

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

На правах рукописи

Мирошниченко Кирилл Александрович

Церебропротекторное действие новых сульфопроизводных
пиримидин-4(1H)-она в условиях экспериментальной хронической
травматической энцефалопатии

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Черников Максим Валентинович

Пятигорск – 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Экспериментальные животные и условия их содержания.....	33
2.2 Исследуемые объекты	33
2.3 Алгоритм проведения исследования.....	37
2.4 Дизайн исследования	38
2.5 Модели ХТЭ	40
2.5.1 Модель механического воздействия	40
2.5.2 Модель «Blast wave	40
2.6 Методы оценки когнитивных функций	40
2.6.1 Тест «экстраполяционное избавление» (ТЭИ).....	40
2.6.2 Тест «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ).....	41
2.7 Метод оценки сенсомоторных функций.....	41
2.8 Метод оценки уровня неврологического дефицита.....	42
2.9 Метод определения «острой» токсичности	43
2.10 Биологические материалы и пробоподготовка	44
2.11 Методы оценки изменения биохимических показателей	45
2.11.1 Методика определения лактата, пировиноградной кислоты.....	45
2.11.2 Методика определения гомоцистеина	45
2.11.3 Метод иммуноферментного исследования.....	45
2.11.4 Методика оценки содержания ТБК-активных продуктов.....	46
2.11.5 Методика оценки активности супероксиддисмутазы.....	46
2.11.6 Методика оценки активности глутатионпероксидазы	46
2.11.7 Оценка активности глутатионредуктазы	47
2.12 Методы оценки эндотелиальных функций сосудов головного мозга	47
2.12.1 Методы оценки антитромботической функции	47
2.12.2 Методы оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов и уровня церебрального кровотока	48
2.13 Анализ коагуляционного звена гемостаза	48
2.14 Метод оценки функций митохондрий.....	49
2.15 Методы статистической обработки результатов эксперимента.....	50
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА УРОВЕНЬ КОГНИТИВНЫХ, СЕНСОМОТОРНЫХ ФУНКЦИЙ И ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ (ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ).....	51
3.1 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на когнитивные функции крыс в тесте ТЭИ в условиях экспериментальной ХТЭ.....	51

3.2	Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на когнитивные функции крыс в тесте УРПИ в условиях экспериментальной ХТЭ.....	53
3.3	Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень сенсомоторных функций крыс в тесте «Beam walking test» в условиях экспериментальной ХТЭ.....	54
3.4	Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию некоторых биохимических показателей в условиях экспериментальной ХТЭ	56
3.5	Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию маркеров нейродеградации в условиях экспериментальной ХТЭ	60
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	66
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА В ИНТЕРВАЛЕ ДОЗ		72
4.1	Изучение параметра «острая» токсичность соединения-лидера	72
5.1	Определение эффективности применения соединения-лидера в дозах 25-150 мг/кг условиях ХТЭ	74
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ГЛАВА 5. УГЛУБЛЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА SUB1 И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХТЭ.....		80
5.1	Оценка отсроченного влияния исследуемых соединений на течение экспериментальной ХТЭ.....	80
5.1.1	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на когнитивные функции крыс в условиях ХТЭ.....	80
5.1.2	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на концентрацию специфических маркеров нейродеградации в условиях ХТЭ	81
5.2	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на течение ХТЭ в модели «Blast wave».....	84
5.2.1	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на неврологические функции крыс в условиях ХТЭ в модели «Blast wave».....	84
5.2.2	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на содержание маркеров нейродеградации в условиях ХТЭ в модели «Blast wave».....	85
5.2.3	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на концентрацию белка AIF в условиях ХТЭ в модели «Blast wave».....	89
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА SUB1 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХТЭ95		
6.1	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на эндотелиальные функции церебральных сосудов в условиях ХТЭ.....	95
6.1.1	Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и уровень церебрального кровотока в условиях ХТЭ.....	95
6.1.2	Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на степень агрегационной способности тромбоцитов в условиях ХТЭ.....	99

6.1.3	Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на некоторые параметры плазменного гемостаза, активность противосвертывающей системы в условиях ХТЭ	101
6.2	Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на митохондриальные функции в условиях экспериментальной ХТЭ.....	103
6.2.1	Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на респирометрическую функцию в условиях экспериментальной ХТЭ.....	103
6.2.2	<i>Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на антиапоптотическую функцию в условиях экспериментальной ХТЭ.....</i>	105
6.3	Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на антиоксидантную функцию в условиях экспериментальной ХТЭ.....	106
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
	ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	113
	ВЫВОДЫ.....	126
	НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	128
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	129
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ) является прогрессирующей нейродегенеративной патологией, неминуемо приводящей к повышению инвалидизации и смертности населения [185]. Главным этиологическим фактором данного заболевания выступают повторяющиеся черепно-мозговые травмы (ЧМТ). За последние два десятилетия в связи с широким исследованием ХТЭ накопились убедительные сведения о том, что данная патология является не узконаправленной, как считалось ранее для спортсменов контактных видов спорта и военнослужащих, а представляет угрозу здоровью и жизни всего населения независимо от возраста и вида профессиональной деятельности [126]. Это связано с тем, что среди общего черепно-мозгового травматизма большая часть приходится на бытовой (около 40-78%), дорожно-транспортный (10-30%) и связанный с профессиональной деятельностью (12-15%) [18].

Клиническая картина ХТЭ проявляется комплексом когнитивных, неврологических, сенсомоторных расстройств, которые могут быть ошибочно не отнесены к проявлениям данного заболевания, учитывая степень и характер их проявлений, так как данные симптомы присущи для ряда других нейродегенеративных патологий, таких как прогрессирующий когнитивный дефицит, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона [200]. Рассматривая главный этиологический фактор, ЧМТ, можно судить о распространенности данного заболевания. Согласно статистическим данным во всем мире ежегодно получают ЧМТ около 42 миллионов человек, из них в России около 600 тысяч [129]. Однако следует упомянуть тот факт, что большинство ЧМТ легкой степени тяжести не учтены, вследствие отсутствия обращений за помощью в лечебно-профилактические учреждения. Последнее приводит к тому, что население не получает должной терапии, увеличивая тем самым вероятность отсроченных осложнений, главным из которых и является развитие ХТЭ [93]. У лиц,

подверженных данной патологии, в зависимости от тяжести клинических проявлений отмечается значительное снижение качества жизни вплоть до инвалидизации и смерти, им необходим специализированный уход, что создает дополнительные экономические и медико-социальные трудности для общества в целом [192].

На сегодняшний день не существуют как оптимальных лекарственных средств для терапии ХТЭ, так и стратегии лечения в целом. Но учитывая высокую социальную важность и неизбежно возрастающую частоту заболевания, вследствие современного технического прогресса, поиск «терапевтических мишеней» и активных субстанций к ним представляет научный интерес с целью внедрения в практическую деятельность для сохранения качества жизни населения.

Для создания лекарственных средств сохраняет свою актуальность использование в качестве предшественника соединений хорошо изученных структур, в частности, производных пиримидина [22]. Перспективность данного направления заключается в том, что пиримидины, являясь компонентом нуклеиновых кислот, проявляют широкий спектр фармакологических активностей, обладая при этом низкой токсичностью [107,5]. Так, одним из установленных видов активности производных пиримидина является церебропротекторная, выражающаяся в эндотелиопротекторном [10], антигипоксическом [36], антиагрегационном [11], антиоксидантном [177,201] действиях.

Степень разработанности темы

Число научных публикаций, связанных с ХТЭ, значительно увеличилось с четырех в 1999г до 160 в 2019г, что характеризует повышенный интерес в изучении патологии [67]. Установлено развитие первых клинических проявлений ХТЭ у населения по прошествии нескольких лет или даже десятилетий после первой ЧМТ, что позволяет судить об отсроченном неблагоприятном эффекте ЧМТ в перспективе в виде развития данного заболевания [173]. Основным

диагностическим критерием является накопление фосфорилированного тау-белка в виде нейрофибриллярных агрегатов в лобной и височных долях коры больших полушарий, что и является отличием от других таупатий, таких как болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция [164]. На сегодняшний день диагностировать ХТЭ возможно только посредством аутопсии и анализа головного мозга. Физиологическая роль тау-белка заключается в обеспечении стабильности формы и жесткости нейронов, способствуя поддержанию постоянства структуры и внутриклеточного транспорта везикул, тем самым оказывая непосредственное воздействие на функционирование клеток центральной нервной системы [96]. В условиях ЧМТ наблюдается первичный и вторичный каскады повреждения головного мозга, возникающие вследствие воздействия травматического фактора, приводящие к нейродеградации, посредством дестабилизации тау-белка, способствующей его фосфорилированию и конформации в нейрофибриллярные агрегаты [54]. На сегодняшний день существуют два подхода к нивелированию последствий ЧМТ, первый, использование средств индивидуальной защиты, шлемов, но как ни парадоксально это приводит к увеличению частоты и тяжести травматических воздействий, получаемых людьми из-за повышенного чувства личной безопасности (т. е. «компенсация риска») [129]. И второй, посредством фармакотерапии вторичного каскада повреждения мозга (снижение уровня мозговой гемодинамики, гиперпродукция активных форм кислорода, сокращение уровня макроэргов в клетках головного мозга) с помощью средств, обладающих церебропротекторной активностью. Однако имеющиеся на сегодняшний день лекарственные средства в полной мере не позволяют нивелировать клинические проявления у больных, что и обосновывает необходимость поиска новых средств для профилактики и терапии ХТЭ.

Целью исследования явилась оценка наличия церебропротекторной активности у новых сульфопроизводных пиримидин-4-1(Н)-она в условиях экспериментальной ХТЭ.

Для достижения вышеназванной цели были установлены следующие **задачи:**

1. Выполнить фармакологический скрининг среди новых производных пириимидин-4-1(Н)-она для выбора соединения с наиболее выраженным фармакологическим эффектом, посредством оценки когнитивных, сенсомоторных функций и состояния метаболизма головного мозга у крыс.
2. Определить перспективы использования соединения-лидера, посредством оценки острой токсичности и эффективности применения в интервале доз.
3. Провести углубленное исследование соединения-лидера на предмет наличия церебропротекторной активности в условиях экспериментальной хронической травматической энцефалопатии, путем изучения отсроченного влияния на уровень когнитивных функций, биохимических процессов нейронов, цереброспецифичных маркеров нейродеградации.
4. Изучить воздействие вещества-лидера на течение экспериментальной хронической травматической энцефалопатии в условиях модели «Blast wave».
5. Изучить потенциальные механизмы действия соединения-лидера.

