

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал  
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

*На правах рукописи*

Поздняков Дмитрий Игоревич

Эндотелиопротекторная активность производных коричной кислоты и  
флавоноидов на фоне ишемии головного мозга

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Воронков Андрей Владиславович

Пятигорск– 2017

## **Оглавление**

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	12
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	30
2.1. Модель церебральной ишемии.....	37
2.2. Методы регистрации скорости мозгового кровотока и оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов.....	37
2.3. Методы оценки антитромботической функции эндотелия.....	38
2.4. Методы оценки противовоспалительной функции эндотелия сосудов.....	42
2.5. Методы оценки антиоксидантной и антирадикальной активности.....	42
2.6. Методы оценки церебропротекторной активности.....	45
2.7. Методы иммуноферментных исследований.....	46
2.8. Методы статистической обработки результатов эксперимента.....	47
ГЛАВА 3. Влияние исследуемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной ишемии головного мозга (фармакологический скрининг).....	48
3.1. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии.....	48
3.2. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии.....	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
ГЛАВА 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединения 4-гидрокси-3,5 – ди-трет-бутилкоричная кислота.....	63

4.1. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на состояние вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	63
4.2. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на агрегационную активность тромбоцитов при АДФ-стимулированной агрегации в условиях фокальной церебральной ишемии .....	65
4.3. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на концентрацию С-реактивного белка в условиях фокальной церебральной ишемии .....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	67
ГЛАВА 5. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на стабильность работы NO-синтазной системы и показатели периферического сосудистого сопротивления и эластичности сосудов у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга .....	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	72
ГЛАВА 6. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на антитромботическую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии .....	74
6.1 Сравнительная оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов на различных моделях агрегации у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии .....	74
6.2 Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на некоторые параметры плазменного гемостаза, активность противосвертывающих систем и уровень фактора фон Виллебранда в условиях фокальной церебральной ишемии .....	80

6.3 Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на скорость образования тромба и продолжительность свертывания крови крыс в условиях фокальной церебральной ишемии.....	84
6.4. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на плазменную концентрацию тромбоксана $A_2$ у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ГЛАВА 7. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ГЛАВА 8. Оценка потенциальных механизмов реализации эндотелиопротекторного действия 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты.....	92
8.1.Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на процессы генерации свободных радикалов и состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	92
8.1.1.Изучение антирадикальной и $Fe^{2+}$ -хелатирующей активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на моделях <i>in vitro</i> .....	92
8.1.2.Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	94
8.2.Изучение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на концентрацию изоферментов NO-синтазной системы и специфических маркеров эндотелиальной дисфункции в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	98

8.3. Оценка церебропротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	100
8.3.1. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на процессы потребления глюкозы и накопления лактата в ткани головного мозга в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	101
8.3.2. Изучение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на концентрацию митохондриальной АТФ-синтетазы и цитохром С оксидазы в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс .....	102
8.3.3. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на степень гидратации и размер зоны некроза головного мозга в условиях фокальной церебральной ишемии .....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	106
ГЛАВА 9. Обсуждение результатов .....	109
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....	119
Список сокращений .....	121
Список литературы .....	124

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Нарушения церебральной гемодинамики занимают одно из лидирующих мест среди причин смертности, первичной инвалидности и утраты трудоспособности населения, приобретая, тем самым, огромную медико-социальную значимость [16, 17]. Статистика показывает неуклонный рост заболеваемости и смертности от цереброваскулярной патологии. Так на 2012 год летальный исход от инсульта зарегистрирован приблизительно в 7,5 млн. случаев, а около 17,5 млн. человек перенесли не фатальный инсульт. Прогноз заболеваемости также неутешителен: к 2020 году уровень летальности от инсульта возрастет до 11,6 млн. случаев в год [22].

Несмотря на широкий спектр медицинских приемов и техник основным методом лечения нарушений мозговой гемодинамики является фармакотерапия. Причем, в современных реалиях актуальным признается направление мультитаргетной терапии цереброваскулярной патологии, что снижает риск полипрагмазии [24]. Фармацевтический рынок, на сегодняшний день, представлен обширным списком препаратов для профилактики и терапии нарушений мозгового кровообращения [28], в том числе и растительного происхождения (препараты Ginkgo Biloba, Vinca Minor и т.д.), которые применяются в клинической практике [115, 210]. Однако, арсенал лекарственных препаратов для терапии цереброваскулярной патологии, в том числе и природного происхождения, по эффективности и безопасности не в полной мере удовлетворяет потребности практикующих специалистов [42, 210].

В этой связи встает вопрос целенаправленного поиска новых терапевтических «мишеней» и фармакологически активных субстанций, способных оказать благоприятное влияние на уровень церебрального кровотока в условиях патологии, с целью их дальнейшего внедрения в практическую деятельность.

## **Степень разработанности темы**

Исследования последних лет показывают возрастающую роль дисфункции эндотелия в патогенезе нарушений мозгового кровообращения [67]. В норме эндотелий сосудов посредством секреции различных биологически активных соединений принимает непосредственное участие в процессах тромбообразования, воспаления, ангиогенеза, вазодилатации и вазоконстрикции. В тоже время эндотелий, являясь лабильной структурой, постоянно подвержен действию неблагоприятных факторов: активных форм кислорода, гипертензии, гликированных белков, воспаления, недостаточности половых гормонов, гиперхолестеринемии и т.д., которые могут способствовать развитию эндотелиальной дисфункции, сопровождаемой снижением выработки эндогенного NO, что в свою очередь активизирует процессы вазоконстрикции, гемостаза, воспаления и гиперпролиферации сосудистой стенки [98].

Поэтому своевременная фармакотерапия эндотелиопротекторами лиц, имеющих один или несколько факторов риска развития дисфункции эндотелия, позволит улучшить течение цереброваскулярной патологии, повысить эффективность лечения и способствовать более благоприятному исходу заболевания [55, 178].

В настоящем установлено положительное эндотелиотропное действие лекарственных препаратов, принадлежащих к различным фармакотерапевтическим группам: ингибиторы АПФ,  $\beta$ -блокаторы, статины, фибраты, антагонисты кальция, тиазидные диуретики и т.д. Однако эндотелиопротекторный эффект данных препаратов является дополнительным (плейотропным), а других высокоэффективных средств с доказанным (исключение составляет сулодексид) эндотелиотропным действием нет [10,178].

Таким образом, актуальной задачей медицинской химии и фармакологии можно считать поиск соединений для лечения и профилактики цереброваскулярной патологии с эндотелиопротекторным действием.

## **Цель исследования**

Оценить наличие у производных коричной кислоты и флавоноидов эндотелиотропного действия и оценить возможность применения данных соединений для фармакотерапии нарушений церебральной гемодинамики.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести фармакологический скрининг в ряду производных коричной кислоты и флавоноидов, с целью установления потенциального эндотелиопротекторного эффекта, с оценкой влияния исследуемых соединений на некоторые показатели вазодилатирующей и антитромботической функций сосудистого эндотелия. Провести оценку зависимости «доза-эффект» для соединения лидера.

2. Изучить влияние соединения-лидера на изменение вазодилатирующей, антитромботической и противовоспалительной функции эндотелия сосудов на фоне ишемии головного мозга.

3. Изучить возможные механизмы эндотелиопротекторного действия соединения-лидера. Установить наличие дополнительного (церебропротекторного) вида фармакологической активности.

## **Научная новизна исследования**

Впервые проведено изучение эндотелиопротекторного действия производных коричной кислоты и флавоноидов в условиях нарушения мозговой гемодинамики. Впервые изучено влияние курсового лечебного введения соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в эффективной дозе на состояние вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной функций эндотелия сосудов при ишемии головного мозга у крыс. Проанализировано влияние данного соединения на степень образования свободных радикалов, процессы ПОЛ и активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты, ферментативные системы синтеза NO, специфические маркеры эндотелиальной дисфункции, а также его церебропротекторные свойства, что позволило выделить соединение, как перспективное для разработки на его основе лекарственного препарата с

эндотелиопротекторной активностью для фармакотерапии нарушения мозгового кровообращения.

### **Реализация и научно-практическая ценность работы**

Полученные результаты, свидетельствующие об эндотелиопротекторном действии 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты делают данное соединение перспективным объектом для дальнейшего изучения с целью создания на его основе эндотелиопротекторного средства с церебропротективным эффектом для терапии повреждения головного мозга ишемического генеза. Полученные в работе результаты используются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, а также при целенаправленном синтезе соединений, обладающих эндотелиопротекторными свойствами.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В ряду исследуемых соединений наиболее выраженным эндотелиопротекторным действием при ишемии головного мозга обладает производное коричной кислоты - 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота. Данное соединение сохраняет вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную функции эндотелия сосудов в условиях недостаточности мозгового кровообращения..

2. Механизм эндотелиопротекторного действия 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты опосредован антиоксидантными свойствами данного соединения, снижением разобщенности NO-синтазной системы, уменьшением концентрации MMP-1, РКС и ассиметричного диметиларгинина.

3. 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная способствует повышению утилизации глюкозы тканью головного мозга, концентрации митохондриальной АТФ-синтазы и цитохром С оксидазы, снижению лактат ацидоза, отека и зоны некроза головного мозга.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

В работе использованы современные методы анализа и высокотехнологичное оборудование. В ходе проведения экспериментальной работы был получен значительный объем статистически обработанных данных, что позволяет судить о степени достоверности полученных результатов. Основные положения диссертационного исследования были доложены на научных конференциях и симпозиумах: 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2016; V международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск, 2016; III Международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», Пятигорск, 2017. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 14 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

## **Методология исследования**

В проведенном исследовании использовался комплексный подход к оценке эндотелиальной функции/дисфункции. Ход исследования соответствовал этическим нормам работы с экспериментальными животными.

Исследование выполнено на современном уровне с использованием необходимого количества биологических моделей, современных методов и оборудования, адекватных поставленным задачам исследования.

## **Личный вклад автора**

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

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 6 глав собственных исследований, обсуждения результатов, общих выводов, научно-практических рекомендаций и библиографического списка, включающего 214 источников, из них 66 отечественных и 148 зарубежных автора. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 14, рисунков –25.

## **ГЛАВА 1. Обзор литературы.**

### **Медико-социальные аспекты нарушений мозгового кровообращения**

По последним литературным и статистическим данным нарушения мозгового кровообращения (НМК) являются одной из ведущих причин летальности и инвалидизации населения. Так в докладе Всемирной Организации здравоохранения по состоянию на 2012 год от сосудистой патологии нервной системы скончалось 17,5 миллионов человек [22]. При этом следует отметить, что 12% от общего числа летальных исходов опосредовано инсультом [16, 17, 22]. В Российской Федерации статистика смертности от цереброваскулярной патологии также неутешительна. РФ занимает восьмое место по уровню летальности от НМК во всем мире, что, безусловно, делает актуальными вопросы профилактики, ранней диагностики и лечения нарушений мозгового кровообращения [16, 17, 18, 20, 32,34, 44].

Ежегодно в РФ регистрируется более 450000 случаев развития НМК, при этом 80% всех случаев приходится на долю ишемического инсульта, причем 35% от общего количества лиц, подверженных НМК, умирают в остром периоде заболевания, а уровень летальности увеличивается на 12-15% к концу первого года реабилитационного периода [14, 16-18]. Инвалидизация после инсульта составляет 3,36 случая на 10000 человек и занимает первое место в структуре общей инвалидности трудоспособного населения. К концу 3-го года, после перенесенного НМК, примерно 55% человек отмечают ухудшение качества жизни, и лишь 20% из них способны вернуться к труду [39]. Проблема рациональной терапии инсульта перестала быть только медицинской и давно приобрела социально-экономический характер. Неуклонный рост показателей смертности, заболеваемости и инвалидизации от НМК предопределяет огромную роль данных состояний в социальной, экономической и политической жизни общества [23, 39, 44]. В этой связи НМК можно считать одной из главных медико-социально-экономических проблем современного общества, а профилактику, раннюю диагностику и

фармакотерапию данных состояний, безусловно, можно считать актуальной задачей современной медицины и фармакологии [16, 17, 20, 43, 48, 81, 91, 106].

### **Этиология и патогенез ишемического инсульта**

В настоящее время выделяют несколько классификаций ишемического инсульта, а именно: классификация TOAST (Trial of org 10172 in acute stroke treatment), GENIC (Etude du profil Genetic de l'infarctus Cerebral), Лозанский регистр инсульта, классификации НИИ неврологии. При этом общепринятой считается классификация TOAST [62].

Данная классификация была разработана Adams H.P. et al. в 1993 году и предполагает наличие 5 патогенетических типов ишемического инсульта [19, 62]:

- кардиоэмболический,
- атеротромбоэмболический,
- лакунарный (вследствие окклюзии мелкого сосуда),
- инсульт другой установленной этиологии,
- инсульт неустановленной этиологии.

Высокий риск ишемического инсульта наблюдается при наличии следующих предрасполагающих факторов: митральный стеноз с фибрилляцией предсердий, фибрилляция предсердий других типов, механические клапанные протезы, тромб в предсердии, дилатационная кардиомиопатия, синдром слабости синусного узла, акинезия участка левого желудочка, инфекционный эндокардит [19, 20, 23, 62].

Причинами развития ишемического инсульта могут служить: гематологические заболевания, гиперкоагуляция, неатеросклеротические васкулопатии (при исключении из возможных причин инсульта атеросклеротических и кардиальных событий) [13, 19, 37, 65].

Таким образом, ишемический инсульт представляет собой гетерогенный синдром.

Последние проведенные экспериментальные и клинические исследования позволяют сделать вывод о не тождественности острой очаговой ишемии (обратимым состоянием) и инфарктом мозга (сформировавшимся очагом некроза). Необратимые изменения в ткани головного мозга происходят при снижении скорости мозгового кровотока до 10-15 мл/100г/мин, что, в определенных условиях, занимает временной промежуток в 5-6 мин с момента острого нарушения церебральной гемодинамики. Поскольку очаг поражения («ишемическое ядро») является морфологически сформированным, данная зона не может являться мишенью терапевтического воздействия. К периферии от «ядра ишемии» сохраняется зона ишемизированной, но функционально и структурно целостной мозговой ткани – зона «ишемической полутени» или «пенумбры». В зоне «ишемической полутени» уровень мозгового кровотока достигает 12-18мл/100г/мин, что, в течении определенного времени, обеспечивает жизнеспособность нейронов с сохранением энергетического метаболизма [16, 32, 44, 63, 106]. Именно зона «пенумбры» является непосредственной мишенью фармакотерапевтического воздействия, поэтому 3–6 часов от момента проявления первых клинических признаков инсульта можно рассматривать в качестве «терапевтического окна», в пределах которого лечебные мероприятия, направленные на ограничение зоны некроза мозговой ткани, могут быть наиболее эффективными и безопасными [164, 165].

В условиях прекращения тока крови к головному мозгу и, как следствие, нарастающей его ишемии, в нейронах запускается каскад сложных патобиохимических реакций («ишемический каскад»), определяющий основные особенности повреждения головного мозга при ишемическом инсульте [17, 187, 202].

Основными элементами «ишемического каскада» повреждения головного мозга являются [4, 14, 26, 34, 41, 60, 62, 74, 213]:

- снижение объемного мозгового кровотока
- глутаматная эксайтотоксичность

- лактат-ацидоз
- сверхсинтез NO и развитие оксидативного стресса
- реакции местного воспаления, отек, повреждение ГЭБ

и эндотелия сосудов микроциркуляторного русла

Снижение мозгового кровотока и, как следствие, уменьшение биосинтеза белка, образование макроэргов (АТФ) вызывают перестройку метаболизма мозговой ткани с аэробного на анаэробный путь утилизации глюкозы. В результате наблюдается повышенное образование лактата, что сдвигает рН внутриклеточной жидкости в кислую сторону. Как итог происходит потеря эластичности клеточной мембраны и ее «разрыхление», что создает среду для ускоренного входа электролитов во внутриклеточное пространство и формирования цитотоксического отека головного мозга и повышения токсичности глутамата [83, 87, 89, 106].

Цитотоксический отек характеризуется неповрежденным гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), сопряженным с дисфункцией систем  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  транспорта веществ через клеточную мембрану, что приводит к усилению тока воды из интерстиция во внутриклеточное пространство паренхимы мозга [6, 14, 48, 85]. В последствии отек головного мозга прогрессирует, отмечается повреждение ГЭБ с выходом белков плазмы в интерстиций. В результате повышается онкотическое давление, что приводит к развитию отека вазогенного типа. В дополнение к нарушению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы во время развития цитотоксического отека имеет место дисфункция системы пор водно-электролитного трансмембранного транспорта - аквапорина-4 [187, 189]. Повышенная сосудистая проницаемость создает условия для накопления в цитозоле ионов кальция, которые в совокупности с повышенным синаптическим выбросом возбуждающих нейротрансмиттеров (глутаминовая кислота) опосредуют глутаматно-кальциевый ишемический каскад повреждения головного мозга. Согласно, сформированной в начале 70-х годов и дополненной в 80-х годах XX века глутаматно-кальциевой теории эксайтотоксичности, глутамат

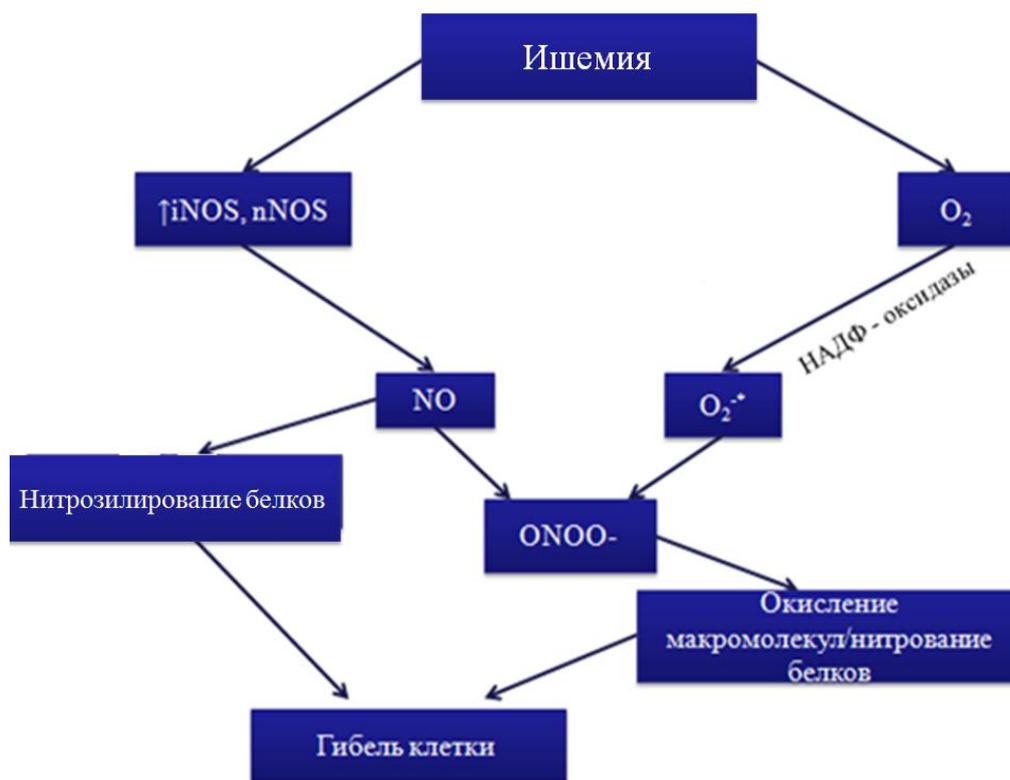
посредством стимуляции GluN2B субъединицы NMDA рецептора вызывает сбой механизмов регуляции кальциевого гомеостаза в клетке (тормозит активность мембранного натрий-кальциевого транспортера) в результате чего возникает внутриклеточная кальциевая перегрузка. Переизбыток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает активацию внутриклеточных, эндонуклеаз, протеинкиназ и фосфолипаз, а также инициирует процесс ПОЛ, что ведет к гибели клетки [60, 66, 75, 88, 124, 138, 187].

Воспалительный каскад, сопровождающий ишемический инсульт, активируется непосредственно сразу после окклюзии сосуда. Нарушение микроциркуляции и изменение реологических свойств крови повышают напряжение сдвига на сосудистом эндотелии. Это приводит к активации на поверхности эндотелия Р-селектина, Е-селектина, молекул межклеточной адгезии, цитокинов, что «замедляет» лейкоциты и повышает степень их адгезии к эндотелиальному слою. Дальнейшая активация коагуляционного каскада создает среду для прогрессирования воспаления. Так тромбин, являясь хемотаксическим фактором для моноцитов и нейтрофилов, посредством активации протеаз и NF $\kappa$ B индуцирует экспрессию молекул адгезии на эндотелиоцитах [110]. Кроме того тромбин способствует активации системы комплемента (активирует С3 и С5 фрагменты), что повреждает эндотелий сосудов и ведет к развитию эндотелиальной дисфункции [74, 110, 200, 209].

Важным элементом «ишемического каскада» является окислительный стресс, сопряженный гиперпродукцией свободных радикалов [33, 146].

Благодаря наличию неспаренных электронов свободные радикалы (СР) проявляют высокую реакционную активность по отношению к макромолекулам, таким как: ДНК, фосфолипиды клеточной мембраны, РНК и белки, инициируя их окисление [146, 209, 212]. Свободные радикалы кислорода (оксиданты) и их производные, образуются в процессе развития ишемического инсульта и включают в себя: супероксид-анион ( $\text{O}_2^-$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ).  $\text{O}_2^-$  образуется в

митохондриях, и приблизительно от 2% до 5% электронного потока используется для его производства [86, 161, 167, 212].



**Рисунок 1. Основные условия для генерации свободных радикалов в условиях ишемического инсульта. [86]**

Кроме генерации СР непосредственно в электронотранспортной цепи, некоторое их количество образуется в результате ферментативных реакций, катализируемых прооксидантными ферментами: ксантин-оксидазами, НАДФН-оксидазами [86, 128, 162].

В конститутивно низкой концентрации оксиданты выступают в качестве сигнальных молекул для регуляции различных функций организма, таких как: регуляция сосудистого тонуса, мониторинг напряжения кислорода и продукция эритропоэтина [86, 115]. Однако гиперпродукция СР способствует инициации клеточного повреждения. При этом выделяют 4 основных пути повреждения клеток, которые через различные эффекторные системы вызывают клеточную гибель, в том числе и эндотелиоцитов сосудов (рис.2).



**Рисунок 2. Основные механизмы повреждения нейронов при ишемическом инсульте, опосредованные инициацией окислительного стресса. [86]**

При этом ведущим механизмом повреждения считается прямое окисление ультраструктур клетки [86].

### **Место эндотелиальной дисфункции в патогенезе нарушений мозгового кровообращения**

Исследования последних 10–15 лет кардинально изменили мнение научного сообщества по вопросу функциональных свойств эндотелия сосудов [3, 7, 39, 47, 59]. По современным представлениям, эндотелий – это не только монослой клеток, обеспечивающий барьерную функцию, но также активный эндокринный орган, играющий решающую роль в управлении вазомоторикой. Посредством секреции вазоактивных соединений (действующих паракринно или аутокринно) сосудистый эндотелий участвует в регуляции проницаемости и тонуса сосудов, гемостатических реакциях, ангиогенезе. При целостном функционировании эндотелий, главным образом, секретирует противосвертывающие, вазодилатирующие и противовоспалительные факторы [39, 178].

В целом, соединения, продуцируемые эндотелиоцитами, можно дифференцировать на следующие группы [55, 178]:

- Вазоконстрикторы и вазодилататоры: монооксид азота (NO), простаглицлин, тромбосаны и эндотелин-1, ангиотензин II, 20-гидроксиэйкозатетраеновая кислота и др.
- Анти/проагреганты: NO, простаглицлин, фактор фон Виллебранда, АДФ, фибронектин, эндотелин-1, тромбоспондин, простаглицлин, тромбосаны и др.
- Пролиферативные факторы: эндотелиальный фактор роста, факторы роста фибробластов и др.
- Противовоспалительные агенты: NO, трансформирующий фактор роста-β, фактор ингибирующий миграцию и др.
- Ферменты: АПФ.

Эндотелий-продуцируемые биологически активные вещества выполняют целый ряд важных физиологических функций направленных на поддержание сосудистого гомеостаза. В физиологических условиях сочетание антиагрегантов и вазодилататоров способствует поддержанию адекватного кровотока, особенно в микроциркуляторном русле, что, безусловно, необходимо для обеспечения адекватной церебральной гемодинамики [39, 104,173, 178].

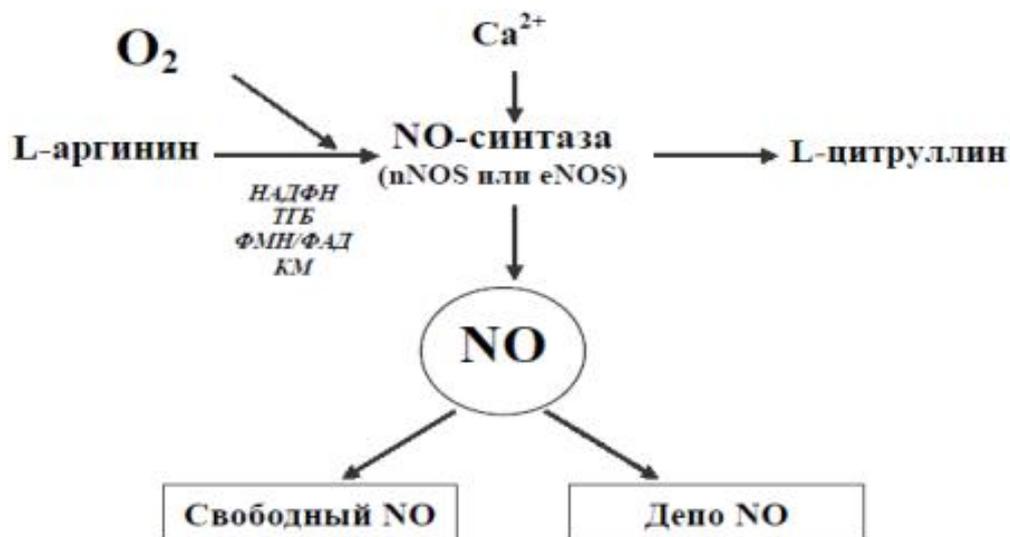
Важным моментом в сосудистой неврологии стало признание концепции дисрегуляции эндотелиальной системы (эндотелиальная дисфункция), как одного из ведущих патогенетических механизмов НМК [47, 67, 188, 197]. Под эндотелиальной дисфункцией (ЭД) – понимается структурно-функциональные изменения в сосудистом эндотелии, выражаемые в сниженной и/или извращенной реакции эндотелия на действие биологически активных соединений, а также нарушение продукции эндотелий-зависимых вазоактивных субстанций и/или извращение их функций [40, 55, 174, 178].

ЭД играет существенную роль в развитии ряда сердечнососудистых патологий, в том числе и социально значимых заболеваний, таких как:

артериальная гипертензия, атеросклероз, ишемический инсульт, сахарный диабет и т.д.[9, 45, 51, 53, 97, 113, 138, 139, 170, 178, 181].

При этом развитию ЭД, в условиях нарушения церебральной гемодинамики, во многом способствуют патофизиологические механизмы, лежащие в основе клеточного повреждения других элементов «ишемического каскада» (глутаматная эксайтотоксичность, отек, воспаление, окислительный стресс), поскольку они носят неизбирательный характер, и могут являться пусковым фактором повреждения эндотелия.

ЭД чаще всего ассоциируют с недостатком NO – ключевого метаболита, опосредующего все функции эндотелия сосудов. Поскольку именно оксид азота является ключевой биомолекулой, формирующей весь спектр функциональной активности эндотелия сосудов, необходимо упомянуть о некоторых, ключевых аспектах его синтеза. Биосинтез NO представляет собой процесс окисления азота аминокислоты L-аргинина (окисляется азот концевой гуанидиновой группы). Данная реакция протекает в присутствии ко-факторов: ФАД, ФМН, НАДФ\*Н и тетрагидробиоптерина [10, 208].



**Рисунок 3. Биосинтез оксида азота. [10]**

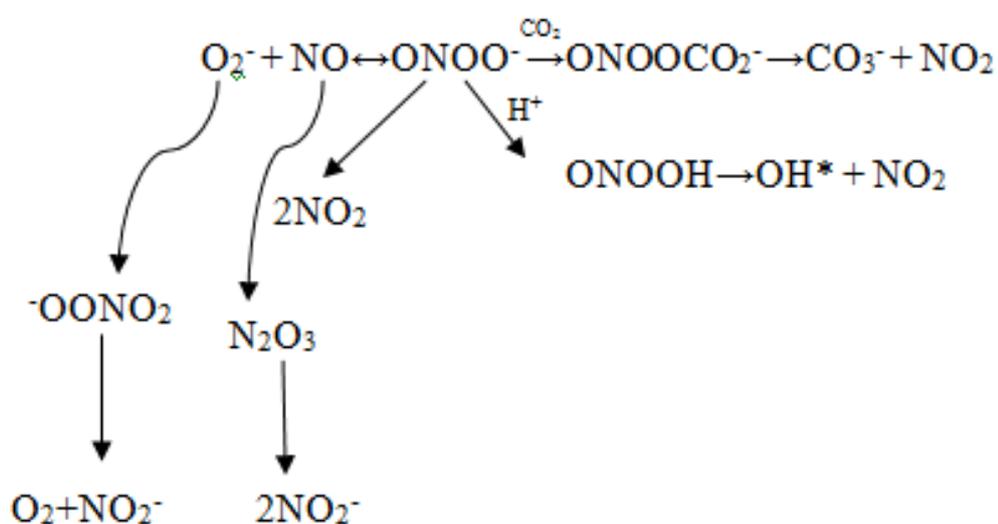
Реакция синтеза NO катализируется семейством ферментов под общим названием NO–синтазы и включает в себя 3 (основные) изоформы:

эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), индуцибельная NO-синтаза (iNOS) и нейрональная NO-синтаза (nNOS) [39, 93]. Активность eNOS и nNOS регулируется внутриклеточным содержанием  $Ca^{2+}$  и образованием комплекса  $Ca^{2+}$ -кальмодулин. Данные изоформы продуцируют незначительное количество NO (наномоли) в ответ на кратковременный стимул [109]. Недостаточная активность eNOS играет более существенную роль в регуляции церебральной гемодинамики, нежели чем дефицит nNOS, поскольку nNOS также функционирует в качестве медиатора и участвует в процессах синаптической пластичности, модуляция нейроэндокринных функций, формировании памяти и поведенческой активности [198]. iNOS активируется на уровне экспрессии и имеет отличные – кальций-независимые пути регуляции, производит большие количества NO, нежели eNOS. iNOS локализуется в эндотелиоцитах, глиальных клетках (астроцитах, олигодендроцитах) [99].

В условиях нарушения мозгового кровообращения оксид азота может играть как положительную, так и отрицательную роль. Ряд экспериментальных исследований показал, что продукция NO в условиях ишемического инсульта может, как способствовать церебропротекции, так и напротив усилить нейрональную гибель [76, 102, 155, 208].

При ишемии головного мозга гиперпродукция NO коррелирует с глутамат-опосредованным ростом внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , что приводит к  $Ca^{2+}$ -кальмодулин зависимой активации eNOS. Дополнительно в условиях ишемии существует механизм ранней экспрессии данного изофермента, что может способствовать значительному выбросу NO и усилить его церебропротекторное действие. Однако, данный эффект кратковременный ( $\approx 1$ ч.) и далее отмечается стойкое угнетение активности eNOS [101, 102]. При этом немаловажно, что сниженная активность eNOS сохраняется в течении, по крайней мере, 10 дней, после острого ишемического приступа. Вслед за этим отмечается вторая волна синтеза NO. Данный процесс происходит при участии индуцибельной изоформы NO-

синтазы и отчасти nNOS, и развивается спустя несколько часов после ишемической атаки и длится до 4-7 дней. Как известно активность nNOS и iNOS в эндотелиоцитах, в условиях физиологической нормы тормозится путем S-нитрозилирования ряда регуляторных белков. В условиях ишемического инсульта происходит денитрозилирование данных структур, что сверхактивирует ферментативные системы (nNOS и iNOS) на продукцию огромных количеств NO (ммоль) [122]. При этом избыток NO вызывает нитрозилирование Fe-S групп белков и нитрирование ДНК, что опосредует первичную цитотоксичность оксида азота. Вторичная цитотоксичность NO, в условиях ишемии головного мозга, тесно связана с развитием оксидативного стресса и образованием пероксонитрита. В частности  $O_2^{\cdot-}$  может реагировать с оксидом азота (NO). В результате данной реакции ( $NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$ ) образуется токсичное соединение – пероксонитрит, который путем активации различных эффекторных систем, а также за счет высокой прямой окисляющей способности (рис.5), приводит к дисфункции многих функционально активных структур, в том числе и эндотелия сосудов [86, 115, 155, 158,159, 171, 181, 197, 212].



**Рисунок 4. Возможные продукты реакции оксида азота и супероксида. [155]**

Период полураспада пероксонитрита короткий ( $\approx 10-20$  мс), но достаточный, чтобы проникнуть через биологические мембраны, что

опосредует его внутриклеточную токсичность. Пероксонитрит, являясь сильным окислителем, повреждает молекулы-мишени посредством двух различных механизмов. Во-первых, пероксонитрит и его протонированная форма - пероксонитритная кислота ( $\text{ONOOH}$ ) (рис.4) могут вызвать прямую окислительную модификацию макромолекул, посредством одно- или двухэлектронных реакций окисления [86]. При этом, лишь несколько химических групп напрямую реагируют с пероксонитритом, что способствует его селективной реакции с основными фрагментами белков, такие как тиолы, цинк-тиолы, железосерные белки, активные центры тирозинфосфатаз. Второй механизм предполагает косвенное окисление при разложении пероксонитрита на высокорекреационные радикалы (рис.4). В то же время имеется и общий путь повреждения, затрагивающий митохондрии (рис.5). Наружная мембрана митохондрий является ключевым звеном в механизме пероксонитрит-опосредованного апоптоза. С наружной стороны мембраны митохондрий располагаются различные проапоптотические сигнальные молекулы, активируемые  $\text{ONOO}^-$ , которые через каспаза-зависимые или каспаза-независимые пути индуцируют апоптоз. Данный процесс ассоциируется с формированием поры на наружной мембране митохондрий, и носит название приходящая митохондриальная проницаемость (ПМП). ПМП является пероксонитрит специфичным механизмом апоптоза. В результате данного процесса повышается проницаемость митохондриальных мембран и происходит их «набухание» с последующей гибелью, что в свою очередь усугубляет, развившуюся ЭД [116, 117, 145, 155, 156, 199]. Кроме того пероксонитрит запускает каскад реакций, приводящих к замыканию цикла его синтеза [152], путем активации AMPK и LKB1-киназы, что приводит к большему фосфорилированию nNOS и iNOS, а следовательно к повышению синтеза NO и пероксонитрита (рис.5) [86, 122, 155, 156, 199].



