированных (свежевыделенных) клеток (рис.76). В первом случае - более высокая скорость реакции непосредственно после начала стимуляции вполне ожидаема. А вот снижение соотношения между продукцией NO и площадью пика ф-eNOS позволяет предположить, что выявленная зависимость имеет ограниченный «динамический диапазон», то есть, прирост продукции NO характерен только до определенной доли формы ф-eNOS в культуре. Судя по

^{†††} Исследование выполнено совместно с сотрудниками кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой, д.м.н., проф. Островскому О.В., д.б.н., проф. Дудченко Г.П., к.х.н., доц. Веровскому В.Е., к.ф.н., ст.преп. Зыковой Е.В..

соотношению площадей пиков для стрессированных клеток и клеток, стимулированных ацетилхолином, – эта доля составляет примерно 30-40%.

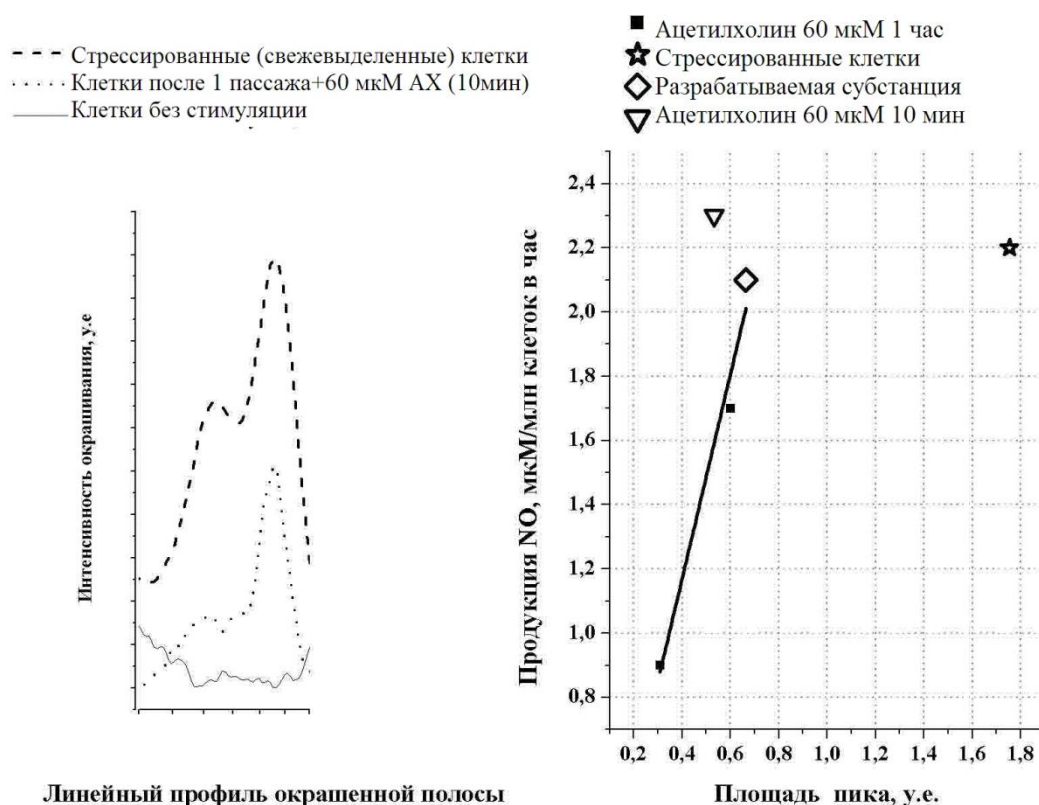


Рис. 76. Зависимость продукции NO от содержания в клетках HUVEC. Содержание p-eNOS считали пропорциональным площади пика в области 140 кДа на денситограммах нитроцеллюлозных мембран после вестерн-блота.

С учетом этого факта, использованные концентрации ацетилхолина и разрабатываемой субстанции могут выглядеть как «гиперстимуляция» и в дальнейших исследованиях следует использовать более низкие концентрации.

Снижение количества eNOS фосфорилированной по Thr495 в стимулированных ацетилхолином и разрабатываемой субстанцией клетках было менее выраженным, и плохо коррелировало с продукцией NO.

Влияние разрабатываемой субстанции на продукцию NO и содержание eNOS(pS1177) в эндотелиальных клетках

Результаты исследования активности разрабатываемой субстанции приведены в табл.82 и табл.83.

Таблица 82

Влияние РГПУ-260 в концентрации 60 мкМ на продукцию NO эндотелиальными клетками ($M \pm \sigma$)

Стимулятор	ΔNO , мкМ/млн*час
Ацетилхолин	1,63 \pm 0,7
РГПУ-260	2,30 \pm 0,42

Примечание:

*- Результат вычитался из результатов для стимулированных клеток

Величины продукции NO, полученные при стимуляции клеток ацетилхолином, близки к данным литературы [Amanda J., 2008].

Таблица 83

Влияние РГПУ-260 в концентрации 60 мкМ на содержание eNOS(pS1177) в эндотелиальных клетках ($M \pm \sigma$)

Стимулятор	Площадь пика 140кДа, у.е.
Без стимуляции	0,138 \pm 0,043
Ацетилхолин	0,536 \pm 0,156
РГПУ-260	0,697 \pm 0,171

При стимуляции клеток разрабатываемой субстанцией наблюдали как выраженный прирост продукции NO, сопоставимый с эффектом ацетилхолина, так и появление полос в области 140 кДа при проведении иммуноблотинга с использованием первичных антител к eNOS, фосфорилированных по Ser1177.

Можно заключить, что разрабатываемая субстанция несколько превосходит ацетилхолин по стимулирующему действию на высвобождение NO эндотелиальными клетками. Указанный эффект объясняется увеличением содержания eNOS(pS1177).

8.2 Биохимические аспекты механизма действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.

В развитии церебральной ишемии значительная роль отводится процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ). Липиды входят в состав всех клеточных мембран, обеспечивают постоянство внутренней среды

клетки, её заряда, передачу сигналов и другие процессы. При активации ПОЛ, т.е. при смещении про- и антиоксидантного равновесия, в первую очередь происходит повреждение мембран клеток, что нарушает их структуру и нормальное функционирование, вплоть до её гибели. Учитывая ранее полученные нами результаты о церебро- и эндотелиопротекторном действии соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях церебральной ишемии, а также роль свободно-радикального окисления в развитии нейродегенеративных процессов, было целесообразным изучить влияние исследуемых соединений на процессы ПОЛ и состояние АОС при фокальной ишемии на фоне моделируемых коморбидных состояний.

Установлено, что моделирование фокальной ишемии приводит к повышению концентрации продуктов ПОЛ (ТКА-активных продуктов) и снижает активность ферментов АОС (СОД) (рис.77, рис.78).

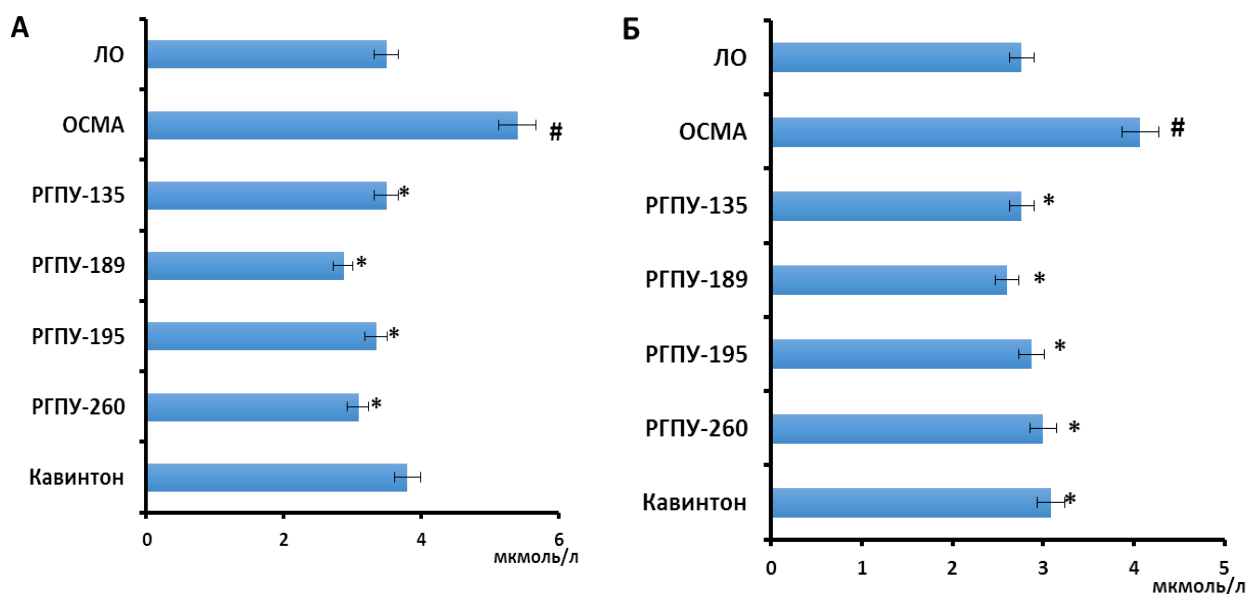


Рис. 77. Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтона на концентрацию ТБК-активных продуктов (мкмоль/л) у животных с экспериментальным СД (А) и НПГ (Б) после ОСМА.

Обозначения:

- $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе -ЛО животных; # - $p < 0,05$; различия статистически значимы по отношению к группе животных с недостаточностью половых гормонов и сахарному диабету после ОСМА.

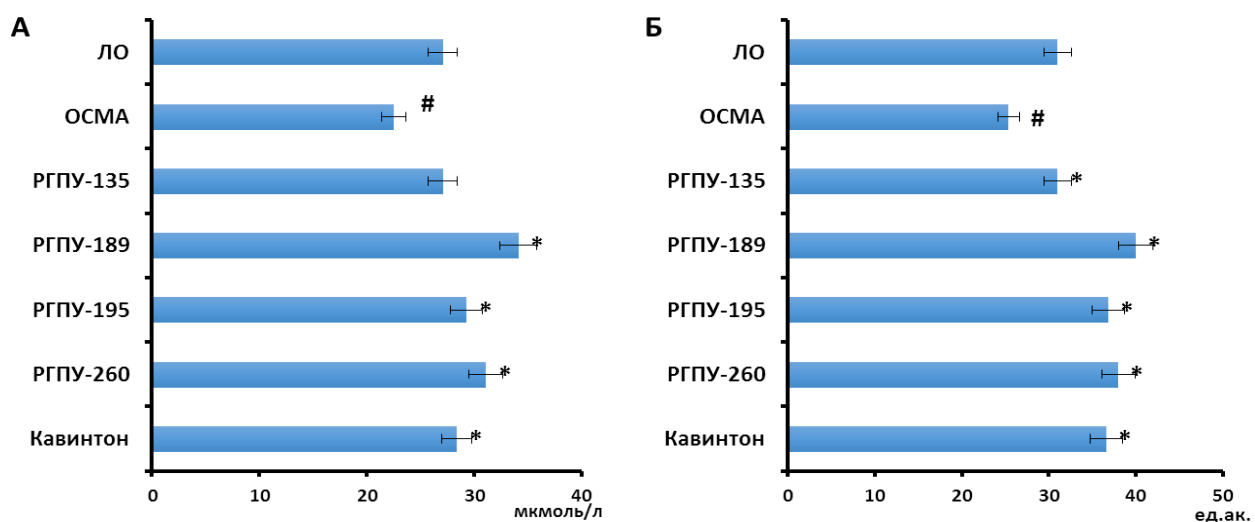


Рис. 78. Влияние РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтона на активность СОД у животных с экспериментальным СД(А) и НПГ(Б) после ОСМА
 Обозначения:
 # - $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе -ЛО животных; # - $p < 0,05$; различия статистически значимы по отношению к группе животных с недостаточностью половых гормонов и сахарному диабету после ОСМА.

В группах животных, получавших РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 и кавинтон, активность СОД была выше, а содержание ТБК-активных продуктов – ниже, чем в контрольных группах (рис.77, рис.78).

Ишемизированная ткань мозга испытывает энергодефицит, более того, в результате снижения аэробного окисления глюкозы в ней развивается лактат-ацидоз, что приводит к дальнейшему каскаду нарушений клеточного метаболизма. Вещества, увеличивающие потребление глюкозы мозгом, уменьшают повреждение ишемизированной нервной ткани [Дьякова И.А., 2012]. В связи с чем было изучено влияния соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и препарата сравнения кавинтона на метаболизм глюкозы в ткани мозга при фокальной ишемии.

Было установлено, что все исследуемые соединения (в большей или меньшей степени) достоверно увеличивают утилизацию глюкозы мозгом у животных с фокальной ишемией (рис. 79).

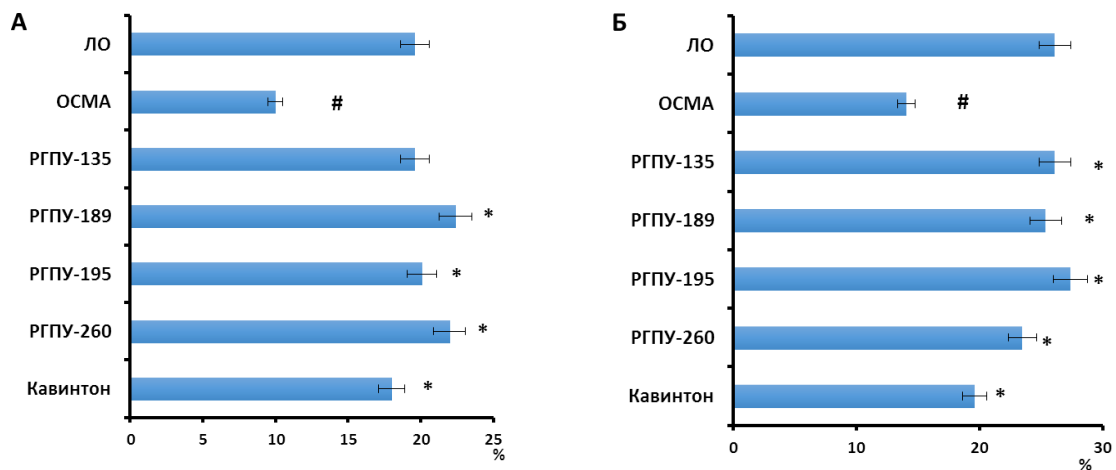


Рис. 79. Влияние исследуемых соединений на потребление глюкозы мозгом у животных с СД(А), НПГ(Б) после ОСМА.

Обозначения:

- $p < 0,05$ - различия статистически значимы по отношению к группе -ЛО животных; # - $p < 0,05$; различия статистически значимы по отношению к группе животных с недостаточностью половых гормонов и сахарному диабету после ОСМА.

Таким образом, курсовое введение исследуемых соединений защищает ишемизированную ткань мозга от перекисного окисления липидов, снижая содержание ТБА-активных продуктов и повышая активность СОД, увеличивает потребление глюкозы мозгом.

8.3 Заключение

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 оказывают церебро- и эндотелиопротекторный эффекты как на животных с отягощенным преморбидным фоном, так и без него, уменьшая выраженность неврологических нарушений, улучшая сосудорасширяющую реакцию на ацетилхолин, снижая выраженность отека мозговой ткани. На данном этапе были изучены возможные механизмы их протекторного действия при НМК.

Установлено, что соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 способны влиять на антитромботическую, противовоспалительную функции эндотелия, снижать количество ЦЭК, повышать продукцию NO эндотелиальными клетками (in vitro). Помимо этого, указанные соединения снижают содержание продуктов ПОЛ и повышают активность СОД, снижают объем инфаркта.

ОБСУЖДЕНИЕ

НМК являются одной из ведущих причин заболеваемости, смертности и инвалидизации населения во всем мире. Актуальной проблемой и приоритетным направлением современной ангионеврологии и фармакологии являются поиск и разработка новых эффективных средств терапии данной категории больных.

В этом отношении, казалось бы, весьма интересными представляются нейропротекторные препараты, которые могли бы препятствовать, прерывать или замедлять последовательность повреждающих биохимических или молекулярных процессов, приводящих к необратимому ишемическому повреждению [Дьяконов М. М., 2015]. Но несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время не создано ни одного лекарственного средства с доказанной эффективностью в отношении нейропротекции при ишемии мозга [Рекомендации ESO, 2008]. В качестве нейропротекторов предложено достаточно большое число препаратов с различными механизмами действия. Однако, эффективность этих препаратов, заявляемая на доклинических стадиях их разработки, не подтверждается в клинической практике [Мельникова Е. В., 2012; Захаров В. В., 2016;]. В настоящее время выделяют несколько причин сложившейся ситуации, одной из наиболее значимых по мнению ряда авторов [O'Collins V. E., 2006; Röther J., 2008; Minnerup J., 2016] является существующая методология поиска новых препаратов для лечения НМК. Дело в том, что исследование эффективности новых веществ на этапах доклиники происходит на интактных, молодых, линейных животных, на которых моделируется один из возможных типов НМК (фокальная или тотальная, острая или хроническая ишемия мозга). Однако, в реальных клинических условиях практически у всех пациентов, перенесших инсульт, до его развития имелся один или несколько факторов риска, например АГ, СД, пожилой возраст, стресс и другие патологии, связанные с поражением сосудов, которые в свою очередь влияют на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и развитие,

прогрессирование основного заболевания. Так например, результаты исследования Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) показали, что среди больных с СД увеличивается риск смерти от НМК в 2,8 раза по сравнению с пациентами, не имевшими данного заболевания. У данной категории больных намного чаще развивался фатальный ишемический инсульт (в 3,8 раза), а внутримозговое и субарахноидальное кровоизлияния в 1,5 и 1,1 раза чаще заканчивались смертельным исходом. По результатам этого же исследования было показано, что в целом наличие СД 2 типа приводило к увеличению относительного риска развития инсульта в 1,8-6 раз чаще, по сравнению с не имеющими этого заболевания [Hanson E., 2012; Tamita K., 2012; Koh K. K., 2013; Щепанкевич Л. А., 2014].

Другим фактором риска развития НМК являются недостаточность половых гормонов. Так например, частота васкулярных событий у женщин резко повышается в постменопаузе [Айтбаев К. А., 2014]. Это связано с тем, что происходящее во время менопаузы естественное прекращение выработки половых гормонов – эстрогенов, приводит к развитию дисфункции эндотелия и повышению активности тромбообразования. В результате проведенных клинических исследований было показано, что у женщин в постменопаузе развивается эндотелиальная дисфункция, проявляющаяся снижением уровня стабильных продуктов деградации NO и нарушением вазорегулирующей функции эндотелия в виде неадекватной или парадоксальной реакции плечевой артерии на напряжение сдвига при сохраненной эндотелийнезависимой вазодилатации в ответ на нитраты [Колбасова Е.А., 2012]. В совокупности это приводит к тому, что женщины в постменопаузе представляют группу повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [Балан В.Е., 1996]. Во многих клинических исследованиях продемонстрировано, что после наступления менопаузы на фоне прекращения продукции эстрогенов развиваются изменения сосудистой реактивности: снижается продукция простациклина, повышается уровень эндотелина и нарушаются механизмы эндотелийзависимого тонуса сосудов

[Корягина Н.А., 2012; Nintasen R., 2012]. В последние годы получены данные, касающиеся прямого и непрямого влияния эстрогенов на функцию и структуру сосудов. Открыты специфические эстрогеновые рецепторы в клетках сосудистой стенки и сердечной мышце [Корягина Н.А., 2012]. Установлено, что применение эстрогенов у женщин с нормальными показателями артериального давления в перименопаузе защищает их от возрастных изменений функции эндотелия, восстанавливает механизм эндотелийзависимой вазодилатации и увеличивает содержание оксида азота в сосудистой стенке. Также по данным ряда авторов, синдром гипоестрогенемии является фактором риска развития атеросклероза сосудов головного мозга и сердца, артериальной гипертензии, ожирения и инсулинорезистентности, что в совокупности еще больше повышает риск развития инсультов и летальных исходов [Кухарева И. Н., 2008].