Научная новизна исследования

В рамках данной исследовательской работы впервые было выполнено изучение церебропротекторной активности новых производных пириимидин-4-1(Н)-она в условиях экспериментальной ХТЭ.

Также впервые для соединения-лидера под лабораторным шифром Sub1 установлены такие параметры, как «острая» токсичность и «доза-эффект». Впервые было изучено влияние соединения-лидера Sub1 на состояние эндотелиальной и митохондриальной дисфункций в условиях экспериментальной

ХТЭ. А именно, проанализирована степень воздействия на вазодилатирующую, антиагрегантную, антикоагуляционную активности, как главных функций эндотелия сосудов головного мозга, обеспечивающих необходимый уровень церебральной гемодинамики. Также установлен характер влияния соединения-лидера Sub1 на респирометрическую, антиоксидантную и апоптоз-регулирующую функции митохондрий, посредством оценки АТФ-генерирующей активности, уровня гликолитических процессов, степени образования свободных радикалов, состояния ферментов, обеспечивающих эндогенную антиоксидантную защиту клеток головного мозга, а также концентрацию главного эффектора апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость работы

В рамках данного диссертационного исследования установлена церебропротекторная активность нового производного пиримидин-4-1(Н)-она Sub1, проявляющаяся в нивелировании эндотелиальных и митохондриальных дисфункций в условиях экспериментальной ХТЭ. Также показано выраженное церебропротекторное действие Sub1 в условиях двух экспериментальных моделей ХТЭ с разными этиологическими факторами, уровень отсроченного влияния соединения на течение ХТЭ. На основании результатов проведенной работы можно судить о целесообразности дальнейшего изучения соединения Sub1 с целью создания на его основе церебропротекторного лекарственного препарата для профилактики и лечения ХТЭ, также, создана рекомендация химикам-синтетикам в виде дальнейшего целенаправленного синтеза новых соединений в ряду производных пиримидина с целью поиска средств с церебропротекторной активностью.

Методология и методы исследования

В данной диссертационной работе методология была составлена согласно поставленным задачам исследования, выполненного на базе Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В исследовании использовался комплексный морфо-

функциональный подход к оценке церебропротекторной активности изучаемых соединений, в виде оценки эндотелиальных и митохондриальных функций. Все выполняемые манипуляции строго соответствовали общепринятым этическим нормам работы с экспериментальными животными. Также данное диссертационное исследование произведено с использованием необходимого количества биологических моделей на современном оборудовании с применением методов, адекватных поставленным задачам исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. В ряду изучаемых новых производных пиримидин-4-1(Н)-она наиболее выраженным церебропротекторным действием в условиях экспериментальной ХТЭ обладает соединение Sub1. Применение Sub1 позволяет нивелировать характерные проявления ХТЭ в виде когнитивного, сенсомоторного и неврологического дефицитов.

2. Механизм действия Sub1 связан с восстановлением функций митохондрий и эндотелия сосудов головного мозга, что в свою очередь приводит к меньшей нейродеструкции в условиях экспериментальной ХТЭ и выражается снижением концентрации маркеров нейродеградации.

3. Sub1 способствует восстановлению физиологически необходимого уровня мозговой гемодинамики, нормализации процессов метаболизма клеток головного мозга, снижая продукцию гомоцистеина и устраняя лактат-ацидоз. Также при применении данного вещества отмечается повышение уровня макроэргов, уменьшение образования АФК, снижение индукции сигналов, запускающих процесс апоптоза.

Внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в ходе данной работы, применяются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ. Методология поиска и разработки средства церебропротекторного действия на основе нового производного

пиримидина, применяемого для лечения хронической травматической энцефалопатии, за счет снижения гиперфосфорилирования тау-белка используются в исследованиях, выполняемых в рамках реализации научного проекта № 20-315-90062 от 1 сентября 2020 г., при предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий, в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации (Москва).

Степень достоверности и апробация результатов

В рамках данного диссертационного исследования были использованы современные методы выполнения экспериментальных работ и высокотехнологичное оборудование. Также, при проведении исследований был получен достаточный объем статистически обработанных данных, последнее и позволяет судить о высокой степени достоверности полученных результатов. Основные положения диссертационной работы докладывались на XL Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования», Москва, 22.09.2020; IX Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск, 03-04.12.2020; XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2020.

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ; 4 в базе журналов, индексируемых в SCOPUS; 1 в базе журналов, индексируемых в Web of Science. Также получен 1 патент на изобретение и зарегистрирована 1 база данных.

Личный вклад автора

Вклад автора являлся основным и заключался в определяющем участии на всех этапах диссертационного исследования по изучению церебропротекторного действия новых сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она в условиях экспериментальной ХТЭ. Для выполнения диссертационной работы автором был

произведен подбор и анализ литературных источников, сбор первичных данных, также выполнена статистическая обработка результатов исследований.

Структура и объем работы

Диссертация написана на 154 страницах машинописного текста. Рукопись включает в себя введение, семь глав, выводы, научно-практические рекомендации, список сокращений и список литературы. В работу включены 33 рисунка и 8 таблиц. Список литературы состоит из 233 источников, из них 44 отечественных, 189 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Эпидемиологические особенности, клинические проявления, диагностические аспекты хронической травматической энцефалопатии

Исходя из результатов исследований последних лет и анализа данных литературы, хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, являясь осложнением повторяющихся черепно-мозговых травм (ЧМТ) [185,96]. Ежегодно регистрируется около 10 миллионов случаев госпитализации людей в лечебно-профилактические учреждения с ЧМТ [224,81], включая проникающие травмы (при которых происходит нарушение целостности черепной коробки и твердой мозговой оболочки, с прямым повреждением тканей мозга) и закрытые травмы головы, при которых череп и твердая мозговая оболочка остаются целыми [221]. Однако фактическое значение количеств ЧМТ будет отличаться, так как 80-90% травм в виде легкой травмы недооценены в большинстве исследований по причине отсутствия обращений [99]. При этом наиболее распространенными причинами ЧМТ любой степени тяжести являются занятия контактными видами спорта, участие в боевых действиях, дорожно-транспортные происшествия, которые вместе составляют более 50% всех случаев [122]. Не следует забывать об огромном количестве бытовых травм, которые люди получают довольно часто в повседневной жизни, при этом указанные сотрясения не учтены в медицинских базах, ввиду отсутствия обращений в лечебно-профилактические учреждения [93]. Нельзя не отметить то, что люди, страдающие эпилепсией и эпилептическим синдромом, также подвержены ЧМТ при неконтролируемых падениях во время приступов. Стоит отметить, что подверженность ЧМТ выше среди мужского пола [80].

Наиболее частой клинической формой ЧМТ выступает сотрясение головного мозга (СГМ), составляя 80% проявлений от общего количества травм головы [152]. На сегодняшний день получены достоверные сведения о наличии прямой зависимости между неоднократными СГМ и развитием ХТЭ [91]. Ученые, воспроизводя патологию на животных, показали, что воздействие стресса также,

наряду с СГМ, способно приводить к образованию патологических маркеров, характерных для ХТЭ [172]. Проанализировав вышесказанное, следует то, что ХТЭ может поражать людей всех возрастов и профессий и являться основной причиной смерти и инвалидизации, что делает данную патологию не узкоспециализированной по данным литературы, для спортсменов и военных [126], а более социально значимой для всего населения. Следовательно, лечение и профилактика ХТЭ выступают одним из приоритетных направлений развития медицины и фармакологии.

На сегодняшний день ХТЭ является одной из интенсивно изучаемых патологий, что значительно расширяет сведения о патогенезе и течении, а также позволяет оценить влияние и периодичность СГМ на развитие заболевания, его последствия и вред, наносимый здоровью больного, также способствует развитию эффективной и безопасной фармакотерапии.

Клинические проявления ХТЭ обычно наблюдаются спустя несколько лет или десятилетий после первой ЧМТ [173] и состоят из следующего симптомокомплекса:

1. Поведенческие нарушения:

- депрессия;
- перепады настроения;
- апатия (потеря интереса к обычной деятельности, мотивации и эмоций);
- импульсивность (новое поведение, например: увлечение азартными играми, повышенная или необычная сексуальная активность, злоупотребление психоактивными веществами, чрезмерное количество покупок или необычные покупки);
- агрессия;
- суицидальные наклонности;
- параноидальный бред (устойчивые убеждения о преследовании, необоснованная ревность)

- тревога (чрезмерные страхи, навязчивое или компульсивное поведение)[118].

2. Когнитивные нарушения:

- снижение уровня внимательности;
- ухудшение памяти;
- искажение исполнительных функций;
- деменция [95].

3. Двигательные расстройства:

- спастичность;
- дизартрия;
- дисграфия;
- тремор;
- нарушение координации [210].

4. Сенсорные нарушения:

- снижение уровня функций зрительного и обонятельного анализаторов [97].

5. Головные боли (сильная головная боль с частотой не менее одного эпизода в месяц на протяжении как минимум 6 месяцев) [94].

Помимо вышеуказанных проявлений наблюдаются эндокринные дисфункции. Наиболее распространенными выступают нарушения, связанные с травмой гипофиза. Тело последнего защищено турецким седлом клиновидной кости, но ножка гипофиза (через которую осуществляется связь с гипоталамусом), уязвима к механическому воздействию. Посттравматический гипопитуитаризм присутствует в ~ 30% случаев больных, подвергшихся легким СГМ [133]. Наиболее часто наблюдается дефицит гормона роста и гонадотропного гормона, в то время как недостаток аденокортикотропного, тиреотропного гормонов встречается реже. Так же стоит отметить, что дефицит гормона роста может привести к изменениям в строении тела, и тем самым снизить качество жизни [212].

В настоящее время не существует общепринятых критериев или биомаркеров заболевания, которые могут быть использованы для клинической

диагностики ХТЭ. На сегодняшний день, ХТЭ может быть установлена только посмертно, заключением neuropатолога после анализа мозга [96, 220].