**Рисунок 5. Механизмы развития и последствия эндотелиальной дисфункции в условиях ишемии головного мозга.**

Гиперпродукция оксида азота и последующая его окислительная перестройка в пероксонитрит, опосредует активацию ряда ферментных систем, в частности матриксной металлопротеиназы-1 и протеинкиназы С [155], а также повышение содержания ассиметричного диметиларгинина (рис.5) [155, 182].

Ассиметричный диметиларгинин является одним из маркеров клеточного повреждения при ишемическом инсульте, при этом концентрация ADMA прямо коррелирует с тяжестью заболевания. ADMA, выступая в качестве конкурентного субстрата для eNOS (проявляет антагонизм по отношению к истинному субстрату – L-аргинину), снижает ее активность, экспрессируя, при этом iNOS, что негативно сказывается на эндотелиальной функции и течении патологического процесса. Также ADMA вызывает утолщение комплекса интима-медиа основных магистральных сосудов,

отвечающих за кровоснабжение головного мозга [182], способствует повышению реактивности церебральных сосудов к действию вазоконстрикторов (при этом системное АД практически не изменяется), что в свою очередь, ведет к ухудшению функционального состояния эндотелия сосудов, и как следствие этого, недостатку кровоснабжения мозговой ткани, и увеличению зоны инфаркта мозга [137, 178, 206].

Матриксная металлопротеиназа-1 относится к проангиогенным факторам, обеспечивающим ремоделирование сосудов и ангиогенез, за счет высвобождения факторов роста, таких как TGF- $\beta$  и VEGF [147]. Кроме того MMP-1 оказывает негативное влияние на состояние сосудистой стенки. Так избыточная активация MMP-1 инициирует биодegradацию коллагена, гиперпродукцию ИЛ-8, усиливая тем самым хемотаксис нейтрофилов. Влияние MMP-1 на регуляцию сосудистого тонуса проявляется усилением вазоконстрикции, посредством активации PAR-1. Разрушение коллагенового матрикса повышает проницаемость сосудов, способствуя развитию отека и нейтрофильной инфильтрации, что вкупе с повышением тонуса сосудов ведет к прогрессу эндотелиальной дисфункции [147, 177].

Протеинкиназа C (PKC) – фермент, входящий в семейство серин/треонин киназ, участвующих в трансдукции сигнала через плазматическую мембрану клетки. В эндотелиоцитах (при условии их повреждения) PKC активируется диацилглицеролом. Активная форма PKC, уменьшает фосфорилирование eNOS, экспрессирует NF $\kappa$ B [149, 152]. В экспериментальных исследованиях доказано, что снижение активности PKC повышает биодоступность NO [9], снижает проявление воспалительной реакции сосудистой стенки, восстанавливает эндотелий-зависимую вазодилатацию на фоне ЭД [149, 180].

Таким образом, пероксонитритопосредованная активация PKC и MMP-1, повышение содержания ADMA, посредством различных механизмов, усугубляет течение ЭД, замыкая «порочный круг» эндотелиальной деструкции.

На основании вышеизложенного можно предположить, что сохранение эндотелиальной функции в условиях ишемического инсульта, способно снизить степень нейронального повреждения, уменьшить некротический очаг, способствовать более мягкому течению заболевания, а также ускорить реабилитационный период, что, несомненно, делает сосудистый эндотелий одной из перспективных фармакотерапевтических «мишеней» для терапевтического воздействия с целью снижения риска развития, профилактики и лечения ИМК. При этом, точками приложения действия фармакологически активных субстанций для коррекции эндотелиальной дисфункции можно считать воздействие на активность изоферментов синтазы оксида азота, матриксной металлопротеиназы-1, протеинкиназы C, а также снижение концентрации ADMA.

### **Медикаментозная коррекция эндотелиальной дисфункции при нарушениях мозгового кровообращения.**

Современная тенденция в области экспериментальных и клинических исследований направлена на поиск веществ с эндотелиопротекторной активностью среди как существующих препаратов, так и среди новых фармакологически активных субстанций.

Методы медикаментозной коррекции ЭД можно классифицировать на 2 вида [178]:

1. Устранения факторов, способствующих повреждению эндотелия (гипергликемия, инсулинорезистентность, артериальная гипертензия, курение и т.д.);
2. Нормализация синтеза и устранение токсичности NO.

При этом в виду сложности и многофазности патогенеза эндотелиальной дисфункции оптимальный терапевтический эффект, как правило, достигается при комбинированной терапии. Эндотелиопротекторные свойства наиболее изучены у лекарственных препаратов, применяемых для фармакотерапии сердечнососудистых заболеваний: сулодексид, иАПФ, блокаторы кальциевых каналов,

антагонисты рецепторов ангиотензина (АТ-1), диуретики (тиазиды и тиазидоподобные),  $\beta$ -блокаторы, фибраты, статины [55, 178].

Возможные механизмы эндотелиопротекторного действия представленных данных групп препаратов приведены в таблице 1.

**Таблица 1**

*Потенциальные механизмы сохранения эндотелиальной функции при применении препаратов для терапии сердечнососудистых заболеваний*

Группа препаратов	Потенциальный механизм эндотелиопротекторного действия
Сулодексид	1. Вазопротекторная, антитромбогенная, фибринолитическая активность 2. Липидокорректирующее действие
иАПФ	1. Отсутствие негативного влияния на пуриновый и липидный обмен. 2. Снижение образования ангиотензина II (индуктор оксидативного стресса), активности кининов. 3. Улучшение эндотелиальной функции (прямое влияние на активность NOS) 4. Антиатерогенное действие 5. Антиоксидантная активность (лизиноприл) 6. Антитромботическая активность
Блокаторы кальциевых каналов	1. Ангиопротекторные и антиатеросклеротические свойства 2. Положительное влияние на показатели тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза. 3. Антиоксидантные свойства
Антагонисты АТ-1 рецепторов	1. Антиоксидантное действие 2. Увеличение концентрации NO, улучшение тонуса резистивных сосудов

	3. Оптимизация функции тромбоцитов
Диуретики	1.Повышение активности eNOS и nNOS 2.Прямой вазодилатирующий эффект, антиоксидантные свойства, повышение биодоступности NO, уменьшение его деструкции. 3.Увеличение базального уровня NO (при комбинированной терапии с иАПФ)
β-блокаторы	1.Снижение симпатического тонуса. 2. Активация NO-синтазы под действием небиволола и карведилола
Фибраты	1.Снижение воспалительной реакции в сосудах, восстановление механическо-барьерной функции эндотелия. 2. Антиоксидантное действие. 3.Положительное влияние на систему гемостаза
Статины	1.Улучшение эластичности сосудистой стенки, уменьшение ее жесткости. 2.Коррекция дислипидемии 3.Антиагрегантное и антиоксидантное действие
Ивабрадин	Активация eNOS
Антиоксиданты (витамины С и Е, N-ацетилцистеин, генистеин)	1. Антиоксидантный эффект 2. Активация eNOS
Ингибиторы фосфодиэстеразы-5	1.Активация eNOS 2. Повышение содержания цГМФ 3. Снижение концентрации эндотелина-1

Как видно из таблицы 1 практически всем представленным лекарственным препаратам в той или иной мере присущи антиоксидантные свойства. В этой связи нами было выбрано направление поиска

потенциальных эндотелиопротекторов в ряду соединений, которые могут оказывать вероятный антиоксидантный эффект.

Экспериментальные исследования последних лет показывают, что мировое научное сообщество все более часто обращает свой взор в сторону природных объектов, поскольку при сопоставимой с их синтетическими аналогами эффективностью, соединения природного происхождения имеют лучший профиль безопасности применения [110]. В этой связи перспективным направлением коррекции ЭД становится применение веществ природного происхождения, к которым относятся флавоноиды и производные коричной кислоты, обладающие антиоксидантной активностью [36, 49, 100, 110, 163, 193].

Флавоноиды обладают обширным спектром фармакологического действия, а именно, оказывают: антиоксидантное, противовоспалительное, цитопротекторное, антиканцерогенное и метаболическое действие, а некоторым представителям данного ряда соединений присущи эндотелиопротекторные свойства [45, 49]. Для коричных кислот также характерна высокая фармакологическая активность [69]. Так для отдельных производных коричной кислоты (феруловая, кофейная кислота) установлена антиоксидантная, противовоспалительная активность [69, 84, 163]. Кроме того для некоторых представителей данного ряда веществ описано антиагрегантное и церебропротекторное (феруловая кислота) действие [38, 127]. Широкий спектр фармакологической активности, а также невысокая токсичность по сравнению с синтетическими препаратами, а также потенциальные эндотелийпозитивные свойства, стали основными критериями выбора исследуемых соединений для включения в экспериментальную работу, предусмотренную настоящим исследованием.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы.

Исследование реализовано на 530 крысах-самцах линии Wistar. Животные были получены из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Во время эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария: температура окружающего воздуха  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , относительная влажность  $65\pm 5\%$ , при естественной смене свето-темнового режима. Все проводимые с животными экспериментальные процедуры, а также их содержание, соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998), а также Приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP), ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96.

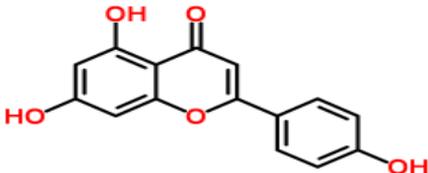
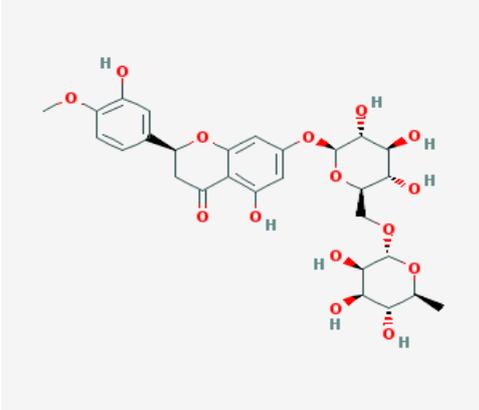
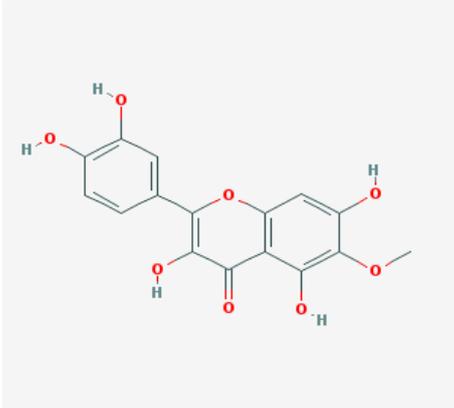
Для размещения крыс применялись макролоновые клетки Т-3 со стальными крышками и кормовым углублением. Подстилочным материалом служили автоклавированные опилки хвойных пород древесины. Кормление проводили в фиксированное время. Водопроводная вода подавалась в питьевых стандартных емкостях (250 мл). Клетки, аксессуары и подстил менялись еженедельно.

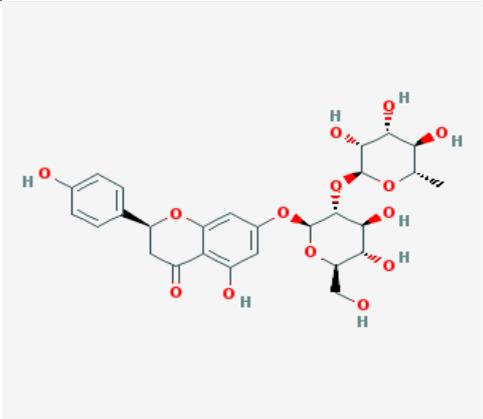
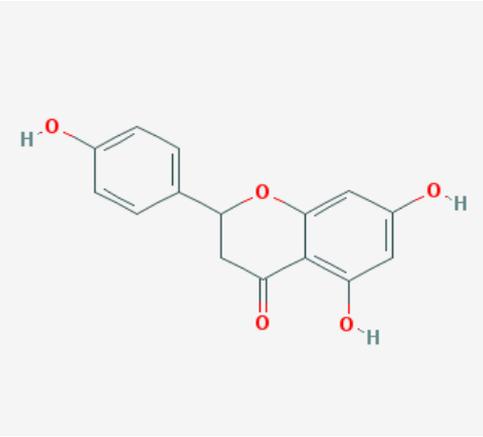
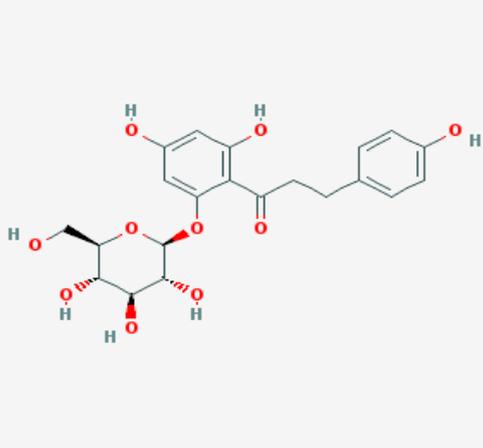
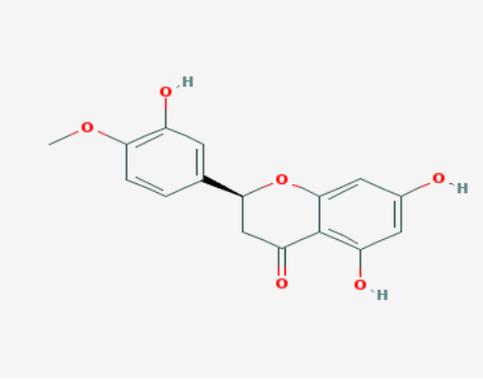
В работе изучено эндотелиопротекторное действие флавоноидов и производных коричной кислоты на фоне ишемии головного мозга. Изучаемые соединения (флавоноиды: апигенин, гесперидин, патулетин, нарингин, нарингенин, флоридзин, гесперетин, икариин; производные коричной кислоты: 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота, р-кумаровая кислота, кофейная кислота, синаповая кислота, коричная кислота) были выделены на кафедре органической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ под руководством профессора, д.ф.н. Оганесяна Э.Т. за что выражаем ему и всем сотрудникам кафедры искреннюю благодарность.

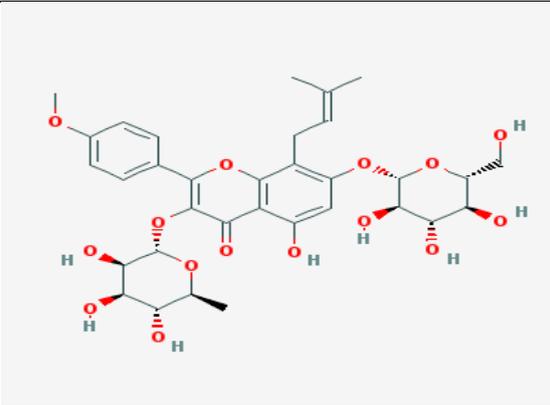
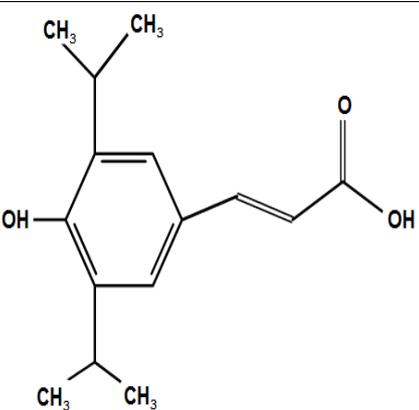
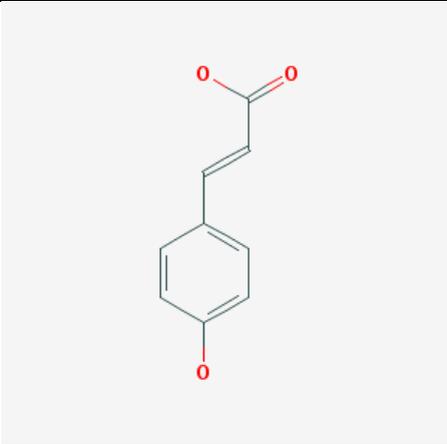
Морин гидрат, катехин гидрат и полифенолы зеленого чая представляли собой коммерческие субстанции производства Sigma-Aldrich (Германия).

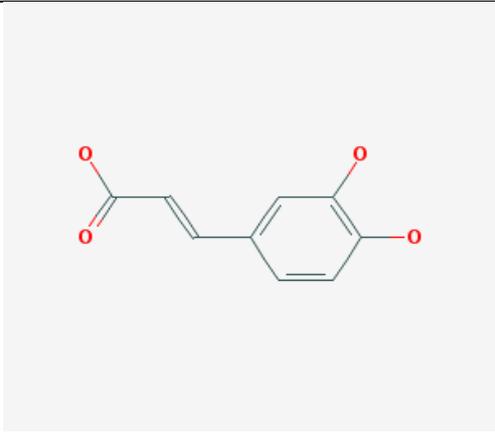
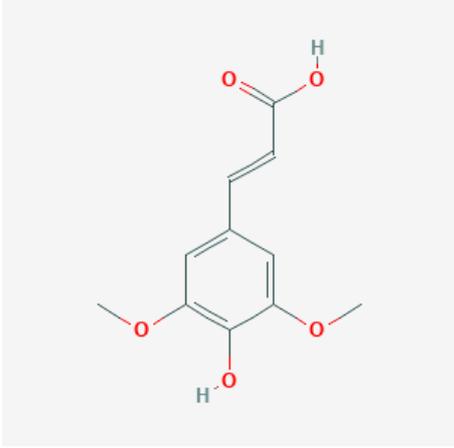
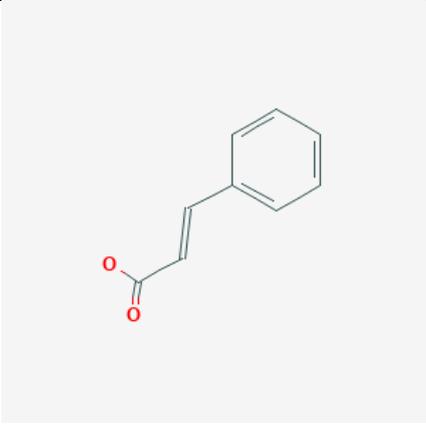
Таблица 2

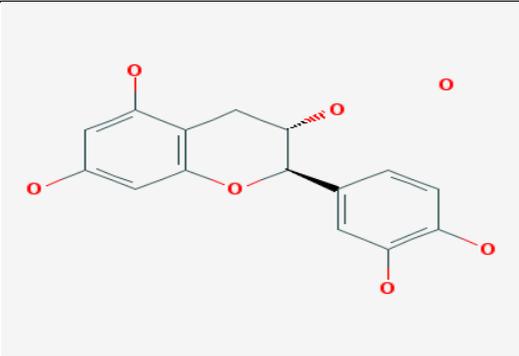
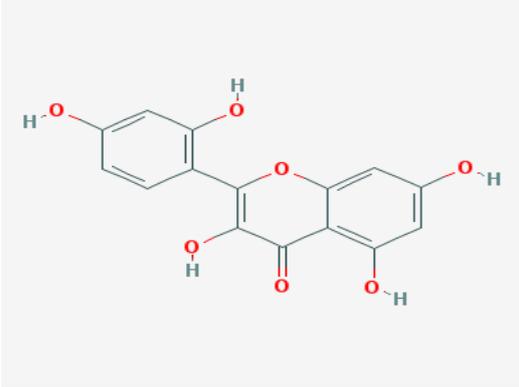
Характеристика исследуемых соединений

Наименование	Химическая формула	Молекулярная масса; г/моль
<b>Выделенные флавоноиды</b>		
<i>Апигенин</i>		257,27
<i>Гесперидин</i>		610,56
<i>Патулетин</i>		332,26

<p><i>Нарингин</i></p>	 <p>The structure shows a flavanone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 2-position and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 3-position. The 3-position is also linked to a glucose molecule via an ether bridge.</p>	<p>580,53</p>
<p><i>Нарингенин</i></p>	 <p>The structure shows a flavanone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 2-position and hydroxyl groups at the 3 and 5 positions of the B-ring.</p>	<p>272,25</p>
<p><i>Флоридзин</i></p>	 <p>The structure shows a flavanone core with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 3-position and a 3-(4-hydroxyphenyl)propyl group at the 4-position. The 3-position is also linked to a glucose molecule via an ether bridge.</p>	<p>436,41</p>
<p><i>Гесперетин</i></p>	 <p>The structure shows a flavanone core with a 4-methoxyphenyl group at the 2-position and hydroxyl groups at the 3 and 5 positions of the B-ring.</p>	<p>302,28</p>

<p><i>Икариин</i></p>		<p>676,66</p>
<p align="center"><b>Производные коричной кислоты</b></p>		
<p><i>4-гидрокси-3,5-ди- трет-бутилкоричная кислота</i> Лабораторный шифр - АТАСL</p>		<p>273</p>
<p><i>p-Кумаровая кислота</i></p>		<p>164,16</p>

<p><i>Кофейная кислота</i></p>		<p>180,16</p>
<p><i>Синаповая кислота</i></p>		<p>224,21</p>
<p><i>Коричная кислота</i></p>		<p>148,17</p>
<p><b>Коммерческие субстанции производства Sigma-Aldrich (Германия)</b></p>		
<p><i>Полифенолы зеленого чая. Лабораторный шифр – PGT (серия: 10011164733)</i></p>	<p>Представляют собой комплекс соединений фенольной структуры</p>	

<p><i>Катехин гидрат</i> (серия:101274983)</p>		<p>290,27</p>
<p><i>Морин гидрат (серия: 1001444294)</i></p>		<p>302,24</p>

**Этапы проведения исследования:**

1. Проведение фармакологического скрининга, с целью выявления наиболее активного соединения в ряду изучаемых веществ.
2. Углубленное изучение соединения-лидера на предмет наличия эндотелиопротекторного действия на фоне ишемии головного мозга (изучение влияния соединения лидера на вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную функции сосудистого эндотелия). Определение зависимости «доза-эффект» соединения-лидера;
3. . Выяснение потенциального механизма действия соединения-лидера. Проведение дополнительного блока исследований (оценка церебропротекторной активности соединения-лидера).

При проведении фармакологического скрининга все исследуемые соединения вводились *per os* в дозе 100 мг/кг [Kumar S, et.al 2013., Wang, X, et.al. 2014] по истечении 3-х часов с момента оперативного вмешательства и ежедневно на протяжении 3-х дней (табл.3). В качестве препаратов сравнения на данном этапе исследования, а также на этапе углубленного изучения эндотелиопротекторного действия соединения-лидера выступали: сулодексид

– комбинация гепариноида с дерматан сульфатом (Вессел Дуэ Ф, Alfa Wasserman, Италия, серия: 14520), в дозе 30 ЕВЛ/кг; мексидол (Фармасофт, РФ, серия:080415) – 30 мг/кг, тиоктовая кислота («Октолипен», Фармстандарт-Лексредства, РФ, серия: 200615) в дозе 50 мг/кг (мексидол и тиоктовая кислота - аналоги по предполагаемому механизму действия; сулодексид – препарат с доказанным эндотелиопротекторным действием) [9, 29, 31].

**Таблица 3**

**Дизайн исследования**

Ложнооперированные животные (n=10)	Группа крыс НК (n=10)	Группы крыс, получавшие препараты сравнения (n=10)	Группы крыс, получавшие исследуемые соединения (n=10)
Применялись все последовательные процедуры за исключением термокоагуляции средней мозговой артерии	Моделирование фокальной ишемии		
Экспозиция 72 часа	Экспозиция 3 часа		
	Введение бидистиллированной воды в эквивалентном количестве	Введение препаратов сравнения и исследуемых соединений	
	Экспозиция 72 часа (препараты сравнения и исследуемые соединения вводились ежедневно)		
Регистрация показателей			

При проведении оценки антиоксидантных свойств соединения - лидера препаратами сравнения служили: мексидол (Фармасофт, РФ, серия:080415) в

дозе 30 мг/кг и тиоктовая кислота («Октолипен», Фармстандарт - Лексредства, РФ, серия: 200615) в дозе 50 мг/кг [29, 31].

Церебропротекторная активность соединения–лидера оценивалась в сравнении с мексидолом (Фармасофт, РФ) – 30 мг/кг и тиоктовой кислотой («Октолипен», Фармстандарт - Лексредства, Россия) – 50 мг/кг, кавинтоном (Гедеон Рихтер, Венгрия, серия: А71067А) – 3,2 мг/кг. В качестве растворителя использовали бидистиллированную воду [29, 31, 38].

## **2.1. Модель церебральной ишемии**

### *Модель фокальной ишемии головного мозга крыс*

У наркотизированных хлоралгидратом крыс (350 мг/кг, Acros Organics, серия: А035219) выстригали участок 2 см<sup>2</sup> правее и ниже глаза. Делали надрез на коже. Разделяли мышцы и удаляли отросток скуловой кости. Специальным бором высверливали трепанационное отверстие над зоной перекрестия обонятельного тракта и средней мозговой артерии. Далее производили коагуляцию пережиганием средней мозговой артерии под местом пересечения обонятельного тракта и средней мозговой артерии. Мягкие ткани восстанавливали, осуществляли репозицию костных обломков. Рану обрабатывали 5% раствором йода. До пробуждения животных оставляли под согревающей лампой. В послеоперационном периоде животных переводили на мягкормовую диету [38].

## **2.2. Методы регистрации скорости мозгового кровотока и оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов**

Скорость мозгового кровотока регистрировали на ультразвуковом доплерографе датчиком с частотой 25МГц (УЗОП-010-01) и программным комплексом «Minimax Doppler» (1.7.), производства компании «Минимакс» (Санкт–Петербург, Россия). Оценку церебральной гемодинамики проводили в теменной области головного мозга животных в проекции средней мозговой артерии. Для чего в правой теменной кости животного бором высверливали трепанационное отверстие, периодически охлаждая поверхность раствором

0,9% натрия хлорида. В качестве контактной среды использовали гель «Унигель».

Изменение *вазодилатирующей функции* сосудистого эндотелия оценивали, анализируя скорость мозгового кровотока при введении эндотелий-специфичных анализаторов (модификация синтеза NO). В качестве модификаторов синтеза монооксида азота использовали: ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия: A11040712), L-аргинин в дозе 150 мг/кг (Panreas, серия: 143464.1208), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 15 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия: 1413116). Эндотелий-независимую вазорелаксацию оценивали по реакции сосудов на введение нитроглицерина (НТГ, Биомед, Россия, серия: 300215) 0,007 мг/кг. Последующее введение анализатора осуществляли по восстановлению уровня мозгового кровотока. Для оценки стабильности работы NO-синтазной системы определяли изменение скорости мозгового кровотока в ответ на последовательное 10-ти кратное введение АЦХ в указанной дозе. Все используемые тест-системы вводились внутривенно в левую бедренную вену, непосредственно в процессе регистрации кровотока. Дополнительно производили оценку степени изменения индексов периферического сосудистого сопротивления (индекс Пурсело) и эластичности сосудов (индекс Гослинга). После выполнения всех необходимых манипуляций животные выводились из эксперимента декапитированием, до выхода из наркоза [53].

### **2.3. Методы оценки антитромботической функции эндотелия**

#### **Исследование агрегации тромбоцитов**

Анализ агрегационной активности кровяных пластинок производили на агрегометре «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», РФ), методом G.Vorn в модификации Габбасова [11, 80]. При постановке эксперимента в измерительную кювету агрегометра помещали 0,3 мл плазмы, термостатировали при температуре 37°C в течение 3-х минут. После

инкубации добавляли индукторы агрегации: АДФ в конечной концентрации 5 мкМ, коллаген в конечной концентрации 1 мг/мл и ристомидин в конечной концентрации 15 мг/мл (все индукторы производства НПО «РЕНАМ», набор «АГРЕНАМ», серия:1115). Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали в течении пяти минут. По полученным агрегатограммам определяли степень и скорость агрегации кровяных пластинок. Для удобства интерпретации полученных данных нами был введен поправочный коэффициент равный 0,1.

#### **Анализ коагуляционного звена гемостаза**

Влияние исследуемых соединений на коагуляционный компонент гемостаза оценивали с использованием системы анализатора гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701». При этом регистрировались следующие показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, серия:1913), тромбиновое время (ТВ, серия:3915), концентрация фибриногена (серия:3815) (реактивы производства НПО «РЕНАМ»). Для калибровки прибора и при проведении тестов использовалась калибровочная плазма НПО «РЕНАМ». Лиофилизированные реактивы хранились с соблюдением условий температурного режима и готовились *ex tempore*. Все тесты проводились на бедной тромбоцитами плазме, получаемой центрифугированием образцов цитратной крови крыс в режиме 3000 об/мин/15 минут. Ход анализа строго соответствовал инструкции, прилагаемой к каждому набору.

#### **Определение активности фактора фон Виллебранда**

Активность фактора фон Виллебранда (FW) определяли агглютинационным методом. К разведенной имидазоловым буфером (1:5) плазме (50 мкл) добавляли 50 мкл Виллебранд–реактанта. В проходящем свете на темном фоне при непрерывном покачивании предметного стекла регистрировали время от момента добавления Виллебранд-реактанта до начала появления агглютинации и по калибровочному графику определяли активность FW в %. (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия:6515)

## **Определение концентрации растворимых–фибриномономерных комплексов (РФМК)**

Метод основан на оценке времени появления в исследуемой плазме хлопьев фибрина после добавления в нее о-фенантролина. Скорость их образования зависит от концентрации РФМК. К 100 мкл исследуемой плазмы добавляли 100 мкл 0,78% раствора о-фенантролина. В проходящем свете на темном фоне регистрировали время от момента добавления о-фенантролина до начала появления первых хлопьев. Количество РФМК оценивали по таблице зависимости их концентрации от времени образования первых хлопьев (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия:3416).

## **Определение концентрации Д-димеров коллагена**

25 мкл исследуемой плазмы вносили в одноразовую кювету. По достижении плазмой тестовой зоны регистрировали интенсивность образующейся окраски и по зависимости концентрации Д-димеров от интенсивности полученной окраски определяли их концентрацию (наборы реактивов производства VedaLab, Франция. серия:01036-04).

## **Определение активности системы протеина С**

Принцип метода основан на активации эндогенного протеина С под действием фракции яда щитомордника (*Agkistrodon contortrix contortrix*), что удлиняет время свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). При проведении анализа определяли следующие показатели: АЧТВ плазмы-калибратора без активатора; АЧТВ плазмы-калибратора с активатором; АЧТВ исследуемой плазмы без активатора; АЧТВ исследуемой плазмы с активатором. Все тесты проводили по описанной выше методике для определения АЧТВ. Результаты определения активности системы протеина С принято выражать в виде Нормализованного отношения (НО).

$$НО = \frac{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{больн}}{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{калибр}} \times НО_{калибр}$$

Где НО калибр - Нормализованное Отношение плазмы-калибратора, указанное в паспорте на набор (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия:3016).

### **Определение активности системы антитромбина–III**

В пробирку вносили 100 мкл исследуемой плазмы (или плазмы калибратора), добавляли 100 мкл рабочего раствора тромбина. Инкубировали при 37<sup>0</sup>С 3 минуты. Затем добавляли 100 мкл рабочего раствора хромогенного субстрата, инкубировали 2 минуты при аналогичном температурном режиме. В кювету спектрофотометра переносили полученную ранее смесь, добавляли 1 мл 50% раствора уксусной кислоты и измеряли абсорбцию полученной смеси при длине волны 405нм (кювета сравнения содержит 1,5 мл 50% раствора уксусной кислоты). По калибровочному графику определяли активность АТ–III в исследуемом образце (набор реактивов НПО «РЕНАМ», серия: 0316)

### **Модель Fe–индуцированного артериального тромбоза (определение скорости образования тромба)**

Артериальный тромбоз воспроизводили по методике предложенной Kurz K.D [Kurz K.D, 1990]. На предварительно изолированную сонную артерию накладывали ватный диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (III). Контроль скорости кровотока проводили доплерографическим методом. Критерием остановки эксперимента служило полное прекращение кровотока в сонной артерии.

### **Определение продолжительности свертывания крови**

Продолжительность свертывания крови определяли на механическом коагулографе «Н-334». По полученным коагулограммам определяли начало, конец и продолжительность свертывания крови.

### **Определение количества тромбоцитов в крови**

Количество тромбоцитов в крови определяли с использованием системы ветеринарного автоматического гематологического анализа ВС 2800vet (Mindray).

## **2.4. Методы оценки противовоспалительной функции эндотелия сосудов.**

### **Определение концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови**

Содержание С-реактивного белка (СРБ, серия:079) в сыворотке крови проводили методом латекс – агглютинации с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+».

### **Определение содержания лейкоцитов в крови**

Количество лейкоцитов в крови определяли с использованием системы ветеринарного автоматического гематологического анализа ВС 2800vet (Mindray).

## **2.5. Методы оценки антиоксидантной и антирадикальной активности**

### **Определение концентрации диеновых конъюгатов**

Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) ацилгидроперекисей жирных кислот в гомогенате головного мозга проводили спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-56) при 233 нм. ДК извлекали смесью гептан:изопропанол (1:1). Концентрация ДК рассчитывалась по молярному коэффициенту экстинкции ( $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) конъюгированных диенов при 233 нм и выражали в нмоль /мг белка [12]. Содержание белка определяли по методу Фолина. Гомогенат головного мозга готовили на 100мМ трис-НСl буфере (рН 7,4 в соотношении 1:7).

### **Определение концентрации малонового диальдегида**

Определение содержание малонового диальдегида (МДА) проводили в гомогенате головного мозга спектрофотометрическим методом. Данный метод основан на образовании окрашенного продукта реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой, имеющего максимум поглощения при 532 нм. Окраска раствора пропорциональна концентрации малонового диальдегида. Количество МДА рассчитывали по величине молярного коэффициента экстинкции ( $1,56 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), полученные результаты выражали в нмоль/мг белка [46]. Содержание белка определяли по методу Фолина.

### **Определение активности каталазы**

Активность каталазы определяли в супернатанте гомогената головного мозга спектрофотометрическим методом по скорости разложения пероксида водорода. Количество пероксида водорода определяли в реакции с 4% раствором аммония молибдата при 410 нм. Активность каталазы определяли как разность экстинкции опытной и холостой пробы, применяя коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода, равный  $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и выражали в нмоль/мин/мг белка [30]. Содержание белка определяли по методу Фолина. Супернатант головного мозга получали центрифугированием гомогената (см. выше) на холоду в режиме - 1000g/10 мин.

### **Определение активности супероксиддисмутазы**

Активность СОД определяли в супернатанте гомогената головного мозга в реакции терминации образования формазана п-нитротетразолия хлорида (НТХ). НТХ использовали как индикатор  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , а его восстановленную форму (формазан) растворяли в ацетоне. Для генерации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  использовали систему, содержащую  $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  раствора рибофлавина,  $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  раствора ТМЭДа в 0,05 M К-фосфатном буфере (рН 7,8) при воздействии дневного света на расстоянии 20 см в течение 5 мин при комнатной температуре. Для извлечения СОД из клеточных органелл использовали 0,5% раствор дезоксихолата. Реакцию терминировали добавлением ацетона и 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли на КФК-3 при 440 нм. Активность СОД выражали в ед. акт/мг белка [61]. Содержание белка определяли по методу Фолина.