Недостаточность половых гормонов чаще ассоциирована с возрастными изменениями в организме, которые в свою очередь также влияют на состояния сосудистой стенки, и связаны с развитием эндотелиальной дисфункции. Так у пожилых людей вероятность развития инсульта существенно возрастает и продолжает прогрессивно увеличиваться по мере старения. Если в возрасте 25-29 лет частота инсультов – 0,09 на 1000 человек, то в возрасте 70 лет и старше – 15,05 на 1000. При этом в последней возрастной группе преобладают женщины [Путилина М.В., 2011].

Перечисленные выше факторы риска тесно переплетаются между собой. Кроме того, все они сопряжены с эндотелиальной дисфункцией, которая многими специалистами в настоящее время рассматривается как самостоятельная мишень терапевтического воздействия с целью профилактики и лечения сосудистых осложнений и снижения риска развития различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе НМК [Тюренков И.Н., 2012; Madden J. A., 2012]. Необходимо также отметить, что на сегодняшний день «эндотелиопротекторы» как отдельный класс лекарственных препаратов не существует, а представлен средствами с

плейотропным эффектом которых является улучшение функционального состояния эндотелия. Однако поиск и создание эндотелиопротекторных препаратов для лечения и профилактики НМК является весьма перспективным, поскольку позволит мультитаргетно воздействовать на различные звенья этиопатогенеза ишемии головного мозга (Рис. 80), что в свою очередь снизит риск полипрагмазии в клинических условиях.

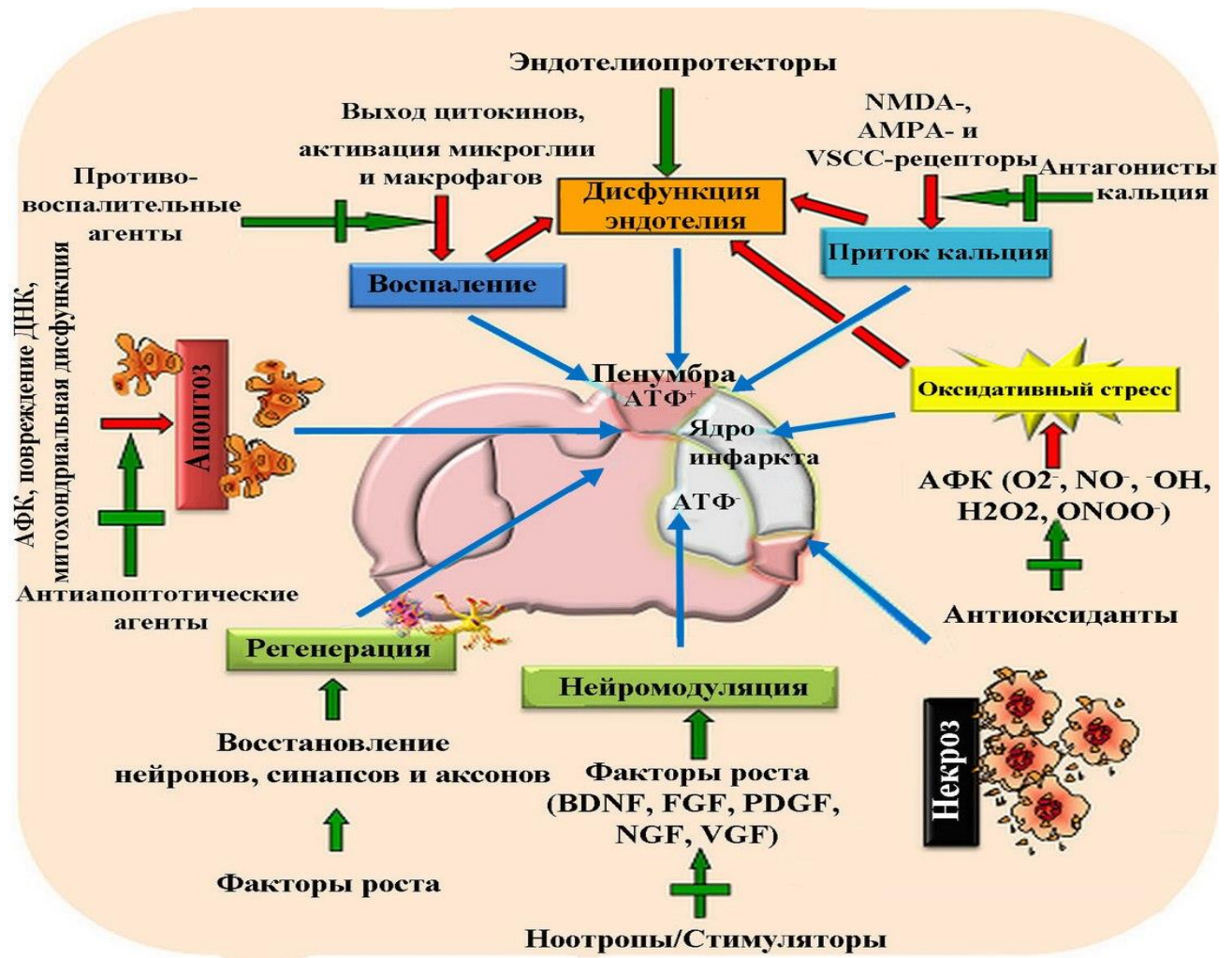


Рис. 80. Место эндотелиопротекторов в терапии ишемии головного мозга.

(адаптировано SureShL Mehta, raghuVeMuganti, 2014)

В связи с выше сказанным, целью данного исследования стала разработка новой методологии поиска средств фармакологической коррекции НМК и на этой основе проведено сравнительное изучение церебро- и эндотелиопротекторных свойств 4 рядов соединений (производные хиназолина, амидов бензойной кислоты, ГАМК и

глутаминовой кислоты) при нарушениях мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции.

Первоначально было изучено суммарное церебро- и эндотелиопротекторное действие 52 соединений при их профилактическом введении животным с окклюзией ОСА. Во всех исследуемых рядах были выделены соединения-лидеры, для каждого из которых проанализирована зависимость выраженности протекторного действия от дозы и определена наиболее эффективная. Далее соединения-лидеры всех химических рядов были сопоставлены между собой и препаратами сравнения, и по результатам данного блока исследований выбраны наиболее эффективные и перспективные для дальнейшего изучения вещества. Ими стали среди производных ГАМК – РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189 (композиции фенибута с органическими биологически активными кислотами), РГПУ-260 (композиция мефебута с L-аригинином), ГАМК – РГПУ-195 (пиридиловое производное ГАМК), среди производных глутаминовой кислоты – РГПУ-135 (фенильное производное глутаминовой кислоты) производных хиназолина – VMA10-17, VMA13-15; среди производных амидов бензойных кислот – С18, С40. Данные соединения оказывали церебро- и эндотелиопротекторное действие при ишемии мозга, моделируемой на животных безотягощенного преморбидного фона, повышая выживаемость крыс, уменьшая выраженность неврологических нарушений (поведенческого, когнитивного и мнестического дефицита), способствуя сохранению МК на более высоком уровне, улучшая функциональное состояние эндотелия. При этом оказываемое ими действие было сопоставимо с таковым у препаратов сравнения цитиколина и кавинтона, превосходя таковое у магния сульфата.

Однако, поскольку проведенный анализ литературных данных, результатов доклинических и клинических исследования показал, что имеющийся у пациентов с острыми или хроническими НМК преморбидный фон существенно влияет на эффективность проводимой терапии основного заболевания, а также неудачи в экстраполяции данных доклинических

исследований в клиническую практику, на следующем этапе был выполнен блок исследований по изучению церебро- и эндотелиопротекторного действия соединений-кандидатов при моделировании острых НМК в условиях отягощенного преморбидного фона (сахарного диабета, НПГ, возрастных изменений).

Несмотря на высокий риск развития НМК и их фатальных исходов у лиц с СД, НПГ, АГ и другими патологиями, влияющими на состояние сосудистой стенки, в доступной литературе весьма ограничены данные об особенностях течения острых НМК на фоне коморбидных состояний. В большинстве случаев рассматриваются только разносторонние синдромы коморбидности, а не их сочетание [Орлова А.С., 2014]. Однако по результатам ранее проведенных экспериментальных исследований [Литвинов А.А., 2015] было показано, что мозговой кровоток животных, перенесших фокальную ишемию на фоне НПГ, на 20% ниже по сравнению с крысами с нормальным гормональным фоном. При этом изменения мозгового кровотока менее выражены при введении модификаторов синтеза оксида азота у животных с ОСМА и НПГ, чем у самок только с ОСМА или с овариоэктомией, т.е. степень выраженности ЭД при сочетанной патологии возрастает.

Это может быть связано с влиянием эстрогенов на церебральный кровоток. В частности, уменьшение цереброваскулярного сопротивления коррелирует с увеличением уровня эстрогена в конце фолликулярной фазы менструального цикла у женщин [Карева Е. Н., 2012; Krause D. N., 2006]. С другой стороны, гипоестрогенный статус сопровождается спазмами сосудов, которые вносят свой вклад в ишемические атаки ЦНС [Krause D. N., 2006]. Кроме того, было доказано, что эстрадиол влияет как на эндотелиальные, так и на гладкомышечные клетки сосудов мозга. Принципиальное значение эстрогенной регуляции функции сосудов подчеркивается тем фактом, что мутация рецепторов эстрогена сопровождается эндотелиальной дисфункцией [Shearman A. M., 2005; Schipper H. M., 2015;]. Влияние эстрогенов на сосуды

мозга в целом складывается из действия на миоциты и изменения эндотелиальной функции (антиатерогенное действие, цитокинопродукция), что в конечном итоге приводит к вазодилатации и более активному ангиогенезу, снижению проницаемости гематоэнцефалического барьера, подавлению воспалительного ответа и пролиферации миоцитов [Miller V. M., 2008], тогда как недостаток половых гормонов приводит к обратным эффектам.

В проведенном нами исследовании было установлено, что у животных, перенесших фокальную ишемию на фоне гипоестрогемии, наблюдались более выраженные неврологические нарушения (сенсомоторный, когнитивный, поведенческий дефицит) на фоне недостаточности мозгового кровообращения (МК был в 4 раза ниже по сравнению с ЛО животными) и ЭД (о чем свидетельствовало ослабление сосудорасширяющей реакции на ацетилхолин, сосудосуживающей – на нитро-L-аргинин). Среди соединений-лидеров, проявивших церебропротективное действие на животных без отягощенного преморбидного фона (по результатам первого этапа исследований), в условиях гипоестрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции наиболее эффективными оказались только соединения РГПУ-260, РГПУ-195, РГПУ-135, РГПУ-189. Остальные вещества не оказывали выраженного церебропротекторного действия в тех же условиях. Курсовое введение данных соединений способствовало развитию меньшего неврологического дефицита (менее выражены были психоневрологические, мнестические и сенсомоторные нарушения). При их применении у животных с ОСМА в ее проекции уровень МК был выше, чем при применении других веществ, а функциональное состояние эндотелия улучшалось, о чем свидетельствовала более выраженная реакция сосудов на ацетилхолин (модулятора стимулируемой продукции NO) и нитро-L-аргинин (модулятора базальной секреции NO). Другие соединения не оказывали протекторного действия.

Известно, что в формировании ЭД при недостаточности половых гормонов лежит комплекс патогенетических механизмов: повышение активности симпатической нервной системы [Zeiger AM. 1989; Wenzel R. R., 2006], модуляция ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, инсулинорезистентность, стимуляция окислительного стресса, увеличение солечувствительности, ожирение, повышение тромбоза А2, свертываемости крови [Teerlink T., 2003; Miller V. M., 2007], снижение биодоступности NO, и как следствие, нарушение ЭЗВД [Тюренков И.Н., 2009]. Производные ГАМК и глутаминовой кислоты обладают широким спектром активности: симпатингибирующим, противоишемическим, антистрессорным, антиоксидантным действием, способны снижать сопротивление сосудов, увеличивать линейную и объемную скорости мозгового кровотока, улучшать микроциркуляцию, улучшать состояние гемостаза, т.е. способны воздействовать на различные механизмы развития ЭД при НПГ. У ряда производных ГАМК доказана эндотелиопротекторная активность в условиях гормональных нарушений [Робертус А.И., 2010; Воронков А.В., 2011, Резникова Л.Б., 2013]. Поэтому можно предполагать, что механизм защитного действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях перманентной фокальной ишемии при НПГ является поливалентным, но учитывая полученные результаты о их влиянии на функциональное состояние эндотелия и роль ЭД в патогенезе, ведущим механизмом является эндотелиопротекция.

Следующим этапом исследований стало изучение церебро- и эндотелиопротекторных свойств веществ, отобранных на этапе скрининга, при моделировании фокальной ишемии на фоне СД. По литературным данным известно, что на фоне СД 2 типа имеется ряд особенностей течения ОНМК по сравнению с пациентами, не имеющими этого заболевания. Предполагается, что в условиях острой ишемии головного мозга наличие метаболических нарушений, характерных для СД 2 типа, становится определяющим в развитии глубокого повреждения ткани головного мозга за

счет развития энергетического дефицита, усугубления оксидативного стресса и воспалительных реакций [Дедов И.И., 1998; Петрищев Н.Н., 2003; Скворцова В.И., 2008; Сергеева С.П., 2013]. Патопфизиология сахарного диабета такова, что увеличение уровня глюкозы отмечается еще до развития сосудистой патологии. Синдром гипергликемии формируется медленно и, таким образом, уже оказывает влияние на эндотелий сосудистой стенки, приводя к снижению ЭЗВД, нарушению проницаемости, очевидно, за счет конечных продуктов гликирования, что также влияет на течение заболевания [Щепанкевич Л. А., 2014]. Таким образом, можно предполагать, что соединения, оказывающие более выраженное эндотелиопротекторное действие, будут более эффективными при моделировании фокальной ишемии на фоне СД.

В результате проведенных исследований, из соединений-кандидатов наиболее выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами обладали два вещества – РГПУ-260 и РГПУ-189 и, несколько в меньшей степени, РГПУ-195. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями А.В. Воронковым (2011), в которых было показано, что соединение РГПУ-189 обладает выраженным эндотелиопротекторным действием, угнетая экспрессию маркеров апоптоза (TRAIL, каспаза-3, NF-kB), снижая экспрессию эндотелина-1 и усиливая активность e-NOS. Несомненно, что указанные свойства соединения РГПУ-189 способствуют балансу между сосудосуживающими и вазоконстрикторными, про- и антитромботическими свойствами эндотелия. В совокупности это приводит к лучшему сохранению кровоснабжения головного мозга при фокальной ишемии и как следствие к ограничению размеров инфаркта и соответственно к менее выраженным неврологическим нарушениям у экспериментальных животных. Соединение РГПУ-195 по литературным данным по нейропротекторной активности превосходит препарат сравнения фенотропил [Епишина В.В., 2006]. Однако его эндотелиопротекторные свойства ранее не изучались.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что даже при отсутствии других факторов риска возраст выступает в виде независимой патогенетической причины повышения заболеваемости и смертности от церебрального инсульта [Улубиева Е. А., 2015]. Исследования последних 10 лет показывают, что старение связано с анатомическими и функциональными изменениями в сосудистой стенке артерий, включая расширение диаметра аорты, утолщение стенок артерий и повышение жесткости артерий [Стражеско И.Д., 2012; Ярмыш Н. В., 2014; Seals D. R., 2014; Драпкина А. М., 2015; Солдатов В. М., 2015; Donato A. J., 2015; Luna C., 2016]. К перечисленным структурным изменениям следует добавить и ряд функциональных: наблюдается формирование дисфункции эндотелия, и в связи с этим уменьшается биодоступность NO и эндотелийзависимое расслабление сосудов. Основными признаками старения эндотелия следует считать развитие его дисфункции и повышение проницаемости. Возрастает продукция ингибитора активатора плазминогена-I, что способствует тромбообразованию, увеличивается выработка сосудосуживающих факторов, таких как ангиотензин II и эндотелин, при падении секреции сосудорасширяющих – NO, простагличина. Синтез оксида азота уменьшается с увеличением возраста в связи с нарушением структуры эндотелия: вместо плотного ряда клеток фиксируются свободные от них участки (фенестрация), особенно выраженные в местах ветвления артерий, уменьшается выработка их предшественников костным мозгом. В результате с возрастом усиливаются вазоконстрикторные реакции, даже ацетилхолин может вызвать сужение сосуда. Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании функции эндотелия у 24-х месячных животных, которым воспроизводили недостаточность мозгового кровообращения путем перевязки у крыс одной сонной артерии полностью и ограничения кровотока по другой сонной артерии до значения, составляющего 50 - 60% от исходного. Из исследуемых веществ наиболее выраженными церебропротекторными свойствами обладали соединения

РГПУ-189 (композиция фенибута с салициловой кислотой) и РГПУ-135 (β -фенилглутаминовой кислоты), повышая выживаемость животных и снижая у них выраженность неврологических нарушений. Таким образом, можно предполагать, что указанные соединения будут эффективны у лиц пожилого возраста в качестве средств профилактики и лечения НМК.

По результатам целенаправленного поиска средств лечения НМК в условиях эндотелиальной дисфункции среди производных хиназолинов, амидов бензойных кислот, ГАМК и глутаминовой кислоты были найдены 4 вещества (РГПУ-135 – β -фенильное производное глутаминовой кислоты, РГПУ-189 – композиция фенибута с салициловой кислотой, РГПУ-195 – β -пиридиловое производное ГАМК, РГПУ-260 – композиция мефебута с L-аргинином), являющиеся наиболее перспективными для дальнейшего углубленного изучения. При этом в условиях коморбидных состояний соединение РГПУ-189 было более эффективно при НПГ, СД, а также у старых (24-х месячных) крыс, РГПУ-135 – при НПГ и у старых животных, РГПУ-195 – при хронических НМК, а соединение РГПУ-260 при СД, НПГ, хронических НМК.

Среди производных хиназолина и амидов бензойных кислот также были выделены соединения-лидеры, обладавшие несколько менее выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами, однако их эффекты на животных без отягощенного преморбидного фона были сопоставимы с препаратами сравнения. Поэтому с учетом рекомендаций химикам-синтетикам о более перспективных структурах в дальнейшем следует продолжить поиск веществ для коррекции НМК в данных рядах соединений, что может позволить найти более активные церебро- и эндотелиопротекторные препараты.

Поскольку развитию острых НМК, как правило, предшествуют длительно протекающие, хронические ишемические изменения в головном мозге [Мартынов М. Ю., 2008], представлялось целесообразным изучить эффективность соединений-лидеров при данном типе НМК.