Исследуемая патология входит в группу заболеваний, характеризующихся термином «таупатия». Кроме ХТЭ к ним относятся также болезнь Альцгеймера (БА), лобно-височная деменция, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика [200]. Одной из определяющих характеристик таупатий является гиперфосфорилирование тау-белка. После фосфорилирования данный белок приобретает конформационные изменения, свернутую форму, способствующую полимеризации и агрегации в парные спиральные филаменты. Помимо фосфорилирования происходят другие посттрансляционные модификации тау-белка, такие как ацетилирование, гликозилирование, убиквитинирование, полиаминирование, окисление, нитрование. Конформационно измененный белок утрачивает свою физиологическую активность, тем самым запуская сложный многоступенчатый каскад реакций, приводящих к нейродеградации. Следует отметить, что недавно были описаны особенности первичной возрастной таупатии и астроглиопатия, которые схожи с признаками ХТЭ, однако характеризуют физиологический процесс старения [53].

Тау-белок впервые был описан в 1975 году исследователями Принстонского университета. Физиологическое функционирование клеток нервной системы определяется комплексом белков, ключевым из которых является тау-белок. Последний является высокоспецифичным соединением для аксонов нейронов. Тау-белок находится в пространственном взаимодействии с микротрубочками цитоскелета (посредством соединения с актином), обеспечивая стабильность формы и жесткость, способствуя поддержанию постоянства структуры клеток мозга. Также данный белок, адсорбируя на своей поверхности ферменты, протеинкиназы и фосфатазы, влияет на внутриклеточный транспорт везикул, тем самым оказывает непосредственное воздействие на функционирование нейронов. Метаболизм данного пептида осуществляется посредством фосфорилирования

при участии серин/треонинкиназ. Данный процесс характерен как для физиологического, так и для патологического состояний.

Конформационная модификация молекулы препятствует возможности тау-белка взаимодействовать с микротрубочками, что в свою очередь приводит к нарушению функционирования транспортной системы мозга, влияя на активность нейронов. Происходящие при этом процессы способствуют усилению экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена нервными клетками (HLA) [106]. Патологическое количество фосфорилированного тау-белка и HLA класса I адгезируются на мембране нейронов под действием электростатических сил. Ионактивная часть HLA класса I (аминокислотные позиции 50-90) связывается с противоположно заряженной ионной областью тау-белка (положение аминокислот от 93 до 133). Такое расположение облегчает сшивание с образованием внутриклеточных и внеклеточных нейрофибриллярных клубков (НФК). Далее данные мембранные комплексы HLA/тау подвергаются эндоцитозу в нейроны, накапливаются и образуют тау-хранилище болезни [106]. Увеличенное содержание НФК устойчиво к действию протеаз, что приводит к дисфункциям клеток нервной системы с последующей гибелью. Это явление можно представить как патологию накопления тау-белка, аналогичную болезни отложения липидов, болезни Тея-Сакса. Гиперфосфорилированные формы тау-белка в виде НФК накапливаются избирательно в глубине борозд лобной, височной, теменной областей коры больших полушарий, что и является отличительным диагностическим признаком ХТЭ [164].

Следующим биомаркером, характерным для изучаемой патологии, выступает глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), который был впервые описан в 1969 г. учеными под руководством L. F. Eng. Также как и тау-белок является высокоспецифичным соединением нервной системы, за ее пределами не обнаружен. Структурной единицей GFAP является молекула размером 8-12 нм и массой 40-53 кД [158]. Выделено три изоформы белка - альфа, бета и гамма, при этом альфа преимущественно локализуется в периферической, а гамма — в центральной нервной системе (ЦНС). В ЦНС белок расположен в глиальных

филаментах внутри протоплазматических астроцитов серого вещества и фиброзных астроцитах белого вещества, являясь структурным элементом цитоскелета. Главными физиологическими функциями GFAP выступают формирование и поддержание функционирования цитоскелета ЦНС, гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), дифференцировка астроцитов и рост отростков (тем самым способствуя взаимодействию последних с миелиновыми оболочками и синапсами), доставка макроэргов к нейронам при повышенной синаптической активности [72]. Наличие данного биомаркера в крови свидетельствует о повреждении клеток нервной системы, нарушении целостности ГЭБ, также является прогностическим признаком дальнейшей нейродеградации. Анализ концентрации GFAP позволяет оценивать тяжесть повреждения головного мозга при ХТЭ [108].

В качестве еще одного биомаркера развития ХТЭ можно выделить протеины группы S-100. Последние являются кальций-связывающими белками с массой до 20 кДа, известно три изоформы, состоящие из α - и β -цепей. Комбинация $\beta\beta$ - S-100B является специфичным протеином для ЦНС, с преимущественной локализацией в цитоплазме астроцитов [65]. Белок S-100B принимает участие в регуляции практически всех метаболических процессов, протекающих при восприятии и интеграции информации, поступающей в нервную систему. Данный протеин непосредственно влияет на специфическую активность рецепторов, тропных к ацетилхолину, γ -аминомасляной кислоте, норадреналину, дофамину и серотонину. S-100B является стабилизирующим фактором тубуло-ассоциированных белков, одним из которых является тау-белок. Он также регулирует сборку микроструктур цитоскелета, устраняя гиперполимеризацию GFAP и конформацию филаментозных структур при митозе. Нельзя не отметить нейротрофическую и морфогенную функции S-100B. Первая проявляется посредством индукции роста аксонов и дендритов, мезэнцефальных серотонинергических нейронов, ганглиев дорсальных корешков спинного мозга. Вторая - в виде стимулирования пролиферации и изменения формы глиальных клеток. Также рассматриваемый белок принимает участие в

реализации генетических программ апоптоза и антиапоптотической защиты [181]. Рядом ученых установлено, что S-100B и GFAP являются основными эффекторами репаративных процессов, происходящих в мозге при различных патологических состояниях [64].

Для таупатий, в частности ХТЭ, характерно наличие в нейронах β -амилоидных отложений, образованных в результате гиперсекреции β -амилоида (A β) [39]. Данные агрегаты обладают выраженной церебротоксичностью, вследствие того, что A β способствует развитию нарушений Ca-гомеостаза, стимулированию окислительного стресса, эксайтотоксичности, индукции апоптоза и некроза. Церебральная амилоидная ангиопатия, в форме β -амилоидных бляшек, также занимает немаловажную роль в патогенезе ХТЭ. A β , адгезируясь на стенках кровеносных сосудов, приводит к прогрессирующей дисфункции сосудистой системы головного мозга, выражающейся в виде внутримозговых кровоизлияний [208]. Известно, что бляшки образованы бета-амилоидным пептидом с молекулярной массой 4 кДа, имеющим длину около 40 аминокислотных остатков. Рассмотрим этиологию развития данных отложений. Ведущую роль в обеспечении процессов нейропластичности занимает трансмембранный белок - белок-предшественник A β (APP), отвечающий за образование, функционирование синапсов, и необходим для физиологического функционирования нервных клеток. Известны два пути протеолиза APP: первый, с участием α -секретазы, называемый неамилоидогенным, так как наблюдается расщепление молекулы APP между аминокислотными последовательностями внутри A β , что не приводит к образованию молекулы амилоидного пептида, второй путь, β -секретазой, которая расщепляет APP вблизи N-конца соответствующего A β домена [188]. СГМ непосредственно способствует увеличению концентрации белка-предшественник APP, и как следствие наблюдается зависимое увеличение секреции A β [209].

Стоит уделить внимание следующему маркеру нейродеградации - нейрон-специфичной енолазе (NSE). Последняя является гликолитическим ферментом с молекулярной массой 78 кДа. Специфичной для нейронов является форма $\gamma\gamma$, $\alpha\alpha$

изоформа характерна для нейроэндокринных клеток, $\alpha\gamma$ -форма экспрессируется в микроглии, олигодендроцитах и астроцитах [169]. Данный белок попадает во внеклеточное пространство лишь при патологических состояниях, сопровождающихся деструкцией нервных клеток, где степень тяжести коррелирует с повышенным уровнем NSE в сыворотке, спинномозговой жидкости [184]. Фермент в физиологической концентрации отвечает за нейротрофическую активность, регулируя рост, дифференцировку, а также нейропластичность клеток ЦНС. Повышенное содержание NSE способствует формированию ишемии, различных метаболических, воспалительных процессов в клетках головного мозга [169, 121]. Однако конкретная роль NSE в воспалительных состояниях, и механизмы, посредством которых высокое содержание NSE может влиять на нейродегенерацию при ХТЭ, остаются неясными [184]. В ряде исследований установлена достоверная корреляция между уровнем NSE в сыворотке крови и выраженностью патологических состояний головного мозга в условиях таупатии [132]. Рядом ученых выявлено, что ингибирование NSE приводит к уменьшению образования хемокинов, цитокинов, что в свою очередь способствует восстановлению метаболических процессов.

Вышеперечисленные биомаркеры нейродеградации характерны для ряда таупатий. Однако на сегодняшний день установлены дифференциальные признаки ХТЭ, отличающие последнюю от ряда таких схожих патологий, таких как БА, лобно-височная деменция:

- атрофия коры головного мозга, особенно выраженной в лобной, височной, теменной долях;
- деструкция промежуточного мозга и сосцевидного тела;
- увеличение желудочков мозга;
- полость прозрачной перегородки с перфорациями;
- нейрофибрилярные и астроцитарные клубки в лобной, височной и теменных долях, с преимущественной локализацией вокруг мелких церебральных сосудов в глубине борозд;

- отложение β -амилоидных бляшек в микрососудах коры больших полушарий;
- обширная деструкция аксонов;
- комплексы гиперфосфорилированного ДНК-связывающего белка TAR 43;
- демиелинизация волокон [220].

В зависимости от патологической картины различают следующие стадии ХТЭ:

- I стадия

В мозге больных, подверженных ХТЭ I стадии, наблюдаются крайне редкие, изолированные периваскулярные очаговые накопления НФК. Они имеют точечный, иногда нитевидный характер. Тау-патология локализуется в глубине церебральных борозд лобных, височных и теменных долей коры [95].

- II стадия

Наблюдаются макроскопические изменения головного мозга, в их числе, умеренное увеличение боковых желудочков, перфорации прозрачной перегородки, бледность голубого пятна и черной субстанции. Микроскопически обнаруживаются множественные периваскулярные очаги НФК в глубине лобной, височных, теменных областей коры. Отчетливо наблюдается отечность аксонов с изменениями в соединительных волокнах. Отложения $A\beta$ присутствуют у 30% больных [173].

- III стадия

Имеются макроскопические изменения: снижение веса мозга, ограниченная атрофия коры лобной и височной долей, увеличение третьего желудочка. Наблюдается бледность голубого пятна и черной субстанции, атрофия сосцевидных тел, таламуса и гипоталамуса. Микроскопически, обнаруживаются конгломераты НФК, астроцитарных клеток вокруг кровеносных сосудов глубинных и поверхностных слоев коры. В 50% всех случаев III стадии ХТЭ присутствуют диффузные отложения $A\beta$. Наблюдается патология белого

вещества, в виде потери миелиновых оболочек, дистрофии и гибели аксонов [118].