### **Определение активности глутатионпероксидазы**

Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли в супернатанте гомогената головного мозга в сопряженной глутатионредуктазной реакции по убыли НАДФН. Активность регистрировали в среде, содержащей  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  ЭДТА, 50мМ К,Na-фосфатный буфера, рН 7,4; 1 ед. акт./мл глутатионредуктазы;  $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  НАДФН;  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  GSH; 30-60 мкг белка на 1

мл среды на КФК-3 при 340 нм. Реакцию начинали добавлением субстрата (гидропероксид кумола -  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) и проводили при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ . Активность ГП выражали в ед. акт /мг белка [114, 160]. Содержание белка определяли по методу Фолина.

### **Определение антирадикальной и хелатирующей активности**

#### *Анти-NO-радикальная активность.*

Натрия нитропруссид, как известно, разлагается в водном растворе, высвобождая  $\text{NO}^{\bullet}$ . В аэробных условиях,  $\text{NO}^{\bullet}$  реагирует с кислородом образуя нитрат и нитрит, количество которых может быть определено с помощью реактива Грисса. 2 мл 10 мМ нитропруссид натрия добавляли к 0,5 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и смешивали с 0,5 мл раствором исследуемого соединения. Затем смесь инкубировали при  $25^{\circ}$ . После 15 мин инкубации аликвоту в 0,5 мл смешивали с 0,5 мл реактива. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность полученного раствора при 546 нм. Далее производили расчет процента ингибирования синтеза  $\text{NO}^{\bullet}$  по формуле:  $\text{NO}^{\bullet} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$ , где  $A_0$  - экстинкция до реакции,  $A_1$  экстинкция после реакции с реактивом Грисса.

#### *Анти- $\text{O}_2^{-*}$ -радикальная активность.*

Исследование проведено по методу Winterbourne. Реакционная среда содержала 0,1 мл 1,5 мМ раствора нитро-синего тетразолия, 0,2 мл ЭДТА (0,1 М), 0,05 мл рибофлавина (0,12 мМ) и 2,55 мл фосфатного буфера (рН 7,4). Реакционную смесь инкубировали при  $25^{\circ}$  в течение 5 минут и измеряли оптическую плотность полученных растворов при 560 нм. Процент ингибирования рассчитывали по формуле  $\text{O}_2^{-*} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$ , где  $A_0$  - экстинкция контрольной пробы,  $A_1$  - экстинкция опытной пробы.

#### *Fe<sup>2+</sup>-хелатирующая активность.*

Принцип основан на образовании комплекса о-фенантролина с  $\text{Fe}^{2+}$  и его разрушение в присутствии хелатирующих агентов. Реакционную смесь, содержащую 1 мл 0,05% о-фенантролина в метаноле, 2 мл хлорида железа

(200 мкм) и 2 мл раствора исследуемого соединения инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность полученного раствора при 510 нм. Процент ингибирования рассчитывали по формуле  $Fe^{2+} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$ , где  $A_0$  - экстинкция контрольной пробы,  $A_1$  - экстинкция опытной пробы [73].

## **2.6. Методы оценки церебропротекторной активности**

### **Определение степени потребления глюкозы головным мозгом**

Степень потребления глюкозы тканью головного мозга оценивали по артериоло-венозной разнице концентрации глюкозы. Артериальную кровь забирали из общей сонной артерии. Венозную кровь получали из венозного сагиттального синуса крыс.

Содержание глюкозы в сыворотке крови определяли ферментативным фотометрическим тестом с использованием набора реактивов «DiaSys» (серия: 06022017) на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray).

### **Определение концентрации лактата в сыворотке крови**

Определение лактата в сыворотке крови проводили энзиматическим колориметрическим методом с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+» (серия:021).

### **Определение степени гидратации ткани головного мозга**

Головной мозг извлекали и в одном полушарии определяли величину отека в навеске массой  $500 \pm 2$  мг. Навеску взвешивали и высушивали в сушильном шкафу до достижения постоянной массы при температуре  $60^{\circ}C$ . Затем производили повторное взвешивание. Массу влаги выражали в процентах от исходной массы навески.

### **Определение размера зоны некроза**

Размер зоны некроза определяли трифенилтетразолиевым методом. Головной мозг извлекали. В работе использовали только полушария головного мозга (мозжечок отсекали). Оба полушария взвешивали, затем

гомогенизировали и отдельно помещали в бюксы с 10 мл 1% раствора трифенилтетразолия хлорида в фосфатном буфере (рН 7,4). Бюксы помещали на водяную баню на 20 минут при температуре 37°C. Осаждали ткань головного мозга (центрифугирование в режиме 5000 об/мин/10 минут). Надосадочная жидкость аккуратно удалялась. В осадок вносили 3 мл фосфатного буфера и 3 мл охлажденного хлороформа. Встряхивали 2 мин. Хлороформный экстракт формазана получали в течение 15 мин при 4°C, встряхивая смесь каждые 5 мин по 30 с. Центрифугировали и измеряли оптическую плотность (492 нм) против чистого хлороформа. Расчет зоны некроза выражали в процентах к общей массе полушарий:

$$x = 100 - \frac{\varepsilon_1 M_1 + \varepsilon_2 M_2}{\varepsilon_1 (M_1 + M_2)} 100,$$

где  $x$  – размер зоны некроза в процентах к общей массе мозга;

$\varepsilon_1$  – экстинкция пробы с неповрежденным полушарием;

$\varepsilon_2$  – экстинкция пробы с поврежденным полушарием;

$M_1$  – масса неповрежденного полушария;

$M_2$  – масса поврежденного полушария.

## 2.7. Методы иммуноферментных исследований

Методом твердофазного иммуноферментного анализа в супернатанте мозговой ткани определяли концентрацию изоферментов синтазы оксида азота (nNOS, серия: L161103374; eNOS, серия: L 161108684; iNOS, серия: L161243261), матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1, серия: L170426080), протеинкиназы C (PKC, серия: L116780139), митохондриальной АТФ-синтазы (мАТФ, серия: L161103401), цитохром C оксидазы (СОХ, серия: L170726128). В сыворотке крови оценивали изменение содержания асимметричного диметиларгинина (ADMA, серия: L161103361) и тромбоксана  $A_2$  (ТХА<sub>2</sub>, серия: L170329064). В работе использовали видоспецифичные наборы реактивов производства компании *Cloud Clone Corp.* (США). Ход анализа строго соответствовал прилагаемой

производителем инструкции к набору реактивов. Считывание результатов производили на микропланшетном ридере Infinite F50 (Tecan, Австрия).

## **2.8. Методы статистической обработки результатов эксперимента**

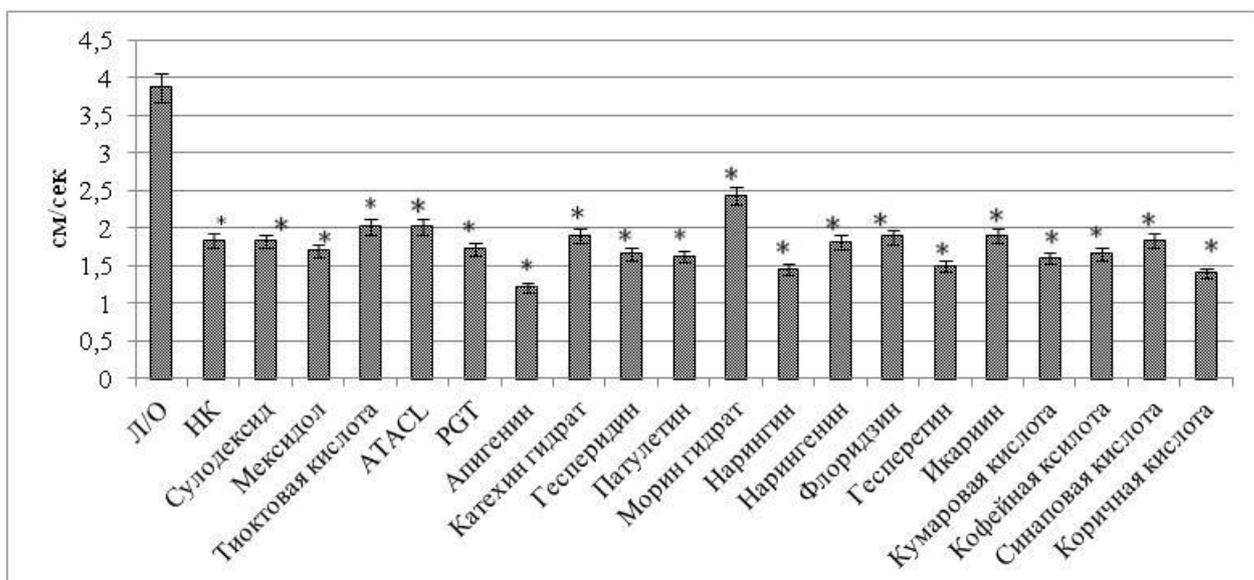
Результаты экспериментов статистически обрабатывали с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения, данные выражали в виде  $M \pm \sigma$ . Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае подчинения данных законам нормального распределения для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента. В противном случае дальнейшую статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни [15].

### **ГЛАВА 3. Влияние исследуемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной ишемии головного мозга (фармакологический скрининг).**

Фармакологический скрининг в ряду производных коричной кислоты и флавоноидов с целью выявления потенциального эндотелиотропного действия на фоне ишемии головного мозга проводился путем определения влияния исследуемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и агрегационную активность тромбоцитов, как составляющей антитромботической функции сосудистого эндотелия.

#### **3.1. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии.**

У ложнооперированных крыс (Л/О) при введении АЦХ Ск увеличилась на 48,7% ( $p < 0,01$ ) (табл.4) от ее первоначального значения у данной группы животных. Введение L-аргинина не вызвало существенных изменений в церебральной гемодинамике у Л/О животных. В тоже время на фоне блокады ферментных систем синтеза NO, посредством внутривенной инъекции нитро-L-аргинин метилового эфира, скорость мозгового кровотока у Л/О животных снизилась, по сравнению с исходным значением Л/О крыс на 23,1% ( $p < 0,05$ ) Оценивая эндотелий-независимую вазодилатацию у животных Л/О группы отмечено увеличение Ск при введении нитроглицерина, относительно фоновой скорости кровотока на 54,6% ( $p < 0,01$ ).



**Рисунок 6. Изменение скорости локального мозгового кровотока в условиях фокальной ишемии головного мозга и ее коррекции исследуемыми соединениями, и препаратами сравнения.**

*Обозначение:* \*- статистически значимо относительно Л/О группы крыс (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,001$ )

В условиях фокальной ишемии головного мозга (группа животных НК (НК), не получавшая фармакологической поддержки) скорость мозгового кровотока, относительно Л/О падает на 111,2% ( $p < 0,001$ ) (рис.6). Ухудшение мозговой гемодинамики у НК группы крыс сопровождалось развитием эндотелиальной дисфункции с нарушением активности NO-синтезирующей системы и сбоем эндотелий-опосредованной регуляции сосудистого тонуса. Данный факт подтверждается незначительным, по сравнению с Л/О крысами, сосудистым ответом на внутривенное введение АЦХ и L-NAME. Так у НК группы животных увеличение (АЦХ) Ск и ее падение (L-NAME) от исходного уровня составили 12% и 11,4% (табл.4) соответственно, что меньше аналогичных показателей Л/О крыс соответственно на 305,8% ( $p < 0,05$ ) и 102,6% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4

**Изменение состояния вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии и ее коррекции препаратами сравнения, и исследуемыми соединениями**

Группа	АЦХ	L-аргинин	L-NAME	НТГ
Л/О	48,7±1,030*	-2,2±0,430	-23,1±1,235Δ	54,6±0,592*
НК	12,0±1,670α	33,1±5,482 Δ α	-11,4±0,669 α	55,9±2,167*
Сулодексид	25,6±1,062 Δ α	18,3±1,664 αμ	-23,1±1,846 Δ	52,3±1,428*
Мексидол	21,1±2,407 Δ α	31,2±3,920 Δ α	-12,8±2,805	55,1±1,018*
Тиоктовая кислота	23,3±4,273 Δ α	17,6±6,588	-16,8±2,068 Δμ	58,4±0,594*
АТАСЛ	32,9±2,551 Δμ	13,8±2,256μ	-17,4±1,072 Δ	51,1±0,866*
РGT	24,4±5,817 Δ	15,5±5,154μ	-15,9±3,697	55,1±5,576*
Апигенин	22,2±1,948 Δ	27,1±4,013 Δ	-12,1±1,742	53,9±3,034*
Катехин гидрат	20,8±6,683 Δ	21,3±5,188 Δ	-12,9±6,410	49,6±5,881*
Гесперидин	20,3±1,677 Δ	29,0±10,382 Δ	-12,8±3,828	52,3±1,368*
Патулетин	19,9±2,409 Δ	20,7±3,692 Δ	-16,2±4,149	50,2±1,327*
Морин гидрат	18,1±2,67 Δ	20,8±1,096 Δ	-11,4±3,061	54,7±1,023*
Нарингин	16,5±6,848	31,4±4,716 Δ	-13,0±4,435	54,7±4,435*
Нарингенин	16,2±1,930	23,2±1,680 Δ	-9,6±2,048	52,3±1,210*
Флоридзин	16,0±4,512	26,3±7,189 Δ	-8,4±3,129	58,6±1,214*
Гесперетин	13,7±3,766	31,3±3,209 Δ	-8,1±1,347	55,4±1,042*
Икариин	8,8±2,868	34,4±8,88 Δ	-4,7±2,166	52,8±1,067*
Кумаровая кислота	21,6±1,814 Δ	30,9±0,697 Δ	-13,6±1,714	52,7±0,801*
Кофейная кислота	22,3±1,167 Δ	35,2±2,102 Δ	-7,0±5,442	48,8±0,804*
Синаповая кислота	22,4±1,669 Δ	32,3±0,811 Δ	-13,3±0,566	49,9±1,754*
Коричная кислота	15,4±1,039	33,3±1,686 Δ	-8,6±0,979	53,34±1,137*

*Примечание:* статистически значимо относительно фоновой скорости кровотока (t-критерий Стьюдента \*- p<0,01; Δ-p<0,05);

α - статистически значимо относительно Л/О группы животных (t-критерий Стьюдента, p<0,05);

μ - статистически значимо относительно НК группы животных (t – критерий Стьюдента, p<0,05).

В ответ на введение L-аргинина у крыс НК отмечено увеличение скорости церебрального кровотока от ее первоначального уровня на 33,1% (p<0,05), что в свою очередь свидетельствует о том, что у данной группы крыс отмечается развитие феномена «L-аргининового парадокса». Введение

нитроглицерина вызвало увеличение  $S_k$  (от ее исходного уровня) у группы крыс НК на 55,9% ( $p < 0,01$ ), что статистически значимо не отличалось от показателей Л/О группы животных.

У животных, получавших сулодексид, при введении ацетилхолина  $S_k$  возросла на 25,6% ( $p < 0,05$ ) от ее исходного уровня ( $S_k$  у крыс, которым вводили сулодексид и животными НК группы были сопоставимы (рис.6)). При введении L-аргинина данной группе крыс скорость церебрального кровотока увеличилась (по сравнению с исходным значением) на 18,3%, что было статистически достоверно меньше показателя НК группы животных на 80,9% ( $p < 0,05$ ). На фоне L-NAME у крыс, получавших сулодексид,  $S_k$  снизилась на 23,1% ( $p < 0,05$ ) (табл.4). Внутривенное введение НТГ способствовало увеличению скорости локального церебрального кровотока на 52,3% ( $p < 0,01$ ).

У крыс при применении мексидола скорость мозгового кровотока при фокальной ишемии головного мозга относительно Л/О группы животных снизилась на 128,4% ( $p < 0,001$ ). Оценивая состояние вазомоторной эндотелиальной функции в условиях коррекции ишемии головного мозга мексидолом установлено, что в ответ на введение АЦХ  $S_k$  увеличивается на 21,1% ( $p < 0,05$ ), а L-NAME – уменьшается на 12,8%. При внутривенном введении L-аргинина крысам, получавшим мексидол,  $S_k$  увеличилась от ее исходного уровня на 31,2% ( $p < 0,05$ ). Эндотелий-независимая вазодилатация при введении НТГ статистически значимо не отличалась от таковой у Л/О крыс.

Применение тиоктовой кислоты способствовало некоторому улучшению вазодилатационной функции эндотелия сосудов, по сравнению с НК группой крыс. Так у данной группы животных рост  $S_k$  при введении АЦХ составил 23,3% ( $p < 0,05$ ). На фоне введения L-аргинина у животных, получавших тиоктовую кислоту, скорость локального мозгового кровотока увеличилась лишь на 17,6%, что на 88,1% ( $p < 0,05$ ) было меньше чем

идентичный показатель у НК группы животных. В ответ на введение L-NAME Ск у данной группы крыс уменьшилась от ее исходного уровня на 16,8%. На фоне введения нитроглицерина Ск, у животных которые получали тиоктовую кислоту, увеличилась на 58,4% ( $p < 0,01$ ) (табл.4), по сравнению с исходным значением у данной группы животных.

На фоне применения соединения АТАСЛ фоновая Ск по сравнению с Л/О крысами снизилась на 92,2% ( $p < 0,001$ ). Стимулированный ацетилхолином синтез оксида азота вызвал у крыс, получавших АТАСЛ, увеличение скорости локального церебрального кровотока на 32,9% ( $p < 0,05$ ) от ее начального уровня (табл.4). Следует отметить, что сосудистый ответ на введение АЦХ при применении АТАСЛ превосходил таковой НК группы животных на 174,2% ( $p < 0,05$ ). В условиях введения донатора NO - L-аргинина у животных данной группы Ск увеличилась всего на 13,8%, что было статистически значимо ниже аналогичного показателя НК группы животных на 139,9% ( $p < 0,05$ ). При введении L-NAME Ск у крыс, которым вводили АТАСЛ, снизилась от ее начального показателя на 17,4% ( $p < 0,05$ ). Внутривенное введение НТГ данной группе животных (табл.4) способствовало увеличению Ск, по сравнению с первоначальным значением на 51,1% ( $p < 0,01$ ).

Тенденция изменения вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия аналогичная таковым при применении соединения АТАСЛ отмечалась и при введении полифенолов зеленого чая (PGT). Так у крыс, получавших PGT, в ответ на введение АЦХ Ск увеличилась на 24,4% ( $p < 0,05$ ) от ее исходного уровня, что превышало значение НК группы животных на 43,5% ( $p < 0,05$ ). При внутривенном введении L-аргинина у данной группы крыс скорость мозгового кровотока увеличилась на 15,5% (табл.4) относительно ее исходного значения, и было меньше аналогичного значения НК группы животных на 113,5% ( $p < 0,05$ ). На фоне L-NAME Ск снизилась относительно исходного показателя данной группы крыс на 15,9%.

Введение нитроглицерина животным, получавшим PGT, способствовало увеличению (от исходного уровня) скорости церебрального кровотока на 55,1% ( $p < 0,01$ ).

На фоне коррекции фокальной церебральной ишемии апигенином Ск, по сравнению с животными Л/О снизилась на 220,6% ( $p < 0,001$ ). Введение АЦХ (табл.4), данной группе животных привело к увеличению Ск от ее фонового уровня на 22,2% ( $p < 0,05$ ), а L-NAME к падению на 12,1%. В тоже время введение L-аргинина крысам, получавшим апигенин, вызвало увеличение Ск на 27,1% ( $p < 0,05$ ). Ск у животных, получавших апигенин, при внутривенном введении нитроглицерина увеличилась на 53,9% ( $p < 0,01$ ).

У крыс, получавших катехин гидрат, исходная скорость церебрального кровотока была ниже таковой, чем у Л/О животных на 103,6% ( $p < 0,001$ ). В ответ на введение АЦХ (табл.4) у данной группы крыс Ск возросла на 20,8% ( $p < 0,05$ ) от ее фонового уровня. В тоже время на фоне введения L-аргинина данный показатель также имел тенденцию к увеличению, а именно от первоначального значения данной группы животных Ск возросла на 21,3 ( $p < 0,05$ ). Введение L-NAME способствовало падению Ск от ее первоначального уровня на 12,9%. У крыс, получавших катехин гидрат, на фоне НТГ Ск увеличилась на 49,6% ( $p < 0,001$ ).

При применении гесперидина на фоне фокальной ишемии головного мозга Ск снизилась относительно Л/О группы животных на 133,8% ( $p < 0,001$ ). Введение АЦХ данной группе крыс вызвало увеличение скорости церебрального кровотока от ее исходного уровня на 20,3% ( $p < 0,05$ ), а L-NAME -ее снижение на 12,8% (табл.4). На фоне внутривенного введения L-аргинина Ск, у животных, получавших гесперидин, увеличилась на 29% ( $p < 0,05$ ). Внутривенное введение НТГ животным, получавшим гесперидин, привело к росту Ск на 52,3% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с исходным значением Ск данной группы крыс.

Моделирование фокальной ишемии головного мозга привело к падению скорости церебрального кровотока у крыс, получавших патулетин, в сравнении с животными Л/О на 138,9% ( $p < 0,001$ ). В условиях внутривенного введения АЦХ (табл.4) данной группе животных С<sub>к</sub> увеличилась от ее исходного значения на 19,9% ( $p < 0,05$ ). Введение L-аргинина способствовало увеличению скорости кровотока у крыс, получавших патулетин, на 20,7% ( $p < 0,05$ ). В тоже время С<sub>к</sub> при введении L-NAME снизилась относительно первоначальных показателей на 16,2%, а при введении нитроглицерина С<sub>к</sub> увеличилась на 50,2% ( $p < 0,01$ ).

При применении морин гидрата С<sub>к</sub> была ниже по сравнению с Л/О крысами на 59,3% ( $p < 0,001$ ). При введении ацетилхолина данной группе животных С<sub>к</sub> увеличилась от ее исходного уровня на 18,1% ( $p < 0,05$ ). В тоже время введение L-аргинина крысам, получавшим морин гидрат, привело к росту скорости локального мозгового кровотока на 20,8% ( $p < 0,05$ ) от первоначальной С<sub>к</sub> данной группы животных. Введение L-NAME вызвало падение скорости мозгового кровотока на 11,4% (табл.4). Скорость локального церебрального кровотока у крыс, получавших морин гидрат, при введении НТГ увеличилась на 54,7% ( $p < 0,01$ ) от ее фонового уровня.

Изменения вазомоторной эндотелиальной функции при применении нарингина, нарингенина и флоридзина (табл.4) были сопоставимы между собой. При введении АЦХ С<sub>к</sub> возросла при применении нарингина на 16,5% ( $p < 0,05$ ); нарингенина – 16,2%, флоридзина – 16% по сравнению с исходной скоростью кровотока (при этом исходная скорость локального мозгового кровотока была сопоставима между группами животных, получавших нарингин, нарингенин и флоридзин, а также с НК группой крыс (табл.4)). На фоне введения L-аргинина С<sub>к</sub> также имела тенденцию к увеличению. Так при применении нарингина данный показатель увеличился на 31,4% ( $p < 0,05$ ), нарингенина – 23,2% ( $p < 0,05$ ), флоридзина – 26,3% ( $p < 0,05$ ). При блокаде NO–синтазной системы, посредством инъекции L-NAME С<sub>к</sub> снизилась от ее

фонового уровня на фоне применения нарингина на 13%, нарингенина – на 9,6%, флоридзина – 8,4%. Необходимо отметить, что Ск при введении НТГ группам животных, получавших нарингин, нарингенин и флоридзин (эндотелий-независимая вазодилатация) была сопоставима как с Л/О группой крыс, так и с группой НК животных (Ск на фоне введения НТГ увеличилась при применении нарингина, нарингенина и флоридзина соответственно на 54,7% ( $p<0,01$ ), 52,3% ( $p<0,01$ ) и 58,6% ( $p<0,01$ )).

Введение гесперетина и икариина (табл.4) не оказало значимого влияния на изменение вазомоторной функции эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии (статистически значимых отличий между данными группами животных и НК группой крыс установлено не было).

На фоне введения крысам кумаровой, кофейной и синаповой кислот Ск была снижена по отношению к Л/О группе животных на 142% ( $p<0,001$ ), 133,1% ( $p<0,001$ ) и 111,1% ( $p<0,001$ ) соответственно. Увеличение скорости церебрального кровотока от ее фонового уровня в ответ на введение АЦХ составило 21,6% ( $p<0,05$ ) у крыс, получавших кумаровую кислоту, 22,3% ( $p<0,05$ ) и 23% ( $p<0,05$ ) у животных, которым вводили кофейную и синаповую кислоты соответственно (табл.4). При этом необходимо отметить, что Ск при введении НТГ у данных групп крыс статистически значимо не отличалась от аналогичного значения НК и Л/О групп животных. На фоне введения L- аргинина крысам, получавшим кумаровую, кофейную и синаповую кислоты Ск увеличилась от ее первоначального значения на 31% ( $p<0,05$ ), 35,2% ( $p<0,05$ ) и 33,3 % ( $p<0,05$ ) соответственно. Скорость локального церебрального кровотока при введении L-NAME статистически значимых изменений по сравнению с исходным ее значением у данных групп животных не претерпела.

Введение крысам коричной кислоты (табл.4) существенного влияния на состояние вазодилатирующей функции эндотелия сосудов не оказало

(статистически значимых отличий относительно НК группы крыс установлено не было).

### **3.2. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии**

Данная серия экспериментов является продолжением скринингового исследования и своей целью ставит изучение влияния исследуемых соединений и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов на модели АДФ–стимулированной агрегации при фокальной ишемии головного мозга, как составляющей части антитромботической функции эндотелия сосудов.

Степень и скорость агрегации тромбоцитов у Л/О группы животных составляли  $1,536 \pm 0,129$  усл.ед. и  $0,993 \pm 0,169$  усл.ед. (табл.6) соответственно. В результате фокальной ишемии головного мозга у НК группы крыс отмечено повышение степени агрегации тромбоцитов на 70% ( $p < 0,05$ ), а скорости – на 195,8% ( $p < 0,02$ ). При этом следует отметить, что у всех экспериментальных групп животных содержание тромбоцитов в крови статистически значимо не отличалось (табл.5). Сулодексид и мексидол практически равновесно способствовали снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов. При использовании сулодексида степень агрегации тромбоцитов относительно НК группы животных снизилась на 41,9% ( $p < 0,05$ ), а на фоне введения мексидола на 44,8% ( $p < 0,05$ ). Скорость агрегации при этом снизилась на 74,7% ( $p < 0,05$ ) (сулодексид) и 65,7% ( $p < 0,05$ ) (мексидол).

**Содержание тромбоцитов в крови в условиях фокальной церебральной ишемии и ее коррекции исследуемыми соединениями и препаратами сравнения**

Группа	ЛО	НК	Сулодексид	Мексидол	Тиоктовая кислота	АТАСЛ	РГТ
PLT*10 <sup>9</sup> /L	462,4± 25,887	474,25± 55,065	430± 22,35	428,2± 44,906	428± 35,019	445,3± 40,989	442,8± 23,778
Группа	Катехин гидрат	Гесперидин	Патулетин	Морин гидрат	Нарингин	Нарингенин	Флоридзин
PLT*10 <sup>9</sup> /L	452,9± 71,939	477,4± 33,372	469± 17,618	472,3± 23,219	433,5± 23,357	441,8± 36,775	468,5± 25,617
Группа	Апигенин	Кумаровая кислота	Кофейная кислота	Коричная кислота	Гесперетин	Икариин	Синаповая кислота
PLT*10 <sup>9</sup> /L	445,67± 33,046	435,3± 12,347	429,7± 22,699	451± 17,268	458,3± 24,397	469,8± 43,256	455,6± 20,485

*Примечание:* PLT – количество тромбоцитов

На фоне применения тиоктовой кислоты степень и скорость агрегации тромбоцитов снизились относительно НК группы животных соответственно на 29,9% ( $p < 0,05$ ) и 58% ( $p < 0,05$ ) (табл.6).

При введении соединения АТАСЛ степень агрегации тромбоцитов по сравнению с НК группой крыс снизилась на 56,7% ( $p < 0,05$ ), а скорость на 52,8% ( $p < 0,05$ ). При этом статистически значимых отличий между группой животных, получавших АТАСЛ и препараты сравнения (сулодексид и мексидол), установлено не было (табл.6).

Применение полифенолов зеленого чая (табл.6) способствовало снижению относительно НК группы крыс степени и скорости агрегации тромбоцитов на 29,4% ( $p < 0,05$ ) и 91,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Степень агрегации тромбоцитов на фоне применения апигенина (табл.6) снизилась по сравнению с НК группой крыс на 31% ( $p < 0,05$ ), а скорость на 81,7% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6

**Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии**

<b>Группа</b>	<b>Степень агрегации (усл.ед.)</b>	<b>Скорость агрегации (усл.ед.)</b>
Л/О	1,536±0,129	0,993±0,169
НК	2,613±0,382 $\alpha$	2,937±1,056#
Сулодексид	1,842±0,407*	1,681±0,532*
Мексидол	1,805±0,297*	1,772±0,235*
Тиоктовая кислота	2,011±0,447*	1,859±0,374*
АТАСЛ	1,668±0,148*	1,922±0,098*
РGT	2,020±0,369*	1,536±0,415*
Апигенин	1,994±0,241*	1,616±0,163*
Катехин гидрат	2,195±0,211*	1,934±0,561*
Гесперидин	2,036±0,370*	1,706±0,431*
Патулетин	2,015±0,268*	2,116±0,406
Морин гидрат	2,028±0,243*	1,828±0,363*
Нарингин	1,842±0,253*	2,103±0,592
Нарингенин	2,385±0,254	1,936±0,362*
Флоридзин	2,764±0,581	3,377±0,521
Гесперетин	2,685±0,215	2,722±0,327
Икариин	2,516±0,181	2,500±0,423
Кумаровая кислота	2,282±0,217*	2,067±0,159*
Кофейная кислота	2,110±0,227*	1,821±0,317*
Синаповая кислота	2,550±0,214	2,550±0,264
Коричная кислота	2,471±0,271	2,250±0,147

*Примечание:*  $\alpha$ - статистически значимо относительно Л/О группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p<0,05$ );

# - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U-критерий Манна – Уитни,  $p<0,02$ );

\* - статистически значимо относительно НК группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ).

Применение катехин гидрата (табл.6) способствовало снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов в сравнении с НК группой животных на 19% и 51,9% ( $p<0,05$ ).

Применение гесперидина, патулетина и морин гидрата (табл.6) степень агрегации тромбоцитов изменялась практически одинаково. Так применение гесперидина способствовало уменьшению степени агрегации тромбоцитов по отношению к НК группе крыс на 28,3% ( $p<0,05$ ), патулетина – на 29,7% ( $p<0,05$ ), морин гидрата – на 28,8% ( $p<0,05$ ). При этом скорость агрегации тромбоцитов наиболее значимо изменилась при применении гесперидина и морин гидрата, а именно имело место снижение данного показателя относительно НК группы животных на 72,1% ( $p<0,05$ ) (гесперидин) и 60,7% ( $p<0,05$ ) (морин гидрат).

На фоне применения нарингина (табл.6) степень агрегации тромбоцитов относительно НК группы животных снизилась на 41,9% ( $p<0,05$ ), а скорость на 39,6%.

При применении нарингенина (табл.6) статистически значимо по отношению к НК группе животных изменилась лишь скорость агрегации тромбоцитов, а именно данный показатель снизился на 51,8% ( $p<0,05$ ).

Применение флоридзина, гесперетина и икариина (табл.6) существенного влияния на изучаемые показатели процесса агрегации тромбоцитов не оказало (статистически значимых отличий по сравнению с НК группой крыс установлено не было).

На фоне введения крысам кумаровой и кофейной кислот (табл.6) степень агрегации тромбоцитов снизилась на 14,5% ( $p<0,05$ ) и 23,7% ( $p<0,05$ ) соответственно. В то же время скорость агрегации тромбоцитов при применении данных соединений снизилась на 42,1% ( $p<0,05$ ) и 61,3% ( $p<0,05$ ) соответственно. Применение синаповой и коричной кислот значимого влияния на агрегационную активность тромбоцитов не оказало

(статистически значимых отличий по отношению к НК группе животных не установлено).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе проведенного исследования установлено, что фокальная ишемия головного мозга приводит к нарушению функционирования сосудистого эндотелия, в результате чего наблюдается развитие эндотелиальной дисфункции. Так, в частности у НК группы животных по сравнению с Л/О крысами отмечено ухудшение сосудистой реакции в ответ на внутривенное введение ацетилхолина и нитро-L-аргинин метилового эфира (скорость мозгового кровотока на фоне введения данных анализаторов функционального состояния эндотелия была ниже аналогичных показателей Л/О группы крыс на 305,8% ( $p < 0,05$ ) и 102,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно). Кроме того у животных НК группы наблюдалось развитие феномена «L-аргининового парадокса», что подтверждается повышением  $S_k$  у данной группы крыс на 33,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным значением скорости локального мозгового кровотока. Также у животных НК группы отмечено повышение степени и скорости АДФ-индуцированной агрегации кровяных пластинок по отношению к группе Л/О крыс на 70% ( $p < 0,05$ ) и 195,8% ( $p < 0,02$ ) соответственно. Полученные данные могут являться подтверждением развития эндотелиальной дисфункции в условиях ишемии головного мозга [52, 53].

Введение препаратов сравнения позволило сохранить эндотелиальную функцию на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс. При этом наиболее выраженные результаты получены при применении сулодексида – «истинного эндотелиопротектора» (наблюдалось улучшение эндотелий-зависимой вазодилатации, проявление феномена «L-аргининового парадокса» носило не столь выраженный характер, как у НК группы крыс, восстанавливался антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов). Аналогичная тенденция изменений отмечена и при применении мексидола,

тиоктовой кислоты. При этом мексидол оказал более выраженное влияние на агрегационную активность тромбоцитов, а тиоктовая кислота на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия [29, 31, 52].

Применение изучаемых соединений оказало неоднозначное действие на состояние эндотелия сосудов. Так лучше всего себя «проявили» следующие соединения: АТАСЛ, полифенолы зеленого чая, апигенин, катехин гидрат, гесперидин и патулетин. При этом по величине эффекта соединение АТАСЛ практически в равновесной степени соответствовало эффекту сулодексида и превосходило мексидол и тиоктовую кислоту. В целом по влиянию на вазодилатационный потенциал сосудистого эндотелия препараты сравнения и изучаемые соединения можно расположить в следующий ряд активности: АТАСЛ  $\geq$  сулодексид  $>$  PGT  $\geq$  апигенин  $>$  мексидол  $\geq$  кумаровая кислота  $\geq$  кофейная кислота  $\geq$  синаповая кислота  $\geq$  катехин гидрат  $\geq$  гесперидин  $\geq$  патулетин  $>$  морин гидрат  $>$  нарингин  $>$  нарингенин  $>$  флоридзин  $\geq$  коричная кислота  $>$  гесперетин  $>$  икариин.