В качестве ХНМК была разработана модель экспериментальной недостаточности кровообращения, создаваемая путем 28-дневного гравитационного воздействия в каудо-краниальном векторе на экспериментальных животных. Многократноповторяющиеся гравитационные воздействия в в каудо-краниальном векторе (в течение 28 дней) позволили воспроизвести у животных НМК, имеющие место при гипертонических кризах у больных с артериальной гипертензией и сопровождающиеся симптомами хронической недостаточности мозгового кровообращения. Исследуемые соединения (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) и препараты сравнения вводились в течение 14 дней по окончании 28-ми дневного воздействия гравитационных перегрузок в каудо-краниальном направлении. Было установлено, что соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195 (в большей степени), РГПУ-260 способны улучшать мозговое кровообращение при его хроническом нарушении и снижать выраженность эндотелиальной дисфункции, тем самым уменьшая выраженность когнитивных и мнестических нарушений. Соединение РГПУ-135 в условиях ХНМК оказывало также анксиолитическое действие, уменьшая у животных после гравитации явления тревоги, беспокойства. Такой плейотропный эффект РГПУ-135 будет несомненно полезным при его применении у пожилых лиц с НМК, имеющих тревожно-депрессивные наслоения. Эти данные также согласуются с результатами, полученными ранее, доказывающие, что соединение РГПУ-135 оказывает выраженное антидепрессивное действие на модели «выученной беспомощности», уменьшая длительность иммобилизации в тесте принудительного неизбежного плавания и увеличивая потребление раствора сахарозы у животных [Багметова В.В., 2013; Меркушенкова О.В., 2009; Чернышева Ю.В., 2013]. Согласно данных литературы, с одной стороны, доказано, что высокий уровень депрессии и тревоги – самостоятельный фактор риска развития инсульта, с другой – депрессия является не только частым, но и наименее диагностируемым осложнением ОНМК. Более трети пациентов

после инсульта страдают депрессией, причем у 50% она ярко выражена. В ее развитии участвуют повреждение мозга, вызывающее дисфункцию серотониновой системы, и дистресс, связанный с утратой моторных навыков и речи. Кроме того, депрессия чаще связана с локализацией инсульта в области левых передних и базальных ганглиев, а также в областях лимбической системы, регулирующей эмоции. Постинсультная депрессия обычно имеет тенденцию к длительному течению. Кроме депрессии пациенты нередко страдают от тревоги, эмоциональной несдержанности. Наличие постинсультной депрессии снижает восстановление когнитивных функций, ограничивает реабилитацию пациента и ухудшает прогноз, в том числе за счет смертности [Hachinski V., 2003; Александров А. А., 2007; Chen Y., 2007; McDougall F., 2007; Salter K. L., 2013; Juang H. T., 2015; Son M. K., 2015]. Таким образом, созданный на основе соединения РГПУ-135 нейропротекторный препарат, обладающий мультитаргетным действием (церебро-, эндотелиопротекторная, антидепрессивная и анксиолитическая активность), будет существенно снижать риск полипрагмазии в клинических условиях у пациентов с НМК и проявлениями тревожно-депрессивных и тревожно-фобических состояний.

Для понимания возможных механизмов действия соединений-лидеров РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 были выполнены ряд исследований по изучению их специфической активности с учетом ранее полученных результатов.

Поскольку при моделировании НМК у старых крыс наиболее выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами обладали соединения РГПУ-135 и РГПУ-189, было целесообразно оценить выраженность их свойств на животных двух возрастных групп. При этом принимая во внимание, что возраст и высокая коморбидность рассматриваются в качестве основных предикторов негативного исхода инсульта [Орлова А.С., 2014], а также учитывая, что у лиц пожилого возраста снижается стрессустойчивость и различные стрессорные факторы могут

спровоцировать развитие новой патологии или обострение уже имеющегося заболевания, было выполнено исследование эффективности соединений-лидеров (РГПУ-135 и РГПУ-189) в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной сочетанным воздействием стресса и возраста. Установлено, что соединения РГПУ-135, РГПУ-189 у животных двух возрастных групп (12-ти и 24-х месяцев) в условиях хронического стресса оказывали значимый церебропротекторный эффект, сохраняя более высокую двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности животных, способствуя сохранению памятного следа, благоприятно влияя на уровень мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга. Также повышалась устойчивость животных к действию стрессорных факторов за счет изменения уровня IL-6 в сторону нивелирования признаков иммуносупрессии. Под влиянием соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 наблюдалось меньшее содержание СРБ и VCAM-1 в крови животных, что также указывало на их эндотелиопротекторное действие.

В настоящее время в ряде экспериментальных и клинических исследований была показана значительная роль иммунной системы в патогенезе НМК [Kemeny M.E., 2007; Корнева Е.А., 2003; Iyer S.S., 2013]. Изучению иммунологической реактивности при ишемии мозга была посвящена серия экспериментальных работ, выполненных под руководством академика РАН И.В.Ганнушкиной [Ганнушкина И.В., 2002]. Было показано, что исходное состояние иммунной системы влияет на степень поражения ткани мозга при его ишемии. В течение последующих лет, в результате проведенных экспериментальных и некоторых клинических исследований, была сформулирована концепция, согласно которой развитие ишемии мозга сопровождается сложным ответом нейроиммуноэндокринной системы [Жданов Г. Н., 2005; Охтова Ф.Р., 2014; Рабсон А., 2006]. Однако, роль иммунного ответа при ишемии трудно оценить однозначно. С одной стороны, он направлен на удаление некротизированной ткани из зоны инфаркта, а с другой – отягощает течение ишемического инсульта,

увеличивая зону инфаркта [Шеремет А. О., 2009]. Об интересе ученых к данной теме свидетельствует возрастающее с каждым годом количество работ по исследованию изменений тех или иных иммунологических показателей при острых и хронических НМК [Котина Е. А., 2013; Мироненко Т. В., 2013; Максимова М. Ю., 2014; Гелетка А. А., 2015; Kokaia Z., 2015; Чернецова Л. Ф., 2016].

Из данных различных литературных источников известно, ГАМК - и глутаматергические механизмы задействованы во многих нейроиммунных процессах [Костанян И.А., 1997; Самотруева М.А., 2012]. Доказательством этому может служить тот факт, что рецепторы различных нейромедиаторов, в том числе и нейроаминокислот, обнаружены на мембранах иммунокомпетентных клеток [Лисяный Н.И., 2003]. Установлено, участие глутаминовой кислоты и глутаматных рецепторов различных типов (GluRs) в функционировании эндокринной и иммунной систем [Костанян И.А., 1997; Droge W., 1998]. Можно ожидать, что вещества с ГАМК- и глутаматергическим механизмом действия будут способны влиять на нейроиммуноэндокринные взаимодействия при различных патологических состояниях.

В исследованиях, проведенных Самотруевой М.А. (2011), показано, что соединение РГПУ-135 (β -фенильное производное глутаминовой кислоты) в дозе 30 мг/кг стимулирует клеточное и гуморальное звено первичного иммунного ответа, а также способствует усилению лимфопролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах, обладая выраженным иммуностропным действием. Следовательно, в механизме церебропротекторного действия данного соединения определенное значение имеет его способность влиять на взаимодействие нервной и иммунной системы. Однако учитывая, что роль иммунитета в патогенезе НМК не однозначна, возможно и церебропротекторное действие соединения РГПУ-135 при различных состояниях иммунной системы также может быть различным. В связи с этим целесообразным было изучить влияние иммунного

статуса животных на церебропротективные эффекты РГПУ-135 при ишемии головного мозга.

Установлено, что иммуносупрессия, вызванная 13-ти дневным пероральным введением циклоспорина, усугубляет течение ишемии головного мозга, что проявляется снижением выживаемости животных, а у выживших животных более выраженными неврологическими нарушениями: снижением мышечной силы, нарушением координации движений, угнетением двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей, когнитивной функции, более низкими показателями МК. Все это наблюдалось на фоне более высокого содержанием в сыворотке крови маркеров повреждения нервной ткани – нейронспецифической енолазы (NSE), основного белка миелина (MBP) и низким содержанием NGF, по сравнению с животными с ишемией мозга на фоне интактного иммунитета. Ишемия головного мозга в условиях стимуляции ИС (7-ми кратным внутрибрюшинным введение липополисахарида (пирогенал, Россия) через день в дозе 10 мкг/кг) вызывала меньшую летальностью крыс, а у выживших животных наблюдался меньший неврологический дефицит, более высокие показатели координации движений, мышечной силы и локомоторной активности, меньший уровень NSE и MBP в сыворотке крови.

В совокупности это указывает на то, что ишемия головного мозга у животных на фоне подавленной иммунной системы протекает значительно тяжелее, чем при интактном и активированном иммунитете. Это согласуется с данными других исследований [Hallenbeck J., 2006; Chamorro A., 2006, 2012; Dirnagl U., 2009; Кульчиков А. Е., 2009; Klehmet J., 2009].

Состояние иммунной системы оказывало значительное влияние и на выраженность церебропротекторного действия исследуемого соединения РГПУ-135 и препаратов сравнения при ишемии головного мозга. Вещество РГПУ-135 было эффективно как при интактном иммунитете животных, так и на фоне измененной иммунореактивности. Однако, при иммуносупрессии он оказывал максимальный терапевтический эффект, достоверно повышая

уровень мозгового кровотока, снижая концентрацию NSE и MBP через 7 дней лечения по сравнению с контрольной группой крыс. Терапевтический потенциал препарата фенибута был в большей степени выражен на фоне активированного иммунитета животных, а при иммуносупрессии его эффективность была низкой. Церебропротективные свойства препарата церебролизина при НМК в большей степени проявились в условиях иммуносупрессии и на фоне интактного иммунитета, а при активации иммунной системы его эффективность оказалась существенно ниже.

Таким образом, представленные результаты исследования указывают на необходимость учета состояния иммунной системы при ОНМК и более дифференцировано назначать церебропротекторные препараты в клинических условиях, учитывая их неодинаковое действие при различной активности иммунной системы, что, вероятно, может повысить эффективность проводимой терапии.

На завершающем этапе работы были изучены возможные механизмы действия исследуемых соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.

Согласно современным представлениям дисфункция эндотелия – это, прежде всего, дисбаланс между продукцией вазодилатирующих, антитромботических, ангиопротективных, антипролиферативных факторов, с одной стороны (NO, простаглицлин, тканевой активатор плазминогена, С-тип натрийуретического пептида, эндотелиального гиперполяризующего фактора) и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов (эндотелин, супероксиданион, тромбоксан A_2 , ингибитор тканевого активатора плазминогена и др.) с другой стороны [Бувальцев В.И., 2001; Баркаган З.С., 2004, Deanfield J.E. 2007, Münzel T, 2008]. В соответствии с продуцируемыми эндотелием субстанций, он выполняет ряд функций, в том числе антитромботическую, противовоспалительную, антипролиферативную, участвует в вазодилатации сосудов, адгезии лейкоцитов, иммунных реакциях, регуляции роста гладкомышечных клеток. Оценивая сохранность

этих функций на фоне введения веществ, можно определить возможный механизм их действия. В проведенном исследовании эндотелиопротекторное действие веществ изучалось по их влиянию на вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную функции эндотелия. Дополнительно, как маркер повреждения, определялось количество десквамированных эндотелиоцитов и *in vitro* – продукцию NO эндотелиальными клетками и фосфорилированной эндотелиальной NO-синтазы.

При изучении вазодилатирующей функции эндотелия была дана оценка ЭЗВД (при введении ацетилхолина, нитро-L-аргинина), ЭНЗВД (при введении нитроглицерина). При исследовании данных параметров было установлено, что ишемия головного мозга как на фоне отягощенного преморбидного фона животных, так и без него приводила к нарушению нормальной функции системы синтеза и выделения NO, что проявлялось снижением ЭЗВД как при введении ацетилхолина, так и при введении нитро-L-аргинина, что свидетельствует о нарушении стимулируемой и базальной секреции NO эндотелием. Полученные данные находят подтверждения в многочисленных литературных источниках [Домашенко М. А., 2006; Варакин Ю. Я., 2013; Долгов А. М., 2013; Расулова Х. А., 2013; Чупин А. В., 2013; Максимович Н. Е., 2015; Adachi U., 2015; Lind L., 2015].

В результате проведенного исследования была выявлена способность у всех соединений-лидеров (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) усиливать ЭЗВД при введении ацетилхолина, у животных с интактным фоном и в условиях СД при применении РГПУ-260, РГПУ-189 и РГПУ-195 (в большей степени), в условиях НПГ – при введении животным РГПУ-260, РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, у старых крыс – при применении РГПУ-189 и РГПУ-135. Такое значительное улучшение ЭЗВД на фоне исследуемых веществ, очевидно, является следствием улучшения функционирования эндотелиальной нитроксид синтазы, активность, которой в отдаленный период ишемии значительно снижается.

Изучение антитромботической функции эндотелия и влияния исследуемых веществ-лидеров на нее осуществлялось как со стороны коагуляционного гемостаза (ТВ, ПВ, АЧТВ, уровень фибриногена и фактора Виллебранда), так и со стороны сосудисто-тромбоцитарного (модель артериального тромбоза, повышение агрегации тромбоцитов на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов) на животных, перенесших фокальную ишемию на фоне НПГ и СД.

Было установлено, что ишемия головного мозга на фоне СД и НПГ сопровождалась выраженной активацией прокоагулянтных и тромбогенных свойств эндотелия, что подтверждает развитие эндотелиальной дисфункции при экспериментальной патологии.

Изучение влияния соединений-лидеров на тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз, показало, что все вещества обладают способностью повышать антитромбогенный и антикоагуляционный потенциал эндотелия при эндотелиальной дисфункции. При этом также как и по влиянию на вазодилатирующую функцию эндотелия, при СД более эффективными оказались РГПУ-260, РГПУ-189 и РГПУ-195, в условиях НПГ – РГПУ-260, РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195.

Развитие эндотелиальной дисфункции сопровождается и нарушением равновесия в продукции веществ, влияющих на тонус сосудов, свертываемость крови, воспаление и пролиферацию сосудов, а также морфологическими изменениями эндотелия и сосудистой стенки в целом.

Исходя из этого, было проведено изучение влияния соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на противовоспалительную функцию эндотелия (по содержанию СРБ) и его целостность (по количеству десквамированных эндотелиоцитов). Под влиянием исследуемых соединений было выявлено достоверное снижение признаков воспаления и количества десквамированных (или слущенных) эндотелиоцитов.

Дополнительно *in vitro* было изучено влияние соединения РГПУ-260 на продукцию NO эндотелиальными клетками и eNOS. Установлено, что

исследуемое вещество превосходит ацетилхолин по стимулирующему действию на высвобождение NO эндотелиальными клетками. Указанный эффект объясняется увеличением содержания eNOS(pS1177)

Таким образом, РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 обладают эндотелиопротективной активностью, которая может способствовать снижению риска возникновения и прогрессирования сосудистых осложнений СД, НПГ, у пожилых людей, а также являться важным компонентом их действия при развитии ЭД при патологиях различного генеза.

В развитии церебральной ишемии значительная роль отводится процессам ПОЛ. Липиды входят в состав всех клеточных мембран, обеспечивают постоянство внутренней среды клетки, её заряда, передачу сигналов и другие процессы. При активации ПОЛ, т.е. при смещении про- и антиоксидантного равновесия в сторону снижения активности ферментов АОС, в первую очередь происходит повреждение мембран клеток, что нарушает её структуру и нормальное функционирование, вплоть до её гибели. Поэтому, учитывая ранее полученные нами результаты о церебро- и эндотелиопротекторном действии соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях церебральной ишемии, а также роль свободно-радикального окисления в развитии нейродегенеративных процессов, было целесообразным изучить влияние исследуемых соединений на процессы ПОЛ и состояние АОС при фокальной ишемии, моделируемой на фоне коморбидных состояний. Установлено, что курсовое введение исследуемых соединений защищает ишемизированную ткань мозга от перекисного окисления липидов, снижая содержание ТБК-активных продуктов и повышая активность СОД, увеличивает потребление глюкозы мозгом. Согласно литературных данных, патогенетические факторы, лежащие в основе развития ЭД при СД, способствуют активации процессов свободно-радикального окисления: дисбаланса между прооксидантами и антиоксидантами, приводящего к избытку свободных радикалов и накоплению высокотоксичных продуктов свободно-радикального окисления

(«окислительный стресс») [Башкирова Ю.В., 2008; Марков Х.М., 2009; Занозина О.В., 2010; Tessari P., 2010]. Поэтому можно предполагать, что оказываемое соединениями влияние на процессы ПОЛ и активность АОС опосредует их эндотелиопротекторное действие.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о необходимости модернизации технологии поиска средств для лечения и профилактики НМК, поскольку выполнение работы на условно здоровых животных без преморбидного фона, который значительно повышает риск развития сосудистых инцидентов и их фатальных исходов, существенно влияя на состояния функциональных резервов сердечно-сосудистой системы, повышает риск неудачной апробации препарата в клинических условиях. Существенно то, что ряд соединений, оказавших на этапе скрининга церебро- и эндотелиопротекторные свойства при НМК в условиях нормы, не проявили столь выраженного протективного действия при моделировании ишемии мозга при СД, НПГ и старых животных. С другой стороны не однозначно было и церебропротекторное действие соединений-лидеров у животных с отягощенным преморбидным фоном, некоторые из них были более эффективны при СД, другие при НПГ или возрастных изменениях. Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать применение препаратов в условиях клинической практики более дифференцировано в зависимости от сопутствующих заболеваний у пациентов. В заключении необходимо отметить, что ведущим механизмом действия РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях фокальной ишемии являлась их эндотелиопротективная активность, что подчеркивает необходимость разработки и создания нового класса средств для лечения НМК – эндотелиопротекторов, а на основе указанных соединений является перспективным создание лекарственных средств с эндотелиопротективным действием, применяющимся в комплексном лечении сосудистых патологий и для предупреждения риска их возникновения.

ВЫВОДЫ:

1. Выраженность степени повреждения головного мозга у животных при НМК и эффективность церебропротекторного действия исследуемых веществ в большой степени зависит от преморбидного состояния (НПГ, нарушений углеводного обмена при СД, возраста, стрессорных воздействий, состояния иммунной системы).
2. При профилактическом введении до окклюзии общих сонных артерий производных ГАМК (композиции фенибута с никотиновой (РГПУ-151), глутаминовой (РГПУ-152), салициловой (РГПУ-189) кислотами, β - пиридил ГАМК (РГПУ-195), композицию мефебута с L-аригинином (РГПУ-260)), производного глутаминовой кислоты (β - фенил глутаминовой кислоты (РГПУ-135)), производных хиназолина (3-[2-(1-Нафтиламино)-2-оксоэтил]-6-бромхиназолин-4(3Н)-он (VMA10-17), N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA13-15)), производных гидроксibenзойных кислот (4-(N-салицилоил)аминобутановая кислота (C18), каливая соль N-(п-ацетоксибензоил)глицина (C40)) наблюдалось повышение выживаемости животных (в среднем на 43-52%), уменьшение тяжести неврологических нарушений, (поведенческого, когнитивного дефицита), степени падения мозгового кровотока и улучшение эндотелийзависимой вазодилатации (в среднем на 10,4-19,9%). Оказываемое ими церебро- и эндотелипротекторное действие было сопоставимо с таковыми препаратов сравнения кавинтона и цитиколина.
3. При моделировании фокальной ишемии головного мозга у животных на фоне СД, НПГ наиболее выраженное церебропротекторное действие оказали соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260, тогда как эффективность соединений VMA10-17, VMA13-15, C18, C40, РГПУ-151, РГПУ-152 оказалась невысокой.