- IV стадия

Отмечается значительное снижение веса мозга до 1000г и менее. В дополнение к генерализованной церебральной атрофии, присутствует выраженное поражение переднего таламуса. Микроскопически, обнаруживается потеря миелиновых оболочек и деструкция нейронов в коре головного мозга, гиппокампе и черной субстанции. Тау-патология может быть распространена по всему мозгу, включая таламус, гипоталамус, сосцевидные тела, базальные ганглии, ствол мозга, мозжечок. При этом отмечается потеря миелиновых волокон, дистрофия аксонов, полная деструкция белого вещества [215].

Патогенетические аспекты ХТЭ и перспективные терапевтические мишени

Разбирая механизм формирования ХТЭ, обращает на себя внимание то, что на фоне имеющейся ЧМТ увеличивается восприимчивость тканей мозга к новым сотрясениям на этапе восстановления, этот период характеризуется термином - «окно уязвимости». В случае повторной ЧМТ, возникшей после периода от первоначальной, достаточного для восстановления патофизиологических изменений, наблюдается устранение последствий второй травмы до физиологического уровня. В случае, когда СГМ происходит во время «окна уязвимости» (до нормализации патофизиологических изменений после первого ЧМТ), отмечается кумулятивное повреждение мозга, способствующее более длительному выздоровлению с неполным восстановлением функций поврежденного участка мозга, а также развитию нейродегенеративных заболеваний [104,110].

ЧМТ включает в себя первичную травму, за которой следует каскад вторичных патологических процессов. Анализируя травматическое влияние на черепную коробку (первичная травма), было установлено, что повреждение возникает немедленно. Последнее образуется посредством воздействия

вращательных (угловых), линейных (поступательных) сил, способствующих тупой травме, когда мозг сталкивается с черепом в момент внешнего воздействия [170]. Также стоит выделить воздействие ударной волны взрывов, при которых установлено повреждение периваскулярных тканей, посредством передачи избыточного давления по сосудистой сети головного мозга [155].

Вышеописанное травмирование, вызываемое различными этиологическими факторами, создает повышенное внутричерепное давление, посредством передачи инерции мозгу от поступательного фактора. Изменение давления генерирует силы сдвига и деформации, которые, в свою очередь, приводят к растяжению и повреждению протяженных структур, таких как аксоны и кровеносные сосуды [150,213]. Биомеханические исследования показали, что наиболее высокие силы напряжения наблюдаются в нижней части борозд в лобной, теменной и височной долях коры [70]. Данный факт объясняется тем, что наивысшая степень деформации образуется локально, где отмечается изменение направление аксонов или плотности ткани (например, вокруг кровеносных сосудов или на границе серого и белого веществ). Следует подчеркнуть, что именно указанное местоположение соответствует расположению биомаркеров, диагностируемых при развитии ХТЭ [89].

Стоит отметить, что аксоны наиболее чувствительны к деформирующим силам, вследствие их вязкоупругой структуры, линейного расположения микротрубочек и нейрофиламентов, большого соотношения поверхности мембраны аксона (аксолеммы) к объему (аксоплазмы) [157,146]. При тяжелых СГМ происходит полное разрушение аксона (первичная аксонотомия). Менее серьезные деформации вызывают очаговые патологические аномалии аксонов, которые приводят к отсроченной вторичной аксонотомии [45]. Следует отметить, что травматические силы сдвига вызывают повышенную проницаемость мембраны, что способствует притоку кальция, увеличению митохондрий, нарушению структурно-функционального состояния микротрубочек, изменению аксонального транспорта и накоплению компонентов цитоскелета (фосфорилированный тау-белок) и мембранных органелл [113].

Ранее были получены сведения, что после СГМ у лабораторных животных – свиней, аксоны продолжают дегенерировать на протяжении нескольких месяцев после травмы [148]. Впоследствии экспериментальные данные подтвердились обследованиями пациентов, подвергшихся ЧМТ, в которых демонстрируется вторичная аксонотомия спустя десятилетия после травмы [142], что в свою очередь приводит к неврологическим дисфункциям.

Исходя из данных исследований последних лет следует, что, вероятнее всего, именно деструкция аксонов занимает ведущую роль в гиперфосфорилировании тау-белка, агрегации и трансинаптическом и межнейронном распространении, и как следствие нейротоксическом действии [220, 216]. Последнее связано с нарушением синаптической функции, так как вследствие гиперфосфорилирования тау-белка наблюдается его перераспределение из аксона в соматодендритный компартмент, что является достаточным для развития дисфункции аксонального транспорта [92].

Также в условиях первичной травмы отмечается повреждение микрососудов головного мозга, которое проявляется в виде микроразрывов и ишемизации тканей [71]. Последние способствуют прогрессирующему нарушению церебральной гемодинамики, что подтверждается исследованиями рядом ученых, использовавших в качестве модели ХТЭ методику «Blast wave» [141].

Диффузное повреждение аксонов и микрососудов головного мозга является причиной гибели нейронов, первичной, при остром травматическом повреждении, включая гибель как от прямого физического повреждения, так и от некроза, вследствие немедленного высвобождения активирующих его факторов, таких как глутамат, и вторичной, отсроченной гибели клеток, включающую каскады некротических и апоптотических процессов [137].

В отличие от первичной травмы, степень проявления вторичного каскада патологических реакций потенциально обратима и может быть скорректирована посредством своевременной и эффективной фармакотерапии. Данный каскад процессов непосредственно связан с эндотелиальной дисфункцией, в виде

недостаточного уровня церебральной гемодинамики, также, с повреждающим действием активных форм кислорода (АФК), с нарушением внутриклеточного метаболизма (снижение продукции макроэргов, превалирование анаэробного окисления субстратов, ацидоз, гиперактивация апоптоза), что характеризует развитие митохондриальной патологии.

Следовательно, одним из ведущих механизмов развития изменений, микроскопических и макроскопических, приводящих, в свою очередь, к клиническим проявлениям ХТЭ, вероятно, выступает развивающаяся при механическом воздействии на головной мозг эндотелиальная дисфункция церебральных сосудов. Эндотелий сосудов - это монослой клеток, проявляющий эндокринную активность, ответственный за вазомоторику, также обеспечивающий барьерную функцию (ГЭБ). Физиологическое функционирование эндотелия характеризуется продукцией антисвертывающих, вазодилатирующих и противовоспалительных соединений, эффекты которых, в свою очередь, поддерживают необходимый уровень церебральной гемодинамики [25,174]. За счет секреции вазоактивных соединений эндотелий непосредственно влияет на проницаемость и тонус сосудов, гемостатические реакции, воспаление и ангиогенез. При СГМ вследствие прямого первичного повреждения отмечается снижение синтеза эндогенных регулирующих факторов, что стимулирует процессы вазоконстрикции, воспаления и структурно-функционального изменения сосудистой стенки [125]. Данные проявления способствуют прогрессирующей ишемии, при которой наблюдается развитие каскада сложных биохимических реакций, приводящих к повреждению головного мозга и ХТЭ [120, 167]. Установлены следующие патологические процессы, формируемые на фоне снижения уровня церебрального кровотока: повреждение эндотелия ГЭБ и сосудов микроциркуляторного русла, реакции местного воспаления. В результате наблюдается изменение проницаемости клеточной мембраны, что приводит к чрезмерному входу электролитов во внутриклеточное пространство, способствующее формированию отека головного мозга [119,78,15]. Стоит выделить поступление ионов кальция, приводящее к нарушению

функционирования систем кальциевого гомеостаза, при этом отмечается активация внутриклеточных ферментов, эндонуклеаз, протеинкиназ и фосфолипаз, а также индукция процессов перекисного окисления липидов, что в свою очередь, ведет к гибели клеток нервной системы [149,166]. Также вероятно развитие кровотечения, вызванное разрывом сосуда, что является одним из наиболее разрушительных факторов для клеток ЦНС [131], приводящее к отеку, повышению внутричерепного давления, гипоксии, активации образования АФК и индукции воспаления [156].

Следующим этапом патогенеза ХТЭ, вероятно, выступает митохондриальная дисфункция, непосредственно связанная со сниженным уровнем церебральной гемодинамики [211]. В настоящее время выделено три основополагающих функции митохондрий: респирометрическая – синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в процессе окислительно-восстановительных реакций в дыхательной цепи митохондрий [163], регулирующая апоптоз [55] и антиоксидантная – регуляция редокс-состояния клетки [233]. Основной из последних выступает респирометрическая, которая находится в прямом регулирующем взаимодействии с остальными [66].

В литературных источниках приводятся сведения о том, что в патогенезе ЧМТ, и соответственно, ХТЭ наблюдается развитие энергодифицита, что свидетельствует о снижении респирометрической активности митохондрий [87]. Данное состояние проявляется, вероятно, вследствие уменьшения мозгового кровотока, что вызывает изменение обменных процессов в сторону активации анаэробного пути метаболизма – гликолиза, при этом происходит гиперпродукция лактата, что приводит к развитию ацидоза. Также одним из патологически важных проявлений, возникающих при недостаточном кровоснабжении, выступает повышенное образование АФК, сопровождающееся в свою очередь повреждением макромолекул различных клеточных структур [102,23]. Данный факт объясняется, вероятно, снижением активности антирадикальных ферментных систем, вследствие повышенного содержания АФК. В условиях нарастающего энергодифицита, лактат-ацидоза, гиперсекреции АФК может

наблюдаться индукция проапоптотических факторов (белки семейства Bid/Bax), которые активируют каспаза-независимый путь апоптоза, через секрецию белка, индуцирующего апоптоз (AIF) (apoptosis inducing factor), что непосредственно приводит к гибели клеток головного мозга [51], с последующим формированием клинических проявлений ХТЭ.

В тоже время, в условиях развивающейся патологии наблюдается ингибирование специфических белков, участвующих в регуляции апоптоза, что изменяет тип гибели клеток на некроз. Последний приводит к необоснованной потере клеток нервной системы [193,232,231], способствует развитию воспаления, предположительно, путем обезвреживания продуктов распада погибших иммунных клеток [114,79].

Механизм формирования таупатологии в условиях ХТЭ можно представить в виде следующей схемы (рис. 1).