Влияние исследуемых соединений на агрегационную активность тромбоцитов было сопоставимо с данными полученными при оценке вазодилатирующей функции эндотелия. Так степень агрегации тромбоцитов более всего снизилась (относительно НК группы крыс) при применении соединения АТАСЛ, скорость агрегации при применении данного соединения также имела тенденцию к снижению, но данный показатель был незначительно (на 18,3%) выше, чем у группы крыс, получавших сулодексид, мексидол (12,4%), полифенолы зеленого чая (29,7%), апигенин (23,2%), катехин гидрат (3,1%), гесперидин (16,7%), морин гидрат (5,1%). Также степень агрегации тромбоцитов (содержание тромбоцитов в крови было сопоставимо между всеми экспериментальными группами) снижалась относительно группы животных НК при применении PGT (29,4% ( $p < 0,05$ )), апигенина (31% ( $p < 0,05$ )), гесперицина (28,3% ( $p < 0,05$ )), патулетина (29,7% ( $p < 0,05$ )), морин гидрата (28,8% ( $p < 0,05$ )) и нарингина (41,9% ( $p < 0,05$ )).

Скорость агрегации претерпела существенные изменения при применении PGT, апигенина, гесперидина, морин гидрата, нарингенина, катехин гидрата и АТАСЛ (результаты были сопоставимы между собой и статистически значимых отличий между группами не установлено). По совокупной величине влияния на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии препараты сравнения и исследуемые соединения позволяют сгенерировать ряд активности: сулодексид > мексидол  $\geq$  АТАСЛ  $\geq$  PGT > апигенин > нарингин > тиоктовая кислота > патулетин > гесперидин > морин гидрат > катехин гидрат > нарингенин > кофейная кислота  $\geq$  кумаровая кислота  $\geq$  коричная кислота  $\geq$  синаповая кислота  $\geq$  икариин > гесперетин > флоридзин.

Подобные изменения в вазодилатирующей функции эндотелия и агрегационной активности тромбоцитов, вероятно, связаны с антиоксидантными свойствами флавоноидов и производных коричной кислоты, что согласуется с литературными данными [71, 73, 79, 112, 119, 120, 121, 135, 137, 151, 163, 170, 211]. Сопоставляя полученные данные в качестве соединения – лидера для проведения дальнейших исследований было выбрано соединение АТАСЛ.

## **ГЛАВА 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединения 4-гидрокси-3,5 –ди-трет-бутилкоричная кислота**

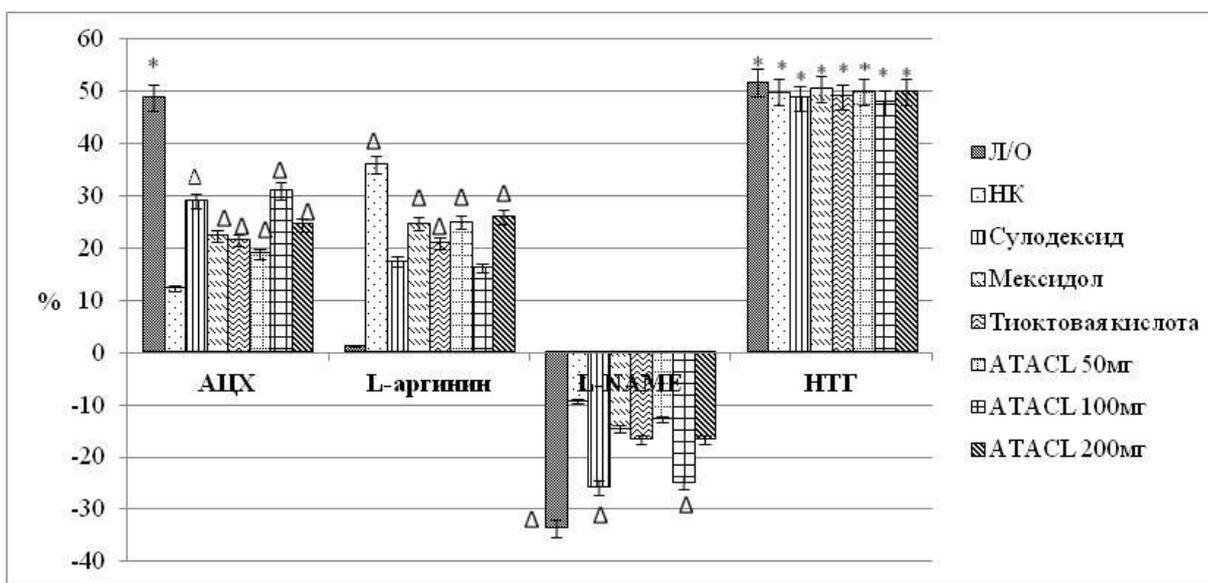
В данной серии экспериментов изучалась зависимость «доза-эффект» соединения – лидера 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в 3-х дозировках (50мг/кг, 100мг/кг и 200мг/кг) на вазомоторную функцию эндотелия сосудов, концентрацию С-реактивного белка и агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс.

### **4.1. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на состояние вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

Начальная С<sub>к</sub> у группы Л/О животных составляла 4,042±0,217 см/сек. На фоне фокальной церебральной ишемии у крыс группы НК С<sub>к</sub> снизилась в 2,8 раза (p<0,01) по сравнению с Л/О группой животных. У животных, получавших мексидол, сулодексид и тиоктовую кислоту фоновая скорость церебрального кровотока была ниже аналогичного значения у Л/О группы крыс в 2,2 (p<0,01); 2,4 (p<0,01) и 2,6 (p<0,01) раза соответственно. На фоне введения соединения АТАСЛ фоновая С<sub>к</sub> для групп крыс, получавших 100мг/кг, 50мг/кг и 200 мг/кг составляла соответственно 1,883±0,327см/сек; 1,810±0,159 см/сек; и 1,619±0,259 см/сек.

У Л/О животных в ответ на внутривенное введение АЦХ С<sub>к</sub>, по отношению к фоновому показателю данной группы, увеличилась на 48,7% (p<0,01) (рис.7), в то время как у крыс НК группы данный показатель составлял 12,3%. В условиях коррекции фокальной церебральной ишемии мексидолом, тиоктовой кислотой и сулодексидом С<sub>к</sub> при введении АЦХ возросла на 22,3% (p<0,05), 21,4% (p<0,05) и 28,9% (p<0,05) (рис.7) соответственно. При применении 50 мг/кг соединения АТАСЛ С<sub>к</sub> при введении АЦХ увеличилась лишь на 18,9%, в тоже время АТАСЛ в дозе 100мг/кг и 200 мг/кг способствовало более выраженному сосудистому

ответу, что отражается в увеличении Ск при введении АЦХ на 30,9% ( $p < 0,05$ ) и 24,4% ( $p < 0,05$ ) (рис.7) соответственно. При этом следует отметить, что Ск при введении нитроглицерина была сопоставима во всех экспериментальных группах (рис.7).



**Рисунок 7. Влияние различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс.**

*Обозначение:* статистически значимо (t-критерий Стьюдента) относительно исходной скорости кровотока \* -  $p < 0,01$ ;  $\Delta$  -  $p < 0,05$ .

В условиях введения L-аргинина С<sub>к</sub> у Л/О животных статистически значимо не изменилась, относительно фонового ее значения у данной группы крыс. У группы НК животных при введении данного анализатора, С<sub>к</sub> возросла на 35,9% ( $p < 0,05$ ), относительно начальной С<sub>к</sub> у данной группы крыс. На фоне применения мексидола, тиоктовой кислоты, АТАСЛ, в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг С<sub>к</sub> при введении L-аргинина изменилась практически в равной степени (рис.7), а именно отмечено ее увеличение на 24,6% ( $p < 0,05$ ), 20,9% ( $p < 0,05$ ), 24,9% ( $p < 0,05$ ) и 25,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно. В тоже время при применении сулодексида и АТАСЛ в дозе 100 мг/кг С<sub>к</sub>, в ответ на

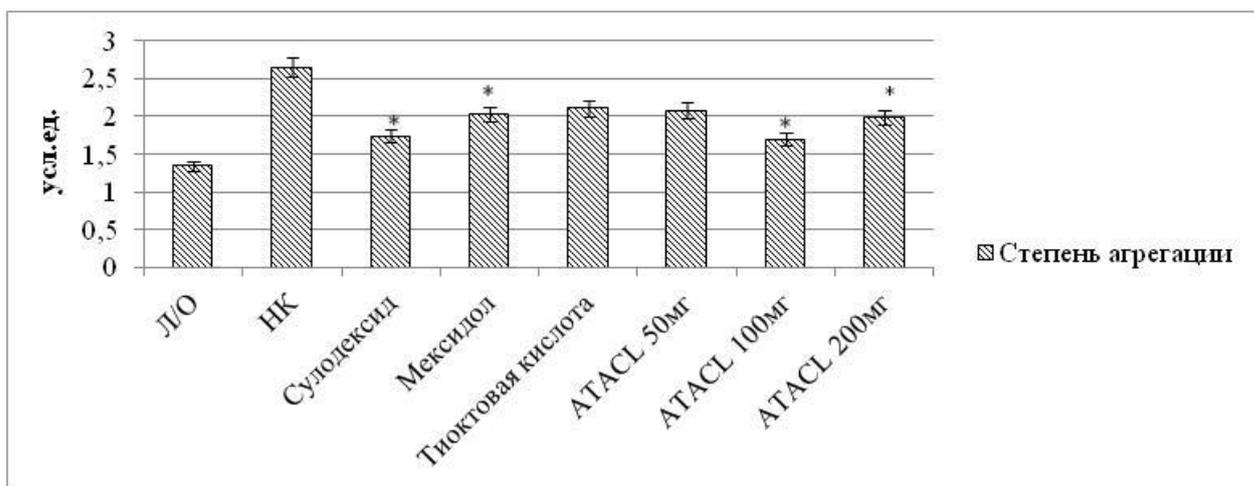
введение L-аргинина увеличилась лишь на 17,4% и 16,2%, относительно фоновых значений Ск соответственно для каждой группы животных.

Введение L-NAME группе Л/О крыс привело к снижению Ск на 33,7% ( $p < 0,05$ ). У НК группы крыс в аналогичных условиях Ск уменьшилась лишь на 9,3% от ее фонового значения у данной группы животных. При применении сулодексида скорость церебрального кровотока на фоне введения L-NAME снизилась на 25,8% ( $p < 0,05$ ), а на фоне применения мексидола – на 14,6%, тиоктовой кислоты – 16,6%. Блокада синтеза NO у группы животных, получавших 100 мг/кг АТАСЛ, привела к падению Ск на 24,9% ( $p < 0,05$ ). В тоже время Ск у крыс, которым вводили 50 мг/кг и 200 мг/кг АТАСЛ статистически значимо не изменилась (рис.7).

Таким образом, соединение АТАСЛ оказывало наиболее выраженное влияние на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в дозе 100 мг/кг.

#### **4.2. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на агрегационную активность тромбоцитов при АДФ-стимулированной агрегации в условиях фокальной церебральной ишемии**

Оценивая состояние агрегационной способности тромбоцитов установлено, что степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у Л/О крыс составляла  $1,345 \pm 0,114$  усл.ед. (рис.8). У НК группы крыс, по отношению к Л/О животным, данный показатель увеличился на 97,4% ( $p < 0,05$ ). Применение мексидола, тиоктовой кислоты и сулодексида способствовало снижению степени агрегации кровяных пластинок относительно НК группы крыс на 30,5% ( $p < 0,05$ ) и 25,7% и 52,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно. (рис.8).



**Рисунок 8. Влияние введения различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии.**

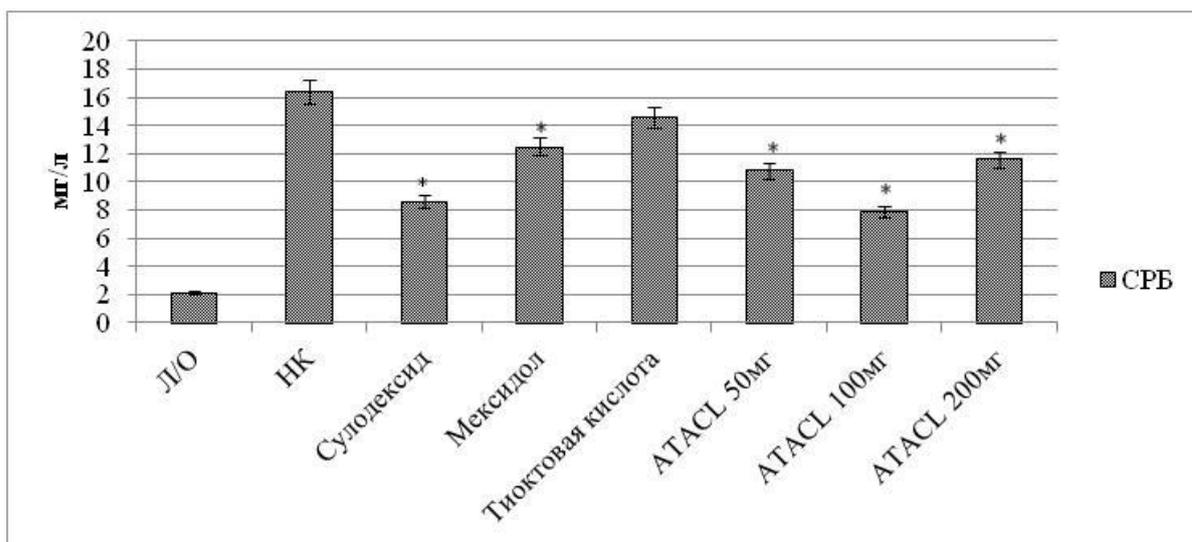
*Обозначение:* \*- статистически значимо относительно НК группы животных (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

Введение соединения АТАСЛ в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг способствовало уменьшению степени АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по сравнению с группой животных НК на 27,8% и 33,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Тогда как введение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг способствовало редукции агрегационной способности тромбоцитов по отношению к НК группе крыс на 56,4% ( $p < 0,05$ ), т.е. практически равноценно с сулодексидом.

#### **4.3. Оценка влияния различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на концентрацию С-реактивного белка в условиях фокальной церебральной ишемии**

При анализе концентрации СРБ у Л/О группы животных данный показатель составлял  $2,1 \pm 0,215$  мг/л. (рис.9).

В тоже время у крыс НК группы оцениваемый показатель был существенно выше, нежели у животных Л/О группы, а именно у НК группы крыс отмечен рост концентрации СРБ в 7,8 раза ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 9. Влияние различных доз 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на концентрацию С-реактивного белка в условиях фокальной церебральной ишемии.**

*Обозначение:* \*- статистически значимо относительно группы НК животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ).

Применение мексидола и тиоктовой кислоты (рис.9) способствовало снижению концентрации СРБ, по сравнению с НК группой животных соответственно на 31,2% ( $p < 0,05$ ) и 12,3%. Тогда как в условиях введения сулодексида содержание СРБ уменьшилось, по сравнению с НК группой крыс на 90,7% ( $p < 0,05$ ).

В условиях фокальной церебральной ишемии соединение АТАСЛ (рис.9) в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг, способствовало снижению концентрации СРБ, относительно НК группы животных на 51,9% ( $p < 0,05$ ) и 41,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Введение АТАСЛ дозе 100 мг/кг привело к уменьшению содержания СРБ, в сравнении с группой НК крыс на 107,6% ( $p < 0,05$ ).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Анализ полученных данных позволил установить, что фокальная ишемия головного мозга приводит к нарушению эндотелий-опосредованной регуляции сосудистого тонуса, сопровождаемой ухудшением эндотелий-

зависимой вазодилатации. Также на фоне ишемического повреждения головного мозга отмечена повышенная сенсбилизация тромбоцитов к агрегации, что выражается в повышении степени агрегации, по сравнению с Л/О животными на 97,4% ( $p < 0,05$ ). В условиях фокальной ишемии головного мозга также имеет место нарушение противовоспалительной функции эндотелия сосудов, о чем свидетельствует повышенный в 7,8 раза ( $p < 0,05$ ) уровень СРБ у НК группы животных. Применение мексидола, тиоктовой кислоты и в большей степени сулодексида способствовали коррекции возникших изменений, при этом применение тиоктовой кислоты оказало большее влияние на состояние вазодилатирующей функции эндотелия, а мексидол на агрегационный потенциал тромбоцитов и концентрацию СРБ. Применение сулодексида оказало равноценное влияние на изучаемые параметры

Соединение АТАСЛ проявило наиболее выраженный фармакологический эффект в дозе 100 мг/кг. Введение АТАСЛ в данной дозе способствовало восстановлению вазомоторной функции сосудистого эндотелия, снижению степени АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, по отношению к НК группе крыс на 56,4% ( $p < 0,05$ ), а также уменьшению концентрации СРБ на 107,6% ( $p < 0,05$ ). При этом по степени эндотелий-позитивного влияния соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг превосходило мексидол и тиоктовую кислоту, и было сопоставимо с сулодексидом.

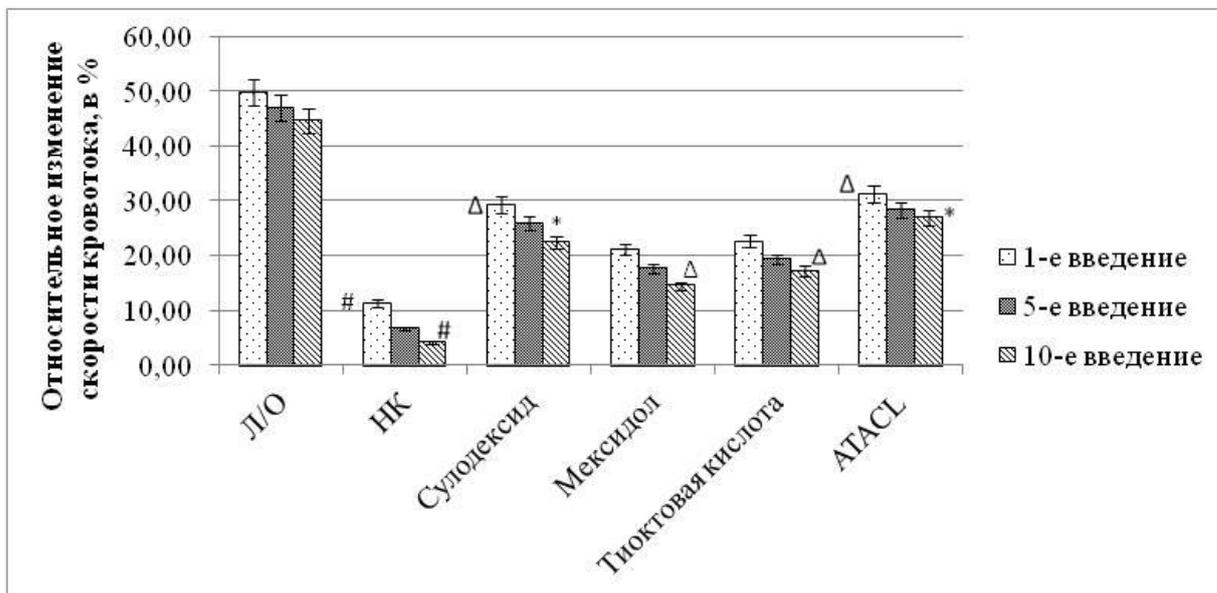
## **ГЛАВА 5. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на стабильность работы NO-синтазной системы и показатели периферического сосудистого сопротивления и эластичности сосудов у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга.**

Как известно эндотелию сосудов отводится высокая роль в регуляции сосудистого тонуса. При этом ключевой биомолекулой, опосредующей все его функции является оксид азота (NO). Активация и блокада синтеза монооксида азота влияет на сосудистый тонус, что ведет к увеличению либо к уменьшению скорости кровотока [76, 103]. Также решающая роль отводится недостатку NO в патогенезе эндотелиальной дисфункции. Сопоставляя данные полученные при исследовании активности NO-синтазной системы (в условиях блокады и активации синтеза оксида азота, оценка стабильности работы) можно судить о степени выраженности дисфункции эндотелия.

Влияние соединения-лидера на состояние вазодилатирующей функции эндотелия сосудов на фоне фокальной ишемии головного мозга было изучено ранее на этапах фармакологического скрининга и оценке зависимости «доза-эффект». В данной главе собственных исследований представлено изучение влияния соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на стабильность работы NO-синтазной системы и показатели периферического сосудистого сопротивления и эластичности сосудов у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга

Увеличение скорости локального мозгового кровотока при 10-ти кратном введении ацетилхолина представлено на рисунке 10. Как видно у группы Л/О крыс увеличение скорости локального церебрального кровотока было практически равновесным при 1-м и 10-м введении ацетилхолина. В итоге различие сосудистой реакции на введение АЦХ между 1-м и 10-м его введением составило 11,6% (рис.10). При этом показатели периферического

сосудистого сопротивления RI и PI у Л/О группы животных принимали значения  $0,6 \pm 0,04$  усл.ед. и  $1,83 \pm 0,09$  усл.ед. соответственно (рис.11).

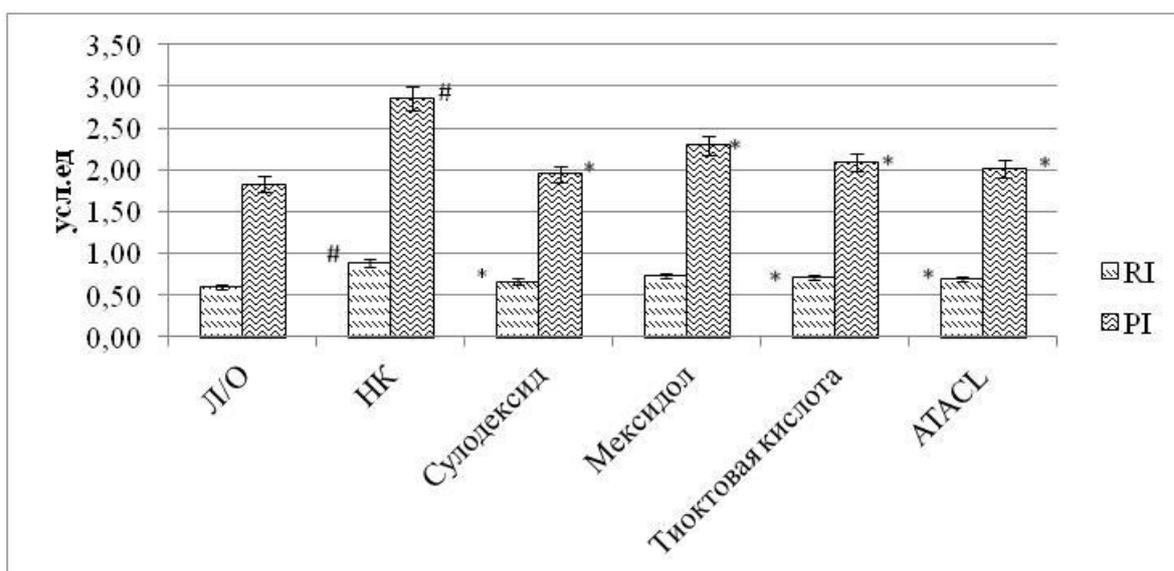


**Рисунок 10. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на стабильность работы NO-синтазной системы на фоне фокальной ишемии головного мозга.**

*Обозначение:* статистически значимо (t-критерий Стьюдента) относительно НК группы крыс\* -  $p < 0,02$ ; Δ -  $p < 0,05$ ;

#- статистически значимо относительно Л/О группы крыс (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,02$ ).

У НК группы крыс реакция сосудов на 1-е введение АЦХ была на 340,7% ( $p < 0,02$ ) меньше чем у Л/О группы животных. При последующих введениях ацетилхолина Ск у НК группы крыс имела тенденцию к снижению, относительно 1-го введения у данной группы животных (рис.10). В итоге к 10-му введению АЦХ скорость локального церебрального кровотока у НК группы животных была на 169% ( $p < 0,05$ ) ниже относительно 1-го введения у данной группы крыс и в 10,6 раз ( $p < 0,02$ ) по сравнению с Л/О группой животных. При этом у НК группы животных отмечено увеличение относительно Л/О крыс индексов Пурсело (RI) и Гослинга (PI) на 48,3% ( $p < 0,05$ ) и 56,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис.11).



**Рисунок 11. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на значения индексов Пурсело и Гослинга в условиях фокальной церебральной ишемии.**

*Обозначение:* RI – индекс Пурсело; PI – индекс Гослинга

\* - статистически значимо относительно НК группы крыс (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

#- статистически значимо относительно Л/О группы крыс (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ).

На фоне применения сулодексида (рис.11) скорость мозгового кровотока при 1-м и 10-м введении ацетилхолина была выше относительно НК группы животных на 159,3% ( $p < 0,05$ ) и 433,3% ( $p < 0,02$ ) соответственно. Разница скоростей локального мозгового кровотока между 1-м и 10-м введением АЦХ крысам, получавшим сулодексид, составила 30,8%. Значения индексов периферического сосудистого сопротивления (рис.11) были ниже по сравнению с группой животных НК на 34,8% ( $p < 0,05$ ) и 46,7% ( $p < 0,05$ ) (индекс Пурсело и Гослинга соответственно).

При применении мексидола (рис.10) Ск на фоне 10-го введения АЦХ была ниже по сравнению с 1-м его введением у данной группы крыс на 45,5%. Скорость мозгового кровотока при 10-м введении ацетилхолина у крыс, получавших мексидол, была выше таковой у животных группы НК на 245,2% ( $p < 0,05$ ). Также при применении мексидола отмечена тенденция

снижения индексов RI и PI (рис.11) соответственно на 21,9% и 24,3% ( $p < 0,05$ ).

Применение тиоктовой кислоты (рис.10) способствовало сохранению стабильности NO-синтазной системы относительно группы животных НК на фоне фокальной ишемии головного мозга. Данный факт нашел отражение в том, что разница между 1-м и 10-м введением АЦХ у данной группы крыс составила 31,4%, что было меньше аналогичного значения группы НК на 438,2% ( $p < 0,05$ ). Кроме того у крыс, получавших тиоктовую кислоту, скорость мозгового кровотока при 10-м введении АЦХ была выше по сравнению с группой животных НК на 309,5% ( $p < 0,05$ ). Значения индексов RI и PI (рис.11) при применении тиоктовой кислоты снизились относительно НК группы крыс на 25,4% ( $p < 0,05$ ) и 36,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

На фоне применения соединения АТАСЛ (рис.10) скорость мозгового кровотока при 1-м введении АЦХ была выше по сравнению НК группой крыс на 176,1% ( $p < 0,05$ ). Также у данной группы животных отмечено увеличение скорости локального мозгового кровотока при 10-м введении ацетилхолина относительно группы животных НК на 540,5% ( $p < 0,02$ ). Кроме того у данной группы животных разница скоростей церебрального кровотока между 1-м и 10-м введением АЦХ составила 16%, что было меньше аналогичного показателя НК группы крыс в 10,6 раза ( $p < 0,05$ ). Также у крыс, получавших АТАСЛ, индексы периферического сосудистого сопротивления и эластичности сосудов (рис.11) снизились относительно НК группы крыс на 29% ( $p < 0,05$ ) – RI и 42,3% ( $p < 0,05$ ) – PI.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В условиях ишемии головного мозга у крыс наблюдается снижение стабильности работы NO-синтазной системы, подтверждаемое сниженной сосудистой реакцией на 10-е введение АЦХ по сравнению с его первым введением НК группе крыс на 169% ( $p < 0,05$ ).

Помимо ухудшения вазоактивного потенциала сосудистого эндотелия у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга отмечено увеличение периферического сосудистого сопротивления и утрата сосудами эластичности, что отражается в увеличении относительно Л/О крыс индексов Пурсело и Гослинга на 48,3% ( $p < 0,05$ ) и 56,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Подобные изменения в состоянии вазодилатирующей функции эндотелия могут быть связаны с развивающимся в условиях ишемии головного мозга окислительным стрессом [33].

Применение сулодексида, мексидола и тиоктовой кислоты оказало однонаправленное, но разное по степени выраженности действие на состояние NO-синтазной системы. На фоне введения сулодексида у крыс наблюдалось снижение периферического сосудистого сопротивления, что отражается в уменьшении значений индексов Пурсело и Гослинга относительно НК группы животных на 34,8% ( $p < 0,05$ ) и 46,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также следует отметить, что при применении сулодексида у крыс работа системы синтеза оксида азота была более стабильна, чем у НК группы животных. Подобные изменения вазодилатирующей функции эндотелия, сосудистого сопротивления и работы NO-синтазной системы были характерны также, и для групп животных, получавших мексидол и тиоктовую кислоту. Однако данные изменения носили менее выраженный характер по сравнению с сулодексидом.

Применение соединения АТАСЛ способствовало нормализации работы NO-синтазной системы практически в равной с сулодексидом степени. Индексы Пурсело и Гослинга на фоне применения соединения АТАСЛ были ниже относительно групп животных, которым вводили мексидол и тиоктовую кислоту, и статистически достоверно не отличались от показателей Л/О группы животных и крыс, получавших сулодексид.

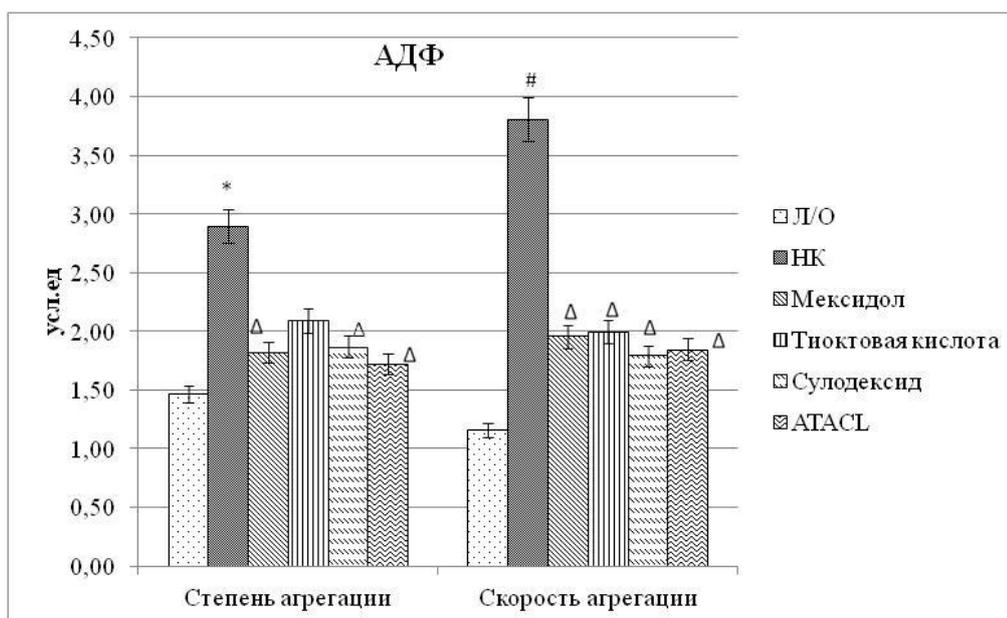
## **ГЛАВА 6. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на антитромботическую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии.**

В патогенезе ишемии головного мозга одна из ведущих ролей отводится нарушению работы системы гемостаза. Повреждение эндотелия инициирует каскад гемостатических реакций, разделяемых на первичные и вторичные. К первичным относят вазоспазм, адгезию тромбоцитов к субэндотелиальному слою при участии фактора фон Виллебранда, продукцию тромбоксана  $A_2$ , активацию тромбоцитов и образование тромба. При вторичном гемостазе активируется коагуляционный каскад, формируя фибриновый тромб [96, 205].

Учитывая важную роль нарушений системы гемостаза в патогенезе ишемического повреждения головного мозга, а также высокий тромборезистентный потенциал сосудистого эндотелия, целесообразно изучить влияние соединения АТАСЛ на антитромботическую функцию сосудистого эндотелия в условиях ишемии головного мозга

### **6.1 Сравнительная оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов на различных моделях агрегации у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии.**

В ходе проведенного исследования установлено, что у Л/О животных степень и скорость агрегации тромбоцитов при АДФ-индуцированной агрегации составляли  $1,463 \pm 0,127$  и  $1,159 \pm 0,236$  усл.ед. соответственно (рис.12). На модели коллаген – индуцированной агрегации тромбоцитов, изучаемые показатели принимали значения  $1,225 \pm 0,077$  (степень агрегации) и  $0,769 \pm 0,108$  (скорость агрегации) усл.ед. (рис.13). На фоне индукции процесса агрегации тромбоцитов ристомицином значения степени и скорости агрегации составили  $1,577 \pm 0,114$  и  $1,433 \pm 0,08$  усл.ед. соответственно (рис.14).



**Рисунок 12. Изменение параметров процесса АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в условиях коррекции фокальной церебральной ишемии соединением АТАСЛ и препаратами сравнения у крыс.**

*Обозначение:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс # -  $p < 0,02$ ; \* -  $p < 0,05$ ;

$\Delta$  - статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы крыс ( $p < 0,05$ ).

Фокальная ишемия головного мозга привела к повышению у НК группы крыс степени и скорости АДФ (рис.12) – индуцированной агрегации тромбоцитов относительно Л/О группы животных на 97,9% ( $p < 0,05$ ) и 228,4% ( $p < 0,02$ ) соответственно. При оценке агрегационной активности тромбоцитов при индукции процесса агрегации коллагеном (рис.13), было установлено повышение степени и скорости агрегации тромбоцитов у НК группы крыс, по сравнению с Л/О животными на 91,3% ( $p < 0,05$ ) и на 316,3% ( $p < 0,02$ ) соответственно. Также у данной группы крыс установлено повышение степени и скорости ристомидин-индуцированной (рис.14) агрегации тромбоцитов относительно Л/О животных на 54,3% ( $p < 0,05$ ) и 81,5% ( $p < 0,05$ ). При этом следует отметить, что содержание тромбоцитов в

крови во всех экспериментальных группах было сопоставимо (статистически значимых отличий между группами не установлено) (табл.7).