4. Лечебное курсовое 14 дневное введение вещества РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг в условиях хронического НМК в большей степени, чем соединений (РГПУ-135 (26 мг/кг), РГПУ-189 (30 мг/кг), РГПУ-260 (5,5 мг/кг)), уменьшало когнитивные и мнестические нарушения, улучшало МК (на 26,3%) и приводило к повышению ЭЗВД (на 12,9-13,7%).
5. У старых животных соединения РГПУ-135 и РГПУ-189 наиболее значительно уменьшали выраженность пострессорных неврологических нарушений, улучшали сохранение памятного следа, препятствовали повышению АД, падению мозгового кровотока, нарушению эндотелийзависимой вазодилатации, и это сочеталось с уменьшением выраженности патоморфологических изменений в головном мозге.
6. Изменение состояния иммунной системы оказывает значительное влияние на последствия и выраженность церебропротекторного действия исследуемых веществ. Так, при активированной иммунной системе, по сравнению с подавленной, наблюдалась большая выживаемость животных с ишемией головного мозга (60% и 25%, соответственно), меньшая выраженность у них неврологического дефицита ($5,3 \pm 0,9$ балла и $8,1 \pm 0,8$ балла, соответственно), более высокие показатели МК ($3,1 \pm 0,2$ и $2,89 \pm 0,2$, соответственно), низкая концентрация в сыворотке крови маркеров повреждения головного мозга – NSE ($2,41 \pm 0,3$ нг/мл и $3,44 \pm 0,4$ нг/мл) и МВР ($1,4 \pm 0,15$ нг/мл и $2,4 \pm 0,3$ нг/мл). Соединения РГПУ-135 оказывало в равной степени протекторное действие при ишемии головного мозга на фоне интактной, подавленной и активированной иммунной системы.
7. Механизм церебропротекторного действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 при НМК обусловлен улучшением мозгового кровообращения, эндотелиопротекторными свойствами (за счет повышения активности эндотелиальной NO-синтазы, улучшения базальной и стимулируемой продукции оксида азота, противовоспалительной и антитромботической функции эндотелия),

снижением продуктов ПОЛ (ТБК-АП), повышением активности антиоксидантной системы (СОД), увеличением утилизации глюкозы мозгом, снижением агрегационной активности тромбоцитов и свертывания крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Разработка препаратов для лечения НМК и методология их изучения требует пересмотра и должна на этапах углубленного изучения наиболее активных веществ включать изучение фармакологической активности новых средств при моделировании НМК в условиях отягощенного преморбидного фона. Представленная методология поиска церебропротекторных препаратов (на животных с отягощенным преморбидным фоном и без него) дает возможность повысить эффективность поиска средств для профилактики и лечения НМК на этапе доклинической разработки препаратов и их внедрения в клиническую практику.
2. Проведенный сравнительный анализ 4 химических рядов соединений позволил выделить наиболее перспективные вещества для дальнейшего целенаправленного синтеза новых соединений и разработки на их основе средств профилактики и лечения острых и хронических НМК.
3. Полученные данные об особенностях действия соединений лидеров (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) при НМК в условиях отягощенного преморбидного фона (СД, НПГ, стресса, возрастных изменений) позволяют рекомендовать дифференцировано применять исследуемые вещества в последующей клинической практике у пациентов с различными вариантами НМК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NO – оксид азота
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
АГ – артериальная гипертензия
АД – артериальное давление
АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ДА – двигательная активность
ИРМ – иммунореактивный материал
ИС – иммунная система
ЛО – ложнооперированные животные
ЛП – латентный период
МК – мозговой кровоток
НМК – нарушение мозгового кровообращения
НПГ – недостаточность половых гормонов
ОИА – ориентировочно-исследовательская активность
ОП – открытое поле
ОСА – окклюзия общих сонных артерий
ОСМА – окклюзии средней мозговой артерий
ПВ – протромбиновое время
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
ПОЛ – перикисное окисление липидов
СРБ – С-реактивный белок
ТВ – тромбиновое время
ТЭИ – тест экстраполяционного избавления
УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
ФВ – фактор Виллебранда
ФИМ – фокальная ишемия головного мозга
ХНМК – хроническое нарушение мозгового кровообращения
ЦНС – центральная нервная система
ЭД – эндотелиальная дисфункция
ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация
ЭНВД – эндотелийнезависимая вазодилатация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрахам, С. Модулирующие JAK-киназу хиназолиновые производные и способы их применения / С. Абрахам, Ц. Чао, М.Дж. Хадд [и др.] //патент на изобретение 2529019 Рос.Федерация – № 2011139321/04; заявл. 26.02.2010; опубл. 27.09.2014.
2. Айтбаев, К. А. Современные методы первичной профилактики ишемического инсульта (Обзор литературы) / К. Айтбаев А., Т. М. Мураталиев //Вестник КРСУ. – 2014. – Т. 14, № 5. – С. 6-10.
3. Александров, А. А. Антидепрессанты в неврологии /А.А. Александров //Медицинские новости. –2007. – № 13. – Режим доступа: <http://www.mednovosti.by/journal.aspx?article=300>.
4. Алльгайер, Х. 1Н-Хиназолин-2,4-Дионы /Х. Алльгайер, И. Оберсон, Д. Каркаш [и др.] //патент на изобретение 2509764 Рос.Федерация – № 2011131276/04; заявл. 10.04.2006; опубл. 20.03.2014.
5. Алльгайер, Х. Производные хиназолина /Х. Алльгайер, В. Фрестль, М. Коллер [и др.] //патент на изобретение 2414468 Рос.Федерация – № 2007106930/04; заявл. 26.07.2005; опубл. 20.03.2011.
6. Аничков, Д. А. Менопауза и сердечно-сосудистый риск / Д.А. Аничков, Н. А. Шостак, А. Д. Журавлева //Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2005. – Т. 1, № 1. – С.37-42.
7. Аркадьев, В. Г. Влияние церебрала на иммунную систему при экспериментальном геморрагическом инсульте / В.Г. Аркадьев, Л. В. Новик, А. Ю. Пустоваров [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, № 2. – С. 20-23.
8. Багметова В.В. Психотропные свойства и аспекты механизмов действия новых производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот диссертация ... доктора медицинских наук : 14.03.06 /Багметова Виктория Владимировна. – Волгоград, 2013.– 379 с.
9. Багметова, В.В. Нейропротекторные эффекты метилового эфира фенибута и его композиций с органическими кислотами при коррекции

психоневрологических нарушений, вызванных судорожной патологией / В. В. Багметова, И.Н. Тюренок, Л. Е. Бородкина [и др.] Нейропротекторные эффекты метилового эфира фенибута и его //Фундаментальные исследования. – 2013. – №. 3-1. – С.22-26.

10. Бардахчян, Э.А. Структурно-функциональные изменения печени и мозга при эндотоксиновом шоке (ультраструктурное исследование) / Э.А. Бардахчян, Н.Г. Харланова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1997. – № 1. – С.17-21.

11. Баркаган, З. С. Сравнительный анализ основных и побочных эффектов различных форм ацетилсалициловой кислоты / З.С. Баркаган, Е.Ф. Котовщикова //Клиническая фармакология и терапия. – 2004. – Т. 13, №. 3. – С. 1-4.

12. Башкирова, Ю.В. Эндотелиальная дисфункция и микроциркуляторные нарушения у больных сахарным диабетом типа II / Ю.В. Башкирова, Т.А. Рудницкая, Р.С. Хапаев [и др.] //Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2008. – №. 6. – С. 134.

13. Бембенек, С.Д. Хиназолиноны как ингибиторы пролилгидроксилазы / С.Д. Бембенек, Ф.М. Хоукатт, Б.И. Леонард [и др.] //патент на изобретение 2528412 Рос.Федерация – № 2011137461/04; заявл. 10.02.2010; опубл. 20.09.2014.

14. Берли, Р. Производные хиназолина / Р. Берли, С.Д. Бембенек, Ф.М. Хоукатт [и др.] // патент на изобретение 2302244 Рос.Федерация – № 2003137571/15; заявл. 14.06.2002; опубл. 10.07.2007.

15. Бойко, С.С. Фармакокинетика ноотропных лекарственных средств / С.С. Бойко, Г.Ю. Вицкова, В.П. Жердев // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1997. – Т.60, №6. – С.62-70.

16. Борисов, А. В. Уровень С реактивного белка у пациентов с инсультом/ А.В. Борисов, А.Е. Семак, Я.М. Мотузова // Медицинский

журнал: рецензируемый научнопрактический журнал. – 2006. – № 2. – С. 25 – 27.

17.Бородкина, Л.Е. Нейропротекторные свойства и механизм действия новых производных аналогов гаммааминомасляной кислоты: диссертация ... доктора медицинских наук : 14.03.06 / Бородкина Людмила Евгеньевна.- Волгоград, 2009.- 379 с.

18.Брендель,Й. 2-(бутил-1-сульфониламино)-n-[1(r)-(6-метоксипиридин-3-ил)-пропил]бензамид, его применение в качестве лекарственного средства, а также содержащие его фармацевтические композиции / Й.Брендель, Х. Гегеляйн, К. Вирт, Г.У. Кюрцель //Патент на изобретение 2333202 Рос.Федерация – № 2005132163/04; заявл. 05.03.2004; опубл. 10.09.2008.

19.Бувальцев, В. И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний / В. И. Бувальцев //Международный медицинский журнал. – 2001. – № 3. – С. 202-209.

20.Бурчинский, С. Г. Возможности комплексной нейропротекции при ишемическом инсульте / С.Г. Бурчинский //Международный неврологический журнал. – 2015. – №. 6 (76). – С. 98-104.

21.Варакин, Ю. Я. Оценка функции сосудистого эндотелия у пациентов с начальными клиническими проявлениями цереброваскулярной патологии при артериальной гипертонии /Ю. Я. Варакин, В.Г. Ионова, Г. В. Горностаева [и др.] //Журнал неврології ім. БМ Маньковського. – 2013. – №. 1. – С. 61-68.

22.Воробьева, Е.Н. Дисфункция эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях: факторы риска, методы диагностики и коррекции / Е.Н. Воробьева, Р.И. Воробьев, Е.А. Шарлаева [и др.] //Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2, № 1. – С. 21-40.

23. Воробьева, О. В. Возможности антиоксидантной терапии в лечении хронической ишемии мозга и профилактике острых дисгемий / О. В. Воробьева // Трудный пациент. – 2014. – Т. 12, № 11. – С. 32-35.

24. Воронина, Т.А. Роль синаптической передачи в процессах памяти, нейродегенерации и механизме действия нейротропных препаратов / Т.А. Воронина // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2003. – Т.66, №2. – С.10-14.

25. Воронков, А.В.. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: диссертация ... доктора медицинских наук: 14.03.06/ Воронков Андрей Владиславович.- Волгоград, 2011.- 237 с.

26. Гаевый, М.Д. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой / М.Д. Гаевый, Л.М. Аджиенко, А.А. Абдулсалам, Л.М. Макарова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – №3. – С.63-64.

27. Ганнушкина, И.В. Аспекты дизрегуляции в патогенезе нарушений мозгового кровообращения // Дизрегуляторная патология / Под ред. Г.Н. Крыжановского М.: Медицина, 2002. - С. 260-293.

28. Гелетка, А. А. Плазменно-клеточные показатели липидного обмена и количество десквамированных эндотелиоцитов крови у больных в раннем восстановительном периоде каротидного ишемического инсульта в зависимости от степени тяжести / А.А. Гелетка // Український вісник психоневрології. – 2015. – №. 23, вип. 4. – С. 10-13.

29. Гелетка, А. А. Значение изучения биохимических, метаболических и иммунных показателей у больных, которые перенесли ишемический инсульт / А.А. Гелетка, И.А. Григорова, К.А. Лещенко // Проблеми безперервної медичної освіти та науки. – 2015. – №. 1. – С. 70-72.

30. Герасимов, А.А. Последние достижения в коррекции функционального состояния эндотелия [Электронный ресурс] / А.А. Герасимов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 3. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19398>

31.Горбачева, С.В. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения/ С.В. Горбачева, И.Ф. Беленичев, В.В. Дунаев, Бухтиярова Н.В. // Экспер. и клин.фармакол. – 2007. – Т.70, №6. – С.13-16.

32.Грачева С. В. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов / С.В. Грачева // Труды ВГМИ. – 1985 – Т. 37. – С. 124-129.

33.Гриневич, В.В. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в системе: гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников при воспалении / В.В. Гриневич, О.В. Волкова, И.Г. Акмаев // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 5 – С. 10-14.

34.Гусев, Е.И. Хроническая недостаточность мозгового кровообращения /Е.И. Гусев, А.Н. Коновалов, В.И. Скворцова //М.: ГЭОТАР–Медиа. – 2010. – 224 с.

35.Гусев, Е.И. Когнитивные нарушения при цереброваскулярных заболеваниях/ Е.И. Гусев, А.Н. Боголепова //М.: МЕДпресс-информ. – 2013. – Т. 176.

36.Гусев, Е.И. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов //Доктор. Ру. – 2013. – Т. 5. – №. 83. – С. 7-12.

37.Гусев, Е.И. Основные механизмы острой церебральной ишемии. Мозг: теоретические и клинические аспекты /Е.И. Гусев - М.: Медицина, 2003.- С. 139- 157.

38.Гусев, Е.И. Церебральный инсульт /Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов, А.Н. Ясаманова, И.А. Щукин, Т.И. Колесникова. // Consilium Medicum. – 2014. – № 12. – С. 13-17.

39.Гусев, Е.И. Современные патогенетические аспекты формирования хронической ишемии мозга /Е.И. Гусев, А.С. Чуканова // Журнал Неврологии и психиатрии. – 2015. –№3. – С. 4-8.

40. Дамулин, И.В. Сосудистая деменция: патогенез, диагностика и лечение /И.В. Дамулин //Фарматека. – 2010. – Т. 7. – С. 13-18.

41. Данилов, В.И. Инсульт. Современные подходы диагностики, лечения и профилактики: метод. рекомендации / под ред.: В. И. Данилова, Д. Р. Хасановой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 248 с.

42. Дедов, И. И. Введение в диабетологию : руководство для врачей / И. И. Дедов, В. В. Фадеев. – М. : Берг, 1998. – 200 с.

43. Долгов, А. М., Рябченко А. Ю., Денисов Е. Н., Туманова Н. Г. Эндотелий-зависимые механизмы регуляции тонуса сосудов при ишемическом инсульте / А.М. Долгов, А.Ю. Рябченко, Е.Н. Денисов, Н.Г. Туманова //Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94, № 1. – С.9-13.

44. Домашенко, М. А. Дисфункция эндотелия в остром периоде ишемического инсульта: автореф... канд. мед. наук. 14.00.13 /Домашенко Максим Алексеевич. – М. – 2006. – 31с.

45. Драпкина, А. М. Сосудистый возраст. Механизмы старения сосудистой стенки. Методы оценки сосудистого возраста / А.М. Драпкина //Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2015. – Т. 13, № 5. – С. 74-82.

46. Дьякова, И.Н. Экспериментальное исследование церебропротекторных свойств феруловой кислоты в условиях ишемии мозга : автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 14.00.25 / Дьякова Ирина Николаевна. – Пятигорск, 2007. – 23 с.

47. Дьяконов, М. М. Многолетний опыт низкодозированной пептидной нейропротекции в медицине (обзор) / М.М. Дьяконов, П.Д. Шабанов //Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2015. – № 2. – С.371-373.

48. Епишина, В. В. Сравнительное изучение психотропной активности гетероциклических производных гаммааминомасляной и глутаминовой кислот : автореф. дис.... канд. мед. наук,14.03.06/ Епишина Виктория Владимировна. – Волгоград, 2006. – 24 с.

49. Жданов, Г. Н. Иммунологические критерии в прогнозировании течения и исхода ишемического инсульта / Г.Н. Жданов, М.М. Герасимова // Неврологический журнал. – 2005. – Т. 10, № 1. – С. 19-21.

50. Занозина, О. В. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности / О. В. Занозина, Н.Н. Боровков, Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. – №. 3. – С.104-112.

51. Захаров, В.В. Лечение сосудистых когнитивных нарушений / В.В. Захаров, Н.В. Вахнина // Эффективная фармакотерапия. – 2016. – №. 1. – С. 4-11.

52. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д.М. Зубаиров // Казань: ФЭН. – 2000. – 364 с.

53. Ильин, Л.А. Противорвотное средство бензамид /Л.А. Ильин, К.С. Мартиросов, В.В. Зорин [и др.] // Патент на изобретение 2205009 Рос.Федерация – № 2002107681/14/04; заявл. 27.03.2002; опубл. 27.05.2003.

54. Камчатнов, П.Р. Коррекция эмоциональных и когнитивных нарушений у пациентов с хронической ишемией головного мозга/ П.Р. Камчатнов, О.В. Воробьева, А.П. Рачин // Журн неврол и психиат. – 2014. – Т. 4,. – С. 114.

55. Карева, Е. Н. Гестагены и головной мозг / Е.Н. Карева, О.М. Олейникова, В.О. Панов [и др.] // Вестник Рос. академии мед. наук. – 2010. – №. 6. – С. 40-49.

56. Ким, Сун-Янг. Новые соединения, их изомер или их фармацевтически приемлемые соли в качестве антагониста ванилоидного рецептора и содержащая их фармацевтическая композиция / Сун-Янг Ким, Дзин Кван Ким, Ки-Вха Ли [и др.] // Патент на изобретение 2448108 Рос.Федерация – № 2009106867/04; заявл. 10.09.2010; опубл. 20.04.2012.

57. Киршенблат Я. Д. Сравнительная эндокринология яичников / Я.Д. Киршенблат – Наука, 1973. – 20 с.

58. Ковалев, Г.В. Некоторые итоги и перспективы фармакологического изучения нейроактивных аминокислот и их аналогов // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов / под. ред. Г.В. Ковалева. – Волгоград, 1985. – С.11-21.

59. Ковалев, Г.В. Ноотропные средства / Г.В. Ковалев. – Волгоград: Нижне-Волжское книжное издательство, 1990. - 368с.

60. Колбасова, Е. А. Роль сосудодвигательной и NO продуцирующей функции эндотелия в развитии климактерических нарушений у женщин в постменопаузе / Е. А. Колбасова // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 36-41.

61. Корнева, Е.А. Введение в иммунофизиологию: учеб. по-сobie / Е.А. Корнева. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. – 48 с.

62. Корягина, Н.А. Оценка функционального состояния эндотелия у работающих женщин 40-60 лет в реальной клинической практике / Н.А. Корягина, Л.М. Василец, А.И. Шапошникова [и др.] // Журнал «Врач-аспирант». – 2012. – №3.1 (52). – С.174-181.

63. Кособян, Е. П. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии цереброваскулярного поражения у пациентов с сахарным диабетом / Е. П. Кособян, И. Р. Ярек-мартынова, М.Ю. Мартынов [и др.] // Сахарный диабет. – 2012. – №. 1. – С.42-48.

64. Костанян, И.А. Рецепторы нервных клеток / И.А. Костанян, Е.В. Наволоцкая, Р.И. Нуриева [и др.] // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, № 10. – С. 805-808.

65. Котина, Е. А. Иммунные реакции у пациентов с острым ишемическим инсультом / Е.А. Котина, Л.В. Новикова // Всероссийская ассоциация семейных врачей. – 2013. – С. 29-31.

66. Кривицкая, А.Н. Сравнительная характеристика психотропных свойств солей и композиций фенибута с органическими кислотами : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.06 / Кривицкая Анастасия Николаевна– Волгоград, 2012. – 213 с.

67. Кузнецова, С. М. Эндотелиальная дисфункция-фармакологическая мишень дисциркуляторной энцефалопатии / С. М. Кузнецова, В. В. Кузнецов, Д. В. Шульженко [и др.] // Журнал неврології ім. БМ Маньковського. – 2015. – №. 4. – С. 66-76.

68. Кульчиков, А. Е. Сравнительное изучение иммунокорригирующего действия нейропептидных препаратов при острой экспериментальной цереброваскулярной патологии / А.Е. Кульчиков, О.С. Моложавая, О.В. Скачкова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 38-43.

69. Кухарева, И.Н. Конституциональные факторы риска развития инсульта у женщин /И. Н. Кухарева, Б.М. Доронин //Бюл. Сиб. Медицины. – 2008. – Прил 1. – С.51-54.

70. Лагута, П. С. Аспирин. Устойчивые позиции и новые возможности после 100-летнего юбилея / П.С. Лагута, Е.П. Панченко //Леч врач. – 2003. – Т. 6. – С. 10-15.

71. Лисяный, Н.И. Нервные клетки их иммунные функции/ Н.И. Лисяный // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 193-194.

72. Литвинов, А. А. Анализ последствий ишемического поражения головного мозга животных, вызванного воздействием центробежного ускорения в краниокаудальном векторе на фоне однократного введения производных гамма-амино-и гамма-оксимасляной кислот /А.А. Литвинов, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова //Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. – 2012. – Т. 4, №40. – С. 179.

73. Литвинов, А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимасляной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия: дис. ... кан. фарм. наук : 14.03.06 / Литвинов Андрей Андреевич – Волгоград., 2015. – 196 с.

74. Макарова, Л.М. Влияние производного глутаминовой и аповинкаминовой кислот на метаболизм головного мозга в постишемическом периоде /Л.М. Макарова, М.А. Приходько, В.Е. Погорелый [и др.]// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – № 2. – С.12-15.

75.Макарова, Л.М. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга / Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Экспер. и клин.фармакол. – 2006. – Т.69,№6. – С.24-26.

76.Максимова, М. Ю. Факторы межклеточного взаимодействия при ишемическом инсульте /М. Ю. Максимова, Л. В. Комелькова, Ф. Р. Охтова //Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2014. – №. 2. – С. 15-20.