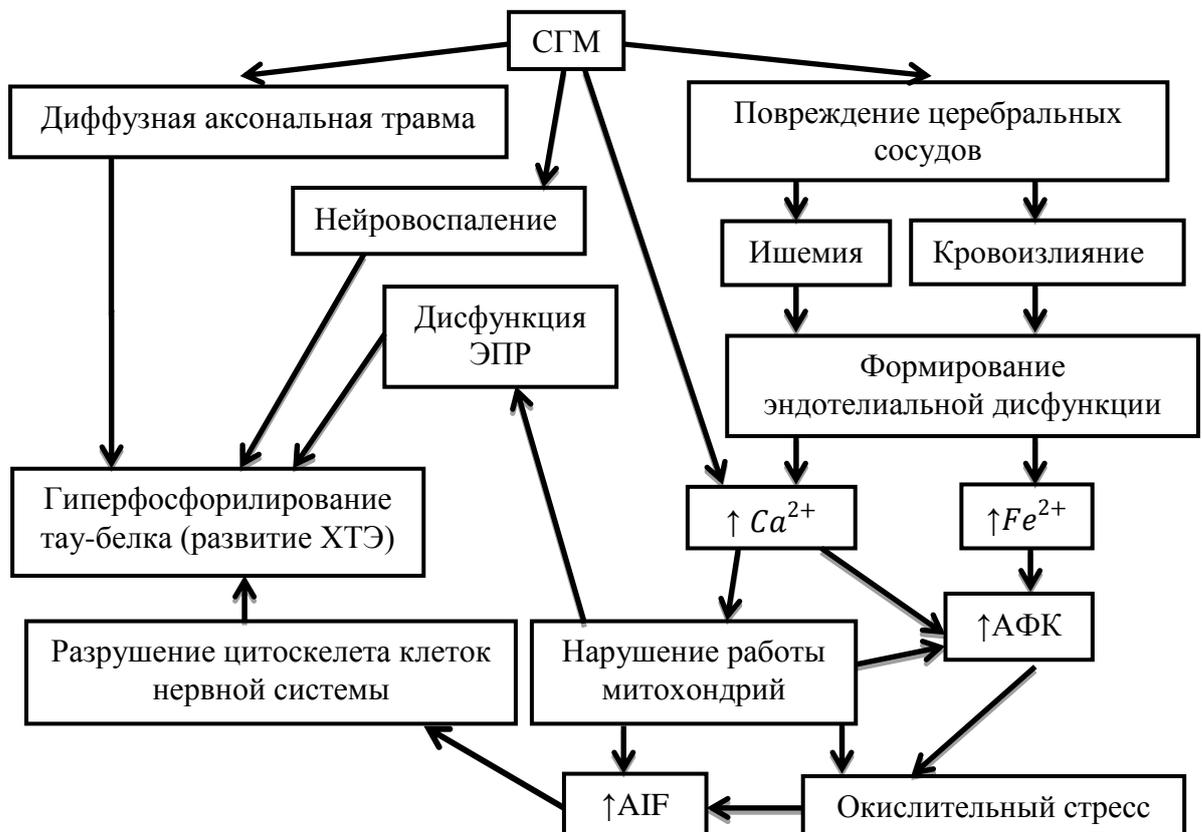


Рисунок 1 – Механизм формирования ХТЭ

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что сохранение митохондриальной и эндотелиальной функций в условиях ХТЭ, вероятно, позволит уменьшить уровень деградации клеток головного мозга. Тем самым, устраняя клинические проявления данной патологии, способствуя более мягкому течению заболевания. В этой связи митохондрии и эндотелий сосудов головного мозга являются перспективными «мишенями» для фармакотерапии, с целью уменьшения риска развития, профилактики и лечения ХТЭ.

Современное состояние фармакотерапия ХТЭ. Перспективы применения производных пиримидина в лечении ХТЭ

На сегодняшний день, несмотря на значительные усилия экспериментальной и клинической медицины отсутствуют как лекарственные препараты для терапии ХТЭ, так и стратегии лечения [95]. Наиболее перспективными направлениями разработки средств для фармакотерапии выступают воздействия на специфические молекулярные пути, характерные для ХТЭ [74], среди них можно выделить:

1. Влияние на ацетилирование тау-белка.

Как известно, патологическое конформационное изменение тау-белка происходит в результате его фосфорилирования, которому предшествует посттрансляционное ацетилирование, наблюдаемое в результате нейровоспаления, окислительного стресса [191, 101]. В ходе доклинических исследований было установлено, что применение сальсалата приводило к снижению воспаления, активации нейропротекции и нейрогенеза за счет стимулирования генов, ответственных за восстановление физиологического уровня ацетилирования тау-белка в моделях ЧМТ у мышей посредством снижения активности p300 лизин-ацетилтрансферазы [195,180]. Введение сальсалата показало аналогичные результаты в условиях экспериментальной модели лобно-височной деменции у грызунов [101]. Согласно экспериментальным данным, метиленовый синий модулирует активность ацетилирования, способствуя нейропротекции, снижает степень проявления

поведенческих нарушений и частоту изменения настроения, а также минимизирует дегенерацию нейронов, нейровоспаление, микроглиоз и митохондриальную дисфункцию у грызунов в условиях ЧМТ [160,161]. Исследования *in vitro* показали, что гистондеацетилаза 6 (HDAC) и сиртуины (SIRT1 и SIRT2) способствуют деацетилированию тау-белка [205,50].

2. Влияние на фосфорилирование тау-белка.

Фосфорилирование тау-белка активирует гликогенсинтазу 3 β (GSK-3 β), которая вызывает дальнейшее патологическое фосфорилирование тау-белка с последующим образованием НФК. Также, была установлена ведущая роль GSK-3 β в подавлении антиоксидантной защитной системы, посредством ингибирования фактора Nrf2, необходимого для транскрипции гемоксигеназы-1, способной метаболизировать активные формы кислорода, продуцируемые в условиях нейродегенеративных процессов [136,189]. Исходя из этого, в доклинических исследованиях были изучены селективные ингибиторы GSK-3 β с целью фармакотерапии ХТЭ. Один из таких ингибиторов, диметилфумарат, снижал активность GSK-3 β , способствовал активации Nrf2 в условиях экспериментальной таупатии, что предотвращало астроглиоз и микроглиоз [103]. Было исследовано влияние препаратов лития, которые также ингибируют GSK-3 β . Установлено, что на фоне введения лития отмечалось снижение фосфорилирования тау-белка, образования А β , нейровоспаления и гибели нейронов при сохранении когнитивных функций и целостности ГЭБ [59, 46].

Существует еще один класс киназ, циклинзависимые киназы, которые также участвуют в патологическом фосфорилировании тау-белка. Ингибитор данного класса киназ росковитин был изучен в условиях экспериментальной ЧМТ у мышей, полученные результаты свидетельствовали о сокращении нейродегенерации [147].

3. Иммунотерапия

Использование моноклональных антител также является одним из экспериментальных направлений поиска средств для терапии таупатий. Недавнее исследование показало, что доставка вектора аденоассоциированного вируса,

кодирующего антитело к фосфорилированному тау-белку, снижала уровень последнего в ЦНС в условиях экспериментальных моделей с повторяющимися черепно-мозговыми травмами [57]. Исследование *in vitro* показало, что некоторые антитела предотвращают поглощение нейронами и межнейрональное распространение фосфорилированного тау-белка [203].

4. Нивелирование воспаления.

При изучении вопросов терапии ХТЭ необходимо учитывать сложный воспалительный каскад и метаболические изменения, наблюдаемые в условиях данной патологии. Введение салюбринала значительно снижало окислительный стресс, активность провоспалительных цитокинов и индуцируемой синтазы оксида азота, предотвращая при этом поведенческие нарушения в моделях с повторяющимися ЧМТ у крыс [196]. Вместе с тем, предполагается, что кальпаин-2 способствует нейродегенерации после ЧМТ. Использование селективного ингибитора кальпаина-2 предотвращало повышенное фосфорилирование тау-белка и продукцию белка TDP-43, снижая при этом астроглиоз и микроглиоз, устраняя когнитивные нарушения в модели с повторяющимися черепно-мозговыми травмами у мышей [76]. Также необходимо отметить роль продукта метаболизма арахидоновой кислоты, эндоканнабиноида 2-арахидоноилглицерина, который нивелирует воспаление. Ингибирование моноацилглицероллипазы, которая метаболизирует 2-арахидоноилглицерин, способствовало снижению концентрации провоспалительных цитокинов, фосфорилирования тау-белка, нейродегенерации, астроглиоза, что приводило к сохранению когнитивных функций в условиях повторяющихся легких ЧМТ у мышей [143].

Значительное количество средств для терапии нейродегенеративных заболеваний, которые показали положительные результаты при доклинических исследованиях, при переходе к клиническим фазам демонстрируют отсутствие значимого терапевтического эффекта [229,228]. Объяснением данного факта, вероятнее всего является то, что терапия, в частности ХТЭ, назначается, когда патология слишком запущена, при условии развития клинических проявлений спустя несколько лет после травмирования, что не позволяет лекарству-кандидату

достаточно эффективно влиять на течение патологии [74]. К тому же ограничивающим фактором оценки эффективности соединений для терапии ХТЭ является то, что относительно недавно были разработаны адекватные модели ХТЭ, отражающие все нейропатологические особенности данного заболевания [95]. Ключом к успеху поиска средств для терапии ХТЭ является установленная этиология, повторяющиеся ЧМТ [74], вероятно эффективная терапия хронической ЧМТ будет способствовать нивелированию развития отсроченных осложнений, которым и является ХТЭ.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в терапии ЧМТ и отдаленных последствий, выражающиеся в наличии широкого спектра лекарственных средств, обладающих определенной доказательной базой и которые успешно используются при лечении ЧМТ, перечень эффективных, безопасных и экономически выгодных препаратов, оказывающих позитивный эффект в условиях травматического повреждения головного мозга, остается ограниченным, что подтверждается достаточно высоким уровнем смертности и инвалидизации населения вследствие отдаленных последствий ЧМТ [154, 109]. Вышесказанное обосновывает целесообразность поиска новых фармакологически активных соединений, с целью создания лекарственных препаратов для лечения хронической ЧМТ и ее отдаленных последствий.

Исходя из имеющихся классов соединений, необходимое сочетание низкой системной токсичности, высокой терапевтической эффективности и низкой стоимости лечения присуще производным пиримидина [107].