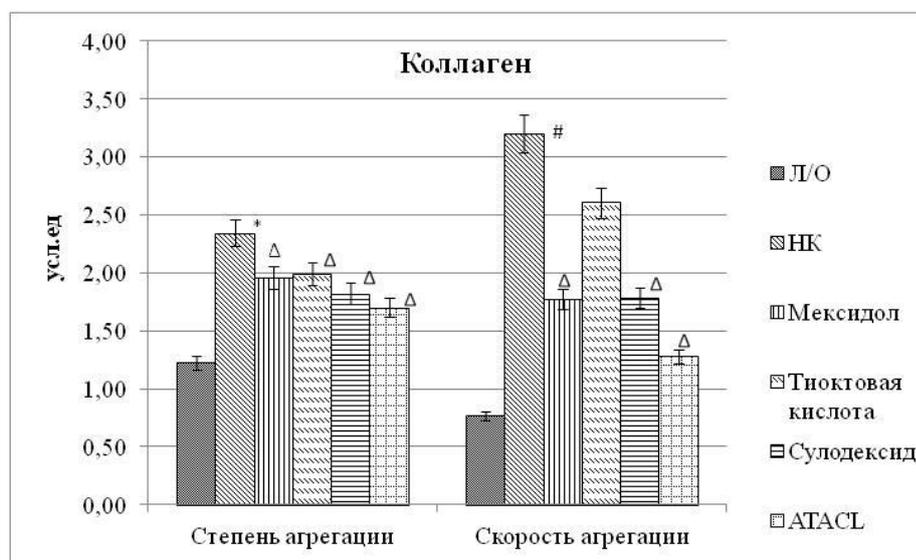
**Таблица 7**

**Содержание тромбоцитов в крови при применении исследуемого соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс**

Группа	Л/О	НК	Сулодексид	Мексидол	Тиоктовая кислота	АТАСЛ
PLT*10 <sup>9</sup> /L	418,6± 40,989	415,5± 23,778	421,6± 33,372	426,3± 28,927	415,8± 20,519	420,8± 14,115

*Примечание:* PLT – количество тромбоцитов.

На фоне применения сулодексида степень и скорость агрегации тромбоцитов снизились, при индукции процесса агрегации АДФ, по сравнению с НК группой животных на 55,1% ( $p<0,05$ ) и 112,4% ( $p<0,05$ ) соответственно (рис.20). Кроме того, у группы крыс, получавших сулодексид, на модели коллагеновой агрегации установлено снижение, по сравнению с НК группой животных параметров, характеризующих агрегационную активность тромбоцитов – степени агрегации на 28,8% ( $p<0,05$ ), а скорости агрегации – на 79,1% ( $p<0,05$ ) (рис.13). При ристомицин-индуцированной агрегации у крыс, на фоне применения сулодексида, степень агрегации тромбоцитов снизилась относительно НК группы животных на 39,1% ( $p<0,05$ ). Кроме того скорость агрегации (ристомицин) была меньше у животных, получавших сулодексид, по сравнению с крысами НК группы на 52,6% ( $p<0,05$ ) (рис.14).



**Рисунок 13. Изменение параметров процесса коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов в условиях коррекции фокальной церебральной ишемии соединением АТАСЛ и препаратами сравнения у крыс.**

*Обозначение:* статистически значимо (U-критерий Манна – Уитни) относительно Л/О группы крыс # -  $p < 0,02$ ; \* -  $p < 0,05$ ;

Δ - статистически значимо относительно НК группы крыс (U-критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ ).

При применении мексидола у крыс на модели АДФ-индуцированной агрегации отмечено уменьшение степени агрегации тромбоцитов по сравнению с НК группой животных на 59% ( $p < 0,05$ ). При этом скорость агрегации (рис.12) (АДФ) при применении мексидола была ниже по сравнению с НК группой животных на 94,6% ( $p < 0,05$ ). Аналогичная тенденция в изменении агрегационной активности тромбоцитов на фоне применения мексидола установлена и на моделях коллаген-индуцированной (рис.13) и ристомицин-индуцированной (рис.14) агрегации тромбоцитов. При этом у животных, получавших мексидол, степень агрегации снизилась (относительно НК группы крыс) в обоих случаях. Так на модели коллагеновой агрегации степень агрегации на фоне введения мексидола снизилась по отношению к НК группе крыс на 19,6% ( $p < 0,05$ ), а также на 20,4% ( $p < 0,05$ ) при индукции агрегации ристомицином. Скорость агрегации при применении мексидола значимо изменилась лишь при использовании в

качестве индуктора агрегации коллагена, а именно имело место ее снижение по сравнению с НК группой крыс на 80,2% ( $p < 0,05$ ).

У крыс, на фоне применения тиоктовой кислоты степень и скорость агрегации тромбоцитов при использовании в качестве индуктора данного процесса АДФ (рис.12) снизились относительно НК группы крыс на 38,4% ( $p < 0,05$ ) и 91% ( $p < 0,05$ ) соответственно. На модели коллагеновой (рис.13) агрегации у животных, получавших тиоктовую кислоту, значимо изменилась лишь степень агрегации, а именно имело место снижение данного показателя по отношению к НК группе крыс на 17,4% ( $p < 0,05$ ). При индукции агрегации ристомидином (рис.14) у крыс на фоне применения тиоктовой кислоты наблюдалось снижение (относительно НК группы животных) степени и скорости агрегации тромбоцитов на 21% ( $p < 0,05$ ) и 69,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно.



**Рисунок 14. Изменение параметров процесса ристомидин-индуцированной агрегации тромбоцитов в условиях коррекции фокальной церебральной ишемии соединением АТАСЛ и препаратами сравнения у крыс.**

*Обозначение:* \* - статистически значимо относительно Л/О группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ );

Δ - статистически значимо относительно НК группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

Оценивая влияние соединения АТАСЛ на состояния агрегационного потенциала тромбоцитов на фоне фокальной ишемии головного мозга, отмечено снижение степени и скорости АДФ-индуцированной (рис.12) агрегации тромбоцитов у данной группы животных относительно НК группы крыс на 68% ( $p < 0,05$ ) и 106,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне применения соединения АТАСЛ была сопоставима с таковой при применении препаратов сравнения, а степень агрегации значимо не отличалась от аналогичного значения у групп животных, получавших сулодексид и мексидол, и была меньше на 21,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой крыс, которым вводили тиоктовую кислоту. При использовании в качестве индуктора агрегации коллагена (рис.13) у животных, получавших АТАСЛ, степень и скорость агрегации тромбоцитов снизились относительно НК группы крыс на 37,7% ( $p < 0,05$ ) и 150,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом степень агрегации при применении соединения АТАСЛ статистически значимо не отличалась от групп крыс, получавших препараты сравнения, а скорость агрегации была ниже относительно группы животных, которым вводили тиоктовую кислоту на 103,8% ( $p < 0,05$ ) (статистически значимых отличий в значении скорости агрегации тромбоцитов между группами крыс, получавших АТАСЛ, сулодексид и мексидол установлено не было). При ристомицин (рис.14) – индуцированной агрегации степень и скорость агрегации тромбоцитов на фоне применения АТАСЛ были ниже по отношению к группе животных НК на 33,5% ( $p < 0,05$ ) и 41,5% ( $p < 0,05$ ). При этом статистически значимых отличий между группами крыс, получавших АТАСЛ, сулодексид и мексидол установлено не было. В то же время при применении соединения АТАСЛ скорость агрегации тромбоцитов снизилась относительно группы животных, получавших тиоктовую кислоту на 26,8% ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, установлено, что и препараты сравнения, и исследуемое соединение АТАСЛ способны снизить агрегационный потенциал тромбоцитов на фоне фокальной ишемии головного мозга. При

этом эффект от применения АТАСЛ превосходил эффект от применения мексидола и тиоктовой кислоты, и не ступал таковому от применения сулодексида.

## **6.2 Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на некоторые параметры плазменного гемостаза, активность противосвертывающих систем и уровень фактора фон Виллебранда в условиях фокальной церебральной ишемии**

У группы Л/О животных исходные показатели, характеризующие состояние плазменного гемостаза составляли: активированное частичное тромбопластиновое время –  $32,7 \pm 0,902$  сек., концентрация фибриногена –  $1,53 \pm 0,123$  г/л, тромбиновое время –  $18,9 \pm 1,267$  сек. (табл.8).

**Таблица 8**

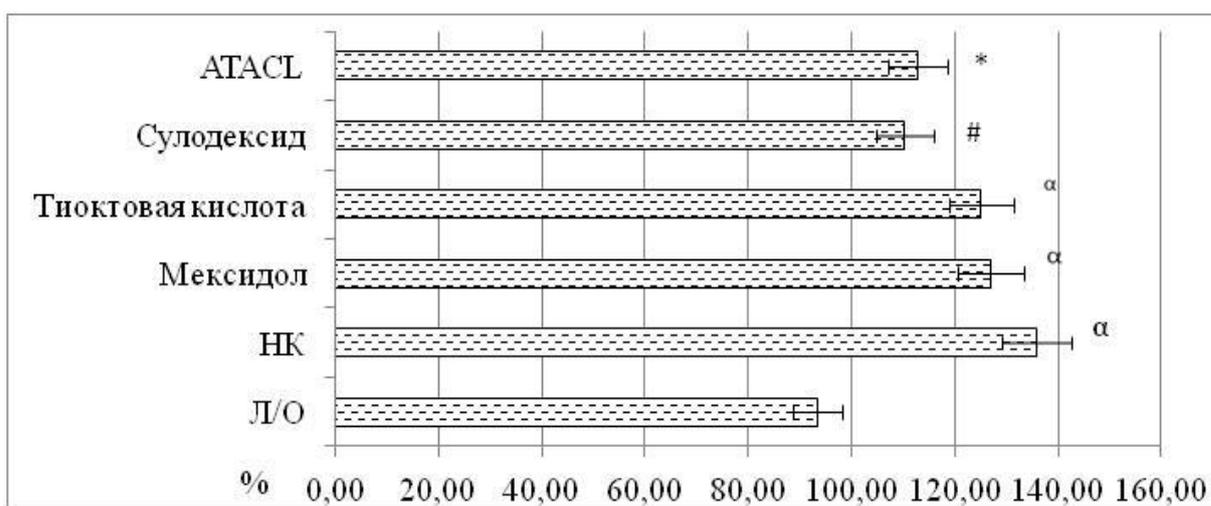
**Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на длительность АЧТВ, ТВ и концентрацию фибриногена у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс**

Показатель	Л/О	НК	Мексидол	Тиоктовая кислота	Сулодексид	АТАСЛ
<b>АЧТВ, сек</b>	$32,7 \pm 0,902$	$19,8 \pm 2,559\#$	$21,1 \pm 1,743$	$20,9 \pm ,344$	$30,3 \pm 0,68^*$	$27,8 \pm 1,427^*$
<b>Фибриноген, г/л</b>	$1,53 \pm 0,123$	$5,31 \pm 0,408\alpha$	$4,09 \pm 0,606^*$	$4,26 \pm 0,69^*$	$3,16 \pm 0,276\mu$	$3,06 \pm 0,51^*$
<b>ТВ, сек</b>	$18,9 \pm 1,267$	$8,48 \pm 1,39\#$	$10,9 \pm 1,042$	$10,6 \pm 0,573$	$13,5 \pm 0,751^*$	$13,8 \pm 1,382^*$

*Примечание:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы животных \* -  $p < 0,05$ ;  $\mu$ -  $p < 0,02$ ;  
статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс # -  $p < 0,05$ ;  $\alpha$  -  $p < 0,02$ .

Уровень фактора фон Виллебранда (рис.15) у Л/О группы крыс составлял 93,4%. Концентрация РФМК и Д-димеров принимали значения  $5,1 \pm 0,153$  г/л\* $10^{-2}$  и  $203,8 \pm 1,594$  нг/мл соответственно (табл.9). Активность противосвертывающих систем антитромбина–III и протеина С у Л/О животных были соответственно  $102 \pm 4,848\%$  и  $1,01 \pm 0,007$  усл.ед. (табл.10).

В ходе проведенного исследования у НК группы крыс по сравнению с группой Л/О животных отмечено снижение показателей ТВ и АЧТВ на 122,9% ( $p < 0,05$ ) и 65,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл.8). Также у НК группы крыс относительно Л/О группы животных отмечено повышение содержания фибриногена на 247,1% ( $p < 0,02$ ), РФМК на 358,8% ( $p < 0,02$ ), Д-димеров на 100,6% ( $p < 0,05$ ) (табл.9), FW (рис.15) на 45,4% ( $p < 0,01$ ). Активность антитромбина-III и системы протеина С (табл.10) у НК группы крыс снизилась по сравнению с Л/О животными на 66,7% ( $p < 0,05$ ) и 31,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.



**Рисунок 15. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на активность фактора фон Виллебранда у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии**

*Обозначение:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно группы животных НК \* -  $p < 0,05$ ; # -  $p < 0,02$ ;

α – статистически значимо относительно Л/О группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,01$ ).

На фоне применения сулодексида наблюдалась тенденция нормализации состояния всех изучаемых параметров, что подтверждается снижением концентрации фибриногена в плазме крови у крыс, получавших сулодексид, по сравнению с Л/О животными на 68% ( $p < 0,02$ ). Показатели ТВ и АЧТВ. (табл.8) при применении сулодексида увеличились относительно НК группы крыс на 59,2% ( $p < 0,05$ ) и 53% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Содержание РФМК на фоне введения сулодексида статистически значимо не отличалось от значения Л/О группы крыс (табл.9). Уровень FW, у животных, получавших сулодексид, снизился на 23% ( $p<0,02$ ), по сравнению с НК группой крыс. На фоне применения сулодексида содержание Д-димеров уменьшилось на 36% ( $p<0,01$ ), по отношению к НК группе животных. Также у крыс, получавших сулодексид активность противосвертывающей системы антитромбина-III и протеина С, по сравнению с НК группой крыс увеличилась соответственно на 56,2% ( $p<0,05$ ) и 16,9% ( $p<0,05$ ). Полученные данные подтверждают ранее проведенные исследования на предмет наличия у сулодексида положительного влияния на антитромботическую функцию сосудистого эндотелия [10, 45].

На фоне применения мексидола концентрация фибриногена уменьшилась по сравнению с НК группой крыс на 29,8% ( $p<0,05$ ). Также у крыс, получавших мексидол, по сравнению с НК группой животных отмечено снижение содержания Д-димеров (табл.6) на 18,5% ( $p<0,05$ ) и повышение активности АТ-III на 20,9% ( $p<0,05$ ). Остальные изучаемые параметры при применении мексидола статистически значимо не отличались от аналогичных показателей НК группы животных.

**Таблица 9**

**Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на концентрацию специфических маркеров тромбообразования в плазме крови крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс**

Показатель	Л/О	НК	Мексидол	Тиоктовая кислота	Сулодексид	АТАСЛ
РФМК, $10^{-2}$ г/л	5,1± 0,153	23,4± 3,363 $\alpha$	20,8± 1,53	18± 2,522*	6,6± 0,485 $\mu$	9,8± 1,737 $\mu$
Д - димеры, нг/мл	203,8± 1,594	408,8± 3,76#	345± 18,333*	359,8± 13,822*	300,6± 9,501 $\eta$	274,2± 8,794 $\eta$

*Примечание:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы животных \* -  $p<0,05$ ;  $\mu$  -  $p<0,02$ ;  $\eta$  -  $p<0,01$ ;  
статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс # -  $p<0,05$ ;  $\alpha$  -  $p<0,02$ .

На фоне применения тиоктовой кислоты наблюдалось снижение относительно НК группы животных концентрации РФМК на 30% ( $p < 0,05$ ), Д-димеров и фибриногена на 13,6% ( $p < 0,05$ ) и 24,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Остальные изучаемые параметры по сравнению с НК группой крыс существенных изменений не претерпели.

**Таблица 10**

**Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на активность противосвертывающих систем антитромбина–III и протеина С**

Показатель	Л/О	НК	Мексидол	Тиоктовая кислота	Сулодексид	АТАСЛ
АТ-III, %	102± 4,848	61,2± 4,63#	74± 3,564*	61,2± 4,81	95,6± 7,966*	90,6± 5,105*
НО, усл.ед	1,01± 0,007	0,77± 0,06#	0,8± 0,01	0,85± 0,03	0,9± 0,234*	0,93± 0,019μ

*Примечание:* НО – нормализованное отношение, характеризует активность системы протеина С.

статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно группы животных НК \* -  $p < 0,05$ ; μ -  $p < 0,02$ ;

# - статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс ( $p < 0,05$ ).

У крыс при применении соединения АТАСЛ отмечено уменьшение относительно группы животных НК концентрации фибриногена на 73,5% ( $p < 0,05$ ). Кроме того, у животных, получавших АТАСЛ, по отношению к НК группе крыс отмечено увеличение времени АЧТВ и ТВ на 40,4% ( $p < 0,05$ ) и 62,7% ( $p < 0,05$ ) (табл.8) соответственно, что статистически значимо не отличалось от показателей группы животных, получавших сулодексид. Также применение АТАСЛ способствовало снижению, относительно группы животных НК концентрации РФМК на 138,8% ( $p < 0,02$ ), Д-димеров (табл.9) на 49,1% ( $p < 0,01$ ) и фактора фон Виллебранда на 20,4% ( $p < 0,05$ ). Активность противосвертывающих систем АТ-III и протеина С (табл.10), при применении АТАСЛ превосходила аналогичные показатели НК группы животных соответственно на 48% ( $p < 0,05$ ) и 20,8% ( $p < 0,02$ ). В сравнении с животными, получавшими мексидол, на фоне введения АТАСЛ уменьшилась

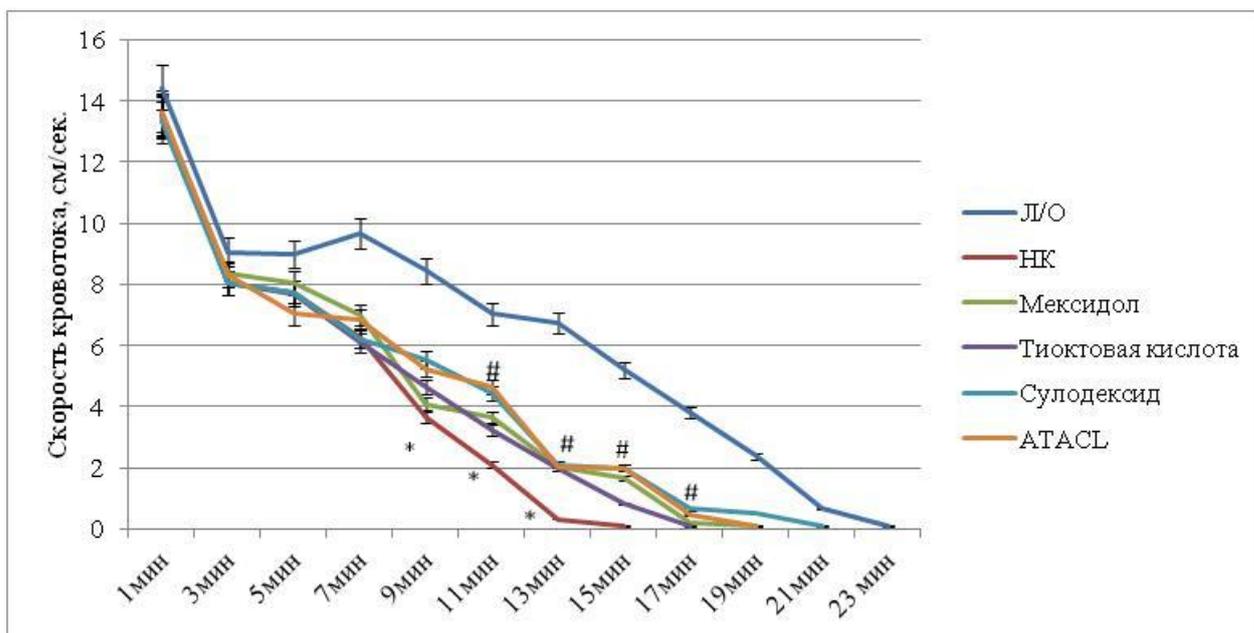
концентрация РФМК на 122,2% ( $p < 0,02$ ), Д – димеров на 25,8% ( $p < 0,05$ ) и фибриногена на 33,7% ( $p < 0,05$ ). Относительно группы животных, которым вводили тиоктовую кислоту, у крыс на фоне применения АТАСЛ наблюдалось снижение концентрации РФМК, Д-димеров и фибриногена на 83,7% ( $p < 0,05$ ), 31,2% ( $p < 0,05$ ) и 39,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность системы АТ-III на фоне введения АТАСЛ превосходила таковую при применении мексидола на 22,4 % ( $p < 0,05$ ), а тиоктовой кислоты на 48% ( $p < 0,02$ ). Активность системы протеина С также была выше при применении АТАСЛ, чем при введении мексидола на 16,3% ( $p < 0,05$ ). АЧТВ и ТВ на фоне введения АТАСЛ были выше, чем при применении мексидола на 31,7% ( $p < 0,05$ ) и 26,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а тиоктовой кислоты соответственно на 33% ( $p < 0,05$ ) и 30,2% ( $p < 0,05$ ).

### **6.3 Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на скорость образования тромба и продолжительность свертывания крови крыс в условиях фокальной церебральной ишемии**

У Л/О группы крыс прекращение кровотока в правой сонной артерии наступало к 23-ей минуте (рис.16), в то время как у группы животных НК время полной окклюзии правой сонной артерии тромбом было меньше, чем у Л/О группы крыс на 53,3% ( $p < 0,05$ ).

На фоне применения сулодексида скорость образования тромба в правой сонной артерии была статистически значимо ниже по сравнению с НК группой крыс на 40% ( $p < 0,05$ ). Аналогичная тенденция изменений наблюдалась при применении мексидола и соединения АТАСЛ. Так полное прекращение кровотока в сонной артерии у крыс наступало позже по отношению к группе животных НК на 30% ( $p < 0,05$ ) при применении мексидола и на 35,3% ( $p < 0,05$ ) на фоне применения АТАСЛ. На фоне введения тиоктовой кислоты (рис.16) скорость образования тромба в сонной

артерии крыс статистически значимо не отличалась от таковой у НК группы крыс.



**Рисунок 16. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на скорость тромбообразования в правой сонной артерии у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга.**

Обозначение: \* - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ );

# - статистически значимо относительно НК группы животных (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

Как видно из табл.11 у НК группы животных по сравнению с Л/О крысами наблюдалось статистически значимое уменьшение продолжительности свертывания крови на 52,2% ( $p < 0,05$ ). В тоже время применение сулодексид и соединения АТАСЛ позволило скорректировать возникшие изменения. Так продолжительность свертывания крови у крыс на фоне применения сулодексид и АТАСЛ статистически значимо не отличалась от таковой у Л/О группы животных, и превосходили аналогичный показатель НК группы крыс на 53,8% ( $p < 0,05$ ) и 45,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Таблица 11

**Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на показатели коагулограммы крыс в условиях фокальной церебральной ишемии**

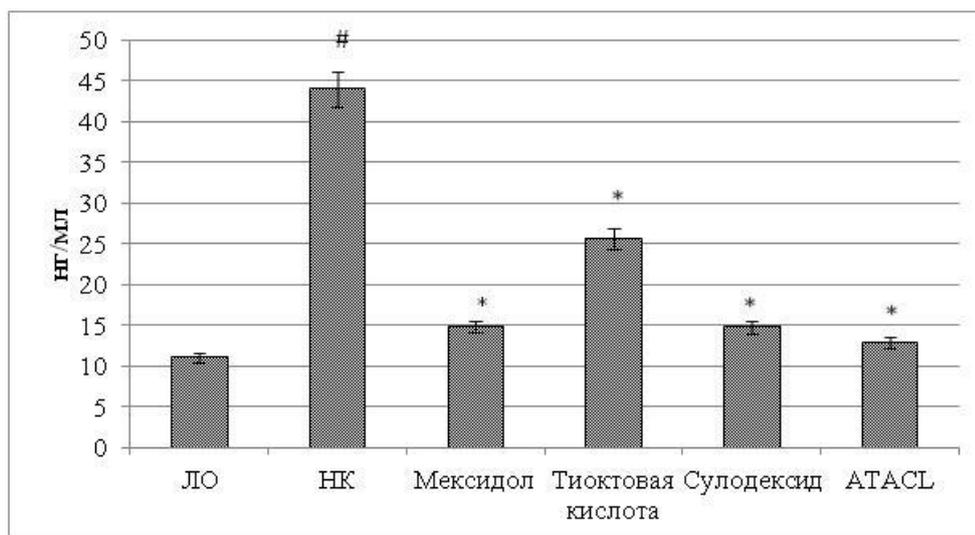
Показатель	Начало свертывания крови, с	Конец свертывания крови, с	Продолжительность свертывания крови, с
Л/О	52±10,939	161,7±11,081	109,7±19,195
НК	46,7±8,839	115,7±13,948	72,1±8,084*
Мексидол	28,3±6,591	125±17,078	96,3±16,362
Тиоктовая кислота	29,6±7,257	128±15,297	98,4±17,974
Сулодексид	53,4±10,459	164,3±18,256	110,9±12,657#
АТАСЛ	50,6±13,441	154±9,234	105±12,349#

*Примечание:* \* - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ );

# - статистически значимо относительно НК группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ ).

#### **6.4 Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на плазменную концентрацию тромбксана $A_2$ у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии**

Содержание тромбксана  $A_2$  у Л/О животных было  $10,95 \pm 2,258$  нг/мл (рис.17). У НК группы крыс наблюдалось повышение концентрации ТХА<sub>2</sub> относительно Л/О животных на 301,6% ( $p < 0,05$ ). Применение мексидола и тиоктовой кислоты способствовало снижению концентрации тромбксана  $A_2$  в сыворотке крови крыс на 196,1% ( $p < 0,05$ ) и 72,5% ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 17. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на изменение концентрации тромбксана  $A_2$  у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии**

*Обозначение:* # - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ );

\*- статистически значимо относительно НК группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ ).

На фоне применения сулодексида концентрация  $TxA_2$  (рис.17) снизилась относительно НК группы крыс на 197,7% ( $p < 0,05$ ). Введение крысам соединения АТАСЛ способствовало снижению содержания тромбксана  $A_2$  на 241,9 % ( $p < 0,05$ ).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе проведенного блока исследований установлено, что фокальная ишемия головного мозга у крыс сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, с угнетением антитромбогенного потенциала сосудистого эндотелия. При этом изменения коснулись как сосудисто-тромбоцитарного, так и плазменного гемостаза. На модели АДФ – индуцированной агрегации степень и скорость агрегации у НК группы крыс увеличились соответственно на 97,9% ( $p < 0,05$ ) и 228,4% ( $p < 0,02$ ). При индукции процесса агрегации коллагеном данные показатели увеличились на 91,3% ( $p < 0,05$ ) и 316,3%

( $p < 0,02$ ) (степень и скорость агрегации соответственно), а при использовании в качестве индуктора ристомицина на 54,3% ( $p < 0,05$ ) и 81,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также у НК группы животных по отношению к Л/О крысам наблюдалось повышение специфических маркеров развития эндотелиальной дисфункции - уровня фактора фон Виллебранда на 45,4% ( $p < 0,01$ ) и концентрации фибриногена на 247,1% ( $p < 0,02$ ) а также растворимых фибрин-мономерных комплексов и Д-димеров коллагена, тромбоксана  $A_2$ , укорочение АЧТВ, ТВ, скорости тромбообразования и времени свертывания крови. Кроме того у группы животных НК отмечено снижение (по сравнению с Л/О группой крыс) активности противосвертывающих систем антитромбина-III и протеина С.

Полученные данные согласуются с проведенными экспериментальными и клиническими исследованиями и подтверждают значительную роль нарушения системы гемостаза в развитии и дальнейшем проявлении осложнений ишемического инсульта [65, 164, 165].

Применение препаратов сравнения у крыс позволило скорректировать возникший дисбаланс, при этом наиболее выраженные изменения наблюдались на фоне применения сулодексида. Так при применении сулодексида наблюдалось восстановление антитромботической функции эндотелия, что подтверждается нормализацией (относительно НК группы крыс) всех изучаемых показателей. На фоне введения мексидола и значимо изменились лишь агрегационная активность тромбоцитов на моделях АДФ и коллаген-индуцированной агрегации (при индукции агрегации ристомицином значимо изменилась только степень агрегации), концентрация фибриногена (снизилась на 29,8% ( $p < 0,05$ )), содержания Д-димеров (уменьшилось на 18,5% ( $p < 0,05$ )) и активность АТ-III (увеличилась на 20,9% ( $p < 0,05$ )). Применение тиоктовой кислоты оказало малозначительное влияние на антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов.

Применение соединения АТАСL, также как и применение сулодексида способствовало сохранению антитромботической функции сосудистого

эндотелия у крыс на фоне ишемии головного мозга. При этом 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота практически в равной с сулодексидом степени устраняла явления повышенной агрегации и гиперкоагуляции в условиях ишемии головного мозга. Кроме того фармакологический эффект от применения данного соединений превосходил таковой от применения мексидола и тиоктовой кислоты.

## ГЛАВА 7. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов в условиях фокальной церебральной ишемии

Учитывая высокую роль воспалительного процесса в патогенезе нарушений мозгового кровообращения [13, 72, 133], а также способность эндотелия сосудов препятствовать генерации воспаления на стенку сосуда [53], нами была проведена оценка противовоспалительной функции сосудистого эндотелия в условиях ишемии головного мозга и на фоне введения соединения АТАСЛ.

Концентрация С-реактивного белка (табл.12) у Л/О животных составляла  $2,23 \pm 0,228$  мг/л, при содержании лейкоцитов (табл.15) в крови у данной группы крыс  $8,26 \pm 1,325 \cdot 10^9$  кл/л. На фоне фокальной ишемии головного мозга у животных отмечено повышение концентрации СРБ в сыворотке крови, относительно Л/О группы крыс в 6,2 ( $p < 0,05$ ) раза, сопровождаемое умеренным лейкоцитозом (содержание лейкоцитов у НК группы крыс превосходило аналогичный показатель Л/О животных на 35,1% ( $p < 0,05$ )).

Таблица 12

Изменение концентрации С-реактивного белка и лейкоцитов в крови у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии

Группа	ЛО	НК	Сулодексид	Мексидол	Тиоктовая кислота	АТАСЛ
СРБ, мг/л	$2,23 \pm 0,228$	$13,92 \pm 1,125 \Delta$	$7,46 \pm 0,527^*$	$8,41 \pm 0,743^*$	$11,21 \pm 1,261$	$6,99 \pm 0,446^*$
WBC, $10^9$ кл/л	$8,26 \pm 1,325$	$11,16 \pm 1,178 \Delta$	$7,34 \pm 0,998^*$	$6,88 \pm 0,959^*$	$8,24 \pm 0,928^*$	$6,92 \pm 0,817^*$

Примечание:  $\Delta$  - статистически значимо относительно Л/О группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ );

\* - статистически значимо относительно НК группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

При применении мексидола содержание С-реактивного (табл.12) белка у крыс снизилось по отношению к НК группе животных на 65,5% ( $p < 0,05$ ), при полном восстановлении лейкоцитарной концентрации (табл.12) (статистически значимых отличий относительно Л/О группы крыс установлено не было).

На фоне введения тиоктовой кислоты концентрация СРБ (табл.12) статистически значимо не отличалась от таковой у НК группы крыс. Содержание лейкоцитов (табл.12) в крови у крыс, получавших тиоктовую кислоту, было сопоставимо с группой Л/О животных.

У крыс, получавших сулодексид и АТАСЛ, концентрация С-реактивного белка (табл.12) относительно НК группы животных снизилась на 86,3% ( $p < 0,05$ ) и 99,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом у данных групп животных наблюдалось полное восстановление лейкоцитарной концентрации (содержание лейкоцитов (табл.12) уменьшилось по отношению к НК группе крыс на 52% ( $p < 0,05$ ) и 61,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе проведенной оценки противовоспалительной функции эндотелия сосудов установлено, что в условиях ишемии головного мозга у крыс на фоне умеренного лейкоцитоза повышается концентрация СРБ в 6,2 ( $p < 0,05$ ) раза. Применение мексидола, сулодексида и АТАСЛ способствовало устранению возникшего дисбаланса противовоспалительной функции эндотелия сосудов (применение препаратов нормализовало концентрацию лейкоцитов и способствовало снижению концентрации СРБ на 65,5% ( $p < 0,05$ ), 86,3% ( $p < 0,05$ ) и 99,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно), в то время как введение тиоктовой кислоты значимого влияния на состояние противовоспалительного потенциала эндотелия сосудов не оказало.

## **ГЛАВА 8. Оценка потенциальных механизмов реализации эндотелиопротекторного действия 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты**

### **8.1. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на процессы генерации свободных радикалов и состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

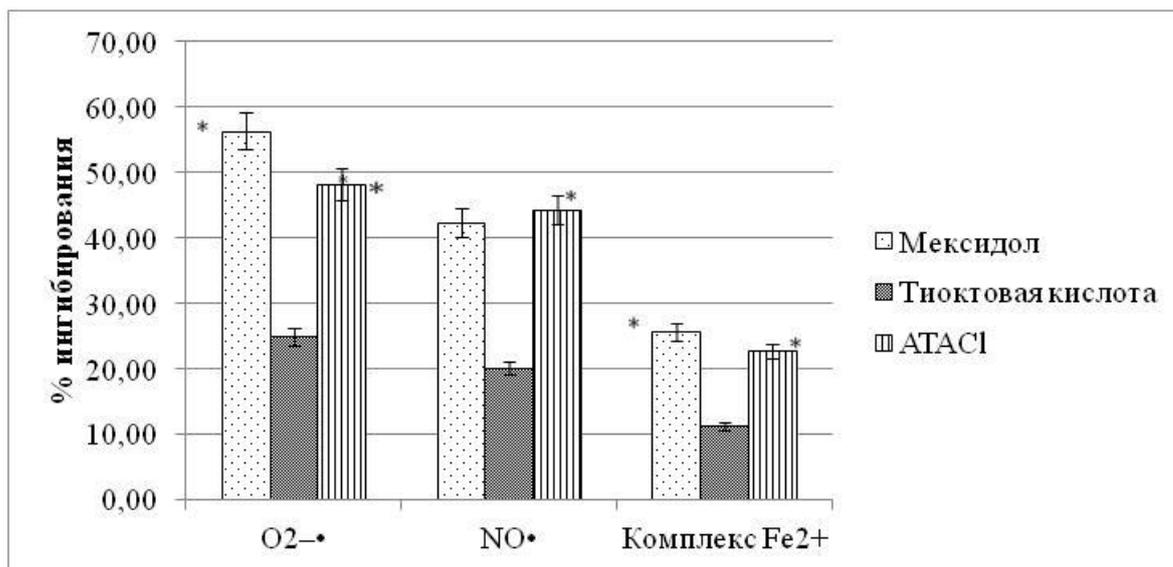
Данная серия экспериментов выполнена в 2 этапа. На первом этапе производили оценку антирадикальных свойств соединения АТАСЛ *in vitro*. При этом определяли процент торможения образования супероксидного анион – радикала и нитрозильного радикала. Также по литературным данным некоторые производные коричной кислоты проявляют хелатирующие свойства в отношении тяжелых металлов [160], поэтому нами была исследована Fe<sup>2+</sup>-хелатирующая активность соединения АТАСЛ. На втором этапе исследования проводили оценку влияния соединения АТАСЛ на состояние про/антиоксидантного равновесия на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс (определяли концентрацию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, а также активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы).

#### **8.1.1. Изучение антирадикальной и Fe<sup>2+</sup>-хелатирующей активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на моделях *in vitro***

В данном блоке исследований осуществляли оценку антирадикальных и хелатирующих свойств соединения АТАСЛ в сравнении с мексидолом и тиоктовой кислотой.