77.Марков, Х. М. Оксид азота и ишемическая болезнь сердца/ Х. М. Марков //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2009. – №. 2. – С.40-46.

78.Мартынов, М. Ю. Хроническая ишемия головного мозга / М. Ю. Мартынов, И. А. Щукин, С. А. Авдеев //Нервные болезни. – 2008. – №. 1. – С.22-24.

79.Маттей, П. Производные хиназолина / П. Маттей, В. Мюллер, В. Найдхарт [и др.] //патент на изобретение 229657 Рос.Федерация – № 2005102916/04; заявл. 27.06.2003; опубл. 20.01.2006.

80.Мельникова, Е. В. Нейропротекция при ишемии головного мозга / Е. В. Мельникова, А. А. Шмонин //Фарматека. – 2012. – Т. 9, № 242. – С. 36-42.

81.Милютина, О. В. Прогностическая роль С-реактивного белка в развитии риска кардиальных событий/ О. В. Милютина, Е. Н. Чичерина //Российский кардиологический журнал. – 2011. – №. 1. – С. 71-73.

82.Мироненко, Т. В. Отдельные показатели иммунологической реактивности организма у пациентов в раннем восстановительном периоде мозговых инсультов / Т.В. Мироненко, Л.В. Диденко //Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – Т. 24, № 25 (168). – С.78-83.

83.Нейфельд, И. В. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний женщин / И. В. Нейфельд, А. И. Жирняков, И.Н. Скупова //Бюллетень

медицинских интернет-конференций. – Общество с ограниченной ответственностью Наука и инновации, 2012. – Т. 2, № 12. – С.994-996.

84. Нечунаева, Е. В. Иммуно-биохимические показатели в ранней диагностике хронической ишемии головного мозга / Е. В. Нечунаева, Г. И. Шумахер, Е. Н. Воробьева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №. 2-2011. – С. 142-146.

85. Овечкин, А. М. Фармакотерапия острой послеоперационной боли, основанная на применении препаратов, воздействующих на NMDA-рецепторный комплекс/ А. М. Овечкин, И. В. Ефременко // Анестезиология и реаниматология. – 2013. – №. 3. – С. 63-69.

86. Оганов, Р. Г. Сосудистая коморбидность: общие подходы к профилактике и лечению/ Р. Г. Оганов // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 4-7.

87. Олейникова, О. М. Эстрогены и головной мозг / О.М. Олейникова, В. О. Панов, Н. Л. Шимановский, В. И. Скворцова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – №. 2. – С. 48-59.

88. Олешко, Т.Б. Роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі ішемічного інсульту (огляд літератури)/ Т. Б. Олешко, Д. Д. Сотніков // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2015. – Т.3, №2. – С.165-173.

89. Орлова, А.С. Особенности течения свободнорадикальных процессов у коморбидных больных при остром инсульте и транзиторных ишемических атаках: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.11, 14.03.03/ Орлова Александра Сергеевна. – М., 2014. – 159с.

90. Остроумова, О. Д., Дубинская Р. Э. Дисфункция эндотелия при сердечнососудистых заболеваниях / О. Д. Остроумова, Р. Э. Дубинская // Кардиология. – 2005. – Т. 2. – С. 59-62.

91. Остроумова, О. Д. Старение и дисфункция эндотелия / О. Д. Остроумова, Р. Э. Дубинская // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2004. – Т. 3. – №. 4. – С. 83-89.

92. Охтова, Ф. Р. Ишемический инсульт и показатели клеточного и гуморального иммунитета (клинико-иммунологическое исследование) дис. ... канд. мед. наук. 14.01.11/ Охтова Фатима Рамазановна – М, 2014. – 107с.

93. Охтова, Ф.Р. Ишемический инсульт и показатели клеточного и гуморального иммунитета (клинико-иммунологическое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. 14.01.11/ Охтова Фатима Рамазановна – М., 2014. – 29 с.

94. Перфилова, В. Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК : дис. – Волгоград : автореф. дис.... докт. биол. наук. 14.03.06 /Перфилова Валентина Николаевна. – Волгоград, 2009. – 304 с.

95. Перфилова, В. Н. Влияние новых солей фенибута на физическое и психическое развитие потомства крыс с экспериментальным гестозом / В. Н. Перфилова, Л. Б. Иванова, В. И. Д. Д. Карамышева, Бородин, //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 75, № 3. – С. 18-20.

96. Петрищев, Н. Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / СПб. гос. мед. ун-т им. акад. И. П. Павлова; под ред. проф. Н. Н. Петрищева. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. – 181 с.

97. Петрищев, Н.Н. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови / Н. Н. Петрищев, О. А. Беркович, Т. Д. Власов //Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – Т. 1. – С. 50-2.

98. Петров, В. И. Возбуждающие аминокислоты. / В. И. Петров, Л. Б. Пиотровский, И. А. Григорьев– Волгоград, 1997. – 167 с.

99. Петров, В. И. Персонализированная медицина: эволюция методологии и проблемы практического внедрения/ В. И. Петров, И. Н. Шишиморов, О. В. Магницкая, Б. Е. Толкачев //Вестник Волгоградского

государственного медицинского университета. – 2016. – №. 1 (57). –С. 3-11.

100. Петров, В.И. Средство, обладающее антидепрессантным, анксиолитическим, нейропротекторным и иммуностимулирующим действием/ В.И. Петров, И.Н. Тюренков, В.В. Багметова [и др.] //патент на изобретение № 2429834 Российской Федерации – № 2010130956/15,; заявл. 23.07.2010; опубл. 27.09.2011.

101. Петров, В.И. Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью / В.И. Петров, И.Н. Тюренков, А.А. Озеров //Патент на изобретение 2507199 Рос.Федерация – № 2012138666/04; заявл. 10.09.2012; опубл. 20.02.2014.

102. Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. № 294 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие здравоохранения» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rg.ru/2014/04/24/zdravooxr-site-dok.html>.

103. Прогноз научно-технологического развития России: 2030. Медицина и здравоохранение/ Под ред. Л.М. Гохберга, Л.М. Огородовой. – М.: НИУ «Высшая школа экономики», 2014. – 48 с.

104. Путилина, М.В. Факторы риска, особенности клинического течения и подходы к терапии у пациентов пожилого возраста с церебральным инсультом / М.В. Путилина //Журнал Неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 2011. – Т. 111, № 5. – С. 90-95.

105. Пшенникова, М. Г. Стресс: регуляторные системы и устойчивость к стрессорным повреждениям //Диз регуляторная патология /Под ред. Г.Н. Крыжановского.– М.: Мед. – 2002. – С. 307-328.

106. Пшенникова, М. Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М. Г. Пшенникова //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000. – Т. 2. – С. 24-31.

107. Рабсон, А. Основы медицинской иммунологии. / А.Рабсон, А. Ройт, П. Делвз– Пер. с англ. М. Изд-во «Мир» 2006. – 315 с.

108. Раевский, К.С. Нейрофармакологические и нейрохимические аспекты / К.С. Раевский, В.П. Георгиев // Медиаторные аминокислоты – 1986. М.: «Медицина». – 165с.
109. Расулова, Х. А. Некоторые молекулярные механизмы развития ишемического инсульта / Х. А. Расулова //Международный медицинский журнал. – 2013. – Т. 19, № 3. – С. 22-29.
110. Резникова, Л. Б. Эндотелиопротекторная активность производных ГАМК при экспериментальном гестозе: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06/ Резникова Людмила Борисовна. – Волгоград, 2013. – 128с.
111. Робертус, А.И. Эндотелиопротективные свойства гамк при недостаточности половых гормонов дис. ... канд. биол. наук: 14.03.06 / Робертус Александра Игоревна – Волгоград, 2010. – 120 с.
112. Рощина, Я.М. Динамика и структура потребления алкоголя в современной России / Я.М. Рощина // Вестник Российского мониторинга экономического положения и здоровья населения НИУ ВШЭ. – 2012. – №2. – С. 238–257.
113. Руда, М. М. Предшественники эндотелиальных клеток: роль в восстановлении функции эндотелия и перспективы терапевтического применения / М. М. Руда, Е. В. Парфенова, Ю. А. Карпов //Кардиология. – 2008. – Т. 1. – С. 66-74.
114. Румянцева, С. А. Второй шанс / С. А. Румянцева, В. А.Ступин, В. В. Афанасьев, Е. В. Силина //М.: Международная издательская группа «Медицинская книга. – 2011. – 174 с.
115. Рыжавский, Б.Я. Однонаправленные изменения морфометрических и гистохимических характеристик различных нейронов в процессе онтогенетического развития головного мозга и при изменениях его функционального состояния (теоретические аспекты) / Б. Я. Рыжавский //Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – №. 4. – С.60-65.

116. Рябченко, А.Ю. Клинико – патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции у больных с ишемическим инсультом на фоне гипертонической болезни: дис. ... канд. мед. наук 14.01.11 / Рябченко Александр Юрьевич – М., 2014. – 106с.

117. Сайгитов, А. Т. Сердечно-сосудистые заболевания в контексте социально-экономических приоритетов долгосрочного развития России / А. Т. Сайгитов, А.А. Чулок //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 3. – С. 286–299.

118. Самотруева, М.А. Изучение регуляторных механизмов действия аналогов ГАМК на нейроиммунную систему: дис. ... д-ра мед. наук.14.03.06 /Самотруева Марина Александровна – Волгоград, 2012. – 373 с.

119. Сергеев, А.А. Физиологические механизмы действия ускорений / А.А. Сергеев – Ленинград: Наука, 1967. – 392с.

120. Сергеев, Д.В. Нейропротекция при ишемическом инсульте: оправданы ли надежды? / Д.В. Сергеев // РМЖ, Неврология. – 2010. – Т.18, № 26. – С. 1521-1525.

121. Сергеева, С.П. К механизму Fas- индуцированного апоптоза нейронов в патогенезе ишемических инсультов/ С.П.Сергеева, П.Ф. Литвицкий, М.М. Гультияев [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – №3. – С.15-18.

122. Скворцова, В. И. Снижение заболеваемости, смертности и инвалидности от инсультов в Российской Федерации. / В. И. Скворцова– М. Литера, 2008.

123. Смирнов, А. В. Характеристика морфологических изменений гиппокампа старых крыс в результате стрессового воздействия/ А.В. Смирнов, И. Н. Тюренков, М. В. Шмидт [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2013. – №2. – С.14-17.

124. Соколов, А.В. Долгосрочный прогноз научно- технологического развития России на период до 2030 года: ключевые особенности и первые

результаты / А.В. Соколов, А.А. Чулок // Форсайт. – 2012. – Т.6, №1. – С.12-25.

125. Солдатов, В. М. Возрастные особенности экспрессии сигнальных молекул в эндотелии сосудов человека и их роль в развитии сердечно-сосудистой патологии / В. М. Солдатов, К. Л. Козлов, Н. С. Линькова //Молекулярная медицина. – 2015. – №. 6. – С. 33-37.

126. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А. А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур [и др.] //Биомедицина. – 2011. – Т. 1, № 3. – С.12-18.

127. Стоукс, Э.С.Э. Гроизводные бензамида, способ их получения и их применение, фармацевтическая композиция и способ обеспечения ингибирующего действия по отношению к hdac/ Э.С.Э. Стоукс, К. А. Робертс, М. Д. Уоринг // Патент на изобретение 2376287 Рос.Федерация – № 2004132844/04; заявл. 02.04.2003; опубл. 20.12.2009.

128. Тимофеева Т.Н., Деев А.Д., Шальнова С.А., Баланова Ю.А., Константинов В.В. Аналитическая справка об эпидемиологической ситуации по АГ в 2008 году и ее динамике с 2003 по 2008 гг. по трем проведенным мониторингам [Электронный ресурс].– Режим доступа: [http:// www.e-hypertonia.ru](http://www.e-hypertonia.ru).

129. Титова, Н. В. Современный взгляд на ноотропную терапию / Н. В. Титова // Русс. мед. журн. – 2007. – Т.15, № 24. – С. 1846-1850.

130. Трофименко, А. И. Визуализация очага ишемии головного мозга у крысы тетразолиевым методом А. И. Трофименко, А. Х. Каде, С. А. Занин [и др.] //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №. 5. – С.99.

131. Турунцева, О. Н. Особенности вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы и функции эндотелия у женщин с ожирением в перименопаузе/ О. Н. Турунцева, А. А. Соболев, И. Л. Гуляева //Educatio. – 2015. – №. 4 (11)-2. –С.83-85.

132. Тюренков, И.Н. Недостаточность половых гормонов, эндотелиальная дисфункция и ее коррекция эстрогенами / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.И. Робертус // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 6. – С. 57-59.

133. Тюренков, И.Н. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванном сочетанием разномодальных стрессоров / И.Н. Тюренков, В.В. Багметова, Ю.В. Чернышева, Д.Д. Бородин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 9. – С. 1045-1056.

134. Тюренков, И.Н. ГАМКа – Рецепторы: структура и функции / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // Экспер. и клин. фармакология. – 2010. – Т.73, №10. – С. 43-48.

135. Улубиева, Е.А. Влияние возраста, курения на эндотелиальную функцию у женщин / Е.А. Улубиева, А. Г. Автандилов // Проблемы женского здоровья. – 2015. – Т.10, №2. – С. 47-54.

136. Улубиева, Е.А. Возрастная динамика структурно-функциональных изменений артерий у практически здоровых женщин / Е. А. Улубиева, А. Г. Автандилов // Терапевт. – 2015. – №. 10. – С. 35-40.

137. Фатеев, И.В. Модель нарушения мозгового кровообращения с поэтапной перевязкой общих сонных артерий / И.В. Фатеев, В.Н. Быков, С.В. Чепур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 9. – С. 350-354.

138. Федеральный закон от 02.12.2013 (ред. от 28.06.2014) № 349-ФЗ от 02.12.2013 «О федеральном бюджете на 2014 год и на плановый период 2015 г. и 2016 г». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_172899.

139. Федин А. И. Эндотелиальная дисфункция у больных с хронической ишемией мозга и возможности ее фармакологической коррекции / А. И. Федин, Е. П. Старых, М. В. Путилина [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – Т. 5. – С. 15-20.

140. Хохлов А. Л. Аспекты коррекции дисфункции эндотелия при ишемическом инсульте/ А. Л. Хохлов //Архивъ внутренней медицины. – 2015. – №. 4. – С. 24-29.
141. Хут, А. Замещенные амиды бензойной кислоты и их содержащий фармацевтический препарат / А. Хут, Д. Зайдельманн, К.Х. Тираух // Патент на изобретение 2353618 Рос.Федерация – № 2002130252/04; заявл. 20.04.2004; опубл. 27.04.2009.
142. Чазова, И. Е. Ведение женщин с сердечно-сосудистым риском в перии постменопаузе: консенсус российских кардиологов и гинекологов / И. Е.Чазова, В. П. Сметник, В. Е. Балан [и др.] //Практическая медицина. – 2009. – №. 34. – С. 5-18.
143. Чернецова, Л. Ф. Клинико-иммунологические параллели у больных ишемическим инсультом на этапе ранней реабилитации / Л. Ф. Чернецова, Т. В. Журавель //Журнал'Цитокины и воспаление. – 2016. – Т. 2006, № 3. – С. 49-54.
144. Чупин, А. В. Сосудистые факторы нарушений церебрального кровотока при церебральном атеросклерозе / А. В.Чупин, А. Ж. Бекбосынов //Медицина и образование в Сибири. – 2013. – №. 1. – С. 1-7.
145. Шеремет, А. О. Роль иммунной системы в патогенезе острых и хронических ишемических повреждений головного мозга / А. О. Шеремет, Ю. Д. Губарев //Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2009. – Т. 59, № 7. – С.47-52.
146. Шмелева, В. М. Активация системы гемостаза у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / В. М. Шмелева, О. Н. Семенова, Л. П. Папаян, С. И. Ягашкина // Вестник Санкт-Петербургского Университета. – 2009. – №1 – С. 37-43.
147. Щепанкевич, Л. А. Ишемический инсульт у больных с Сахарным Диабетом 2 типа: кровь и сосудистая стенка: дис. ... докт. мед. наук.14.01.11/ Щепанкевич Лариса Александровна – М., 2014. – 229 с.

148. Щербаков Д. В. Заболеваемость взрослого населения сибирского федерального округа болезнями системы кровообращения / Д.В. Щербаков //Фундаментальные исследования. – 2014. – №. 10-9. – С.1827-1832.
149. Ярек-Мартынова, И. Р. Сердечно-сосудистые заболевания у больных сахарным диабетом / И.Р. Ярек-Мартынова, М. В. Шестакова //Cardio Соматика. – 2010. – №. 1-С. – С. 46-50.
150. Ярмыш, Н. В. Эндотелиальная дисфункция и её регуляторные факторы / Н. В. Ярмыш, Л. Н. Грозная //Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – №. 3 (2). – С. 37-43.
151. Abelson, J. F. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome / J.F. Abelson, K. Y. Kwan, B. J. O'Roak [et al.] //Science. – 2005. – Vol. 310. – №. 5746. – P. 317-320.
152. Adachi, U. Differences in Endothelial Function between Ischemic Stroke Subtypes / U. Adachi, Y. Tsutsumi, M. Iijima [et al.] //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2015. – Vol. 24, № 12. – P. 2781-2786.
153. Adams, H.P.Jr. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II) / H.P. Jr.Adams, M.B. Effron, J. Torner [et al.] //Stroke. – 2008. – Vol.39. – P. 87–99.
154. Agardh, C. D. Hypoglycemic brain injury: metabolic and structural findings in rat cerebellar cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration / C. D. Agardh, H. Kalimo, Y.Olsson, B. K. Siesjö //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1981. – Vol. 1, № 1. – P. 71-84.
155. Albers, G.W. Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke / G.W.Albers, W.M.Clark, R.P. Atkinson [et al.]// Stroke. – 1999. – Vol. 30, №3. – P.508-513.
156. Amanda, J. In vivo regulation of endothelium-dependent vasodilation in the rat renal circulation and the effect of streptozotocin-induced diabetes / J.

Amanda // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – № 295. – P. 829-839.

157. Anderson, R. E. Effects of glucose and PaO₂ modulation on cortical intracellular acidosis, NADH redox state, and infarction in the ischemic penumbra / R. E. Anderson, W. K. Tan, H. S. Martin, F. Meyer // *Stroke*. – 1999. – Vol. 30, №. 1. – P. 160-170.

158. Ankolekar, S. The influence of stroke risk factors and comorbidities on assessment of stroke therapies in humans and animals / S. Ankolekar, S. Rewell, D. W. Howells, P. M. Bath // *International Journal of Stroke*. – 2012. – Vol. 7, №. 5. – P. 386-397.

159. Ashe, K. H. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice / K. H. Ashe, K. R. Zahs // *Neuron*. – 2010. – Vol. 66, №. 5. – P. 631-645.

160. Ashwini, C. A. Comparative anatomy of the circle of Willis in man, cow, sheep, goat, and pig / C. A. Ashwini, R. Shubha, K. S. Jayanthi // *Neuroanatomy*. – 2008. – Vol. 7. – P. 54-65.

161. Auriel, E. Neuroprotection in acute ischemic stroke—current status/ E. Auriel, N. M. Bornstein // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2010. – Vol. 14, №. 9. – P. 2200-2202.

162. Bailey, E. L. Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review / E. L. Bailey, C. Smith, C. L. Sudlow, J. M. Wardlaw // *International Journal of Stroke*. – 2011. – Vol. 6, №. 5. – P. 434-444.

163. Barone, F. C. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy/ F. C. Barone, D. J. Knudsen, A. H. Nelson [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1993. – Vol. 13, №. 4. – P. 683-692.

164. Beckmann, N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo / N. Beckmann // *Magnetic resonance in medicine*. – 2000. – Vol. 44, №. 2. – P. 252-258.