Для производных пиримидина характерен широкий спектр фармакологической активности, включающий в себя: противовоспалительное [35], анальгетическое [202], антиоксидантное [171, 177, 201], эндотелиопротекторное [10], антигипоксическое [36], антиагрегационное [11] действия. Также для производных пиримидина определены антиапоптотические свойства, выражающиеся в виде стабилизации митохондриальной мембраны и уменьшении продукции апоптоз-индуцирующего фактора [183]. Следует отметить, что для соединений, имеющих в своей структуре ядро пиримидина,

характерна общность метаболических путей с эндобиотиками, что нивелирует возможность неблагоприятного лекарственного взаимодействия [130]. Используя метод *in silico*, молекулярный докинг, установлено, что для сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она характерно образование лиганд-ферментного комплекса с β -секретазой-1, ингибирование которой обуславливает церебропротекторное действие. Выполненные исследования моделируемых лигандов с человеческой β -секретазой-1 выявили, что данные соединения связываются с аминокислотами Asp32, Thr72, Thr329. Согласно литературным данным рентгеноструктурного анализа комплексов лиганд-фермент из базы данных The Protein Data Bank, именно эти остатки аминокислот являются значимыми для проявления церебропротекторной активности [1]. Следовательно, учитывая широкий спектр фармакологической активности, также низкую системную токсичность и оптимальный фармакокинетический профиль, производные пиримидина выступают перспективным классом соединений для исследования, с целью создания на их основе средств для терапии отдаленных последствий ЧМТ в виде ХТЭ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные и условия их содержания

Экспериментальная часть исследования выполнена на 450 крысах-самцах линии *Wistar* и 21 мышью-самки линии *Balb/c*. Животные были взяты из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ.

В период проведения исследования животные размещались в стандартных условиях вивария: температура окружающего воздуха составляла $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, при относительной влажности $65\pm 5\%$, естественной смене свето-темнового режима (12 часов день, 12 часов ночь). Манипуляции, выполняемые с животными, а также их содержание соответствовали установленным требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета по защите животных, используемых в научных целях, а также национального стандарта Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

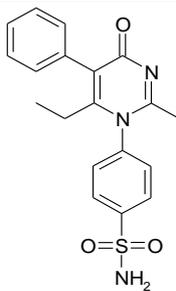
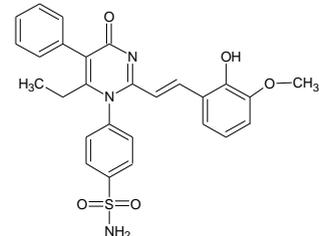
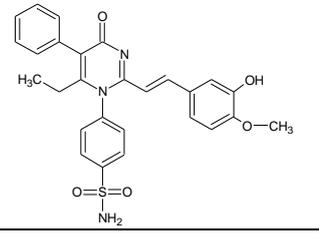
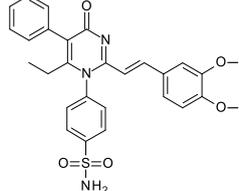
Для размещения крыс были выбраны макролоновые клетки Т-3 со стальными крышками и кормовым углублением. Подстилочным материалом выступали автоклавированные опилки нехвойных пород древесины. Кормление осуществлялось в утренние часы. Вода поступала в стандартных питьевых емкостях (250 мл). Клетки, аксессуары и подстил менялись еженедельно.

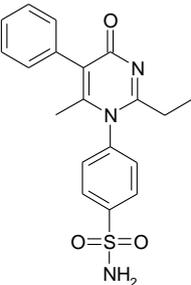
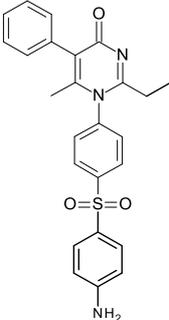
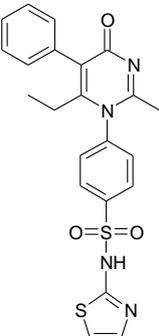
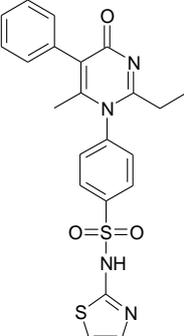
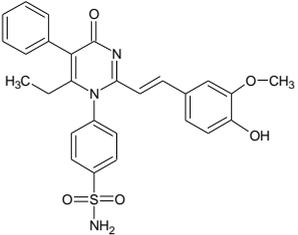
2.2 Исследуемые объекты

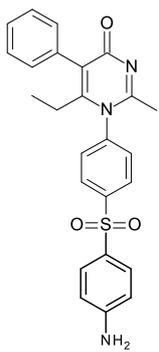
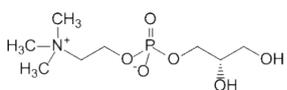
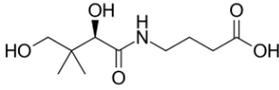
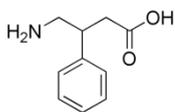
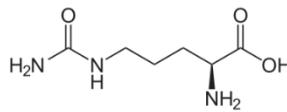
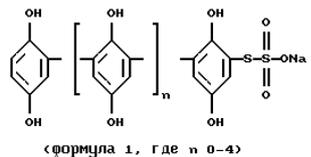
В ходе проведенного исследования было рассмотрено церебропротекторное действие новых сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она в условиях экспериментальной ХТЭ. Изучаемые соединения (Sub1, Sub2, Sub3, Sub4, Sub5, Sub6, Sub7, Sub8, Sub9, Sub10) (табл. 1) синтезированы на кафедре органической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ под руководством профессора, д.ф.н. Кодониди И.П., за что выражаем ему и всем сотрудникам кафедры искреннюю благодарность.

Препаратами сравнения на этапах скрининга выступали: холина альфосцерат («Церепро», Верофарм, РФ), гопантенная кислота («Пантогам», «ПИК-ФАРМА ПРО», РФ); аминифенилмасляная кислота («Фенибут», «ОлайнФарм», Латвия), для углубленного исследования церебропротекторного действия вещества-лидера были использованы также цитруллина малат («Стимол», Biocodex, Франция), полидигидроксифенилентиосульфат натрия («Гипоксен» «Олифен корпорация», Россия) (ПДФТН).

Таблица 1 – Характеристика исследуемых соединений и препаратов сравнения

п/п	Шифр вещества	Молярная масса, г/моль	Структурная формула	Брутто формула	Химическое название
1	Sub1	369		$C_{19}H_{19}N_3O_3S$	4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид
2	Sub2	503		$C_{27}H_{25}N_3O_5S$	4-{2-[2-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бензсульфамид
3	Sub3	503		$C_{27}H_{25}N_3O_5S$	4-{2-[2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бензсульфамид
4	Sub4	489		$C_{26}H_{23}N_3O_5S$	4-{2-[2-(3,4-дигидроксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бензсульфамид

5	Sub5	369		$C_{19}H_{19}N_3O_3S$	4-(6-метил-2-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид
6	Sub6	445		$C_{25}H_{23}N_3O_3S$	1-[4-(4-аминобензсульфонил)-фенил]-6-метил-2-этил-5-фенил-1Н-пиримидин-4-он
7	Sub7	452		$C_{22}H_{20}N_4O_3S_2$	4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-N-тиазол-2-ил-бензсульфамид
8	Sub8	452		$C_{22}H_{20}N_4O_3S_2$	4-(6-метил-2-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-N-тиазол-2-ил-бензсульфамид
9	Sub9	503		$C_{27}H_{25}N_3O_5S$	4-{2-[2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бензсульфамид

10	Sub10	445		$C_{25}H_{23}N_3O_3S$	1-[4-(4-аминобензсульфонил)-фенил]-2-метил-6-этил-5-фенил-1H-пиримидин-4-он
Препараты сравнения					
11	Церебро	257,2		$C_8H_{20}NO_6P$	холина гидроксида (R)-2,3-дигидроксипропилгидрофосфат
12	Пантогам	233		$C_{10}H_{19}NO_5$	(R)-4-(2,4-дигидрокси-3,3-диметил-1-оксобутил)аминобутановая кислота
13	Фенибут	179,2		$C_{10}H_{13}NO_2$	4-амино-3-фенилбутановая кислота
14	Стимол	175,2		$C_6H_{13}N_3O_3$	2-амино-5-(карбамоиламино)пентановая кислота
15	Гипоксен				полидигидроксифенилент иосульфонат натрия

При выполнении фармакологического скрининга изучаемые соединения вводились *per os* в форме водной суспензии в дозе 100 мг/кг (на основании

данных, полученных в ходе предварительных исследований), на протяжении семи дней, спустя 30 мин после моделирования травмы. Препараты сравнения вводили по вышеописанному алгоритму также перорально: холина альфосцерат в дозе 100 мг/кг; гопантевая кислота - 100 мг/кг; аминифенилмасляная кислота - 25 мг/кг, цитруллин малат – 25 мг/кг, ПДФТН – 25 мг/кг [34,38,29]. На этапе углубленного изучения церебропротекторной активности препараты сравнения вводили в вышеназванных дозах, соединение-лидер – 100 мг/кг. При оценке отсроченного эффекта референтные препараты и соединение-лидер вводили в течение всего периода моделирования (7 дней) с последующей экспозицией без фармакологической поддержки. В ходе изучения воздействия на течение ХТЭ в модели «Blast wave» препараты сравнения и соединение-лидер вводили спустя 30 минут после воздействия однократно.

2.3 Алгоритм проведения исследования

1. Выполнение фармакологического скрининга для выбора соединения с наиболее выраженным фармакологическим эффектом из ряда исследуемых веществ.
2. Определение токсичности и зависимости «доза-эффект» соединения-лидера.
3. Детальное изучение соединения-лидера на предмет наличия церебропротекторной активности в условиях экспериментальной ХТЭ (изучение отсроченного влияния на уровень когнитивных функций, биохимические процессы нейронов, концентрацию цереброспецифичных маркеров). Исследование воздействия вещества-лидера на течение модельной ХТЭ, вызванной другим повреждающим фактором.
4. Изучение потенциальных механизмов действия соединения-лидера.

2.4 Дизайн исследования

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.





Рисунок 2 – Дизайн исследования

В ходе выполнения работы формировали группы животных по 10 особей в каждой. Выделяли следующие группы: положительного контроля (ПК) – с крысами данной группы выполнялись все экспериментальные манипуляции за исключением моделирования патологии и введения фармакологической поддержки; негативного контроля (НК) – животные подвергались моделированию ХТЭ, в качестве поддержки вводили эквивалентное количество дистиллированной воды; также выделяли группы крыс, которым моделировали патологию и вводили препараты сравнения и исследуемые соединения.