В результате проведенного эксперимента установлено, что мексидол тормозит генерацию супероксидного анион-радикала на 56,3%, в то время как тиоктовая кислота снижает образование данного радикала всего на 24,9% (рис.18). Также выявлены анти- NO – радикальные и хелатирующие свойства

мексидола, подтверждаемые торможением образования NO\* на 42,4% и комплекса с двухвалентным железом на 25,6%. Тиоктовая кислота проявила сходные с мексидолом свойства, однако процент торможения генерации NO\* и комплекса с Fe<sup>2+</sup> был существенно ниже по сравнению с мексидолом (рис.18).



**Рисунок 18. Антирадикальные и хелатирующие свойства соединения АТАСЛ в сравнении с мексидолом и тиоктовой кислотой.**

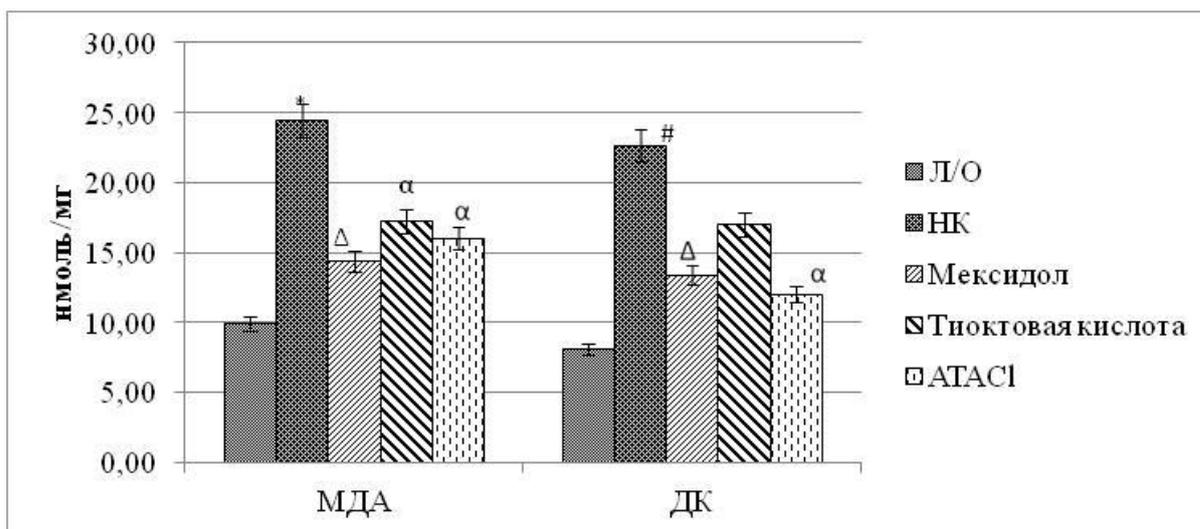
*Обозначение:* \* - статистически значимо (t – критерий Стьюдента) относительно группы животных, получавших тиоктовую кислоту (p<0,05).

Соединение АТАСЛ проявило сходную с мексидолом антирадикальную и хелатирующую активность (статистически значимых отличий не установлено). При сравнении антирадикальных свойств АТАСЛ и тиоктовой кислоты установлено, что процент торможение образования O<sub>2</sub><sup>-•</sup> и NO\* у соединения АТАСЛ был выше, чем у тикотовой кислоты на 93,6% (p<0,05) и 120,4% (p<0,05) соответственно, а процент терминации образования комплекса с двухвалентным железом (рис.18) на 100,9% (p<0,05). Таким образом, соединение АТАСЛ по антирадикальной и хелатирующей активности не уступает мексидолу и превосходит тиоктовую кислоту.

### **8.1.2. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

Окислительный стресс является одним из основных звеньев патогенеза ишемического инсульта. При этом гиперпродукция свободных радикалов ведет к усугублению повреждения структур клетки [Луцкий М.А. с соавт., 2014]. Основная защитная функция от свободно-радикального окисления ложится на ферменты эндогенной антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Поэтому повышение активности указанных ферментов способно снизить гиперпродукцию свободных радикалов и нивелировать их повреждающее действие на мозговую ткань [Маслюкова А.В. с соавт., 2015].

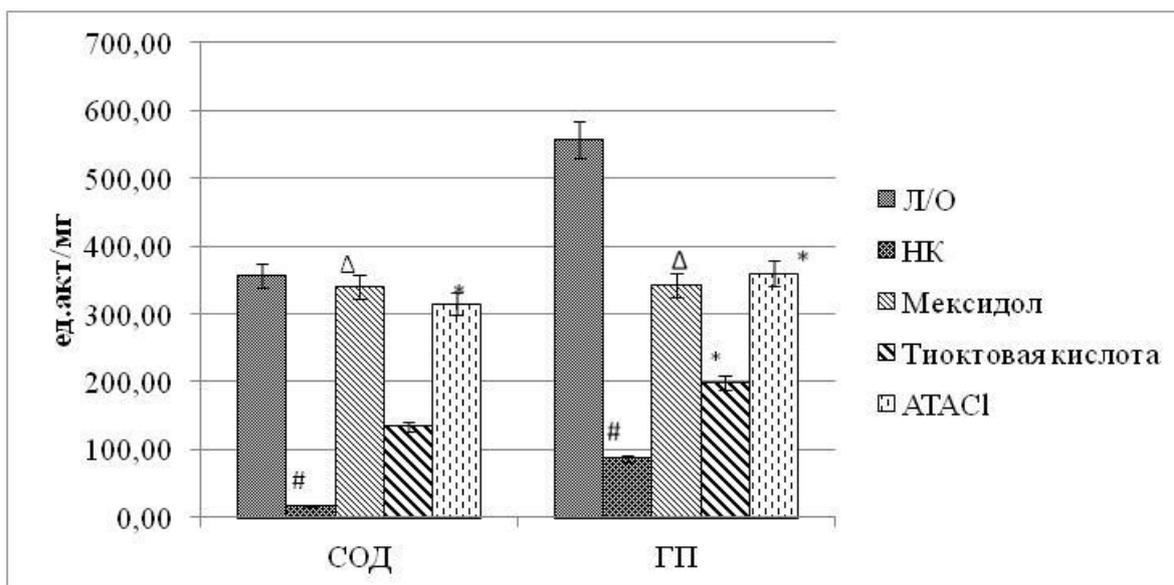
В результате исследования установлено, что у крыс фокальная ишемия головного мозга приводит к развитию про/антиоксидантного дисбаланса, сопровождаемого повышенным образованием оксидантов, что подтверждается увеличением концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов (рис.19) у группы крыс НК, по сравнению с Л/О животными на 145,7% ( $p < 0,01$ ) и 178,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Кроме того у НК группы животных активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты на фоне ишемии головного мозга была существенно ниже, чем у Л/О крыс. Так у группы животных НК наблюдалось снижение (по сравнению с Л/О группой крыс) (рис.20, рис.21) активности: СОД – в 20,3 раза ( $p < 0,05$ ), каталазы – в 7 раз ( $p < 0,05$ ), глутатионпероксидазы - в 6,4 раза ( $p < 0,05$ )



**Рисунок 19. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на концентрацию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в гомогенате головного мозга крыс на фоне фокальной ишемии.**

*Обозначение:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс \* -  $p < 0,01$ ; # -  $p < 0,05$ ;  
 статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы животных  $\Delta$  -  $p < 0,02$ ;  $\alpha$  -  $p < 0,05$ .

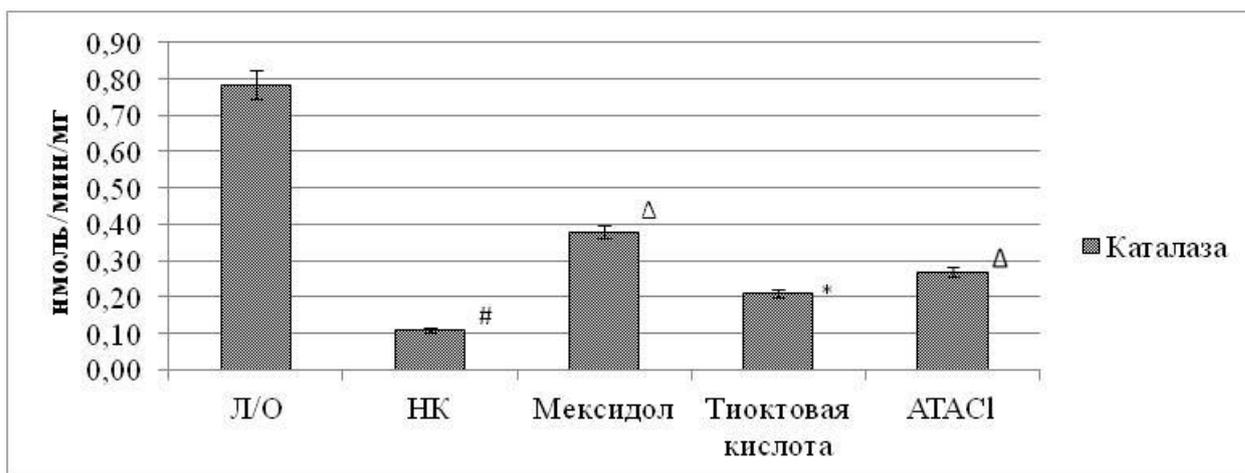
Применение мексидола на фоне ишемии головного мозга способствовало снижению концентрации МДА и ДК (рис.19), относительно группы животных НК на 70,1% ( $p < 0,02$ ) и 69,3% ( $p < 0,02$ ) соответственно. Кроме того, у крыс на фоне введения мексидола наблюдалось повышение, по сравнению с НК группой крыс, активности СОД в 19,4 раза ( $p < 0,02$ ), каталазы - на 245,5% ( $p < 0,05$ ), ГП – на 292,8% ( $p < 0,02$ ) (рис.20, рис.21). Как следствие повышения активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты и снижения образования прооксидантов, на фоне применения мексидола коэффициент окислительного стресса, по отношению к НК группе крыс уменьшился в 6,6 раз ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 20. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс.**

*Обозначение:* # - статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс ( $p < 0,05$ );  
 статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы животных Δ -  $p < 0,02$ ; \* -  $p < 0,05$ .

У крыс на фоне применения тиоктовой кислоты концентрация МДА (рис.19) на 41,4% ( $p < 0,05$ ) была ниже относительно НК группы животных. Также введение тиоктовой кислоты способствовало повышению активности каталазы и ГП (рис.20, рис.21) на 90,9% ( $p < 0,05$ ) и 127,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Остальные изучаемые показатели статистически значимо не отличались от НК группы животных.



**Рисунок 21. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на активность каталазы в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс.**

*Обозначение:* # - статистически значимо относительно Л/О группы крыс (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ );  
 статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы животных Δ -  $p < 0,02$ ; \* -  $p < 0,05$ .

Применение соединения АТАСІ способствовало устранению про/антиоксидантного дисбаланса, возникшего в результате ишемического повреждения головного мозга, что подтверждается снижением концентрации прооксидантов МДА и ДК по сравнению с НК группой животных на 52,6% ( $p < 0,05$ ) и на 88,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис.19). Также на фоне введения данного соединения отмечено увеличение (по отношению к НК группе крыс) активности ферментов антиоксидантной защиты, а именно активность СОД возросла в 18 раз ( $p < 0,05$ ), каталазы на 1456% ( $p < 0,02$ ) и глутатионпероксидазы в 4,1 раза ( $p < 0,05$ ).

## **8.2.Изучение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на концентрацию изоферментов NO-синтазной системы и специфических маркеров эндотелиальной дисфункции в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

У Л/О животных концентрация изоферментов синтазы оксида азота (eNOS, nNOS, iNOS) составляла  $77,9 \pm 0,009$  пг/мл,  $13 \pm 0,008$  нг/мл и  $16,7 \pm 0,013$  нг/мл соответственно (табл.13). При этом концентрация ассиметричного диметиларгинина у Л/О животных принимала значение  $34,9 \pm 0,029$  нг/мл. Концентрация РКС и матриксной металлопротеиназы-1у Л/О крыс были  $49,08 \pm 9,794$  нг/мл и  $24,17 \pm 1,297$  нг/мл соответственно.

На фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс отмечено повышение концентрации ADMA по сравнению с Л/О животными на 96% ( $p < 0,05$ ). При этом повышение содержания ADMA у группы животных НК коррелировало с угнетением эндотелиальной NO-синтазы (концентрация eNOS у НК группы крыс уменьшилась относительно Л/О группы животных на 65,4% ( $p < 0,05$ )), и повышением концентрации nNOS и iNOS на 63,5% ( $p < 0,05$ ) и 30,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Кроме того у крыс НК отмечено повышение концентрации РКС и MMP1 (табл.16) по отношению к Л/О группе животных на 179,5% ( $p < 0,05$ ) и 45,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При применении мексидола у крыс, по сравнению с группой животных НК наблюдалось снижение концентрации ADMA на 40% ( $p < 0,05$ ), nNOS и iNOS (на 14,7% и 39,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно), и незначительном повышении концентрации eNOS – на 13,8%. Также у животных, получавших мексидол, отмечено снижение концентрации РКС на 109,5% ( $p < 0,05$ ). Содержание MMP1 на фоне применения мексидола статистически значимо не отличалась от аналогичного значения группы крыс НК (табл.13).

У крыс, получавших тиоктовую кислоту, концентрация ADMA была ниже, чем у НК группы крыс на 41,6% ( $p < 0,05$ ). При этом концентрация

nNOS и iNOS у крыс, на фоне введения тиоктовой кислоты уменьшилась (относительно НК группы крыс) на 48,3% ( $p<0,05$ ) и 26,9% ( $p<0,05$ ) соответственно, а содержание eNOS, напротив, повысилось на 21,6%. Также у крыс, которым вводили тиоктовую кислоту, концентрация РКС, снизилась по отношению к группе животных НК на 83,8% ( $p<0,05$ ). Следует отметить, что введение крысам тиоктовой кислоты не вызвало статистически значимых, по сравнению с животными НК, изменений концентрации MMP1 (табл.13).

**Таблица 13**

**Влияние соединения АТАСЛ на концентрацию изоферментов NO-синтазной системы и специфических маркеров эндотелиальной дисфункции на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс**

Группа	ЛО	НК	Мексидол	Тиоктовая кислота	Сулодексид	АТАСЛ
ADMA нг/мл	34,9± 0,029	68,4± 0,052#	49± 0,045*	48,3± 0,074*	45,2± 0,041*	37,2± 0,036*
nNOS нг/мл	16,7± 0,013	27,3± 0,045#	23,8± 0,012	18,4± 0,056*	12± 0,011*	17± 0,027*
iNOS нг/мл	13± 0,008	17± 0,003#	12,2± 0,013*	13,4± 0,006*	10,1± 0,006*	10,5± 0,002*
eNOS пг/мл	77,9± 0,088	47,1± 0,065#	53,6± 0,069	57,3± 0,048	60,7± 0,095*	100,9± 0,022*
РКС нг/мл	49,08± 9,794	137,2± 26,138#	65,5± 2,79*	74,63± 22,875*	57,34± 3,716*	65,76± 6,824*
MMP1 нг/мл	24,17± 1,297	35,06± 5,919#	28,86± 2,315	32,11± 0,025	24,67± 2,604*	25,47± 2,498*

*Примечание:* # - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p<0,05$ );

\*- статистически значимо относительно НК группы животных (U – критерий Манна – Уитни,  $p<0,05$ ).

На фоне введения сулодексида (табл.13) у крыс по сравнению с животными НК группы отмечено снижение концентрации ADMA на 53,1% ( $p<0,05$ ). Кроме того у крыс, получавших сулодексид, наблюдалось повышение концентрации eNOS относительно группы животных НК на 28,9% ( $p<0,05$ ), сопровождаемое понижением содержания nNOS и iNOS на

127,5% ( $p < 0,05$ ) и 68,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также на фоне введения сулодексида у крыс, по отношению к животным НК группы, наблюдалось уменьшение концентрации РКС и MMP1 на 139,3% ( $p < 0,05$ ) и 42,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

У животных, получавших соединение АТАСЛ, концентрация ADMA (табл.13) снизилась по отношению к НК группе крыс на 83,9% ( $p < 0,05$ ). Снижение концентрации ADMA сопровождалось повышением содержания eNOS у животных, которым вводили АТАСЛ, (относительно группы крыс НК) на 114,2% ( $p < 0,05$ ), концентрация nNOS и iNOS, у данной группы животных, напротив, уменьшилась на 60,6% ( $p < 0,05$ ) и 61,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Концентрация РКС у крыс на фоне введения АТАСЛ снизилась по отношению к НК группе животных на 108,6% ( $p < 0,05$ ). Также при применении АТАСЛ наблюдалось снижение, относительно НК группы крыс, концентрации MMP1 на 37,7% ( $p < 0,05$ ).

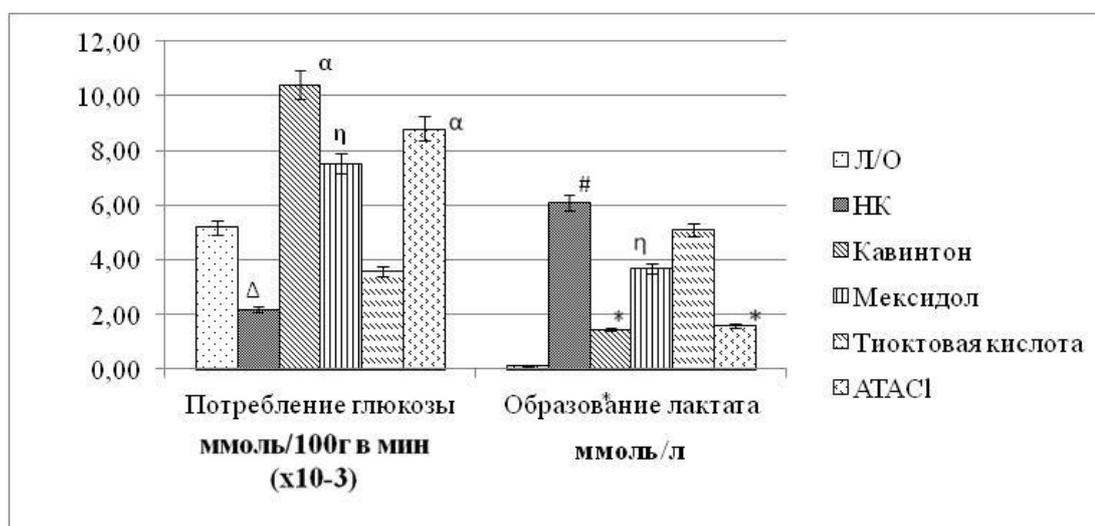
### **8.3. Оценка церебропротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

В ходе постановки данного исследования было проведено 3 серии экспериментов: 1-я была направлена на изучение влияния соединения АТАСЛ на процессы потребления глюкозы и образования лактата, концентрации митохондриальной АТФ-синтетазы и цитохром С оксидазы в ткани головного мозга на фоне фокальной ишемии; 2-я на оценку влияния соединения АТАСЛ на степень гидратации мозговой ткани на фоне фокальной ишемии головного мозга; 3-я на изучение влияния соединения АТАСЛ на размер зоны некроза мозговой ткани на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс.

### 8.3.1. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на процессы потребления глюкозы и накопления лактата в ткани головного мозга в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс

У группы Л/О животных потребление глюкозы головным мозгом было на уровне  $5,2 \pm 0,114$  ммоль/100г в мин (рис.22), при этом уровень молочной кислоты у Л/О крыс был незначителен ( $0,11 \pm 0,081$  ммоль/л).

Результатом фокальной ишемии головного мозга у крыс стало снижение уровня утилизации глюкозы головным мозгом, что подтверждается снижением по отношению к Л/О животным потребления данного субстрата мозговой тканью на 139,6% ( $p < 0,05$ ). В тоже время уровень лактата у крыс НК группы значительно превышал таковой у Л/О животных. Так у НК группы крыс концентрация молочной кислоты была выше (рис.22) аналогичного значения Л/О группы животных в 55,5 раз ( $p < 0,02$ ).



**Рисунок 22. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на процессы потребления глюкозы и образования лактата у крыс на фокальной церебральной ишемии.**

*Обозначение:* статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно Л/О группы крыс # -  $p < 0,02$ ; Δ -  $p < 0,05$ ;  
 статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно НК группы крыс\* -  $p < 0,01$ ; α -  $p < 0,02$ ; η -  $p < 0,05$

На фоне применения кавинтона потребление глюкозы головным (рис.22) мозгом было выше по отношению к НК группе крыс на 379,3% ( $p < 0,02$ ), а уровень лактата соответственно ниже на 321% ( $p < 0,01$ ).

Аналогичная тенденция изменений отмечалась и на фоне применения мексидола. Так у крыс, получавших мексидол, уровень утилизации глюкозы головным мозгом был выше по сравнению с НК группой животных на 247,5% ( $p < 0,05$ ). Образование лактата у данной группы крыс было снижено на 64,9% ( $p < 0,05$ ) относительно группы животных НК.

Применение тиоктовой кислоты значимого влияния на потребление глюкозы головным мозгом и концентрацию лактата не оказало (рис.22).

На фоне применения соединения АТАСЛ потребление глюкозы (рис.22) головным мозгом было выше по отношению к НК группе крыс на 305,5% ( $p < 0,02$ ). При этом концентрация молочной кислоты у крыс, получавших АТАСЛ, снизилась относительно НК группы животных на 281,3% ( $p < 0,01$ ). Статистически значимых отличий между группами животных, получавших кавинтон, мексидол и АТАСЛ не установлено. Потребление глюкозы головным мозгом было выше на 145,8% ( $p < 0,05$ ), а уровень лактата соответственно ниже на 218,8% ( $p < 0,05$ ) у животных, которым вводили АТАСЛ по отношению к крысам, получавшим тиоктовую кислоту.

### **8.3.2.Изучение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на концентрацию митохондриальной АТФ-синтетазы и цитохром С оксидазы в условиях фокальной церебральной ишемии у крыс**

Концентрация митохондриальной АТФ-синтетазы (табл.14) (мАТФ) и цитохром С оксидазы (СОХ) у ЛО группы крыс составляла  $125 \pm 20,894$  нг/мл и  $48,78 \pm 0,287$  нг/мл соответственно. На фоне фокальной ишемии головного

мозга у крыс отмечено угнетение одной из основных энергопродуцирующих систем - мАТФ, что выражается в уменьшении концентрации данного фермента у НК группы крыс, относительно Л/О группы животных на 129,1% ( $p < 0,05$ ). Содержание цитохром оксидазы у НК группы крыс также уменьшилась – на 130,5% ( $p < 0,05$ ). У животных на фоне введения мексидола по сравнению с НК крысами концентрация мАТФ (табл.14) повысилась на 31,6% ( $p < 0,05$ ), а содержание СОХ увеличилось на 90,2% ( $p < 0,05$ ). При применении тиоктовой кислоты концентрация мАТФ и СОХ была выше аналогичных значений НК группы животных на 44,8% ( $p < 0,05$ ) и 82,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

**Таблица 14**

**Изменение концентрации митохондриальной АТФ-синтетазы в условиях коррекции ишемии головного мозга соединением АТАСЛ**

Группа	Л/О	НК	Мексидол	Тиоктовая кислота	Кавинтон	АТАСЛ
мАТФ нг/мл	125,5± 20,894	54,77± 6,583#	72,05± 8,838*	79,32± 17,395*	94,57± 2,656*	67,66± 4,824*
СОХ нг/мл	48,78± 0,287	21,16± 2,046#	40,25± 1,891*	38,67± 5,483*	41,24± 1,961*	44,6± 2,235*

*Примечание:* # - статистически значимо относительно Л/О группы животных (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ );

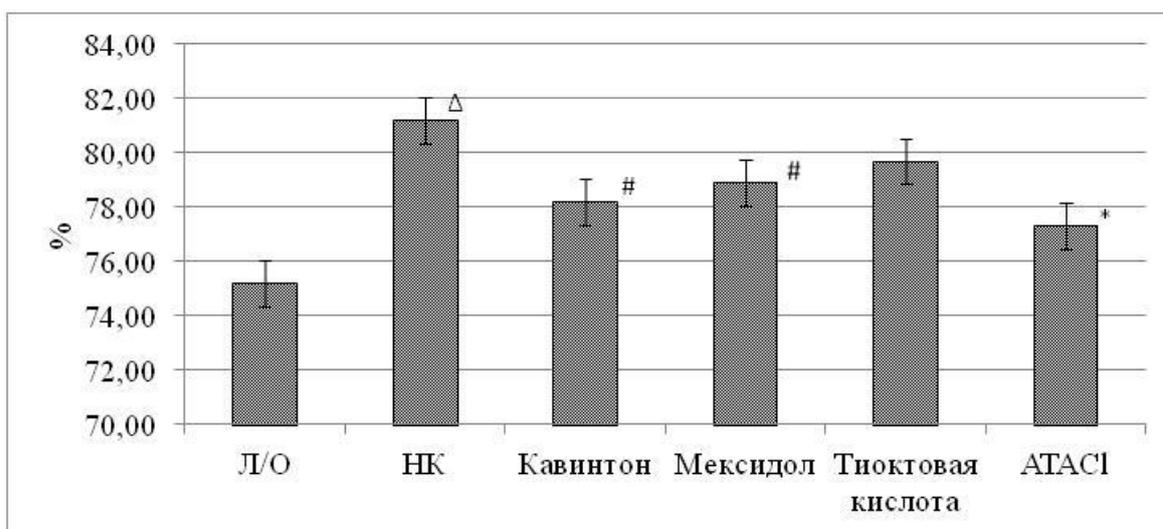
\*- статистически значимо относительно НК группы животных (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

На фоне применения кавинтона отмечено повышение концентрации мАТФ и СОХ (табл.14), относительно НК группы крыс на 72,7% ( $p < 0,05$ ) и 95% ( $p < 0,05$ ) соответственно. В тоже время введение соединения АТАСЛ способствовало повышению содержания мАТФ и цитохром С оксидазы, по сравнению с НК группой крыс на 23,5% ( $p < 0,05$ ) и 110,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

### 8.3.3. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на степень гидратации и размер зоны некроза головного мозга в условиях фокальной церебральной ишемии

Процент гидратации ткани головного мозга у Л/О группы животных составлял 75,2 %. У крыс, после 72-х часов ишемического периода развивался отек головного мозга, сопровождаемый увеличением степени гидратации (рис.23) головного мозга на 8% ( $p < 0,05$ ). При этом процент некротизированной мозговой ткани (рис.24) у НК группы крыс составлял 25,3%.

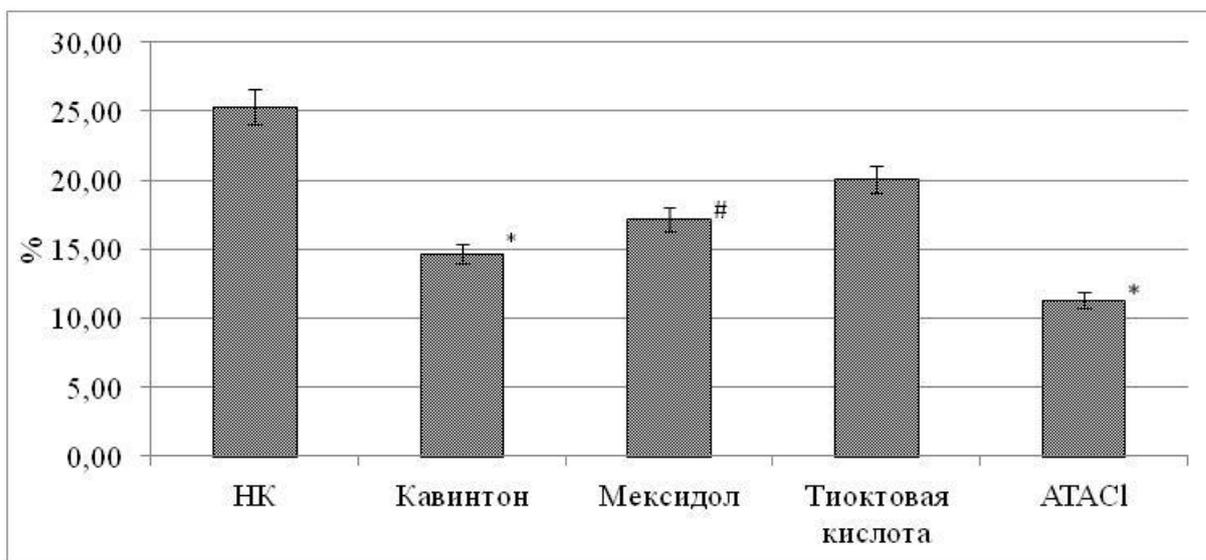
Применение кавинтона способствовало уменьшению отека головного мозга (степень гидратации по сравнению с группой крыс НК уменьшилась на 3,8% ( $p < 0,05$ )). Зона некроза при применении кавинтона снизилась по отношению к НК группе животных на 72,1% ( $p < 0,02$ ).



**Рисунок 23. Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и препаратов сравнения на степень гидратации головного мозга на фоне фокальной ишемии.**

*Обозначение:* Δ - статистически значимо относительно Л/О группы животных ( $t$  – критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );  
# - статистически значимо ( $t$  – критерий Стьюдента) относительно НК группы крыс \* -  $p < 0,02$ ; # -  $p < 0,05$ .

На фоне применения мексидола степень гидратации и размер зоны некроза головного мозга на фоне фокальной ишемии уменьшились по сравнению с НК группой крыс на 2,9% ( $p < 0,05$ ) и 47,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно, что согласуется с литературными данными [6]. Введение тиоктовой кислоты значимого влияния на изучаемые параметры не оказало (статистически значимых отличий между группой животных, получавших тиоктовую кислоту, и НК группой крыс не установлено).



**Рисунок 24. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на размер зоны некроза головного мозга на фоне фокальной ишемии**

*Обозначение:* статистически значимо (t – критерий Стьюдента) относительно НК группы крыс \* -  $p < 0,02$ ; # -  $p < 0,05$

На фоне применения соединения АТАСЛ степень гидратации (рис.23) головного мозга по отношению к группе животных НК уменьшилась на 5% ( $p < 0,02$ ). Процент некротизированной ткани (рис.24) головного мозга на фоне его фокальной ишемии при применении АТАСЛ был ниже, чем у НК группы животных на 123,9% ( $p < 0,02$ ). При этом статистически достоверных отличий между группами крыс, получавших АТАСЛ и кавинтон, не установлено. На фоне применения соединения АТАСЛ размер зоны некроза был ниже по сравнению с животными, получавшими тиоктовую кислоту на

77,9% ( $p < 0,05$ ) и 52,2% ( $p < 0,05$ ) по отношению к крысам, которым вводили мексидол.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Изучая потенциальные механизмы эндотелиопротекторного действия соединения АТАСЛ установлено, что на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс развивается явления окислительного стресса, сопровождаемого повышенным образованием прооксидантов (у группы животных НК отмечено повышение концентрации МДА и ДК на 145,7% ( $p < 0,01$ ) и 178,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно) и снижением активности ферментов эндогенной АОЗ. Кроме того у крыс в условиях ишемии головного мозга снижается потребление глюкозы головным мозгом, нарастают явления лактат-ацидоза, гипергидратации мозговой ткани, сопровождаемой значительной ее некротизацией и снижением энергообразования, разобщением синтеза NO (снижение концентрации eNOS и повышение содержания nNOS, и iNOS), ростом концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции (ADMA). Полученные нами результаты согласуются с многочисленными проведенными исследованиями в области патофизиологии ишемического инсульта [33, 35, 60].

При применении мексидола отмечено снижение (по отношению к группе животных с фокальной ишемией и без фармакологической поддержки) концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Активность ферментов АОЗ при применении мексидола была существенно выше, чем у группы крыс НК. Также для мексидола подтверждены антирадикальные свойства по отношению к супероксидному и нитрозильным радикалам, а также наличие хелатирующих свойств. Полученные результаты подтверждают высокий антиоксидантный потенциал мексидола [2, 8, 57]. На фоне применения тиоктовой кислоты снизилась концентрация МДА, а также возросла активность глутатионпероксидазы и каталазы (по сравнению с

группой крыс НК), что также подтверждает наличие у тиоктовой кислоты антиоксидантных свойств [95].

Применение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты практически в равной степени с мексидолом способствовало снижению генерации свободных радикалов ( $\text{NO}^*$  и  $\text{O}_2^{-*}$ ), а также восстановлению про/антиоксидантного равновесия на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс. По  $\text{Fe}^{2+}$ -хелатирующим свойствам изучаемое соединение АТАСЛ также не уступало мексидолу. На фоне введения соединения АТАСЛ, отмечено снижение нейродеструктивных процессов и сохранение энергосинтетической активности нейронов в условиях ишемии головного мозга. Кроме того при введении соединения АТАСЛ у крыс по сравнению с НК группой животных отмечено снижение концентрации ADMA, РКС, MMP1, iNOS, nNOS, а также повышение активности eNOS. По отношению к группе животных, получавших сулодексид у крыс, которым вводили АТАСЛ, наблюдалась более высокая концентрация eNOS (на 66,3% ( $p < 0,05$ )), остальные изучаемые параметры статистически значимо не отличались. При сравнении групп крыс, которым вводили мексидол и АТАСЛ, у последних наблюдалось повышение содержания eNOS (на 88,2% ( $p < 0,05$ )), концентрация ADMA и nNOS, напротив, снизилась на 31,7% ( $p < 0,05$ ) и 40% ( $p < 0,05$ ) соответственно, при сопоставимых значениях остальных изучаемых показателей. Относительно группы крыс, получавших тиоктовую кислоту, на фоне применения соединения АТАСЛ, у животных отмечено снижение концентрации ADMA и iNOS на 29,8% ( $p < 0,05$ ), и 27,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно, сопровождаемое повышением концентрации eNOS на 76,1% ( $p < 0,05$ ). Также при введении АТАСЛ, по отношению к крысам, получавшим тиоктовую кислоту, наблюдалось снижение концентрации MMP1 на 26,1% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, по воздействию на некоторые ферментативные системы, обеспечивающие адекватное функционирование сосудистого эндотелия, и концентрацию специфических маркеров ЭД соединение АТАСЛ

превосходит препараты сравнения мексидол и тиоктовую кислоту, и сопоставимо с сулодексидом.

Оценка церебропротекторной активности соединения АТАСЛ позволила выявить благоприятное влияние данного соединения на процессы утилизации глюкозы головным мозгом, образования молочной кислоты, а также на концентрацию митохондриальных ферментов – АТФ-синтетазы и цитохром С оксидазы, активность которых увеличилась по сравнению с животными, не получавшими фармакологическую поддержку на 23,5% ( $p < 0,05$ ) и 110,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно. В итоге улучшение энергообразования и митохондриальной функции способствовало уменьшению зоны некроза и степени гидратации головного мозга на 123,9% ( $p < 0,02$ ) и 5% ( $p < 0,02$ ) соответственно.