165. Begley, C. G. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research / C. G. Begley, L. M. Ellis // *Nature*. – 2012. – Vol. 483, №. 7391. – P. 531-533.
166. Bettger, P.J. The association between socioeconomic status and disability after stroke: Findings from the Adherence eValuation After Ischemic stroke Longitudinal (AVAIL) registry/ P.J. Bettger, X. Zhao, C. Bushnell [et al.] // *BMC Public Health*. – 2014. – Vol. 14. – P. 281.
167. Bohlen, M. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination / M. Bohlen A. Cameron, P. Metten [et al.]// *J. Neurosci. Methods*. – 2009. – Vol. 178, № 1. – P. 10-14.
168. Bordi, F. The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat / F. Bordi, C. Pietra, L. Ziviani, A. Reggiani // *Exp. Neurol.* – 1997. – Vol. 145, № 2 (Pt. 1). – P.425-433.
169. Braeuninger, S.G. Focal cerebral ischemia/ S. Braeuninger, C.Kleinschnitz, B.Nieswandt, G.Stol // *Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and Perspectives*. – 2012. – P. 29-42.
170. Brait, V. H. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide / V.H. Brait, K. A. Jackman, A. K. Walduck [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2010. – Vol. 30, № 7. – P. 1306-1317.
171. Brassai, A. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity / A. Brassai, R.G. Suvanjev, E.G. Bán, M. Lakatos // *Brain research bulletin*. – 2015. – Vol. 112. – P. 1-6.
172. Brebner, K. Synergistic effects of interleukin-1, interleukin-6, and TNF- α neuroendocrine, neurochemical and behavioral changes /K.Brebner, S.Hayley, Z.Merali [et al.]// *Neuropsychopharmacology*. – 2000. – Vol. 22. – P. 566-580.

173. Buga, A. M. Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation / A. M. Buga, M. Di Napoli, A. Popa-Wagner // *Biogerontology*. – 2013. – Vol. 14, № 6. – P. 651-662.
174. Burger, D. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells / D. Burger, R. M. Touyz // *Journal of the American Society of Hypertension*. – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 85-99.
175. Cancel, L. M. The role of apoptosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers / L. M. Cancel, J. M. Tarbell // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 208, № 2. – P. 335-341.
176. Cao, L. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition / L. Cao, X. Liu, E. J. Lin D. [et al.] // *Cell*. – 2010. – Vol. 142, № 1. – P. 52-64.
177. Capes, S. E. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients a systematic overview / S. E. Capes, D. Hunt, K. Malmberg [et al.] // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32, № 10. – P. 2426-2432.
178. Caplan, L. R. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke / L. R. Caplan // *N Engl J Med*. – 1999. – Vol. 341, № 16. – P. 1240-1241.
179. Carmichael S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose / S. T. Carmichael // *NeuroRx*. – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. 396-409.
180. Celermajer, D. S. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction / D. S. Celermajer, K. E. Sorensen, C. Bull [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 1994. – Vol. 24, № 6. – P. 1468-1474.
181. Chamorro, A. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease / A. Chamorro, J. Hallenbeck // *Stroke*. – 2006. – Vol. 37, № 32. – P. 291-293.
182. Chen, Y. S. Antidepressant prophylaxis for poststroke depression: a meta-analysis / Y. Chen, N. C. Patel, J. J. Guo, S. Zhan, // *International clinical psychopharmacology*. – 2007. – Vol. 22, № 3. – P. 159-166.

183. Chesler, E. J. Influences of laboratory environment on behavior / E. J. Chesler, S. G. Wilson, W. R. Lariviere [et al.] // *Nature neuroscience*. – 2002. – Vol. 5, № 11. – P. 1101-1102.
184. Ciccone, A. Risk of cerebral haemorrhage after thrombolysis: systematic review of animal stroke models / A. Ciccone, L. Candelise // *Proceedings of the European Stroke Conference, Valencia*. – 2003.
185. Combs, D. J. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol / D. J. Combs, L. G. D'Alecy // *Stroke*. – 1987. – Vol. 18, № 2. – P. 503-511
186. Cook, D.J. Translating promising preclinical neuroprotective therapies to human stroke trials / D.J. Cook, M. Tymianski // *Expert review of cardiovascular therapy*. – 2011. – Vol. 9, № 4. – P. 433-449.
187. Corbett, D. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia / D. Corbett, S. Nurse // *Progress in neurobiology*. – 1998. – Vol. 54, № 5. – P. 531-548.
188. Cottone S., Mulè G., Nardi E. et al. Relation of C-reactive protein to oxidative stress and to endothelial activation in essential hypertension / S. Cottone, G. Mulè, E. Nardi [et al.] // *American journal of hypertension*. – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 313-318.
189. Crusio, W. E. Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice / W. E. Crusio // *Biological psychiatry*. – 2004. – Vol. 56, № 6. – P. 381-385.
190. Crusio, W. E. Standards for the publication of mouse mutant studies / W. E. Crusio, D. Goldowitz, A. Holmes, D. Wolfer // *Genes, Brain and Behavior*. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 1-4.
191. Cummings, J. L. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures/ J. L. Cummings, T. Morstorf, K. Zhong // *Alzheimers Res Ther*. – 2014. – Vol. 6, № 4. – P. 37.

192. Cunningham, P. In sickness, in health and in innovation: NHS DIRECT – a health sector innovation study / P.Cunningham, C.Grant-Pearce, L.Green [et al.] // Administration. – 2005. – Vol. 53, №3. – P.42-65.
193. Damani, S. Characterization of circulating endothelial cells in acute myocardial infarction / S.Damani, A. Bacconi, O.Libiger [et al.] //Science translational medicine. – 2012. – Vol. 4, № 126. – P. 12633-12633.
194. Dandona, P. Thiazolidinediones–improving endothelial function and potential long-term benefits on cardiovascular disease in subjects with type 2 diabetes / P.Dandona, H.Ghanim, A.Chaudhuri, P.Mohanty //Journal of Diabetes and its Complications. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 62-75.
195. Deanfield, J. E. Endothelial function and dysfunction testing and clinical relevance / J. E.Deanfield, J. P.Halcox, T. J. Rabelink //Circulation. – 2007. – Vol. 115, № 10. – P. 1285-1295.
196. DeBow, S. B. Incomplete assessment of experimental cytoprotectants in rodent ischemia studies / S. B.DeBow, D. L.Clark, C. L. MacLellan, F. Colbourne //Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques. – 2003. – Vol. 30, № 04. – P. 368-374.
197. DeVries, A. C. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? / A. C.DeVries, R. J.Nelson, R. J.Traystman, P. D. Hurn //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 325-342.
198. Didion, S. P. Cerebral vascular dysfunction in TallyHo mice: a new model of Type II diabetes / S. P.Didion, C. M.Lynch, F. M. Faraci //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2007. – Vol. 292, № 3. – P. H1579-H1583.
199. Diener, H. C. Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment: Lack at efficacy in a large phase III study with an 8-hour window / H. C. Diener //Stroke. – Vol. 30, № 1. – P. 234-234.

200. Diener, H.C. Lubeluzole in acute ischemic stroke. A double-blind, placebo-controlled phase II trial. Lubeluzole International Study Group / H.C. Diener, W.Hacke, M.Hennerichi [et al.] // *Stroke*. – 1996. – №27. – P. 76-81.
201. Dirnagl, U. J. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance / U. J. Dirnagl, J.Klehmet, J.S. Braun et al. // *Stroke*. – 2007. – Vol. 38(2 suppl). – P. 770-773.
202. Dirnagl, U. Found in translation preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes / U.Dirnagl, M. Endres // *Stroke*. – 2014. – Vol. 45, № 5. – P. 1510-1518.
203. Dirnagl, U. Stroke research at a road block: the streets from adversity should be paved with meta-analysis and good laboratory practice / U.Dirnagl, M. R. Macleod // *British journal of pharmacology*. – 2009. – Vol. 157, № 7. – P. 1154-1156.
204. Donato, A. J. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells / A. J. Donato, R. G. Morgan, A. E. Walker // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2015. – Vol. 89. – P. 122-135.
205. Droge, W. Plasma glutamate concentration and lymphocyte activity / W.Droge, H.P. Eck, M.Betzler [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 1998. – Vol. 114, № 2. – P. 124-128.
206. Dunbar, J. C. Platelet aggregation and disaggregation in the streptozotocin induced diabetic rat: the effect of sympathetic inhibition / J. C.Dunbar, L.Reinholt, R. L.Henry, E.Mammen // *Diabetes research and clinical practice*. – 1990. – Vol. 9, № 3. – P. 265-272.
207. Elkind, M. S. Do common infections cause stroke? / M. S.Elkind, J. W.Cole // *Seminars in neurology*. – 2006. – Vol. 26, № 1. – P. 88-99.
208. England, T. J. Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: a systematic review / T. J. England, C. L. Gibson, P. M. W.Bath // *Brain research reviews*. – 2009. – Vol. 62, № 1. – P. 71-82.

209. Ennis, S. R. Effect of sustained-mild and transient-severe hyperglycemia on ischemia-induced blood–brain barrier opening / S. R.Ennis, R. F. Keep //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2007. – Vol. 27, № 9. – P. 1573-1582.
210. Ergul, A. Hyperglycemia, diabetes and stroke: focus on the cerebrovasculature / A.Ergul, W.Li, M. M.Elgebaly [et al.] //Vascular pharmacology. – 2009. – Vol. 51, № 1. – C. 44-49.
211. Faden, A.I. Opiatereceptor antagonist improves metabolic recovery and limits neurochemical alterations associated with reperfusion after global brain ischemia in rats/ A.I.Faden , R. Shirane, L.H. Chang [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1990. – Vol.255, № 2. – P. 451-458.
212. Fernandez-Real, J. M. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women / J. M.Fernandez-Real, M.Vayreda, C.Richart [et al.] //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2001. – Vol. 86, № 3. – P. 1154-1159.
213. Festing, M. F. W. Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research / M. F. W. Festing //ILAR Journal. – 2014. – Vol. 55, № 3. – P. 399-404.
214. Figtree, G. A. Functional estrogen receptor alpha promoter polymorphism is associated with improved endothelial-dependent vasolidation / G. A.Figtree, T. Guzik, B. G. Robinson [et al.] //International journal of cardiology. – 2010. – Vol. 143, № 2. – P. 207-208.
215. Flint, A. C. Statin use during ischemic stroke hospitalization is strongly associated with improved poststroke survival / A. C. Flint, H.Kamel, B.B. Navi [et al.] //Stroke. – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 147-154.
216. Ford, E.S. Coronary heart disease mortality among young adults in the U.S. from 1980 through 2002: concealed leveling of mortality rates / E.S.Ford, S.Capewell // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – № 50. – P. 2128–2132.
217. Forst, T. Cardiovascular benefits of GLP-1-based herapies in patients with diabetes mellitus type 2: effects on endothelial and vascular dysfunction

beyond glycemic control / T. Forst, M.M. Weber, A.Pfutzner // *Exp Diabetes Res.* – 2012. – T. 2012.

218. Fuchs, V.R. The gross domestic product and health care spending/ V.R. Fuchs // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – № 369. – P.107–109.

219. Garcia, J. H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats Statistical validation / J. H.Garcia, S.Wagner, K. F.Liu, X. J. Hu // *Stroke.* – 1995. – Vol. 26, № 4. – P. 627-635.

220. García-Fernández, R. Endothelial dysfunction in cardiologists after 24 hours on call / R. García-Fernández, J. G. Pérez-Velasco, A. C. Milián [et al.] // *Revista Espanola de Cardiologia.* – 2002. – Vol. 55, № 11. – P. 1202-1204.

221. García-Fernández, R. Estrogen does not prevent endothelial dysfunction caused by cigarette smoking / R.García-Fernández, J. G.Pérez-Velasco, A.Concepcion-Milian [et al.] // *Clinical cardiology.* – 2004. – Vol. 27, № 2. – P. 71-73.

222. Garner, J. P. The significance of meaning: why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it? / J. P. Garner // *ILAR Journal.* – 2014. – Vol. 55, № 3. – P. 438-456.

223. Garner, J. P. Reverse-translational biomarker validation of abnormal repetitive behaviors in mice: an illustration of the 4P's modeling approach / J. P.Garner, C. M.Thogerson, B. D. Dufour [et al.] // *Behavioural brain research.* – 2011. – Vol. 219, № 2. – P. 189-196.

224. Garry, P. S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—From bench to bedside / P. S.Garry, M.Ezra, M. J.Rowland [et al.] // *Experimental neurology.* – 2015. – Vol. 263. – P. 235-243.

225. Gaskill, B. N. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest / B. N.Gaskill, C. J. Gordon, E. A. Pajor [et al.] // *PloS one.* – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. e32799.

226. Gaskill, B. N. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology/ B. N.Gaskill, C. J.Gordon, E. A. Pajor et al. //Physiology & behavior. – 2013. – Vol. 110. – P. 87-95.
227. Gaskill, B. N. Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing / B. N. Gaskill, S. A. Rohr, E. A. Pajor [et al.] //Applied Animal Behaviour Science. – 2009. – Vol. 116, № 2. – P. 279-285.
228. Gimbrone, M. A. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis / M.A. Gimbrone, G. García-Cardena //Circulation research. – 2016. – Vol. 118, № 4. – P. 620-636.
229. Ginsberg, M. D. Hyperglycemia reduces the extent of cerebral infarction in rats / M. D. Ginsberg, R.Prado, W. D. Dietrich [et al.] //Stroke. – 1987. – T. 18. – № 3. – C. 570-574.
230. Gisselsson, D. Hibernomas are Characterized by Homozygous Deletions in the Multiple Endocrine Neoplasia Type I Region: Metaphase Fluorescence in Situ Hybridization Reveals Complex Rearrangements Not Detected by Conventional Cytogenetics / D. Gisselsson, M.Höglund, F.Mertens [et al.] //The American journal of pathology. – 1999. – Vol. 155, № 1. – P. 61-66.
231. Gladstone, D.J. Toward wisdom from failure lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions / D. J. Gladstone, S. E. Black, A. M.Hakim //Stroke. – 2002. – Vol. 33, № 8. – P. 2123-2136.
232. Gordon, T. Menopause and coronary heart disease: the Framingham Study / T. Gordon, W. B. Kannel, M. C. Hjortland [et al.] //Annals of Internal Medicine. – 1978. – Vol. 89, № 2. – P. 157-161.
233. Graham, S.H. Opioid receptor antagonist nalmefene stereospecifically inhibits glutamate release during global cerebral ischemia / S.H. Graham, H. Shimizu, A. Newman [et al.] // Brain Res. – 1993. – Vol. 632, №1-2. –P. 346-350.
234. Grotta J. Lubeluzole treatment of acute ischemic stroke / J. Grotta //Stroke. – 1997. – Vol. 28, № 12. – P. 2338-2346.

235. Grotta, J. Neuroprotection is unlikely to be effective in humans using current trial designs / J. Grotta //Stroke. – 2002. – T. 33. – № 1. – С. 306-307.
236. Grupke, S. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: From review to preview / S.Grupke, J.Hall, M.Dobbs [et al.]//Clinical neurology and neurosurgery. – 2015. – № 129. – P. 1-9.
237. Hachinski, V. Vascular behavioral and cognitive disorders/ V. Hachinski//Stroke. – 2003. – Vol. 34, № 12. – P. 2775-2775.
238. Hackam D. G. Translating animal research into clinical benefit / D. G. Hackam //British Medical Journal. – 2007. – Vol. 7586. – P. 163.
239. Haffner, S.M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction / S.M. Haffner, S. Lehto, T. Ronnemaa [et al.] //N Engl J Med. – 1998. – №339. – P.229-234.
240. Hallenbeck, J. Immunomodulation Strategies for Preventing Vascular Disease of the Brain and Heart / J. Hallenbeck, G. Zoppo, T. Jacobs et al. // Stroke. – 2006. – Vol. 37, №12. – P. 3035-3042.
241. Hanell A. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research /A. Hanell, N. Marklund //Frontiers in behavioral neuroscience. – 2014. – T. 8. – P.252
242. Hanson, E. No evidence for an association between ABO blood group and overall ischemic stroke or any of the major etiologic subtypes / E.Hanson, S.Karlsson, K. Jood et al. //Thrombosis research. – 2012. – Vol. 130, № 3. – P. 339-342.
243. Hantson, L. Therapeutic benefits of lubeluzole in ischemic stroke/ L.Hantson, T. Wessel //Stroke. – 1998. – Vol. 29, № 1. – P. 287-287.
244. Harding, E. J. Animal behaviour: cognitive bias and affective state / E. J. Harding, E. S.Paul, M.Mendl //Nature. – 2004. – Vol. 427, № 6972. – P. 312-312.

245. Hashimoto, M. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle / M.Hashimoto, M.Akishita, M.Eto [et al.]//Circulation. – 1995. – Vol. 92, № 12. – P. 3431-3435.
246. Hay, M. Clinical development success rates for investigational drugs / M. Hay, D. W.Thomas, J. L. Craighead [et al.] //Nature biotechnology. – 2014. – Vol. 32, № 1. – P. 40-51.
247. Hermes, G. L. Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors / G. L.Hermes, B.Delgado, M.Tretiakova [et al.]//Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, № 52. – P. 22393-22398.
248. Hetze, S. Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke / S. Hetze, C.Römer, C.Teufelhart, A.Meisel, O. Engel //Journal of neuroscience methods. – 2012. – Vol. 206, № 1. – P. 7-14.
249. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions / J. Hladovec //Physiologia bohemoslovaca. – 1977. – Vol. 27, № 2. – C. 140-144.
250. Holman, R. R. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering drugs or strategies in type 2 diabetes / R. R.Holman, H.Sourij, R. M. Califf //The Lancet. – 2014. – Vol. 383, № 9933. – P. 2008-2017.
251. Homan, W.P. Studies on the immunosuppressive properties of cyclosporin a in rats receiving renal allografts / W.P. Homan, J.W.Fabre, K.A. Williams [et al.]// Transplantation. – 1980. – Vol. 29, №5. – P. 361-366.
252. Hooijmans, C. R. Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare / C. R.Hooijmans J.IntHout, M.Ritskes-Hoitinga, M. M. Rovers //ILAR Journal. – 2014. – Vol. 55, № 3. – P. 418-426.
253. Horn. J. Calcium antagonists for ischemic stroke a systematic review / J.Horn, M.Limburg //Stroke. – 2001. – Vol. 32, № 2. – P. 570-576.

254. Howells, D. W. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia / D. W. Howells, M. J. Porritt, S. S. Rewell [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2010. – Vol. 30, № 8. – P. 1412-1431.

255. Hudzik, T. J. Long-term functional end points following middle cerebral artery occlusion in the rat / T. J. Hudzik, A. Borrelli, P. Bialobok [et al.] // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2000. – T. 65. – №. 3. – C. 553-562.

256. Hunter, J. Challenges for pharmaceutical industry: new partnerships for sustainable human health / J. Hunter // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2011. – Vol. 369, № 1942. – P. 1817-1825.

257. Hussain, M.S. Research into neuroprotection must continue ... But with a different approach / M.S. Hussain, A. Shuaib // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39, №2. – P. 521-552.

258. Iaci, J.F. Glial growth factor 2 promotes functional recovery with treatment initiated up to 7 days after permanent focal ischemic stroke / J.F. Iaci, A. Ganguly, S.P. Finklestein [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2010. – Vol. 59, №7-8. – P. 640-649.

259. Imrie, H. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction / H. Imrie, A. Abbas, M. Kearney // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2010. – Vol. 1801, № 3. – P. 320-326.

260. Ioannidis, J. P. A. Contradicted and initially stronger effects in highly cited clinical research / J. P. A. Ioannidis // *Jama*. – 2005. – Vol. 294, № 2. – P. 218-228.

261. Ioannidis, J. P. A. Why most published research findings are false / J. P. A. Ioannidis // *PLoS Med*. – 2005. – Vol. 2, № 8. – P. e124.

262. Ishide, T. Neurochemistry within ventrolateral medulla and cardiovascular effects during static exercise following eNOS antagonism /

T.Ishide, C. V.Preuss, T.J.Maher, A.Ally //Neuroscience research. – 2005. – Vol. 52, № 1. – P. 21-30.