2.5 Модели ХТЭ

2.5.1 Модель механического воздействия

ХТЭ воспроизводили путем механического воздействия груза в установке, состоящей из полого вертикального цилиндра и площадки, для фиксации животного, при свободном падении с высоты 50 см, массой 150г на теменно-затылочную область черепной коробки крыс в течение семи дней (однократное травматическое воздействие в сутки). Для предотвращения перелома челюсти голова животного была помещена на мягкой подкладке. Фиксация крыс и строго направленное движение груза в полости цилиндра исключало попадание за пределы заданной области [24,206,218].

2.5.2 Модель «Blast wave»

ХТЭ моделировали посредством воздействия ударной волны сжатого газа. Экспериментальная установка состояла из трубы (длина 5,3 м, диаметр 25 см), баллона со сжатым газом. Для воспроизведения травмы, аналогичной человеческой при воздействии ударной волны, животных, предварительно наркотизированных (хлоралгидрат, 350 мг/кг, внутрибрюшинно), иммобилизовали держателем из проволочной сетки, на подвижной площадке при сохранении подвижности шеи и головы во всех плоскостях. Крыс размещали внутри трубы, на расстоянии 4,74 м от места подачи сжатого газа. Давление, создаваемое при этом, было равно $3,0 \pm 0,1$ атм. Крысы подвергались однократному воздействию ударной волны [90].

2.6 Методы оценки когнитивных функций

2.6.1 Тест «экстраполяционное избавление» (ТЭИ)

Тестирование проводили по общепризнанной методике в установке, которая представляет собой емкость, цилиндрической формы (диаметр 35 см, высота 40 см), наполненную водой, имеющую температуру 22°C на глубине 17,5 см от дна. По центру установки закреплен прозрачный стеклянный цилиндр, имеющий диаметр 9 см, высоту 22 см. Нижний край данного цилиндра погружен в воду на глубину 2,5 см. Внутри цилиндра размещают животное, хвостом вниз, и

фиксируют поведение в течение 120 сек. Исследуемыми показателями явились число безуспешных попыток избегания, выражающихся в виде прыжков, и латентный период подныривания [6].

2.6.2 Тест «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ)

Исследование проводили в установке, состоящей из двух отсеков: освещенного и темного, в котором размещен электродный пол, с силой тока 0,3–0,6 мА. Предварительно животных обучали следующим образом, крыс помещали на освещенную платформу, из-за развитого у грызунов норкового рефлекса, она переходила в темную камеру, где получала электроболевое раздражение через электродный пол и покидала данную зону. Проверку сохранения УРПИ (воспроизведение рефлекса) осуществляли путем повторного помещения животного в светлую камеру через 24 ч. Регистрируемыми параметрами выступали: количество заходов в темный отсек, латентное время первого захода в темный отсек камеры, где ранее животное получало болевое воздействие током, и время, проведенное в светлом и темном отсеках в течение 120 сек [20].

2.7 Метод оценки сенсомоторных функций

«Beam walking test»

Эксперимент был выполнен в установке, состоящей из приподнятой горизонтальной планки длиной 165 см, на конце которой закреплена темная камера. На начале дорожки расположена «стартовая» (15x6 см) площадка. Промежуток, между этой площадкой и темной камерой, представляет собой равномерно сужающуюся планку, от 6 см вначале до 1,5 см в конце длиной 135 см. По всей длине дорожки, на 2 см ниже плоскости ее уровня, по обеим сторонам расположены выступы, шириной 2 см, на которые животные ставят конечности при сенсомоторных нарушениях. Эксперименту предшествовало обучение, проводимое в течение двух дней, заключающееся в приспособлении животного перемещаться по установке. Сначала крыс располагают на дорожке на расстоянии 10-15 см от темной камеры. В последующем эту дистанцию повышают до $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ длины всей планки. В день эксперимента животное помещают в начало дорожки.

Длительность теста составляла 120 сек. Регистрируемыми параметрами выступали количество постановок на выступления, то есть на нижнюю часть доски (ошибки), и число постановок, когда кисть и стопа расположены на обоих уровнях (полуошибки), общее число пройденных шагов до захода в темный отсек или в течение периода эксперимента.

Уровень сенсомоторного дефицита (СД) рассчитывали по формуле:

$$\text{СД, \%} = \frac{\text{Количество ошибок} * 1 + \text{количество полуошибок} * 0,5}{\text{Общее количество шагов}} \times 100 \text{ [197].}$$

2.8 Метод оценки уровня неврологического дефицита

При исследовании степени развития неврологического дефицита в условиях экспериментальной травмы мозга была использована шкала *mNSS* – (*modified neurological severity score*) – дифференциальная система оценки неврологической симптоматики. Данная система позволяет судить об уровне неврологического дефицита по сумме баллов (табл. 2). Интервал сумм 1-6 свидетельствует о наличии травмы легкой степени тяжести, 7-12 - травмы средней тяжести, 13-18 характерно тяжелой травме [49].

Таблица 2 - Психометрическая шкала оценки неврологического дефицита *mNSS*.

Локомоторные тесты (поднятие животного за хвост)	Балл
Сгибание передних конечностей	1
Сгибание задних конечностей	1
Движение головой более чем на 10° к вертикальной оси не позднее 30 секунд	2
Тест «Походка» (помещение животного на стол)	
Нормальная походка	0
Невозможность идти прямо	1
Кружение в стороны	2
Падение со стола	3
Тест «Стержень»	
Устойчивый баланс на стержне	0
Падение одной передней конечности	1
Падение двух передних конечностей	2
Полное падение	3
Рефлекс-тесты	
Потеря рефлекса Пинны (дрожание головы при касании слухового прохода)	1
Потеря роговичного рефлекса	1

2.9 Метод определения «острой» токсичности

Исследование показателя острая токсичность было произведено с помощью метода «Up and Down», параметры данного определения представлены в Руководстве по оценке пероральной токсичности химических соединений №425 Организации экономического сотрудничества и развития.

Для эксперимента животные отбирались случайным образом, массой 25-27г. Мыши маркировались с целью индивидуальной идентификации и содержались в течение не менее 5 дней, для акклиматизации животных к лабораторным условиям, до введения исследуемого соединения. Изучаемое вещество вводили через атравматичный желудочный зонд. Мыши были лишены пищи до введения исследуемого вещества в течение 4 часов.

Учитывая методику исследования, эксперимент был выполнен в 2 этапа. Первый этап заключался в проведении теста «предельной вводимой дозы» на 5000 мг/кг.

Второй этап состоял из введения доз в прогрессии 3,2 раза. Введение исследуемого соединения-лидера до достижения установленной дозы производили дробно с интервалом времени, который составлял 1 час. Если животное выживало после введенной дозировки, доза для следующей мыши увеличивалась в 3,2 раза от первоначальной, если оно умирает, уменьшалась на аналогичный коэффициент.

За животными наблюдали один раз в 30 минут в течение первых 24 часов (с особым вниманием в течение первых 4 часов) и после этого ежедневно на протяжении 14 дней. Все изменения систематически регистрировались с ведением отдельных записей для каждого животного. Фиксировалось общее состояние мышей: особенности их поведения; интенсивность и характер двигательной активности; наличие и характер судорог; координация движений; тонус скелетных мышц; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители; частота и глубина дыхательных движений; состояние волосяного и кожного покрова; положение хвоста; количество и консистенция фекальных масс; частота мочеиспускания и окраска мочи [112].

2.10 Биологические материалы и пробоподготовка

В качестве биологического материала были использованы мозг и кровь животных. Пробоподготовка последней заключалась в получении сыворотки (с последующим определением в ней биохимических показателей; маркеров нейродеградации: GFAP, S100B, NSE) посредством центрифугирования свежей крови в течение 15 минут в режиме 1000g. Также выделяли плазму с целью установления параметров агрегационной активности и плазменного гемостаза при помощи методики, заключающейся в центрифугировании крови с добавлением антикоагулянта (цитрат натрия, соотношение кровь-антикоагулянт 1:9) в течение 15 минут в режиме 1000g [32]. Пробоподготовка мозга заключалась в получении супернатанта гомогената головного мозга. Гомогенат был приготовлен посредством измельчения мозга в механическом гомогенизаторе Поттера (среда: 1 ммоль ЭДТА, 215 ммоль маннита, 75 ммоль сахарозы, 0,1% раствор БСА, 20 ммоль HEPES, с pH 7,2, при соотношении 1 мл на 20-30г мозга). Полученную суспензию гомогената центрифугировали на протяжении 10 минут в режиме 6000g с целью определения в супернатанте маркеров нейродеградации (фосфорилированный тау-белок и A β), ТБК-активных продуктов, активности ферментов антиоксидантной защиты, уровня AIF. Также для углубленного изучения церебропротекторной активности получали отдельный гомогенат (по описанному выше алгоритму) коры больших полушарий и гиппокампа, с последующим определением маркеров нейродеградации. Для оценки функций митохондрий из гомогената, полученному по вышеописанному алгоритму, готовили митохондриальную фракцию, путем градиентного центрифугирования в растворе перколла. Первичный гомогенат центрифугировали при ускорении 1100g на протяжении 2-х минут. Полученный супернатант переносили в пробирки Эппендорф и наслаивали 10%-раствор перколла. Полученную смесь повторно центрифугировали при ускорении 18000g в течение 10 минут. Декантант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующего буфера и центрифугировали в течение 5 минут при 10000g с получением митохондриальной фракции [17,165].

2.11 Методы оценки изменения биохимических показателей

2.11.1 Методика определения лактата, пировиноградной кислоты

Определение содержания лактата, пировиноградной кислоты в сыворотке крови проводили энзиматическим колориметрическим методом с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+». Ход исследования определялся инструкцией к набору реактивов.

2.11.2 Методика определения гомоцистеина

Содержание гомоцистеина оценивали в сыворотке крови методом циклической энзиматической реакции. Принцип анализа основан на регистрации убыли НАДН, образующегося в ходе аденозиндезаминазо-глутаматдегидрогеназной реакции, запускаемой окислением гомоцистеина. Среда инкубации содержала: S-аденозилметионин 0,1 ммоль/л, НАДН 0,2 ммоль/л, ТСЕР 0,5 ммоль/л, 2-оксоглутарат 5 ммоль/л, Глутаматдегидрогеназа 10 кЕд/л, САН-гидролаза 3 кЕд/л, Аденозиндезаминаза 5 кЕд/л, Гомоцистеинметилтрансфераза 5 кЕд/л.