## ГЛАВА 9. Обсуждение результатов

Несмотря на успехи современной ангионеврологии рациональная фармакотерапия нарушений мозгового кровообращения остается одной из наиболее существенных проблем экспериментальной и клинической фармакологии [5, 28, 61, 62]. По данным ВОЗ ежегодно регистрируется около 7,5 млн. случаев НМК, причем около 80% из них приходится на долю ишемического повреждения головного мозга, в то время как частота случаев геморрагического инсульта в общей структуре нарушений мозгового кровообращения составляет  $\approx 20\%$ . Кроме того, высокая степень смертности, инвалидизации и утраты трудоспособности населения делает нарушения мозгового кровообращения, в особенности ишемического генеза, огромной медико-социальной проблемой [24, 25, 187].

В связи с возрастающей медико-социально-экономической ролью нарушений мозгового кровообращения актуальной задачей современной фармакологии и медицинской химии является поиск новых «мишеней» для терапевтического воздействия, с целью устранения нежелательных проявлений и последствий НМК. При этом некоторые авторы к числу таких «мишеней» относят эндотелий сосудов [3, 7, 45, 57, 79].

Эндотелий – монослой клеток, мезенхимного происхождения, выполняющий целый ряд функций, направленных на поддержание сосудистого гомеостаза, посредством секреции ряда ауто – и паракринных веществ, в ответ на физические, химические и биологические стимулы [38, 95, 175]. Являясь высокоспецифичной и высокоорганизованной системой сосудистый эндотелий подвержен воздействию ряда неблагоприятных факторов, приводящих к нарушению его анатомической или функциональной целостности - развивается эндотелиальная дисфункция [192]. ЭД нарушает эндотелий-зависимый механизм сосудистого гомеостаза и способствует активизации процессов вазоконстрикции, активации тромбоцитов, окислительного стресса, тромбоза, коагуляции и воспаления [10, 137, 195].

Эндотелиальная дисфункция – универсальный патофизиологический процесс, лежащий в основе многих сердечно – сосудистых и эндокринных заболеваний таких как: артериальная гипертензия [139], атеросклероз [98, 137], ишемический инсульт [170], ИБС [178], сахарный диабет и [113] т.д. В этой связи коррекцию ЭД и своевременное назначение средств, обладающих эндотелиопротекторной активностью, можно считать одним из новых направлений фармакотерапии «сосудистых» заболеваний, к числу которых можно отнести и НМК [55, 86 178, 201]. Однако «эндотелиопротекция» в большинстве случаев относится к числу дополнительных (плейотропных) эффектов фармакологически активных веществ, а лекарственных препаратов с доказанным эндотелиотропным действием, на сегодняшний день, не существует (за исключением сулодексида) [55]. Поэтому целенаправленный поиск эндотелиопротекторов для терапии НМК представляет собой перспективное направление современной экспериментальной и клинической фармакологии.

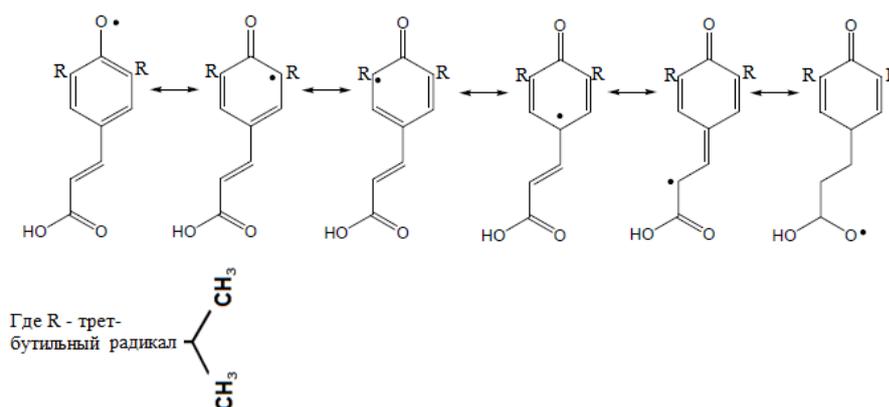
Среди потенциальных эндотелиопротекторов особенно выделяется группа фармакологически активных субстанций, обладающих антиоксидантными свойствами [67, 98], к числу которых, безусловно, можно отнести флавоноиды [21, 49, 99, 100, 108] и производные коричной кислоты [1, 69 110, 163]. В этой связи нами было исследовано 16 веществ, относящихся к вышеупомянутым классам соединений. Проведенный фармакологический скрининг позволил вывить из 16 веществ соединение лидер, обладающее в данном ряду, наиболее выраженной потенциальной эндотелиопротекторной активностью - 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота (лабораторный шифр – АТАСЛ).

При оценке влияния соединения - лидера 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и стабильность работы NO – синтазной системы у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга установлено, что при применения данного соединения сохранялась способность эндотелия сосудов как к

стимулированному, так и к базальному синтезу NO (реакция сосудов на АЦХ и L-NAME была значительно выше у животных, получавших 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоты, нежели у крыс НК группы), а проявления феномена «L-аргининового парадокса» носило менее выраженный характер. Работа NO – синтазной системы на фоне применения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты отличалась большей стабильностью, по сравнению с аналогичным показателем группы животных НК. Далее при оценке влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на антитромботическую функцию сосудистого эндотелия, отмечено сохранение антитромбогенных свойств эндотелия на фоне применения данного соединения. Кроме того, на фоне введения животным 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты наблюдалось восстановление противовоспалительной функции сосудистого эндотелия на фоне ишемического повреждения головного мозга, что отражается в уменьшении концентрации СРБ и нормализации содержания лейкоцитов в крови. При этом следует отметить, что фармакологический эффект от применения соединения АТАСЛ был сопоставим с таковым от применения сулодексида и превосходил эффект от введения мексидола и тиоктовой кислоты.

Анализируя полученные результаты, нами было выдвинуто предположение, что подобное действие 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, реализуется благодаря наличию у данного соединения прямых и непрямых антиоксидантных свойств. Для подтверждения данной гипотезы был проведен блок исследований, посвященных оценке антирадикальных и антиоксидантных свойств соединения АТАСЛ, в ходе которого было установлено, что изучаемое соединение *in vitro* способно подавлять продукцию  $O^{*2-}$  и  $NO^*$ , а также обладает хелатирующими свойствами. *In vivo* на фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс, соединение АТАСЛ способствовало стабилизации про/антиоксидантного равновесия, что выражалось в восстановлении

активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза) и снижении образования прооксидантов (малоновый диальдегид и диеновые конъюгаты). Наличие антиоксидантных свойств, вероятно, можно объяснить химическим строением соединения АТАСЛ. Наличие в структуре АТАСЛ гидроксильной группы повышает восстановительные свойства данного соединения, так как именно подвижный протон О-Н группы является первичным центром связывания радикала. Кроме того в структуре 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты имеется виниленовый фрагмент, который испытывая влияние трет-бутильных радикалов ароматического ядра, стабилизирует радикал оксикоричной кислоты [36] (рис.25)



**Рисунок 25. Стабилизация радикала 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты.**

В итоге образуется стабильный и реакционно неактивный феноксил, что терминирует дальнейшую цепь свободно – радикальных реакций [1, 21, 36]. При этом улучшение в функциональном состоянии эндотелия сосудов, вероятно, связано с повышением биодоступности оксида азота. Известно, что одной из главных причин снижения биодоступности NO и нарушения функционирования эндотелия является гиперпродукция супероксидного радикала, с последующим образованием пероксонитрита [78 ,111 ,122, 182]. Соединение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота, по всей вероятности, способно снижать образование  $O_2^{*-}$ , выступая в качестве

«скэвенджера» свободных радикалов. Устранение из цепи свободно – радикальных превращений супероксидного радикала ведет к терминции образования пероксонитрита и как результат снижается токсическое действие NO на эндотелиоциты сосудов, что сопровождается повышением их функциональной активности [76, 86, 102]. При этом выявленная зависимость фармакологического эффекта от введенной дозы соединения АТАСЛ может быть объяснена «параболическим» характером действия антиоксидантов. В определенных условиях (например – введение неадекватной дозы) наблюдается инверсия фармакологического эффекта и антиоксидантный эффект сменяется прооксидантным, с процессов окисления, что ведет к уменьшению терапевтической эффективности применяемого антиоксиданта [107, 109, 155].

Влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на состояние антитромботического потенциала сосудистого эндотелия, вероятно, объясняется, повышением биодоступности оксида азота, обладающего антиагрегантной активностью, а также устранением дисбаланса между проагрегантными (эндотелин-1, тромбоксан  $A_2$ ) и антиагрегантными (NO, простагландин  $I_2$ ) факторами. Так на фоне введения соединения АТАСЛ в условиях ишемии головного мозга у крыс отмечено снижение плазменной концентрации тромбоксана  $A_2$  на 241,9 % ( $p < 0,05$ ). Также анализ литературных источников показал, что производные коричные коричной кислоты [191] могут проявлять антагонизм по отношению к  $EP_3$  подтипу простагландиновых рецепторов. Эндогенным лигандом данного вида рецепторов является простагландин  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Активация  $EP_3$  рецепторов играет важную роль в развитии лихорадки [194], гипералгезии [148], сокращении матки, секреции желудочного сока, сокращении гладких мышц желудочно-кишечного тракта [129.], повышении внутриглазного давления, эндотелиальной дисфункции [175]. В головном мозге активация  $EP_3$  рецепторов усиливает глутамат-опосредованную нейротоксичность [191]. Экспрессия  $EP_3$  рецепторов на тромбоцитах посредством  $G_i$  белков,

способствует снижению внутриклеточного содержания цАМФ. В результате отмечается гиперсенсебилизация тромбоцитов к АДФ и коллаген-индуцированной агрегации. Соответственно блокада данного подтипа рецепторов способна снизить явление гиперагрегации тромбоцитов. Кроме того для производных коричной кислоты характерно наличие антикоагулянтных свойств [123, 127]. В итоге, полученные в ходе проведения собственного исследования результаты согласуются с литературными данными и подтверждают наличие у 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты положительного влияния на антитромботический потенциал сосудистого эндотелия.

Положительное влияние соединения АТАСL, как представителя класса гидроксикоричных кислот, на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов может реализовываться посредством подавления активности Src/spleen тирозинкиназы регулируемой NFκB и индуцибельной изоформы синтазы оксида азота, а также матриксной металлопротеиназы-1 [147, 163].

Для реализации эндотелиопротекторного действия фармакологически активных соединений существенную роль играет влияние данных субстанций на активность различных изоформ синтазы оксида азота. Как указывалось выше, для поддержания церебрального кровотока на оптимальном уровне наиболее важную роль играет eNOS. В эндотелиоцитах eNOS локализуется в кавернах цитоплазматической мембраны, аппарате Гольджи, митохондриях. При этом активация eNOS обеспечивает 20-50% эндотелий-зависимой вазодилатации, подавляет тромбообразование (преимущественно в венах) и реакции воспаления сосудистой стенки (снижает лейкоцитарную инфильтрацию интимы, продукцию хемокинов), обеспечивает адекватный ауторегуляторный ответ церебральных сосудов на изменение общего артериального давления и системного вазотонуса [65, 81, 162, 180]. «Антиподом» eNOS является iNOS. Не являясь конститутивным ферментом, активируясь на уровне транскрипции генов, iNOS продуцирует оксид азота в количествах, в разы превышающих eNOS – зависимую

концентрацию оксида азота [101], что в совокупности с повышенной продукцией СР инициирует образование пероксонитрита, и как следствие усиливает проявление оксидативного («нитритного») стресса, активирует центральное звено регуляции симпатического тонуса (экспрессия iNOS в ростральном вентролатеральном отделе продолговатого мозга), сопровождаемые вазоплегией, декомпенсацией, индукцией воспаления [99, 101, 186, 197]. nNOS, так же как и eNOS имеет  $Ca^{2+}$ - кальмодулин зависимые механизмы регуляции и производит NO в очень малых (субнанолярных) концентрациях [122, 197, 198]. Однако гиперэкспрессия nNOS на фоне ишемического инсульта только усугубляет течение заболевания, поскольку в условиях ишемии головного мозга nNOS, усиливает NMDA-рецептор – опосредованную глутаматную эксайтотоксичность, в результате возникает «кальциевая перегрузка» нейронов, что ведет к их гибели. Кроме того продуцируемый nNOS оксид азота, образует пероксонитрит, запускающий каскад АМПК-LKB, усиливая структурную модификацию нейронов по типу ПОЛ [122, 198]. Кроме того для адекватного функционирования эндотелиальной системы регуляции сосудистого тонуса немаловажную роль играет концентрация специфичного маркера эндотелиальной дисфункции – асимметричного диметиларгинина, а также ферментных систем – протеинкиназы С и матриксной металлопротеиназы-1 [138, 148, 149].

Исходя из значимой роли перечисленных систем в функционировании эндотелия, нами было изучено влияние 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на изменение концентрации данных параметров. В ходе проведения данного блока исследований было установлено, что 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота в условиях ишемии головного мозга у крыс способствует повышению концентрации eNOS на 114,2% ( $p < 0,05$ ), при уменьшении содержания nNOS (на 60,6% ( $p < 0,05$ )), iNOS (61,9% ( $p < 0,05$ )) и ADMA (на 83,9% ( $p < 0,05$ )). Также применение соединения АТАСЛ способствовало уменьшению концентрации РКС (на 108,6% ( $p < 0,05$ )) и MMP-1 (на 37,7% ( $p < 0,05$ )). Таким образом, существенными

механизмами реализации эндотелиопротекторного действия 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты могут являться: моделирование продукции оксида азота, на уровне регуляции NO-синтазных систем; ингибирование ферментативных комплексов (PKC и MMP-1), способствующих деструкции эндотелия и прогрессированию эндотелиальной дисфункции.

Сохранение эндотелиальной функции в условиях ишемии головного мозга, очевидно, способствует снижению нейрональной гибели и редукции психоневрологических проявлений ишемического инсульта. Однако несомненный интерес может представлять изучение других аспектов церебропротекторной активности АТАСЛ, например улучшение митохондриальной функции, что вкупе с эндотелиотропным действием 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты делает данное соединение перспективным объектом для дальнейшего изучения, с целью создания на его основе лекарственного препарата для фармакотерапии ишемического инсульта. С этой целью было проведено исследование, посвященное изучению влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на метаболические процессы (потребление глюкозы и образование лактата), степень гидратации и размер зоны некроза мозговой ткани, а также концентрацию митохондриальной АТФ-синтетазы и цитохром С оксидазы в условиях ишемии головного мозга у крыс. Являясь одним из основных клеточных энергообразующих систем, мАТФ выполняет и ряд других функций: поддерживает мембранный потенциал митохондрий, участвует в формировании крист, и т.д. [118, 206]. В условиях ишемии головного мозга мАТФ, в виду наличия предрасполагающих факторов, подвергается частичной или полной инактивации, посредством нитрования, S-нитрозилирования, ацетилирования, гликирования, окисления отдельных субъединиц данного ферментативного комплекса, что неизбежно ведет к снижению энергопродукции клеткой и может привести к ее гибели [82, 142]. Напротив, сохранение оптимальной функции мАТФ, в условиях ишемического повреждения головного мозга, способствует восстановлению

синтеза АТФ до должного уровня, что ведет к нормализации биоэнергетики нейрона и, как следствие, уменьшает нейрональную гибель [82]. Цитохром С оксидаза – комплекс, катализирующий конечный этап переноса электронов от цитохрома С к кислороду в митохондриальной дыхательной цепи. В условиях ишемии головного мозга повышение активности СОХ запускает альтернативный путь синтеза АТФ, а также способствует редукции окислительного стресса [214].

В результате проведения данного блока исследований установлено, что 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота практически в равной с кавинтоном степени способствует повышению утилизации глюкозы головным мозгом, уменьшает лактат-ацидоз. Также соединение АТАСЛ способствует увеличению концентрации мАТФ, но уступает по данному показателю кавинтону. Кроме того применение 4-гидрокси -3,5-дитретбутил коричной кислоты способствовало повышению содержания цитохром С оксидазы, что в свою очередь может препятствовать чрезмерной активации НАДФ-оксидаз, уменьшая тем самым зависимую от митохондрий генерацию свободных радикалов, а также обеспечить должное образование макроэргических субстратов, в частности АТФ [214], что в совокупности с антиоксидантными свойствами соединения АТАСЛ может лежать в основе способности данной субстанции уменьшать зону некроза и отек головного мозга. Метаболические изменения, вероятно, также связаны со способностью производных коричной кислоты активировать АМФ-зависимую протеинкиназу (АМФК) – главный энергетический сенсор клетки [205]. В результате активируется транспортер GLUT3, что ведет к повышенной утилизации глюкозы головным мозгом [203]. Кроме того активация АМФК и GLUT3 снижает токсические эффекты глутамата (уменьшение глутаматной эксайтотоксичности) [93, 133], что в свою очередь может являться одним из составляющих церебропротекторного действия соединения АТАСЛ.

Сопоставляя вышеизложенные факты можно предположить, что соединение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота является перспективным объектом для проведения дальнейших доклинических и клинических исследований с целью создания на его основе лекарственного препарата для фармакотерапии нарушений мозгового кровообращения ишемического генеза.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В ряду флавоноидов и производных коричной кислоты (в общей сложности 16 соединений) наиболее выраженным положительным влиянием на эндотелиальную функцию в условиях ишемического повреждения головного мозга обладает соединение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота, сопоставимым по величине фармакологического эффекта с сулодексидом (статистически значимых отличий между группами крыс, получавших АТАСЛ и сулодексид, не установлено).

2. Анализ зависимости «доза-эффект» для соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота позволили установить, что наиболее выраженное эндотелиопротекторное действие данное соединение оказывает в дозе 100 мг/кг.

3. При фокальной ишемии головного мозга у крыс терапевтическое введение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты способствовало сохранению вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия, стабилизировало работу NO- синтазной системы, уменьшало периферическое сосудистое сопротивление и улучшало эластичность сосудов.

4. Введение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в условиях ишемического повреждения головного мозга восстанавливало антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов у крыс, путем снижения способности тромбоцитов к агрегации, активности коагуляционного компонента гемостаза, восстановлению функции противосвертывающих систем, уменьшением концентрации тромбоксана  $A_2$  (отмечено снижение данного показателя при применении соединения АТАСЛ на 241,9 % ( $p < 0,05$ )).

5. Применение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты сохраняло противовоспалительную функцию эндотелия сосудов при ишемии головного мозга у крыс, что подтверждается снижением концентрации СРБ на 99,1% ( $p < 0,05$ ) и устранением лейкоцитоза.

6. Механизм эндотелиопротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты в условиях ишемии головного мозга обусловлен прямой и непрямой антиоксидантной активностью данного соединения, а также с повышением концентрации eNOS (на 114,2% ( $p < 0,05$ )), снижением содержания iNOS, nNOS (на 61,9% ( $p < 0,05$ ) и на 60,6% ( $p < 0,05$ )) соответственно), матриксной металлопротеиназы-1 (на 37,7% ( $p < 0,05$ )), протеинкиназы C (на 108,6% ( $p < 0,05$ )), уменьшением концентрации ADMA (на 83,9% ( $p < 0,05$ )).

7. Применение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты способствует улучшению метаболизма головного мозга и повышению энергообразования нейронов за счет увеличения концентрации митохондриальной АТФ-синтетазы (на 23,5% ( $p < 0,05$ )) и цитохром С оксидазы, что в совокупности с эндотелиопротекторным действием и антиоксидантными свойствами способствовало уменьшению отека мозговой ткани (на 5% ( $p < 0,02$ )) и величины зоны некроза головного мозга (на 123,9% ( $p < 0,02$ )).

### **НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота в качестве эндотелиопротекторного средства для коррекции эндотелиальной дисфункции, развивающейся в условиях недостаточности мозгового кровообращения.

2. Следует продолжить дальнейшее исследование соединения АТАСЛ с целью создания на его основе эндотелиопротекторного лекарственного средства для терапии осложнений ишемического инсульта.

## Список сокращений

АПФ – ангиотензин

превращающий фермент

ПОЛ – перекисное окисление

липидов

ТМЭД-тетраметилэтилендиамин

NO – монооксид азота

eNOS – эндотелиальная синтаза

оксида азота

iNOS – индуцибельная синтаза

оксида азота

nNOS – нейрональная синтаза

оксида азота

MMP-1 – матриксная

металлопротеиназа – 1

PKC – протеинкиназа C

НМК – нарушения мозгового

кровообращения

ГЭБ – гемато – энцефалический

барьер

АТФ – аденозинтрифосфат

NMDA - N-метил-D-аспартат

NFkB – ядерный фактор kB

CP – свободные радикалы

РНК – рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая

кислота

ФНО-  $\alpha$  – фактор некроза опухоли -

$\alpha$

ИЛ – интерлейкин

МАРК – митоген – активируемая

протеинкиназа

NGF – нейтрофический фактор

роста

АДФ – аденозиндифосфат

ТАП – тканевой активатор

плазминогена

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФМН –

флавинаденинмононуклеотид

НАДФН –

Никотинамидадениндинуклеотидф

осфат восстановленный

МПП - митохондриальная

проницаемость перехода

НАД –	СОД – супероксиддисмутаза
Никотинамидадениндинуклеотид	СРБ – С – реактивный белок
АТАСL - 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота	НТХ – нитротетразолий хлористый
СОХ- цитохром С оксидаза	ТХУ – трихлоруксусная кислота
РGT – полифенолы зеленого чая	ГП – глутатионпероксидаза
ЕВЛ – единицы высвобождения липотеидлипазы	ЭДТА – этилендиаминтетрацетат
Ск – скорость мозгового кровотока	GSH- глутатион
АЦХ – ацетилхолин	ДК – диеновые конъюгаты
L – NAME – нитро – L – аргинин метиловый эфир	МДА – малоновый диальдегид
НТГ – нитроглицерин	мАТФ – митохондриальная аденозинтрифосфат – синтетаза
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время	ADMA – ассиметричный диметиларгинин
ТВ – тромбиновое время	ТХА2 – тромбоксан А2
FW- факор фон Виллебранда	Л/О – ложнооперированные животные
РФМК – растворимые фибрин – мономерные комплексы	НК – негативный контроль
ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание	RI – индекс Пурсело
НО – нормализованное отношение	PI – индекс Гослинга
АТ – III - антитромбин – III	PLT – количество тромбоцитов
	WBC – количество лейкоцитов
	АОЗ – антиоксидантная защита

ИБС – ишемическая болезнь сердца

цАМФ – циклический

аденозинмонофосфат

TGF -  $\beta$  – трансформирующий

фактор роста

VEGF - эндотелиальный  
сосудистый фактор роста

PAR-1 – рецептор, активируемый  
протеинкиназой

АМФК – аденозинмонофосфат –  
активируемая киназа

## Список литературы

1. Агаджанян В.С. Целенаправленный поиск индивидуальных веществ и суммарных композиций, характеризующихся антирадикальной активностью в отношении супероксидного анион-радикала: автореф. дис. канд. фарм. наук.- Пятигорск, ПятГФА, 2009.-24 с.
2. Барышева Ю.П. Применение препарата мексидол при цереброваскулярных заболеваниях / Ю.П. Барышева, Т.Н. Зырянцева, В.В. Николаев, И.В. Титаренко //Тюменский медицинский журнал. -2014.- Т. 16, № 2. - С. 49-50.
3. Белова Ю.А. Уровень эндотелиальных прогениторных клеток у больных с ишемическим инсультом и эффективность реабилитации / Белова Ю.А., Чуксина Ю.Ю., Шевелев С.В. и др. // Альманах клинической медицины. – 2015. – № 39. – С.45-50.
4. Богданов А.Н. Эпидемиология, факторы риска и организация неотложной помощи при ишемическом инсульте в городском центре севера Западной Сибири (опыт 20-летнего изучения) / А.Н. Богданов, Ю.В.Добрынин, И.Ю.Добрынина, С.Н. Сони́на // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.- 2014. - №S2.- С.28-33.
5. Бурчинский С.Г. ГАМК-ергические средства в фармакотерапии хронической церебральной ишемии / С.Г. Бурчинский // Міжнародний неврологічний журнал. – 2015. – № 1. – С. 101-105.
6. В.Е. Новиков. Влияние производных 3-оксипиридина на процессы гидратации в мозге и крови в динамике черепно-мозговой травмы / В.Е.Новиков, К.Н.Кулагин, Л.Д.Смирнов // Психофармакол. и биол. наркол. -2005.-Т. 5, № 2.-С. 946-952.
7. Волошин П.В. Ключевые механизмы эндотелиальной дисфункции острых церебральных ишемий в динамике медикаментозной коррекции / П.В. Волошин, В.А. Малахов, Г.Н. Завгородня // Український вісник психоневрології. – 2006. – № 14-4. – С. 5-7.

8. Воронина Т.А. Мексидол. Основные нейрорепродуктивные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Поликлиника. -2009. - №5.- С. 32-36.
9. Воронков А.В. Поиск и изучение эндотелиопротекторной активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она на фоне моделирования недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков, И.П. Кодониди, А.В. Мамлеев, В.С. Сочнев, А.А. Глушко // Современные проблемы науки и образования.- 2015.- № 5. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22482> (дата обращения: 07.01.2017).
10. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: автореф. дис. д-ра мед. наук.- Волгоград: ВолгГМУ, 2011.-46 с.
11. Габбасов З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. / Габбасов З.А. Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А // Лабораторное дело.-1989.- №10.-С.15-18.
12. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. –1983. - № 3. –С. 33 – 35.
13. Галиновская Н. В. Лабораторные показатели воспалительного ответа у лиц с преходящими нарушениями мозгового кровообращения / Н.В. Галиновская, Н.Н. Усова, О.В. Лыщенко, Е.В. Еванашко, В.Я. Латышева // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.-2011.-№ 2. -С. 53-58.
14. Гончар И.А. Прогрессирующий ишемический инсульт: патогенетические механизмы развития / И.А.Гончар // Здоровоохранение.- 2012.- №10.-С.55-59.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика. – 1999. – 459 с.
16. Гусев Е. И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е.И. Гусев, В.И.Скворцова, М.Ю. Мартынов // Вестник РАМН.- 2003.- № 11.- С. 44–48.

17. Гусев Е.И. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы. / Гусев Е.И, Мартынов М.Ю, Камчатнов П.Р. // Доктор.Ру.- 2013.- №5.(83).-С. 7–12.
18. 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.
19. Евтушенко С.К. Ишемический гемодинамический и кардиоэмболический инсульт / С.К. Евтушенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. -2005.-№1.-С. 155-160.
20. Ефимова О.С. Эпидемиология инсультов: ведущие факторы риска и направления профилактики / О. С. Ефимова, А. В. Слободенюк, А.А. Белкин, Е.А. Пинчук // Гигиена и эпидемиология. -2008.- Т.48,№8.- С.43-46.
21. Зиятдинова Г.К. Реакции фенольных антиоксидантов с электрогенерированным супероксид анион-радикалом и их аналитическое применение / Г. К. Зиятдинова, С. П. Захарова, Г. К. Будников // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2015. -№2.- С.129-142.
22. Информационный бюллетень Всемирной организации здравоохранения № 310. Май .-2014.-С.1-2.
23. Исайкин А.И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта / А.И. Исайкин // Трудный пациент. – 2010. – № 4. – С.21-25.
24. Исакова Е.В. Клинико-экономический анализ ведения больных с диагнозом «Инсульт» в ЛПУ Московской области / Е.В. Исакова, П.А. Воробьев, С.В. Котов, Е.В. Деркач // Клин геронтология.-2006.- №12(11). – С. 40-3.
25. Карпова Е.Н. Эпидемиология и факторы риска развития ишемического инсульта / Е.Н. Карпова, К.А. Муравьев, В.Н. Муравьева и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 441.
26. Кистенев Б.А. Ишемический инсульт у больного, страдающего железодефицитной анемией / Б.А. Кистенев, М.Ю. Максимова, А.В. Лагутин // Нервные болезни. – 2007. – № 2. – С.28-32.

27. Кожина А.В. Фармакотерапия больных, перенесших ишемический инсульт, в период реабилитации / А.В. Кожина, О.С. Левин // Современная терапия в психиатрии и неврологии. -2015.- №1.- С.4-11.

28. Козелкин А.А. Эффективность комплексной нейрометаболической терапии у больных с первичным и повторным мозговым ишемическим полушарным инсультом / А.А. Козелкин, Л.В. Новикова // Міжнародний неврологічний журнал. – 2015. – № 2. – С. 70-75.

29. Корокин М.В. Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3 – оксопиридина / М.В. Корокин, Е.Н. Пашин, К.Е. Бобраков, М.В. Покровский, В.А. Рагулина, Е.Б. Артюшкова, Т.Г. Покровская, Л.В. Корокина, В.Ю. Цепелев, Л.М. Даниленко // Кубанский научный медицинский вестник.- 2009.- № 4 (109).- С.104 – 109.

30. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. - № 1. –С. 16 – 19.

31. Кочкаров В.И., Молчанова О.В., Покровская Т.Г. Эндотелиопротективное действие комбинации тиоктовой кислоты с розувастатином при L-NAME индуцированном дефиците оксида азота / В.И. Кочкаров, О.В. Молчанова, Т.Г. Покровская // Научные Ведомости Белгородского Государственного Университета. Серия Медицина. Фармация. -2014. –Т.182, № 11.- С. 192-193.

32. Литвинов А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимаслянной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия дис. канд. фарм. наук.- Волгоград: ВолгГМУ, 2015.-196 с.

33. Луцкий М. А. Формирование окислительного стресса, одного из звеньев сложного патогенеза социально значимых заболеваний нервной системы – инсульта и рассеянного склероза / М.А. Луцкий, А.М. Земсков, М.А. Смелянец // Фундаментальные исследования. - 2014.- №10(5).- С.924-929.

34. Мазина Н.В. Церебро - и эндотелиопротекторные свойства ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислоты при моделировании ишемии головного мозга дис. канд. мед. наук.- Волгоград: ВолгГМУ, 2016.-167 с.

35. Маслюкова А.В. Биохимические маркеры перенесенного острого нарушения мозгового кровообращения / А.В. Маслюкова, И.К. Томилова, Е.А.Баклушина // Вестник ИвГМА.- 2015.- №1.- С.37-44.

36. Машенцева А.А. Экспериментальное и теоретическое исследование взаимосвязи «структура-активность» производных коричной кислоты / А.А. Машенцева, Т.С. Сейтеметов // Journal of Siberian Federal University. Chemistry.- 2010.- №3.- С. 183-192.

37. Мирсаева Г.Х. Липопероксидация в тромбоцитах и сосудистотромбоцитарный гемостаз в различные периоды реабилитации больных, перенесших ишемический инсульт / Г.Х. Мирсаева, Ф.Х. Камилов, Л.Р. Шарафутдинова, Р.М. Фазлыева // Медицинский вестник Башкортостана. - 2010. - №6.- С.59-65.

38. Назарова Л.Е. Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии / Назарова Л.Е., Дьякова И.Н. // Медицинский вестник Башкортостана. -2011.- №3.- С.133-135.

39. Нечипуренко Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко //Медицинские новости. – 2008. – №1. – С.7-13.

40. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / С. – Петерб. Гос. мед.ун-т. им. Акад. И.П. Павлова // под редакцией проф. Н.Н. Петрищева. – СПб, 2003. – С. 82 – 85.

41. Пизова Н.В. Патогенез и лечение хронических ишемических цереброваскулярных заболеваний / Н.В. Пизова, Д.С. Дружинин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. - 2010. - №4. - С.36-41.

42. Пшеничникова В. Первичная профилактика инсульта // Врач.-2015.- №12.- С.17-19.

43. Рябченко А.Ю. Клинико – патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции у больных с ишемическим инсультом на фоне гипертонической болезни: дис. канд. мед. наук: 14.01.11 – Нервные болезни / Рябченко Александр Юрьевич. – М., 2014. – 106с.

44. Скворцова В.И. Ишемический ОНМК у больных молодого возраста / В.И. Скворцова, Е.А. Кольцова, Е.И. Кимельфельд // Журнал неврологии и психиатрии. ОНМК. – 2009. – № 10. – С.3-14.
45. Слиецанс А.А. Изучение эндотелиопротекторных свойств флавоноидов при экспериментальном сахарном диабете: дис. канд. фарм. наук.- Пятигорск, ПятГФА, 2011.-142 с.
46. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК // Современные методы в биохимии /под. ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977 – С. 44-46.
47. Суслина З.А. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения / З.А. Суслина, М.М. Танащян, М.А. Домашенко // Неврология.- 2008.- Т.1., №2.- С.4-11.
48. Сулова Е.Ю. Ведение больных в раннем восстановительном периоде инсульта / Е.Ю. Сулова, Н.В. Вахнина // Медицинский совет.-2014. -№18.- С.6-10.
49. Тараховский Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдраимов, Е.Н. Музафаров // Synchronobook. – 2013. – 310 с.
50. Тюренков И.Н. Влияние гесперидина и флавицина на печеночный кровоток в норме и в условиях стимуляции и блокады синтеза эндогенного оксида азота / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, Е.Г. Доркина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. -2006.- Т5,№3.-С.84-87.
51. Тюренков И.Н. Влияние флавоноидов на основные параметры гемостаза крови и антитромботическую функцию эндотелия при сахарном диабете / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс, Э.Т.Оганесян. // Фармация.- 2012.- №4.С.- 34-36.
52. Тюренков И.Н. Изучение влияния сулодексида на эндотелий – зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин - индуцированным сахарным диабетом / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс, Е.В. Петрова, Г.Л. Снигур // Сахарный диабет.-2011.- №3.- С.12-15.

53. Тюренокв И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренокв, А.В. Воронков // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т.71. – №1. – С.49-51.

54. Тюренокв И.Н. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия сосудов брюшины на фоне стандартной операционной травмы / И.Н. Тюренокв, С.В. Поройский, А.В. Воронков // Волгоградский научно - медицинский журнал.- 2012.- №1.- С.45-46.

55. Тюренокв И.Н. Эндотелиопротекторы – новый класс фармакологических препаратов // И.Н. Тюренокв, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс, Е.В. Волотова // Вестник РАМН.- 2012.- №7. - С. 50-57.

56. Фирсов А.А. Метаболическая цитопротекторная терапия в острый период ишемического ОНМК / А.А. Фирсов, М.В. Смирнов, Т.А. Усанова // Поликлиника. – 2011. – № 1. – С.34-36.

57. Хабиров Ф.А. Клинико-нейрофизиологическая оценка эффективности применения мексидола в лечении тревожных расстройств у больных рассеянным склерозом и хронической ишемией головного мозга/Ф.А. Хабиров, Т.И. Хайбуллин, Н.Н. Бабичева //Бюлл. эксп. биол. и мед. -2012. -Прил. 1. -С. 6 -9

58. Черток В.М. Регуляторный потенциал капилляров мозга / В.М.Черток, А.Г. Черток // ТМЖ. -2016. -№2 (64).- С.72-80.

59. Черток В.М.. Эндотелиальный (интимальный) механизм регуляции мозговой гемодинамики: трансформация взглядов / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Тихоокеанский медицинский журнал.- 2012.- № 2.-С.17-26.