263. Iyer, S.S. Mitochondrial cardiolipinis required for Nlrp3 inflammasome activation / S.S. Iyer, Q. He, J.R. Janczy et al. // Immunity. – 2013. – Vol. 39, № 2. – P. 311-323.

264. Jakobsen, J. Quantitative Changes of Cerebral Neocortical Structure in Insulin-Treated Long-Term Streptozocin-Induced Diabetes in Rats / J.Jakobsen, P.Sidenius, H. J. G. Gundersen [et al.]//Diabetes. – 1987. – Vol. 36, № 5. – P. 597-601.

265. Jarajapu, Y. P. R. Myogenic tone and reactivity of cerebral arteries in type II diabetic BBZDR/Wor rat / Y. P. R.Jarajapu, D. L.Guberski, M. B.Grant, H. J. Knot //European journal of pharmacology. – 2008. – Vol. 579, № 1. – P. 298-307.

266. Johansen, J. S. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice /J.S. Johansen, A. K.Harris, D. J.Rychly, A. Ergul //Cardiovasc Diabetol. – 2005. – Vol. 4, № 5. – P. 1-11.

267. Juang, H. T. Using antidepressants and the risk of stroke recurrence: report from a national representative cohort study / H. T.Juang, P. C.Chen, K. L. //Chien BMC neurology. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 1.

268. Kamada, H. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats relation to blood-brain barrier dysfunction / H. Kamada, F.Yu, C.Nito, P. H. Chan //Stroke. – 2007. – Vol. 38, № 3. – P. 1044-1049.

269. Kamel, H. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications / H.Kamel, C.Iadecola //Archives of neurology. – 2012. – Vol. 69, № 5. – P. 576-581.

270. Kaur, H. Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies / H. Kaur, A. Prakash, B. Medhi //Pharmacology. – 2013. – Vol. 92, № 5-6. – C. 324-334.

271. Kemeny, M.E. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression / M.E. Kemeny, M. Schedlowski / M.E. Kemeny // *Brain Behav. Immun.* – 2007. – Vol.21, № 8. – P.1009-1018.

272. Kernan, W. N. Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline for Healthcare PROFESSIONALS From the American Heart Association/American Stroke Association / W. N.Kernan // *STROKE*. – 2015. – Vol. 46, № 2. – P.E54-E54.

273. Kerr, L. R. Effects of social housing condition on the response of the Shionogi mouse mammary carcinoma (SC115) to chemotherapy/ L. R.Kerr, M. S.Grimm, W. A.Silva [et al.] // *Cancer research.* – 1997. – Vol. 57, № 6. – P.1124-1128.

274. Kikano, G. E. Brain perfusion in acute and chronic hyperglycemia in rats / G. E. Kikano, J. C. LaManna, S. I. Harik // *Stroke*. – 1989. – Vol. 20, № 8. – P.1027-1031.

275. Kilbinger, H. GABAergic inhibition of nitric oxide-mediated relaxation of guinea-pig ileum / H.Kilbinger, T.Ginap, D. Erbelding // *Naunyn. Schimiedebergs. Arch. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 359, № 6. – P. 500-504.

276. Kilkenney, C. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines / C. Kilkenney, W. Browne, I. C.Cuthill [et al.] // *British journal of pharmacology.* – 2010. – Vol. 160, №. 7. – P.1577-1579.

277. Kilkenney, C. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals / C.Kilkenney, N.Parsons, E.Kadyszewski et al.// *PloS one.* – 2009. – Vol. 4, № 11. – P.e7824.

278. Kim, A.S. Global Stroke Belt: Geographic Variation in Stroke Burden Worldwide/ A.S.Kim, E.Cahill, N.T. Cheng // *Stroke*. – 2015. – №46. – P.3564-3570.

279. Kimmelman, J. Should preclinical studies be registered? / J.Kimmelman, J. A. Anderson // *Nature biotechnology.* – 2012. – Vol. 30, № 6. – P.488-489.

280. Kimmelman, J. Distinguishing between exploratory and confirmatory preclinical research will improve translation / J.Kimmelman, J. S.Mogil, U.Dirnagl //PLoS Biol. – 2014. – Vol. 12, № 5. – P.e1001863.

281. Kishi, Takuya. Overexpression of eNOS in the RVLM Causes Hypotension and Bradycardia Via GABA Release / Takuya Kishi, Hirooka Sakai Yoshitaka, Koji [et al.] // Hypertension. – 2001. –V.38. –P. 896-890.

282. Klehmet, J., Harms, H., Richter, M., Prass, K., Volk, H. D., Dirnagl, U. Klehmet J. et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial / J. KlehmetHarms, H. Richter, M. Prass [et al.] //Neuroscience. – 2009. – Vol. 158, № 3. – P.1184-1193.

283. Kockx, M. M. The endothelium during cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery / M. M.Kockx, G. R.De Meyer, L. J. Andries [et al.] //Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 1993. – Vol. 13, № 12. – P.1874-1884.

284. Kofler, S. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation / S.Kofler, T.Nickel, W.Michael //Clinical science. – 2005. – Vol. 108, № 3. – P.205-213.

285. Koh, K. K. Combination pravastatin and valsartan treatment has additive beneficial effects to simultaneously improve both metabolic and cardiovascular phenotypes beyond that of monotherapy with either drug in patients with primary hypercholesterolemia / K. K. Koh, S. Lim, H.Choi [et al.] //Diabetes. – 2013. – Vol. 62, № 10. – P.3547-3552.

286. Kokaia, Z. Targeting neuroinflammation for treatment of ischemic stroke / Z. Kokaia //Georgian medical news. – 2015. – № 243. – P.84-87.

287. Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? //Nature reviews Drug discovery. – 2004. – Vol. 3, № 8. – P.711-716.

288. Kontsevaya, A. Economic burden of cardiovascular diseases in the Russian Federation / A.Kontsevaya, A.Kalinina, R. Oganov //Value in Health Regional Issues. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P.199-204.

289. Kotchen, J. M. Impact of female hormones on blood pressure: review of potential mechanisms and clinical studies / J. M.Kotchen, T. A.Kotchen //Current hypertension reports. – 2003. – Vol. 5, № 6. – P.505-512.
290. Kraft, S. A. Effect of hyperglycemia on neuronal changes in a rabbit model of focal cerebral ischemia / S. A. Kraft, C. P. Larson, L. M. Shuer [et al.] //Stroke. – 1990. – Vol. 21, № 3. – P. 447-450.
291. Krause, D. N. Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function / D. N. Krause, S. P. Duckles, D. A.Pelligrino //Journal of applied physiology. – 2006. – Vol. 101, № 4. – P.1252-1261.
292. Krejza, J. Influence of 17-beta-estradiol on cerebrovascular impedance during menstrual cycle in women / J. Krejza, Z.Mariak, A.Nowacka, E. R.Melhem, V. L.Babikian //Journal of the neurological sciences. – 2004. – Vol. 221, № 1. – P.61-67.
293. Krempf, M. Cardiovascular event rates in diabetic and nondiabetic individuals with and without established atherothrombosis (from the REduction of Atherothrombosis for Continued Health [REACH] Registry) / M. Krempf, K. G.Parhofer, P. G.Steg [et al.] //The American journal of cardiology. – 2010. – Vol. 105, № 5. – P.667-671.
294. Kroenke, C. H. Social networks, social support, and survival after breast cancer diagnosis / C. H. Kroenke, L. D. Kubzansky, E. S. Schernhammer [et al.] //Journal of Clinical Oncology. – 2006. – Vol. 24, № 7. – P.1105-1111.
295. Kuzkaya, N. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase / N. Kuzkaya, N. Weissmann, D.G. Harrison, S.Dikalov // J. Biol. Chem. – 2003. – №278. – P.2546-2554.
296. Lakić, D. Economic burden of cardiovascular diseases in Serbia / D.Lakić, L.Tasić, M.Kos //Vojnosanit Pregl. – 2014. – Vol. 71, №2. – P.137–143.

297. Lammert, E. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels / E.Lammert, O.Cleaver, D. Melton //Science. – 2001. – Vol. 294, № 5542. – P.564-567.
298. Leal, J. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European / J. Leal, R. Luengo-Fernández, A. Gray [et al.] //Union. Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27, №13. – P.1610–1619.
299. Lees, K. R. Does neuroprotection improve stroke outcome? / K. R.Lees //The Lancet. – 1998. – Vol. 351, № 9114. – P. 1447-1448.
300. Lees, K. R. Contemporary Outcome Measures in Acute Stroke Research Choice of Primary Outcome Measure / K. R.Lees, P. M.Bath, P. D. Schellinger [et al.] //Stroke. – 2012. – Vol. 43, № 4. – P.1163-1170.
301. Lemon, R. Surveying the literature from animal experiments / R. Lemon, S. B. Dunnett //Bmj. – 2005. – Vol. 330, № 7498. – P.977-978.
302. Lind L. Endothelium-dependent vasodilation is related to the occurrence of cortical brain infarcts at MR imaging / L.Lind, R.Nylander, L.Johansson [et al.] //Clinical physiology and functional imaging. – 2015. – P.1.-4.
303. Liu, J. Y. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus / J. Y Liu., J.Yao, X. M. Li [et al.]//Cell death & disease. – 2014. – Vol. 5, № 10. – P.e1506.
304. Liu, L. Comparison of two rat models of cerebral ischemia under hyperglycemic conditions / L.Liu, Z.Wang, X. Wang [et al.] //Microsurgery. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P.258-262.
305. Liu, Y. The association between health system development and the burden of cardiovascular disease: An analysis of WHO country profiles / Y.Liu, K.Dalal, B. Stollenwerk // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, №4. – P. 61718.
306. Lo, E. H. Mechanisms and challenges in translational stroke research / E. H. Lo, M. M. Ning //Journal of Investigative Medicine. – 2016. – Vol. 64, № 4. – P.827-829.

307. London, A. J. Why clinical translation cannot succeed without failure / A. J.London, J.Kimmelman //eLife. – 2015. – Vol. 4. – P.e12844.
308. Low, C. A. Chronic life stress, cardiovascular reactivity, and subclinical cardiovascular disease in adolescents / C. A.Low, K.Salomon, K. A. Matthews //Psychosomatic medicine. – 2009. – Vol. 71, № 9. – P.927.
309. Low, C. A. Chronic life stress, cardiovascular reactivity, and subclinical cardiovascular disease in adolescents / C. A. Low, K.Salomon, K. A. Matthews //Psychosomatic medicine. – 2009. – Vol. 71, № 9. – P.927.
310. Luna, C. Aging-associated oxidized albumin promotes cellular senescence and endothelial damage / C. Luna, M.Alique, E.Navalmoral //Clinical Interventions in Aging. – 2016. – Vol. 11. – P.225.
311. MacLellan, C. L. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies / C. L.MacLellan, A. M.Auriat, S. C. McGie [et al.]//Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2006. – Vol. 26, № 8. – P.1031-1042
312. Macleod, M. R. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality / M. R.Macleod, H. B.van der Worp, E. S.Sena [et al.] //Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 10. – P.2824-2829.
313. Madden, J. A. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke / J. A. Madden //Neurology. – 2012. – Vol. 79, № 13 Supplement 1. – P.S58-S62.
314. Majid, A. Neuroprotection in stroke: past, present, and future / A.Majid //ISRN neurology. – 2014. – Vol. 2014. – P.1-17.
315. Mak, I. W. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment / I. W.Mak, N.Evaniew, M.Ghert //Am. J. Transl. Res. – 2014. – Vol. 6, № 2. – P.114-118.
316. Mäkimattila, S. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants/

S.Mäkimattila, M. L. Liu, J.Vakkilainen [et al.]//Diabetes Care. – 1999. – Vol. 22, № 6. – P.973-981.

317. Mandosi, E. Endothelial dysfunction markers as a therapeutic target for Sildenafil treatment and effects on metabolic control in type 2 diabetes / E. Mandosi, E.Giannetta, T.Filardi [et al.]//Expert opinion on therapeutic targets. – 2015. – T. 19. – № 12. – P.1617-1622.

318. Matsumoto, K. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function / K.Matsumoto, H.Yoshitomi, J.Rossant, K. S. Zaret //Science. – 2001. – T. 294. – № 5542. – P.559-563.

319. Matsuzawa, Y. Treating coronary disease and the impact of endothelial dysfunction / Y.Matsuzawa, R. R.Guddeti, T. G.Kwon, L. O.Lerman A., Lerman //Progress in cardiovascular diseases. – 2015. – T. 57. – № 5. – P.431-442.

320. McColl, B. W. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice / B. W.McColl, H. V.Carswell, J.McCulloch, K. Horsburgh //Brain research. – 2004. – T. 997. – № 1. – P.15-23.

321. McCuskey, P. A. In vivo and electron microscopic study of the development of cerebral diabetic microangiopathy / P. A. McCuskey, R. S. McCuskey //Microcirculation, endothelium, and lymphatics. – 1984. – T. 1. – № 2. – P.221-244.

322. McDougall, F. Systematic review of the depressive symptoms associated with vascular conditions / F.McDougall, C.Brayne //Journal of affective disorders. – 2007. – T. 104. – № 1. – P.25-35.

323. McLaughlin, K. J. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms / K. J.McLaughlin, J. L.Gomez, S. E.Baran, C. D. Conrad //Brain research. – 2007. – T. 1161. – P.56-64.

324. McManus, R. Ex-Director Zerhouni surveys value of NIH research / R.McManus //nih Record. – 2013. – T. 65. – № 13. – P.6-7.

325. McNeill, E. The role of tetrahydrobiopterin in inflammation and cardiovascular disease/ E. McNeill, K.M.Channon // *Thromb. Haemost.* – 2012. – №108. – P.832-839.
326. McVeigh, G. E. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus / G. E.McVeigh, G. M.Brennan, G. D. Johnston [et al.] // *Diabetologia.* – 1992. – T. 35. – № 8. – P.771-776.
327. McVicar, C. M. Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice / C. M.McVicar, M.Ward, L. M. Colhoun [et al.]// *Diabetologia.* – 2015. – T. 58. – № 5. – P.1129-1137.
328. Meigs, J. B. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study / J. B.Meigs, M. A. Mittleman, D. M. Nathan [et al.] // *Jama.* – 2000. – T. 283. – № 2. – P.221-228.
329. Merz, C. N. B. Psychosocial stress and cardiovascular disease: pathophysiological links / C. N. B.Merz, J.Dwyer, C. K. Nordstrom [et al.]// *Behavioral Medicine.* – 2002. – T. 27. – № 4. – P.141-147.
330. Micha, R. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus a systematic review and meta-analysis/ R.Micha, S. K.Wallace, D. Mozaffarian // *Circulation.* – 2010. – T. 121. – № 21. – P.2271-2283.
331. Miller, V. M. Vascular actions of estrogens: functional implications / V. M.Miller, S. P.Duckles // *Pharmacological reviews.* – 2008. – T. 60. – № 2. – P.210-241.
332. Miller Virginia, M. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications/ M. Miller Virginia, Sue P. Duckles /M. Miller Virginia // *Pharmacological Reviews* – June 2008. – vol. 60 № 2. – P. 210-241
333. Miner, B. G. Ecological consequences of phenotypic plasticity / B. G. Miner, S. E.Sultan, S. G. Morgan [et al.]// *Trends in Ecology & Evolution.* – 2005. – T. 20. – № 12. – P.685-692.

334. Minnerup, J. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives/ J.Minnerup, B. A.Sutherland, A. M.Buchan, C.Kleinschnitz//International journal of molecular sciences. – 2012. – T. 13. – № 9. – P.11753-11772.

335. Minnerup, J. Methodological Quality of Experimental Stroke Studies Published in the Stroke Journal Time Trends and Effect of the Basic Science Checklist / J. Minnerup, V.Zentsch, A.Schmidt [et al.]//Stroke. – 2016. – T. 47. – № 1. – P.267-272.

336. Moore, S. A. Cellular and vessel wall morphology of cerebral cortical arterioles after short-term diabetes in adult rats / S. A. Moore, H. G.Bohlen, M B. Giller [et al.] //Journal of Vascular Research. – 1985. – T. 22. – № 6. – P.265-277.

337. Moretti, A. Pharmacological therapy of acute ischaemic stroke: Achievements and problems / A.Moretti, F.Ferrari, R. F. Villa //Pharmacology & therapeutics. – 2015. – T. 153. – P.79-89.

338. Muhlhausler, B. S. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials/ B. S.Muhlhausler, F. H.Bloomfield, M. W. Gillman //PLoS Biol. – 2013. – T. 11. – № 2. – P.e1001481.

339. Muir, K.W. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial / K.W.Muir, K.R.Lees, I.Ford, S.Davis // Lancet. – 2004. – №363. – P.439-445.

340. Muller, W.E. Piracetam: novelty in a unique mode of action/ W.E.Muller, G.P.Eckert, A.Eckert // Pharmacopsychiatry. – 1999. – №32. – P. 2-9.

341. Münzel, T. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction / T.Münzel, C.Sinning, F.Post [et al.]//Annals of medicine. – 2008. – T. 40, № 3. – C. 180-196.

342. Muresanu, D. F. Cerebrolysin and Recovery After Stroke (CARS) A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Multicenter Trial / D. F.

Muresanu, W. D. Heiss, V. Hoemberg [et al.] // *Stroke*. – 2016. – T. 47. – № 1. – P.151-159.

343. Myers, R. E. Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys: preservation of vision / R. E. Myers, S. Yamaguchi // *Archives of Neurology*. – 1977. – T. 34. – № 2. – P.65-74.

344. Natale, J. A. E. Elevated brain lactate accumulation and increased neurologic deficit are associated with modest hyperglycemia in global brain ischemia / J. A. E. Natale, S. M. Stante, L. G. D'Alecy // *Resuscitation*. – 1990. – T. 19. – № 3. – P.271-289.

345. National Heart Foundation, 2005. The shifting burden of cardiovascular disease in Australia [Electronic resource]. – Режим доступа: http://www.heartfoundation.org.au/sitecollectiondocuments/hf-shifting_burden-cvd_accecons-2005-may.Pdf.

346. Nedergaard, M. Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction / M. Nedergaard // *Brain research*. – 1987. – T. 408. – № 1. – P.79-85.

347. Nedergaard, M. Focal ischemia of the rat brain, with special reference to the influence of plasma glucose concentration / M. Nedergaard, N. H. Diemer // *Acta neuropathologica*. – 1987. – T. 73. – № 2. – P.131-137.

348. Nichols, M. Trends in age specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980–2009 / M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough, M. Rayner // *Eur. Heart J.* – 2013. – Vol. 34, № 39. – P. 3017–3027.

349. Nieuwenhuis, S. Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance / S. Nieuwenhuis, B. U. Forstmann, E. J. Wagenmakers // *Nature neuroscience*. – 2011. – T. 14. – № 9. – P.1105-1107.

350. Nintasen, R. Divergent effects of 17- β -estradiol on human vascular smooth muscle and endothelial cell function diminishes TNF- α -induced neointima formation / R. Nintasen, K. Riches, R. S. Mughal [et al.]

//Biochemical and biophysical research communications. – 2012. – Vol. 420, № 4. – P.828-833.

351. Noyman, I. Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase activity in endothelial cells / I.Noyman, M.Marikovsky, S.Sasson [et al.] //Nitric Oxide. – 2002. – Vol. 7, № 3. – P.187-193.

352. O'Flaherty, M. The decline in coronary heart disease mortality is slowing in young adults (Australia 1976–2006): a time trend analysis/ M.O'Flaherty, S.Allender, R.Taylor [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2012. – Vol.158, №2. – P. 193–198.

353. O'Collins, V. E. 1,026 experimental treatments in acute stroke / V. E. O'Collins, M. R.Macleod, G. A.Donnan [et al.]//Annals of neurology. – 2006. – Vol. 59, № 3. – P.467-477.

354. OECD. Stat Extracts. [Electronic resource] – Режим доступа: <http://stats.oecd.org> (дата обращения: 10.04.2015).

355. Oizumi, X. Impaired response of perforating arteries to hypercapnia in chronic hyperglycemia / X.Oizumi, T.Akasaki, Y.Kouta [et al.] //Kobe Journal of Medical Sciences. – 2006. – Vol. 52, № 1/2. – P.27.

356. Onal, M.Z. Acute ischemic stroke therapy: a clinical overview/ M.Z.Onal, M.Fisher // Eur. Neurol. – 1997. – №38. – P. 141-154.

357. Ovbiagele, B. Potential role of neuroprotective agents in the treatment of patients with acute ischemic stroke / B.Ovbiagele, C.S.Kidwell, S.Starkman, J.L.Saver // Curr. Treat. Options. Neurol. – 2003. – № 5. – P. 367-375.

358. Paljärvi, L. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: quantitative ultrastructural changes in capillaries of rat cerebral cortex / L. Paljärvi, S.Rehncrona, B. Söderfeldt [et al.]//Acta neuropathologica. – 1983. – Vol. 60, № 3-4. – P.232-240.

359. Palmieri, D. Estrogen receptor activation protects against TNF- α -induced endothelial dysfunction / D.Palmieri, P. Perego, D. Palombo //Angiology. – 2014. – Vol. 65, №. 1. – P.17-21.

360. Pasceri, V. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells / V.Pasceri, J. T.Willerson, E. T. H.Yeh //Circulation. – 2000. – Vol. 102, №. 18. – P.2165-2168.

361. Paul, S. M. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge / S. M. Paul, D. S. Mytelka, C.T. Dunwiddieet [et.al.] //Nature reviews Drug discovery. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P.203-214.

362. Perel, P. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review / P. Perel, I.Roberts, E. Sena [et al.]//Bmj. – 2007. – Vol. 334, № 7586. – P.197.

363. Pikula, A. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury framingham study/ A.Pikula, A. S.Beiser, T. C. Chen [et al.]//Stroke. – 2013. – Vol. 44, № 10. – P.2768-2775.

364. Potter, C.M.F. Role of shear stress in endothelial cell morphology and expression of cyclooxygenase isoforms / C.M.F. Potter, M. H.Lundberg, L. S. Harrington [et al.] //Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P.384-391.

365. Pound, P. Where is the evidence that animal research benefits humans? / P.Pound, S.Ebrahim, P.Sandercock [et al.] //BMJ: British Medical Journal. – 2004. – Vol. 328, № 7438. – P.514.

366. Preis, S. R. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study / S. R.Preis, M. J.Pencina, S. J. Hwang [et al.] //Circulation. – 2009. – Vol. 120, № 3. – P.212-220.

367. Prinz, F. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? / F.Prinz, T.Schlange, K.Asadullah //Nature reviews Drug discovery. – 2011. – Vol. 10, № 9. – P.712-712.

368. Psota, M. The causes of changes in coronary heart disease mortality rates using the IMPACT model: A systematic review/ M.Psota, S.Capewell,

M.O'Flaherty, E. Goncalvesova // Cardiology Letters.– 2013. Vol. 22, №6. – P. 449–458.

369. Ransohoff, R. M. Innate immunity in the central nervous system / R. M. Ransohoff, A. Brown //The Journal of clinical investigation. – 2012. – Vol. 122, №. 122 (4). – P.1164-1171.

370. Rask-Madsen, C. Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes / C. Rask-Madsen, G.L.King // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. – 2007. – №3. – P. 46–56

371. Reidy, M. A. Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells / M. A. Reidy, M.Chopek, S.Chao [et al.]//The American journal of pathology. – 1989. – Vol. 134, № 4. – P.857.

372. Richter, S. H. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: a multi-laboratory study / S. H.Richter, J. P. Garner, B.Zipser [et al.] //PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P.e16461.

373. Röther, J. Neuroprotection does not work! / J.Röther //Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 2. – P.523-524.

374. Rydén, L. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary / L. Rydén, E. Standl, M. Bartnik [et al.] //European heart journal. – 2007. – Vol. 28, № 1. – P.88-136.

375. Sacco, R.L. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas:a randomized controlled trial / R.L. Sacco, J.T. DeRosa , Jr.E.C. Haley [et al.] // JAMA. – 2001. – Vol. 285, №13. – P.1719-1728.

376. Saito, A. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia / A. Saito, C. M.Maier, P.Narasimhan [et al.]//Molecular neurobiology. – 2005. – Vol. 31, № 1-3. – P.105-116.

377. Salazar, A. The impact assessment of telematics applications in health care in Europe / A. Salazar, I. Miles // Int. J. Health Care Technol. Management. – 2004. – Vol. 5, № 5/6. – P. 359-377.

378. Salter, K. L. Prevention of poststroke depression: does prophylactic pharmacotherapy work? / K. L. Salter, N. C. Foley, L. Zhu [et al.] // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2013. – Vol. 22, № 8. – P.1243-1251.

379. Samdani, A. F. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia/ A. F. Samdani, T. M. Dawson, V. L. Dawson // *Stroke*. – 1997. – Vol. 28, № 6. – P.1283-1288.

380. Schaller, B. Cerebral ischemia and reperfusion colon; the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy / B. Schaller, R. Graf // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2004. – Vol. 24, № 4. – P.351-371.

381. Schallert, T. Disentangling multiple types of recovery from brain injury / T. Schallert, M.T. Woodlee, S.M. Fleming // *Pharmacology of cerebral ischemia*. – 2002. – Stuttgart: Medpharm scientific publishers. – P. 201-216.

382. Scheller, D. K. Lubeluzole blocks increases in extracellular glutamate and taurine in the peri-infarct zone in rats / D. K. Scheller, M. De Ryck, J. Kolb [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 1997. – Vol. 338, № 3. – P. 243-251.

383. Schellinger, P. D. Assessment of additional endpoints for trials in acute stroke—what, when, where, in who? / P. D. Schellinger, P. M. Bath, K. R. Lees [et al.] // *International Journal of Stroke*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P.227-230.

384. Schipper, H. M. The Impact of Gonadal Hormones on the Expression of Human Neurological Disorders / H. M. Schipper // *Neuroendocrinology*. – 2015. – P. 1-15.

385. Schramm, T. K. Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and nondiabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk a population study of 3.3 million people / T. K. Schramm, G. H. Gislason, L. Kober [et al.] // *Circulation*. – 2008. – Vol. 117, № 15. – P.1945-1954.

386. Scott, S. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS/ S.Scott, J. E.Kranz, J.Cole [et al.] //Amyotrophic Lateral Sclerosis. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P.4-15.

387. Seals, D. R. You're only as old as your arteries: translational strategies for preserving vascular endothelial function with aging / D. R. Seals, R. E.Kaplon, R. A. Gioscia-Ryan //Physiology. – 2014. – Vol. 29, № 4. – P.250-264.

388. Sena, E. S. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy/ E. S.Sena, H. B. Van Der Worp, D. Howells [et al.]//PLoS Biol. – 2010. – Vol. 8, № 3. – P.e1000344.

389. Sena, E. How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? / E. Sena, H. B.van der Worp, D.Howells [et al.] //Trends in neurosciences. – 2007. – Vol. 30, № 9. – P.433-439.

390. Shearman, A. M. Estrogen receptor α gene variation and the risk of stroke/ A. M.Shearman, J. A.Cooper, P. J. Kotwinski [et al.]//Stroke. – 2005. – Vol. 36, № 10. – P.2281-2282.

391. Sherwood, A. Endothelial function and hemodynamic responses during mental stress / A.Sherwood, K.Johnson, J. A.Blumenthal, A. L. Hinderliter //Psychosomatic Medicine. – 1999. – Vol. 61, № 3. – P.365-370.

392. Shmelkov, S. V. Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice / S. V. Shmelkov, A.Hormigo, D. Jing [et al.] //Nature medicine. – 2010. – Vol. 16, № 5. – P.598-602.

393. Sieber, F. E. Diabetic chronic hyperglycemia and cerebral pH recovery following global ischemia in dogs / F. E.Sieber, R. C. Koehler, P. R. Brown [et al.]//Stroke. – 1994. – Vol. 25, № 7. – P.1449-1455.

394. Silver, B. Medical therapy for ischemic stroke / B. Silver, J. Weber, M. Fisher //Clinical neuropharmacology. – 1996. – Vol. 19, № 2. – P. 101-128.

395. Sima, A. A. F. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes/ A. A. F. Sima, H. Kamiya, Z. G. Li //European journal of pharmacology. – 2004. – Vol. 490, № 1. – P.187-197.;
396. Sirén, A. L. Release of proinflammatory and prothrombotic mediators in the brain and peripheral circulation in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats / A. L. Sirén, E. Heldman, D.Doron [et al.] //Stroke. – 1992. – Vol. 23, № 11. – P.1643-1650.
397. Slivka, A. P. Hypertension and hyperglycemia in experimental stroke / A. P. Slivka //Brain research. – 1991. – Vol. 562, № 1. – P.66-70.
398. Son, M. K. Poststroke Depression / M. K. Son //Brain & Neurorehabilitation. – 2015. – Vol. 8, № 2. – P.65-72.
399. Sorge, R. E. Männlicher Schweiß wirkt gegen Schmerzen / R. E.Sorge, L. J. Martin, K. A. Isbester [et al.] //Journal Club Schmerzmedizin. – 2015. – Vol. 4, № 2. – P.117-117.
400. Sozmen, E. G. Models that matter: white matter stroke models / E. G. Sozmen, J. D. Hinman, S. T. Carmichael //Neurotherapeutics. – 2012. – Vol. 9, № 2. – P.349-358.
401. Srivastava, A. K. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review) / A. K.Srivastava //International journal of molecular medicine. – 2002. – Vol. 9, № 1. – P.85-89.
402. Stratmann, B. Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes / B. Stratmann, D. Tschoepe //Diabetes and Vascular Disease Research. – 2005. – Vol. 2, № 1. – P.16-23.
403. Stuckler, D. Population causes and consequences of leading chronic diseases: a comparative analysis of prevailing explanations / D. Stuckler //Milbank Quarterly. – 2008. – Vol. 86, № 2. – P.273-326.
404. Sugimoto, T. CD34+/CD144+ circulating endothelial cells as an indicator of carotid atherosclerosis / T. Sugimoto, N.Hosomi, T.Nezu [et al.]

//Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2015. – Vol. 24, № 3. – P.583-590.

405. Suzuki, M. Neuroprotective effects of YM872 coadministered with t-PA in a rat embolic stroke model / M. Suzuki, M.Sasamata, K.Miyata // Brain Res. – 2003. – Vol. 959. – P. 169-172.

406. Takumida, M. Localization of nitric oxide synthase isoforms (NOS I, II and III) in the vestibular end organs of the guinea pig / M. Takumida, M.Anniko //ORL. – 1998. – Vol. 60, №. 2. – P. 67-72.

407. Tamita K., Katayama M., Takagi T. et al. Newly diagnosed glucose intolerance and prognosis after acute myocardial infarction: comparison of post-challenge versus fasting glucose concentrations / K. Tamita, M. Katayama, T.Takagi [et al.]//Heart. – 2012. – Vol. 98, № 11. – P.848-854.

408. Tarbell, J. M. Shear stress and the endothelial transport barrier / J. M. Tarbell //Cardiovascular research. – 2010. – Vol. 87, № 2. – P.320-330.

409. Teal, P. Effects of repinotan in patients with acute ischemic stroke: phase IIB modified randomized exposure controlled trial / P.Teal, P.Lyden, M.Kaste [et al.] // Cerebrovasc. Dis. – 2005. – №19(suppl. 2). – P. 68.

410. Teal, P. The BRAINS study: safety, tolerability, and dose-finding of repinotan in acute stroke / P.Teal, F.L.Silver, D.Simard // Can. J. Neurol. Sci. – 2005. – № 32. – P. 61-67.

411. Teerlink, T. Oestrogen replacement therapy lowers plasma levels of asymmetrical dimethylarginine in healthy postmenopausal women/ T. Teerlink, S.J/ Neele, S. De Jong [et al.]// Clin Sci (Lond) – 2003. – № 105. –P. 67–71.

412. Tessari, P. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy / P. Tessari, D.Cecchet, A. Cosma [et al.] //Diabetes. – 2010. – T. 59. – №. 9. – C. 2152-2159.

413. Tolosa, E. The premotor phase of Parkinson's disease / E.Tolosa, Y.Compta, C.Gaig //Parkinsonism & related disorders. – 2007. – Vol. 13. – P.S2-S7.

414. Tricklebank, M. D. The possibilities and limitations of animal models for psychiatric disorders/ M. D.Tricklebank, J. P.Garner //RSC Drug Discovery. Royal Society of Chemistry, Cambridge. – 2012. – P.534-557.

415. Turner, R. C. The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success/ R. C.Turner, S. C.Dodson, C. L. Rosen [et al.] //Journal of neurosurgery. – 2013. – Vol. 118, № 5. – P.1072- 1085.

416. Turner, R. C. Neuroprotection for ischemic stroke: moving past shortcomings and identifying promising directions / R. C.Turner, B.Lucke-Wold, N.Lucke-Wold [et al.]//International journal of molecular sciences. – 2013. – Vol. 14, № 1. – P.1890-1917.

417. Turski, L. ZK200775: a phosphonate quinoxalinedione AMPA antagonist for neuroprotection in stroke and trauma/ L.Turski, A.Huth, M. Sheardown [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – № 95. – P. 10960–10965.

418. Tymianski, M. Neuroprotective therapies: Preclinical reproducibility is only part of the problem/ M.Tymianski //Science Translational Medicine. – 2015. – Vol.7, № 299299fs32. – P. 1-3.

419. van der Worp, H. B. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia / H. B. van der Worp, P.de Haan, E.Morrema, C. J. Kalkman //Journal of neurology. – 2005. – Vol. 252, № 9. – P.1108-1114.

420. van der Worp, H. B. Can animal models of disease reliably inform human studies? / H. B.van der Worp, D. W.Howells, E. S.Sena [et al.]//PLoS Med. – 2010. – Vol. 7, № 3. – P.e1000245.

421. Van Steenkiste, C. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension / C. Van Steenkiste, A. Geerts, E.Vanheule [et al.] //Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137, № 6. – P.2112-2124.

422. von Känel, R. Effect of β 2-adrenergic receptor functioning and increased norepinephrine on the hypercoagulable state with mental stress / R. von Känel, P. J. Mills, M. G. Ziegler, J. E. Dimsdale // *American heart journal*. – 2002. – Vol. 144, № 1. – P.68-72.

423. Vos, T. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries / T.Vos, A.D. Flaxman, M. Naghavi // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380, № 9859. – P. 2163–2196.

424. Walker, F. R. Stress as necessary component of realistic recovery in animal models of experimental stroke / F. R.Walker, K. A.Jones, M. J. Patience et al. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2014. – Vol. 34, № 2. – P.208-214.

425. Walton, K. G. Psychosocial stress and cardiovascular disease Part 2: effectiveness of the Transcendental Meditation program in treatment and prevention / K. G.Walton, R. H.Schneider, S. I.Nidich [et al.] // *Behavioral Medicine*. – 2002. – Vol. 28, № 3. – P.106-123.

426. Warboys, C. M. Acute and chronic exposure to shear stress have opposite effects on endothelial permeability to macromolecules / C. M. Warboys, R. E. Berson, G. E. Mann [et al.]// *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2010. – Vol. 298, № 6. – P.H1850-H1856.

427. Warner, D. S. Halothane reduces focal ischemic injury in the rat when brain temperature is controlled / D. S.Warner, P. S.Ludwig, R. Pearlstein, A. D. Brinkhous // *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. – 1995. – Vol. 82, № 5. – P.1237-1245.

428. Weiss, J. M. Effects of coping behavior with and without a feedback signal on stress pathology in rats/ J. M. Weiss // *Journal of comparative and physiological psychology*. – 1971. – Vol. 77, № 1. – P.22.

429. Wenzel, R. R. Взаимодействие симпатической нервной системы с другими прессорными системами при антигипертензивной терапии / R.

R.Wenzel, H. Bruck, A. Mitchell [et al.] //Clin Cardiol – 2001. – №4 – P. 185-192.

430. Willmot, M. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review / M.Willmot, C.Gibson, L.Gray [et al.] //Free Radical Biology and Medicine. – 2005. – Vol. 39, № 3. – P.412-425.

431. Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. CNS / B. Winblad // Drug Rev. – 2005. – №11. – P.169-182.

432. Wirtz, P. H. Changes in plasma lipids with psychosocial stress are related to hypertension status and the norepinephrine stress response / P. H.Wirtz, U.Ehlert, C. Bärtschi [et al.]//Metabolism. – 2009. – Vol. 58, № 1. – P.30-37.

433. Wolfer, D. P. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes / D. P.Wolfer, W. E.Crusio, H. P. Lipp //Trends in neurosciences. – 2002. – Vol. 25, № 7. – P.336-340.

434. Woywodt, A. Circulating endothelial cells and stroke: influence of stroke subtypes and changes during the course of disease / A.Woywodt, S.Gerdes, B. Ahl [et al.] //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2012. – Vol. 21, № 6. – P.452-458.

435. Würbel, H. Behavioral phenotyping enhanced–beyond (environmental) standardization / H. Würbel //Genes, Brain and Behavior. – 2002. – Vol. 1, №. 1. – P.3-8.

436. Würbel, H. Behaviour and the standardization fallacy /H. Würbel //Nature genetics. – 2000. – Vol. 26, № 3. – P.263-263.

437. Würbel, H. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization / H.Würbel, J. P. Garner //NC3Rs. – 2007. – Vol. 9. – P.1-9.;

438. Xu, S. The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy / S.Xu, S. Pan //Medical science monitor basic research. – 2013. – Vol. 19. – P.37-45.

439. Yamori, Y. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans / Y.Yamori, R.Horie, H.Handa [et al.] //Stroke. – 1976. – Vol. 7, № 1. – P.46-53.

440. Yang, L. Economic burden of cardiovascular diseases in China/ L.Yang, M.Wu, B.Cui, J.Xu // Exp. Rev. Pharm. Outcomes Res. – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 349–356.

441. Yee, J. R. Reciprocal affiliation among adolescent rats during a mild group stressor predicts mammary tumors and lifespan / J. R. Yee, S. A.Cavigelli, B.Delgado, M. K. McClintock //Psychosomatic medicine. – 2008. – Vol. 70, № 9. – P.1050-1059.

442. Zahs, K. R. ‘Too much good news’–are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease? / K. R. Zahs, K. H. Ashe //Trends in neurosciences. – 2010. – Vol. 33, № 8. – P.381-389.

443. Zasslow, M. A. Hyperglycemia decreases acute neuronal ischemic changes after middle cerebral artery occlusion in cats / M. A. Zasslow, R. G. Pearl, L. M. Shuer [et al.]/Stroke. – 1989. – Vol. 20, № 4. – P.519-523.

444. Zechariah, A. Combination of tissue-plasminogen activator with erythropoietin induces blood–brain barrier permeability, extracellular matrix disaggregation, and DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice / A.Zechariah, A.ElAli, D. M. Hermann //Stroke. – 2010. – Vol. 41, № 5. – P.1008-1012.

445. Zeiher, A.M. Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of the functional integrity of the endothelium/ A.M. Zeiher, H.Drexler, H.Wollschlaeger, B.Saurbier // J. Am. Coll. Cardiol. – 1989. – V.14. – P.1181-1190.

446. Zijlstra, G.S. Efficacy of a new pulmonary cyclosporine a powder formulation for prevention of transplant rejection in rats / G.S.Zijlstra, J.Wolting, J.Prop [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2009. – Vol. 28, № 5. – P. 486-492.

447. Zivin, J. A. Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism / J. A. Zivin, M.Fisher, U.DeGirolami [et al.] //Science. – 1985. – Vol. 230, № 4731. – P.1289-1292.

448. Zuchner, S. SLITRK1 mutations in trichotillomania / S.Zuchner, M. L.Cuccaro, K. N. Tran-Viet [et al.] //Molecular psychiatry. – 2006. – Vol. 11, № 10. – P.887-887.