60. Чуканова Е.И. Хроническая ишемия мозга (этиология, патогенез, лечение). Профилактика инсульта и сосудистой деменции / Е.И. Чуканова, Б.Э. Ходжамжаров, А.С.Чуканова // РМЖ. -2012. -№ 10. -С. 517-518.

61. Чумаков В.Н. Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // Вопр. мед. химии. – 1977. - № 5. – С. 712 – 716.

62. Шамалов Н.А., Кустова М.А. Криптогенный инсульт / Н.А. Шамалов, М.А. Кустова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. -2014. -№S2.- С.42-49.

63. Шмонин А.А. Современная терапия хронического нарушения мозгового кровообращения. Часть 2 / А.А. Шмонин, В.С. Краснов, И.А. Шмони́на, Е.В. Мельникова // *Neuropsychiatry*. – 2015. – Т. 1. – С. 99-106.

64. Шмырев В.И. Дисциркуляторная энцефалопатия – вопросы патогенеза, диагностики, дифференциальной диагностики и лечения на современном этапе / В.И. Шмырев, А.С. Васильев, М.С. Рудас // *Кремлевская медицина*.-2009.-№4.- С.31-36.

65. Щепанкевич Л.А. Ишемический инсульт: оценка параметров сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в остром периоде заболевания / Л.А. Щепанкевич, П.И. Пилипенко, И.В. Пикалов, Е.В. Вострикова // *Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии*. -2011.- №1.- С.42-46.

66. Щербак Н.С. Экспериментальные модели ишемического инсульта / Н.С. Щербак, М.М. Галагудза // *Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им.В.А. Алмазова*.- 2011.- №3.- С.39-46.

67. Adachi U. Differences in endothelial function between ischemic stroke subtypes / U. Adach, Y. Tsutsumi, M. Iijima, S. Mizuno, S. Uchiyama, K.Kitagawa // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2015.-Vol. 24.- №. 12.-P. 2781–2786.

68. Aggarwal A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of naringin against post-stroke depression (PSD) in mice / A.Aggarwal, V.Gaur, A. Kumar// *Life Sci*.- 2010.-Vol.86.- P.928-935.

69. Alam M.A. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity / Alam M.A., Subhan N., Hossain H. // *Nutrition & Metabolism*. – 2016.- Vol. 13.- P. 1-13.

70. Alam M.A. Systems Biology of Immunomodulation for Post-Stroke Neuroplasticity: Multimodal Implications of Pharmacotherapy and Neurorehabilitation /

M.A. Alam, V.P. Subramanyam Rallabandi, P.K. Roy // *Frontiers in Neurology*. -2016.- Vol.7.-P.94-110.

71. Al-Numair K.S. Morin, a Flavonoid, on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Experimental Myocardial Ischemic Rats / K.S. Al-Numair, G. Chandramohan, M.A. Alsaif, C. Veeramani, A.S. Newehy. // *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. -2014.-№11.- P.14-20.

72. Alshatwi A.A. Delineating the anti-cytotoxic and anti-genotoxic potentials of catechin hydrate against cadmium toxicity in human peripheral blood lymphocytes / A.A. Alshatwi, T.N. Hasan, A.M. Alqahtani, N.A. Syed, G. Shafi, A.H. Al-Assaf, A.S. Al-Khalifa // *Environ Toxicol Pharmacol*.- 2014.- Vol.38.- P.653-662.

73. Amudha M. Evaluation of In Vitro Antioxidant Potential of *Cordia retusa* / M.Amudha, S. Rani // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016.- Vol.78.- P.80-86.

74. Anrather J. Inflammation and Stroke: An Overview / J. Anrather, C. Iadecola // *Neurotherapeutics*. – 2016.- Vol.13(4).- P.661-670.

75. Arimura K. Role of NADPH oxidase 4 in Brain Endothelial cells after Ischemic Stroke / K. Arimura, T. Ago, J. Kuroda, K. Ishitsuka, A. Nishimura // *Stroke*. – 2012.- Vol. 43.- P.25-14.

76. Atochin D.N. Role of endothelial nitric oxide in cerebrovascular regulation / D.N. Atochin, P.L. Huang // *Current Pharmaceutical Biotechnology*.- 2011.- Vol. 12.- P.1334-1342.

77. Bandeira S. de M. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus / S. de M. Bandeira, L.J-S Fonseca, G. da S. Guedes, L.A. Rabelo, M.O-F Goulart, S.M-L // *International Journal of Molecular Sciences*.- 2013.-№14.-P.3265-3284.

78. Beckman J.S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly / J.S.Beckman, W.H. Koppenol // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*.- 1996.- Vol. 271.- P.1424–C1437.

79. Bhullar K.S. Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols / K.S. Bhullar, H.P. Rupasinghe // *Food Chem.*- 2015.- Vol.168.- P.595-605.
80. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature.* – 1962. – Vol. 194. – P. 927-929.
81. Canavero I. Effects of Acute Stroke Serum on Non-Ischemic Cerebral and Mesenteric Vascular Function / I. Canavero, H.A. Sherburne, S.M. Tremble, W.M. Clark, M.J. Cipolla // *Transl. Stroke Res.*- 2016.- Vol. 7.- P.156-165.
82. Cha M-Y. Mitochondrial ATP synthase activity is impaired by suppressed O-GlcNAcylation in Alzheimer's disease / M-Y. Cha, H.J. Cho, C. Kim // *Human Molecular Genetics.* – 2015. - Vol.24. - P.6492-6504.
83. Chand S. Endothelial nitric oxide synthase single nucleotide polymorphism and left ventricular function in early chronic kidney disease. / S. Chand, C.D. Chue, N.C. Edwards et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 1. – P.116-120.
84. Chen H. Ligustrazine derivatives. Part 5: design, synthesis and biological evaluation of novel ligustrazinyloxy-cinnamic acid derivatives as potent cardiovascular agents / H. Chen, G. Li, P. Zhan, X. Liu // *Eur J Med Chem.*- 2011.- Vol.46 .-P. 5609-5615.
85. Chen H. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation / H.Chen, G.S. Kim, N. Okami, P. Narasimhan, P.H. Chan // *Neurobiol Dis.*- 2011.- Vol.42.- P. 341–348.
86. Chen H. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection / H. Chen, H. Yoshioka, G.S. Kim // *Antioxidants & Redox Signaling.*- 2011.- Vol.14.- P.1505-1517.
87. Chen H. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion / H. Chen, Y.S. Song, P.H. Chan // *J. Cereb. Blood Flow Metab.*- 2009.- Vol. 29.- P.1262–1272.
88. Chen S. Asymmetric Dimethylarginine as Marker and Mediator in Ischemic Stroke / S. Chen, N. Li, M. Deb-Chatterji // *International Journal of Molecular Sciences.* -2012.- Vol.13.- P.15983-16004.

89. Cheng Y.L. Evidence that collaboration between HIF-1 alpha and Notch-1 promotes neuronal cell death in ischemic stroke / Y.L. Cheng, J.S. Park, S. Manzanero, Y. Choi, S.H. Baik, E. Okun, M. Gelderblom, D.Y.Fann, T. Magnus, B.S. Launikonis, M.P. Mattson, C.G. Sobey, D.G. Jo, T.V. Arumugam. // *Neurobiol Dis.*- 2014.-№ 62.- P:286–295.
90. Cheon S.Y. Blockade of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Attenuates Matrix Metalloproteinase 9 Activity in Brain Endothelial Cells and the Subsequent Apoptosis in Neurons after Ischemic Injury / S.Y. Cheon, K.J. Cho, S.Y.Kim, E.H. Kam, J.E. Lee, B-N. Koo // *Frontiers in Cellular Neuroscience.*- 2016.- Vol.10.- P.2-13.
91. Corbett D. Lost in translation: rethinking approaches to stroke recovery / D. Corbett, M. Jeffers, C. Nguemeni // *Prog Brain Res.*-2015.-№218.-P.413–434.
92. Cui Q.J. Continual naringin treatment benefits the recovery of traumatic brain injury in rats through reducing oxidative and inflammatory alterations / Q.J.Cui, L.Y. Wang, Z.X. Wei, W.S.Qu // *Neurochem Res.*-2014.- Vol.39.-P.1254-1262.
93. Culmsee C. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation / C. Culmsee, J. Monnig, B.E. Kemp, M.P. Mattson. // *J Mol Neurosci.*-2001.- №17.- P:45–58.
94. De Alvaro C. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner / C.de Alvaro, T. Teruel, R. Hernandez, M.Lorenzo // *J. Biol. Chem.*- 2004.- Vol. 279.- P.17070–17078.
95. Deng H. A-lipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats / H. Deng, X. Zuo, J. Zhang, X. Liu, L. Liu, Q. Xu, Z. Wu, A. Ji // *Mol. Med. Rep.*- 2015.- Vol.11.- P.3659-3665.
96. Drouin A. Up-regulation of thromboxane A<sub>2</sub> impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice / A. Drouin, N. Farhat, V. Bolduc // *Pflugers Archiv : European journal of physiology.*- 2011.- Vol.462.- P.371-383.

97. Favero G. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention / G. Favero, C. Paganelli, B. Buffoli, L.F. Rodella, R. Rezzani // *BioMed Research International*.- 2014.- Vol. 18.- P.80-96.
98. Fenster B.E. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress / B.E. Fenster, P.S. Tsao, S.G. Rockson // *Am. Heart J.* - 2003. - Vol.146. - P.218–226.
99. Gadacha W. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night / W. Gadacha, M. Ben-Attia, D. Bonnefont-Rousselot, E. Aouani, N. Ghanem-Boughanmi, Y. Touitou // *Redox. Rep.* - 2009.- Vol. 14.-P.154–158.
100. Galati G. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics / G. Galati, O. Sabzevari, J.X. Wilson, P.J. O'Brien // *Toxicology*. -2002.- Vol. 177.- P:91–104.
101. Garcia-Bonilla L. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice / L. Garcia-Bonilla, J.M. Moore, G. Racchumi // *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. – 2014.- Vol. 193.- P.2531-2537.
102. 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, J. Westbrook, K.T. Pattinson // *Exp. Neurol.* -2015.- Vol.263.- P.235-243.
103. Gaur V. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain / V.Gaur, A.Agarwal, A.Kumar // *Eur J Pharmacol.*- 2009.- Vol. 15.-P.147-154.
104. Gendron M.E. A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice / M.E.Gendron, E. Thorin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* -2007.- Vol. 293.-P.2508– 2515.
105. Gendron M.E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction / M.E. Gendron, N.Thorin-Trescases, L. E.Villeneuve // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2007.- Vol. 292.-P.451–458.

106. Ginsberg Md. Neuroprotection For Ischemic Stroke: Past, Present And Future / Md. Ginsberg // Neuropharmacology.- 2008.- Vol.55.- P.363-389.

107. Giordo R. Different Redox Response Elicited by Naturally Occurring Antioxidants in Human Endothelial Cells / R. Giordo, A. Cossu, V. Pasciu, P.T. Hoa, A.M. Posadino, G. Pintus // The Open Biochemistry Journal.- 2013.- Vol.7.- P.44-53.

108. Grassi D. Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis / D. Grassi, G. Desideri, C. Ferri // Nutrients. -2010.- Vol.2.- P.889-902.

109. Held K.F. Sub-nanomolar sensitivity of nitric oxide mediated regulation of cGMP and vasomotor reactivity in vascular smooth muscle / K.F. Held, W.R. Dostmann // Front Pharmacol.- 2012.- Vol.3.-P.130-141.

110. Henry B.L. A Novel allosteric pathway of thrombin inhibition: Exosite II mediated potent inhibition of thrombin by chemo-enzymatic, sulfated dehydropolymers of 4-hydroxycinnamic acids / B.L. Henry, B.H. Monien, P.E. Bock, U.R. Desai // The Journal of biological chemistry. -2007.- Vol.282.-P.31891-31899.

111. Hrabarova E. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation / E. Hrabarova, I. Juranek, L. Soltes // Gen Physiol Biophys.- 2011.- Vol. 30(3).- P.223-238.

112. Hu Y. Icariin inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and expression of proliferating cell nuclear antigen / Y. Hu, K. Liu, M. Yan, Y. Zhang, Y. Wang, L. Ren // Mol. Med. Rep.- 2016.- Vol.13.-P.2899-2903.

113. Hwang M.H. Type 2 Diabetes: Endothelial dysfunction and Exercise. / M.H. Hwang S. Kim / J. Exerc. Biochem. – 2014. – Vol. 18, № 3. – P.239-247.

114. İşlekel S. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion / S. İşlekel, H. İşlekel, G. Güner, N. Ozdamar. // Res. Exp. Med.-1999. – Vol.199. - P.67-76.

115. Jae. C.L. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils / C.L. Jae, H.W.Moo // Anat Cell Biol. - 2014. -Vol.47.- P.149-156.

116. Jagtap P. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors / P.Jagtap, C.Szabo // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. - Vol. 4.-P.421–440.

117. Jin Z. Chemical Conditioning as an Approach to Ischemic Stroke Tolerance: Mitochondria as the Target / Z. Jin, J.Wu, L-J. Yan // *International Journal of Molecular Sciences.*- 2016.- Vol.17.- P.351-364.

118. Jonckheere A.I. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology / A.I. Jonckheere, J.A.M. Smeitink, R.J.T. Rodenburg // *Journal of Inherited Metabolic Disease.* - 2012.- Vol.35(2).-P.211-225.

119. Kamel K.M. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats / K.M. Kamel, O.M. Abd El-Raouf, S.A. Metwally, H.A. Abd El-Latif, M.E. El-sayed // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* - 2014.- Vol.28.- P.309-312.

120. Kara M. Evaluation of the protective effects of hesperetin against cisplatin-induced ototoxicity in a rat animal model / M. Kara, H.Türkön, T. Karaca, O. Güçlü, S. Uysal, M. Türkyılmaz, S. Demirtaş, F.S. Dereköy // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* – 2016.- Vol.85.- P.8-12.

121. Kashif M. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower / M. Kashif, S. Bano, S. Naqvi, S. Faizi // *Pharm. Biol.* -2015.- Vol.53.- P.672-681.

122. Khan M. Blocking a vicious cycle nNOS/peroxynitrite/AMPK by S-nitrosoglutathione: implication for stroke therapy / M. Khan, T.S. Dhammu, F. Matsuda, A.K. Singh, I. Singh // *BMC Neurosci.*- 2015.- Vol. 15.- P.16-42.

123. Khoo L.T. Bioassay-guided fractionation of *Melastoma malabathricum* Linn. Leaf solid phase extraction fraction and its anticoagulant activity / L.T. Khoo, J.O. Abdullah, F. Abas, E.R. Tohit, M. Hamid. // *Molecules.* -2015. -Vol. 20.- P.697-715.

124. Kim G.S. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke / G.S. Kim, L. Yang, G. Zhang // *Nature Communications.*- 2015.- Vol. 6.- P.1038-1072.

125. Kim G.W. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after

photothrombotic cortical ischemia in mice / G.W. Kim, A. Lewén, J. Copin, B.D. Watson, P.H. Chan // *Neuroscience*. - 2001.- Vol.105.-P.7-18.

126. Kim J.A. Quon Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms / J.A. Kim, M. Montagnani, K.K. Koh, M.J. // *Circulation*.- 2006.- Vol.113.- P.1888– 1904.

127. Kim S.Y. Platelet anti-aggregation activities of compounds from *Cinnamomum cassia* / S.Y. Kim , Y.K. Koo , J.Y. Koo, T.M. Ngoc, S.S. Kang , K. Bae, Y.S. Kim, H.S. Yun-Choi // *J Med Food*. – 2010.- Vol.13.- P.1069-1074.

128. Kleinschnitz C. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration / C.Kleinschnitz, H.Grund, K.Wingler // *PLoS Biology*.-2010. - Vol.8. - P.1-13.

129. Kobayash T.Function of prostanoid receptors: Studies on knockout mice / T.Kobayash, S. Narumiya // *Prostaglandins, Other Lipid Mediators*.- 2002.- Vol.68.- P.557–573.

130. Kofler J. SOD1 overexpression and female sex exhibit region-specific neuroprotection after global cerebral ischemia due to cardiac arrest / J.Kofler, P.D. Hurn, R.J. Traystman // *J. Cereb Blood. Flow. Metab*. - 2005. – Vol. 25.-P.11-30.

131. Kumar S. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview / S. Kumar, A.K. Pandey // *The Scientific World Journal*. -2013.-Vol.16.-P. 27-50.

132. Kundan S.B. Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult / S.B. Kundan, S.Anupam // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.- 2011. – Vol.10. - P.1-9.

133. Kuramoto N. Phospho-dependent functional modulation of GABA<sub>B</sub> receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase / N. Kuramoto, M.E Wilkins., B.P. Fairfax // *Neuron*.- 2007.- Vol. 53.-P. 233-247.

134. Lai S.C. Antioxidant and antiproliferative activities of *Desmodium triflorum* (L.) DC / S.C. Lai, Y.L. Ho, S.C. Huang, T.H. Huang, Z.R. Lai // *Am. J. Chin. Med*.- 2010.- Vol.38.- P.329-342.

135. Lakhan S.E. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches / S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, M. Hofer // *Journal of Translational Medicine*.-2009.- Vol.97. – P.1-11.
136. Lambert J.D. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. / J.D. Lambert, R.J. Elias // *Archives of biochemistry and biophysics*. - 2010.- Vol.501.- P.65-72.
137. Landim M.B. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: Implications for atherogenesis / M.B. Landim, A.Casella Filho, A.C. Chagas // *Clinics (Sao Paulo)*. - 2009.- Vol. 64.-P. 471–478.
138. Lapchak P.A. Neuroprotective and neurotrophic curcuminoids to treat stroke: a translational perspective // *Expert Opin Investig Drugs*.-2011.-№ 20.-P:13–22.
139. Lau Y.S. Boldine Ameliorates Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction: Therapeutic Implication for Hypertension and Diabetes / Y.S. Lau, W.C. Ling, D. Murugan, M.R. Mustafa. // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.-2015.- № 65.-P.522-531.
140. Li X.A.The Protective Effects of Icaritin against the Homocysteine-Induced Neurotoxicity in the Primary Embryonic Cultures of Rat Cortical Neurons / X.A. Li, Y.S. Ho, L. Chen, W.L. Hsiao // *Molecules*. -2016.- Vol.22.- P.1-15.
141. Lin G.H. Antioxidant action of a *Chrysanthemum morifolium* extract protects rat brain against ischemia and reperfusion injury / G.H. Lin, L. Lin, H.W. Liang, X. Ma, J.Y. Wang, L.P. Wu, H.D. Jiang, I.C. Bruce, Q. Xia // *J. Med. Food*.- 2010.- Vol. 13.- P.306-311.
142. Long Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology / Q. Long, K. Yang, Q. Yang // *American Journal of Cardiovascular Disease*. – 2015. - Vol.5.-P.19-32.
143. Lopez A. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock / A. Lopez, J.A.Lorente, J.Steingrub, J. Bakker // *Crit. Care. Med*.- 2004.- Vol. 32.-P.21–30.

144. Lorente L. Association between total antioxidant capacity and mortality in ischemic stroke patients. / L. Lorente, M.M. Martín, A. Pérez-Cejas // *Annals of Intensive Care*.- 2016.- Vol. 6.-P.39-45.

145. Lu W. Mitochondrial Protein PGAM5 Regulates Mitophagic Protection against Cell Necroptosis / W. Lu, J. Sun, J.S. Yoon // *PLoS ONE*. -2016.- Vol.11.- P.1371-1385.

146. Manzanero S. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury / S.Manzanero, T.Santro, T.V. Arumugam // *Neurochem Int*. -2013. -Vol.62. -P.8-12.

147. Mazor R. Matrix Metalloproteinase-1-mediated Up-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-2 in Endothelial Cells / R.Mazor, T.Alsaigh, H. Shaked // *The Journal of Biological Chemistry*.- 2013.- Vol.288.- P.598-607.

148. McCafferty G. P. Enhanced bladder capacity and reduced prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated bladder hyperactivity in EP<sub>3</sub> receptor knockout mice. / G. P.McCafferty, B. A.Misajet, N. J. Laping, R. M. Edwards, K. S.Thorneloe // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*.-2008.- Vol.295.- P.507–514.

149. Mehta N.N. Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type-2 diabetes mellitus / N.N. Mehta, M. Sheetz, K. Price // *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009.- Vol. 23.- P.17–24.

150. Meng L.M. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATP-sensitive potassium channel in rat / L.M. Meng, H.J. Ma, H. Guo, Q.Q. Kong, Y. Zhang // *Can. J. Physiol. Pharmacol*.-2016.- Vol.94.- P.973-978.

151. Murunga A.N. Grapefruit Derived Flavonoid Naringin Improves Ketoacidosis and Lipid Peroxidation in Type 1 Diabetes Rat Model / A.N. Murunga, D.O. Miruka, C. Driver, F.S. Nkomo, S.Z.Z. Cobongela, P.M.O. Owira // *PLoS ONE*. - 2016.- Vol.11.- P.153-185.

152. Naruse K. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin

resistance / K.Naruse, C.Rask-Madsen, N.Takahara. // *Diabetes*.- 2006.- Vol.55.-P.691–698.

153. Nunez-Figueroa Y. A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury in vitro and in vivo / Y.Nunez-Figueroa, J.Ramirez-Sanchez, G. Hansel // *Neuropharmacology*.-2014.- №85.- P: 517–527.

154. Olsen F.J. Predicting Paroxysmal Atrial Fibrillation in Cerebrovascular Ischemia Using Tissue Doppler Imaging and Speckle Tracking Echocardiography / F.J. Olsen, P.G. Jørgensen, R. Møgelvang // *J. Stroke Cerebrovasc Dis*. -2015.- Vol.25.- P.350-359.

155. Pacher P. Nitric Oxide And Peroxynitrite In Health And Disease / P.Pacher, Js. Beckman, L. Liaudet // *Physiological Reviews*.- 2007.- Vol. 87. P.315-424.

156. Pacher P. Role of the Peroxynitrite-Poly (ADP-Ribose) Polymerase Pathway in Human Disease / P. Pacher, C. Szabo // *The American Journal of Pathology*. -2008.- Vol.173.- P.2-13.

157. Paini M. An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation / M. Paini, S.R. Daly, B. Aliakbarian, A. Fathi, E.A. Tehrani, P. Perego, F. Dehghani, P. Valtchev // *Colloids Surf B Biointerfaces*.- 2015.- Vol.136.- P.1067-1072.

158. Pasciu V. Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants / V.Pasciu, A.M.Posadino, A. Cossu // *Toxicol. Sci*.- 2010.- Vol. 114.- P.101–112.

159. Pelikant-Malecka I. Endothelial toxicity of unusual nucleotide metabolites / I. Pelikant-Malecka, A. Sielicka, E. Kaniewska, R.T. Smolenski // *Pharmacol Rep*. – 2015. - Vol.67. - P.18-22.

160. Pierce S. Glutathione peroxidase activities from rat liver / S. Pierce, A.L. Tappel // *Biochim. et biophys. Acta*. - 1978. - Vol. 523, № 1. – P. 27 – 36.

161. Radak D. Link between oxidative stress and acute brain ischemia / D. Radak, I. Resanovic, E.R. Isenovic // *Angiology*.- 2014. -Vol. 65.- P.67–76.

162. Radermacher K.A. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress / K.A. Radermacher, K. Wingler, F. Langhauser, S. Altenhöfer, P. Kleikers. // *Antioxid Redox Signal.*- 2013.- Vol.20.-P. 1418-1427.

163. Rao P.V. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant / P.V. Rao, S.H. Gan // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM.* -2014.

164. Robinson A.A. Anticoagulation for the Acute Management of Ischemic Stroke / A.A. Robinson, K. Ikuta, J. Soverow // *The Yale Journal of Biology and Medicine.* -2014.- Vol.87.-P.199-206.

165. Robinson T. Thrombolysis in acute ischaemic stroke: an update / T. Robinson, Z. Zaheer, A.K. Mistri // *Ther Adv Chronic Dis.* – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 119-131

166. Rodhe J. Spatio-temporal activation of caspase-8 in myeloid cells upon ischemic stroke / J. Rodhe, M.A. Burguillos, R.M. de Pablos // *Acta Neuropathologica Communications.*- 2016.- Vol.4.- P.92-103.

167. Rodrigo R. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities / R. Rodrigo, R. Fernández-Gajardo, R. Gutiérrez, J.M. Matamala, R. Carrasco, A. Miranda-Merchak, W. Feuerhake // *CNS Neurol Disord Drug Targets.*-2013. – Vol. 12.-P.698–714.

168. Samanta A. Establishment of drug delivery system nanocapsulated with an antioxidant (+)-catechin hydrate and sodium meta borate chelator against sodium fluoride induced oxidative stress in rats / A. Samanta, S. Chanda, B. Bandyopadhyay, N. Das // *J. Trace Elem. Med. Biol.*- 2016.- Vol.33.- P.54-67.

169. Sangpheak W. Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated  $\beta$ -cyclodextrin. / W. Sangpheak, J. Kicuntod, R. Schuster // *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* – 2015. - Vol.11. - P.2763-2773.

170. Sharma R. Proteomic Signature of Endothelial Dysfunction Identified in the Serum of Acute Ischemic Stroke Patients by the iTRAQ-Based LC-MS Approach / R. Sharma, H. Gowda, S. Chavan, J. Advani, D. Kelkar // *J Proteome Res.* – 2015.- Vol. 14.- P.2466-2479.

171. Shi Y. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood–brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury / Y. Shi, L. Zhang, H. Pu // *Nature Communications*.- 2016.- Vol.7.- P.1038-1056.

172. Shu X. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation / X. Shu, T.C.S. Keller, D. Begandt // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*.- 2015.- Vol.72.- P. 4561-4575.

173. Singh M.P. Morin hydrate attenuates the acrylamide-induced imbalance in antioxidant enzymes in a murine model / M.P.Singh, R.Jakhar, S.C.Kang // *Int J Mol Med*. - 2015 - Vol. 36. -P. 992-1000.

174. Sousa J.B. Endothelial dysfunction impairs vascular neurotransmission in tail arteries. / J.B. Sousa, P. Fresco / *Neurochem. Int.* – 2015. – Vol. 80. – P. 7-13.

175. Steioff K.Long. Term Rho-kinase inhibition ameliorates endothelial dysfunction in LDL-Receptor deficient mice / K. Steioff, H. Rütten, A.E. Busch, O. Plettenburg, Y. Ivashchenko, M. Löhn // *Eur J Pharmacol*.- 2005.- Vol.11.- P.247-249.

176. Stokum J.A. Mechanisms of Astrocyte-Mediated Cerebral Edema / J.A. Stokum, D.B. Kurland, V.Gerzanich, J.Simard. // *Neurochem. Res.* -2015.- Vol. 40.- P.317–328.

177. Struewing I.T. Enhanced Endothelial Cell Senescence by Lithium-induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression / I.T. Struewing, S.N. Durham, C.D. Barnett, C.D. Mao // *The Journal of Biological Chemistry*. -2009.- Vol.284.-P.595-606.

178. Su J.B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment / J.B. Su // *World Journal of Cardiology*.- 2015.- Vol.7.- P.719-741.

179. Szabo C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabo, H. Ischiropoulos, R. Radi // *Nat. Rev. Drug Discov*.- 2007.- Vol. 6.-P.662–680.

180. Tabit C.E. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications / C.E. Tabit, W.B. Chung, N.M. Hamburg, J.A. Vita // *Reviews in endocrine & metabolic disorders*.- 2010.- Vol.11.- P.61-74.

181. Tain Y-L. Targeting on Asymmetric Dimethylarginine-Related Nitric Oxide-Reactive Oxygen Species Imbalance to Reprogram the Development of Hypertension / Y-L. Tain, C-N. Hsu // International Journal of Molecular Sciences. - 2016.- Vol.17.- P.2020- 2030.
182. Tamargo J. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide / J. Tamargo, R. Caballero, R. Gómez, E. Delpón // Cardiovasc Res. – 2010. – Vol. 87. – P.593-600.
183. Tan X-L. Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction, amyloid angiopathy and cognitive impairment / X-L.Tan, Y-Q.Xue, T.Ma // Molecular Neurodegeneration.- 2015.- Vol. 10.- P.24-37.
184. Tang G. Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema / G. Tang, G-Y. Yang // International Journal of Molecular Sciences.- 2016.- Vol 17.- P.1413-1424.
185. Tao J. Tea polyphenols protect against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice through anti-oxidative and anti-apoptotic properties / J.Tao, X.Shen, Y.Ai, X. Han // Experimental and Therapeutic Medicine.- 2016.- Vol. 12.-P.3433-3439.
186. Tatemichi M. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers / M. Tatemichi, T. Ogura, N. Sakurazawa, H. Nagata, M. Sugita, H. Esumi // International Journal of Experimental Pathology.- 2003.- Vol. 84.- P.213-220.
187. Ted W. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection / W. Ted L., S.Zhang, Y. T. Wang // Progress in Neurobiology.- 2014.- Vol.115.-P.157–188.
188. Terasaki Y. Mechanisms of Neurovascular Dysfunction in Acute Ischemic Brain / Y. Terasaki, Y. Liu, K. Hayakawa // Current medicinal chemistry.- 2014.- Vol. 21.- P. 2035-2042.
189. Thrane A.S. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling events elicited by cerebral edema / A.S. Thrane, P.M. Rappold, T.Fujita, A. Torres, L.K. Bekar // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2011.- Vol. 108.- P.846–851.
190. Thrift A.G. Global stroke statistics / A.G. Thrift, D.A.Cadilhac, T.Thayabaranathan // Int J Stroke.- 2014.- №9.-P.6–18.

191. Tomasch M. Fluorescent Human EP3 Receptor Antagonists / M. Tomasch, J. S.Schwed, K. Kuczka, S. M. dos Santos, S. Harder, R.M. Nüsing, A. Paulke, H. Stark // ACS Med. Chem Lett. 2012. Vol.8. P.4-9.
192. Tuttolomondo A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date / A. Tuttolomondo, R. Pecoraro, A. Pinto // Drug Design, Development and Therapy.- 2014.- Vol.8.-P.2221-2239.
193. Umeno A. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones / A. Umeno, M. Horie, K. Murotomi, Y. Nakajima, Y. Yoshida // Molecules.- 2016.- Vol. 30. –P.2-15.
194. Ushikubi F. Impaired febrile responses in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> / F.Ushikubi, E. Segi, Y. Sugimoto, T.Murata // Nature.- 1998.- Vol.395.- P. 281–284.
195. Vairappan B. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress / B.Vairappan // World Journal of Hepatology. -2015.- Vol.7.- P.443-459.
196. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser // Int.J Biochem. Cell. Biol. – 2007.- Vol. 39.- P.44-84.
197. Villalba N. Traumatic Brain Injury Disrupts Cerebrovascular Tone Through Endothelial Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Gain of Function / N. Villalba, S.K. Sonkusare, T.A. Longden // Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease.- 2014.- Vol.3.- P. 1474-1491.
198. Villanueva C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease / C. Villanueva, C. Giulivi // Free radical biology & medicine.- 2010.- Vol.49.- P.307-316.
199. Virag L. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors / L.Virag, C.Szabo // Pharmacol Rev.- 2002.- Vol.54.-P.375–429.

200. Wang C.P. Isoquercetin Ameliorates Cerebral Impairment in Focal Ischemia Through Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects in Primary Culture of Rat Hippocampal Neurons and Hippocampal CA1 Region of Rats / C.P. Wang, Y.W. Shi, M. Tang, X.C. Zhang, Y. Gu, X.M. Liang // *Mol Neurobiol.*- 2016.- Vol.10.- P. 1007-1024.
201. Wang X. Flavonoid intake and risk of CVD: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies / X. Wang, Y. Ouyang, J. Liu, G. Zhao // *British Journal of Nutrition.*- 2014.-Vol.111.-P.1-11.
202. Warner D.S. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain / D.S. Warner, H. Sheng // *J. Exp. Biol.*- 2004. -Vol. 207.- P.21–31.
203. Weisova P. Latrepirdine is a potent activator of AMP-activated protein kinase and reduces neuronal excitability / P. Weisová, S.P. Alvarez, S.M. Kilbride, U. Anilkumar, B. Baumann, J. Jordán, T. Bernas, H.J. Huber, H. Düssmann, J.H. Prehn // *Translational Psychiatry.*- 2013.- №3(10).- P.e317.
204. Wolburg H. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma / H.Wolburg, S. Noell, P.Fallier-Becker, A.F. Mack, K.Wolburg-Buchholz // *Mol. Asp. Med.* -2012.- Vol.- 33.-P.579–589.
205. Woodruff T.M. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. / T.M. Woodruff, J. Thundyil, S-C.Tang, C.G. Sobey, S.M. Taylor, T.V. Arumugam // *Molecular Neurodegeneration.*- 2011.- Vol. 6.- P.1-19.
206. Xu T.Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase / T. Xu, V. Pagadala, D.M. Mueller // *Microbial cell.* – 2015.- Vol. 2.- P.105-125.
207. Yan B.C. Neuroprotection of posttreatment with risperidone, an atypical antipsychotic drug, in rat and gerbil models of ischemic stroke and the maintenance of antioxidants in a gerbil model of ischemic stroke / B.C.Yan, J.H. Park, J.H. Ahn // *J. Neurosci. Res.* – 2014.- Vol.92.- P.795-807.
208. Yetik-Anacak G., Catravas J.D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease / G. Yetik-Anacak, J.D. Catravas // *Vascul Pharmacol.* - 2006. - Vol.45(5).- P.268-276.

209. Yunoki T. Anti-oxidative nutrient-rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats / T. Yunoki, K. Deguchi, Y. Omote, N. Liu, W. Liu // *Brain. Res.*-2014. - Vol. 31. - P.1587- 1601.

210. Zhang L. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke / L. Zhang, Z.G. Zhang, M. Chopp // *Trends in pharmacological science.*- 2012.- Vol. 33.- P.415-422.

211. Zhang T. Apigenin protects blood-brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats / T. Zhang , J. Su, B. Guo, K. Wang, X. Li, G. Liang // *Int. Immunopharmacol.*-2015.- Vol.28.-P.79-87.

212. Zhang Y. Peroxynitrite induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation / Y.Zhang, H.Wang, J.Li, D.A. Jimenez, E.S. Levitan, E. Aizenman, P.A. Rosenberg // *J. Neuroscience.* -2004.- Vol. 24.-P.10616–10627.

213. Zhang Y.B. Neuroprotective effects of N-stearoyltyrosine on transient global cerebral ischemia in gerbils / Y.B. Zhang, M.Y. Kan, Z.H. Yang, W.L. Ding, J. Yi, H.Z. Chen, Y. Lu // *Brain Res.* - 2009. - Vol. 1.-P. 146-156.

214. Zrinivasan S. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress / S. Zrinivasan, N.G. Avadhani // *Free radical biology & medicine.*- 2012.-Vol. 53.-P: 1252-1263.