Оптическую плотность смеси регистрировали при 340 нм. Концентрацию гомоцистеина рассчитывали по кривой зависимости «оптическая плотность-концентрация» для стандартного образца гомоцистеина (DiaSyS).

2.11.3 Метод иммуноферментного исследования

Используя метод твердофазного иммуноферментного анализа, определяли содержание маркеров нейродеградации и главного эффектора апоптоза АIF. Исследование было выполнено с использованием видоспецифичных наборов реактивов производства компании *Cloud Clone Corp.* (США). Алгоритм определения соответствовал инструкции, прилагаемой производителем, к набору реактивов. Считывание результатов производили на микропланшетном ридере InfiniteF50 (Tecan, Австрия).

2.11.4 Методика оценки содержания ТБК-активных продуктов

Содержание ТБК-активных продуктов определяли в супернатанте гомогената с помощью метода УФ-спектрофотометрии, по реакции конденсации с 2-тиобарбитуровой кислотой, результатом которой является окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 532 нм. Степень окраски раствора прямо пропорциональна концентрации ТБК-активных продуктов. Уровень содержания последних рассчитывали по значению молярного коэффициента экстинкции малонового диальдегида (МДА) ($1,56 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), полученные результаты отражали в нмоль/мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [37].

2.11.5 Методика оценки активности супероксиддисмутазы

Степень активности супероксиддисмутазы (СОД) изучали в супернатанте гомогената головного мозга ксантин-ксантинооксидазным методом, который основан на дисмутации супероксидного радикала, образующегося в ходе окисления ксантина и восстановления 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорида. Среда инкубации состояла из: ксантин 0,05 ммоль/л, 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорид 0,025 ммоль/л, ЭДТА 0,94 ммоль/л, ксантинооксидаза 80 Ед/л, CAPS – 40 ммоль/л. Значение оптической плотности смеси определяли при длине волны 505 нм. Уровень активности фермента устанавливали в ед. акт/мг. Содержание белка определяли, используя метод Лоури [226].

2.11.6 Методика оценки активности глутатионпероксидазы

Уровень активности глутатионпероксидазы (ГП) оценивали в супернатанте гомогената головного мозга в сопряженной глутатионредуктазной реакции по степени убыли никотинамидадениндинуклеотидфосфата восстановленного (НАДФН). Среда инкубации содержала: 1 ммоль/л ЭДТА, 50мМ К,Na-фосфатный буфера, рН 7,4, 1 ед. акт/мл глутатиоредуктазы, 20 ммоль/л НАДФН, 1 ммоль/л GSH, 30-60 мкг белка на 1 мл среды. Оптическую плотность смеси определяли на КФК-3 при длине волны 340 нм. Реакции предшествовало

добавление субстрата (гидропероксид кумола – 1,5 ммоль/л), анализ проводили при температуре окружающего воздуха 25°С. Активность фермента выражали в ед. акт/мг белка. Содержание белка устанавливали по методу Лоури [178].

2.11.7 Оценка активности глутатионредуктазы

Метод основан на реакции, при которой глутатионредуктаза (ГР) катализирует восстановление глутатиона в присутствии НАДФН, снижение концентрации последнего фиксируется спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Уровень активности изучаемого фермента анализировали в супернатанте головного мозга. Среда инкубации включала в себя: калий-фосфатный буфер рН 7.3 – 250 ммоль/л, ЭДТА – 0,5 ммоль/л, GSSG – 2,2 ммоль/л, НАДФН – 0,17 ммоль/л. Оптическую плотность реакционной смеси определяли при длине волны 340 нм, активность фермента выражали в ед. акт/мг. Концентрацию белка устанавливали по методу Лоури [134].

2.12 Методы оценки эндотелиальных функций сосудов головного мозга

2.12.1 Методы оценки антитромботической функции

Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводили с помощью агрегометра «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», РФ), методом G. Born в модификации Габбасова [26,73]. Для анализа в измерительную кювету прибора помещали 0,3 мл плазмы, термостатировали на протяжении 3-х минут при температуре 37 °С. После инкубации приливали индуктор агрегации - АДФ в конечной концентрации 5 мкМ (производства НПО «РЕНАМ», набор «АГРЕНАМ», серия:1115). Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали на протяжении пяти минут. Исходя из результатов агрегатограмм, устанавливали степень и скорость агрегации кровяных пластинок. При интерпретации данных был использован поправочный коэффициент равный 0,1.

2.12.2 Методы оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов и уровня церебрального кровотока

Уровень церебрального кровотока измеряли на ультразвуковом доплерографе с датчиком с частотой 25МГц (УЗОП-010-01) и программным комплексом «MinimaxDoppler» (1.7.), производства компании «Минимакс» (Санкт–Петербург, Россия). Исследование мозговой гемодинамики осуществляли в теменной области головного мозга крыс в проекции средней мозговой артерии. Для этого высверливали бором трепанационное отверстие, осуществляя охлаждение поверхности изотоническим раствором натрия хлорида. Гель «Униагель» выступал в качестве контактной среды.

Степень изменения вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга исследовали, изучая скорость мозгового кровотока (СМК) на фоне введения модификаторов синтеза NO. Для изменения уровня выделения эндотелиального релаксирующего фактора были использованы: ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия: A11040712), L-аргинин в дозе 150 мг/кг (Panreac, серия: 143464.1208), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 15 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия: 1413116). Эндотелий-независимую вазодилатацию исследовали по степени реакции сосудов при введении нитроглицерина (Биомед, Россия, серия: 300215) 0,007 мг/кг. Последующая инстилляционная анализатора выполнялась после нормализации уровня мозгового кровотока [41].

2.13 Анализ коагуляционного звена гемостаза

Степень воздействия изучаемых веществ на коагуляционный компонент гемостаза исследовали с помощью системы анализатора гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701». Устанавливали такие показатели как, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, серия:1913), тромбиновое время (ТВ, серия:3915), концентрация фибриногена (серия:3815), активность системы протеина С. Последнюю определяли посредством активации эндогенного протеина С воздействием фракции яда щитомордника (*Agkistrodon contortrix*

contortrix), что приводило к увеличению периода времени свертывания плазмы в тесте АЧТВ. При проведении анализа на установление активности определяли следующие показатели: АЧТВ плазмы-калибратора без активатора, АЧТВ плазмы-калибратора с активатором, АЧТВ исследуемой плазмы без активатора, АЧТВ исследуемой плазмы с активатором. Результаты определения активности системы протеина С принято выражать в виде Нормализованного отношения (НО), расчет которого производили по формуле

$$\text{НО} = \frac{\left(\frac{\text{АЧТВ}_{\text{актив}}}{\text{АЧТВ}}\right)_{\text{больн}}}{(\text{АЧТВ}_{\text{актив}} / \text{АЧТВ})_{\text{калиб}}} \times \text{НО}_{\text{калибр}}$$

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

При калибровке прибора и проведении эксперимента применялась калибровочная плазма НПО «РЕНАМ». Лиофилизированные реактивы хранились согласно инструкции производителя и готовились *ex tempore*. Все исследования были выполнены на бедной тромбоцитами плазме. Алгоритм определения соответствовал инструкции производителя.

2.14 Метод оценки функций митохондрий

Степень дыхательной функции митохондрий оценивали с помощью метода респирометрии с применением системы лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, РФ). В ходе анализа был использован протокол SEAHORSE, исходя из которого, респирометрическую активность митохондрий оценивали по уровню сдвига поглощения кислорода в среде при применении разобщителей митохондриального дыхания. В роли последних были выбраны: олигомицин – 1 мкг/мл, 4-(трифлуорометокси)фенилгидразоно) малонитрил (FCCP) – 1 мМ. Субстратом окисления выступала глюкоза – 15 ммоль. Исследовали АТФ-генерирующую способность (по степени отличия потребления кислорода на фоне добавления FCCP и олигомицина).

Также определяли интенсивность гликолиза (по разнице поглощения кислорода на фоне введения глюкозы и введения олигомицина). При

исследовании объем биообразца был равен 275 μ л, применяемых анализаторов – 25 μ л. Потребление кислорода определяли в ppm [159,27].

2.15 Методы статистической обработки результатов эксперимента

Результаты проведенных экспериментов статистически анализировали с применением комплекта программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Рассчитаны средние значения и стандартная ошибка среднего, показатели выражали в виде $M \pm m$. Полученные данные исследовали на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае подчинения данных закону нормального распределения для сравнения групп средних применяли параметрические методы - ANOVA с пост-обработкой Ньюмена-Кейсла, в противном случае прибегали к использованию методов непараметрической статистики (критерий Краскелла-Уоллиса) [14].

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА УРОВЕНЬ КОГНИТИВНЫХ, СЕНСОМОТОРНЫХ ФУНКЦИЙ И ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ (ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ)

Исходя из данных литературных источников, клинические проявления исследуемого заболевания выражаются в форме когнитивных и сенсомоторных дисфункций. Развитию последних способствуют патологические изменения в головном мозге, в виде нарушений церебральной гемодинамики, метаболических расстройств, приводящих, в свою очередь, к накоплению биохимических маркеров нейродеградации [211].

Данная серия экспериментов была посвящена фармакологическому скринингу в ряду новых сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она, целью которого выступало определение церебропротекторной активности в условиях экспериментальной ХТЭ.

Исследование проводилось путем определения влияния изучаемых соединений и препаратов сравнения на когнитивные и сенсомоторные функции крыс, а также на изменение концентраций биохимических показателей (лактат, пировиноградная кислота, гомоцистеин), специфических маркеров повреждения мозга (GFAP, A β , S-100B, NSE) в условиях экспериментальной ХТЭ.

3.1 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на когнитивные функции крыс в тесте ТЭИ в условиях экспериментальной ХТЭ

В ходе исследования установлено, что у группы крыс ПК период выполнения задачи в тесте ТЭИ, время «избегания», составил 17,8 с, что соответствует данным литературы (рис. 3) [40]. Исследуемый показатель у животных группы НК увеличился на 134,8% ($p < 0,05$), что достоверно отличается от аналогичного значения группы крыс ПК. У животных группы, которой вводили в качестве фармакологической поддержки препарат сравнения холина

альфосцерат, период выполнения задачи был сокращен на 70,6% ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК. При применении гопантеновой кислоты и аминифенилмасляной кислоты наблюдалось уменьшение времени «подныривания» животных на 68,3% ($p < 0,05$) и 39,3% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой крыс НК.

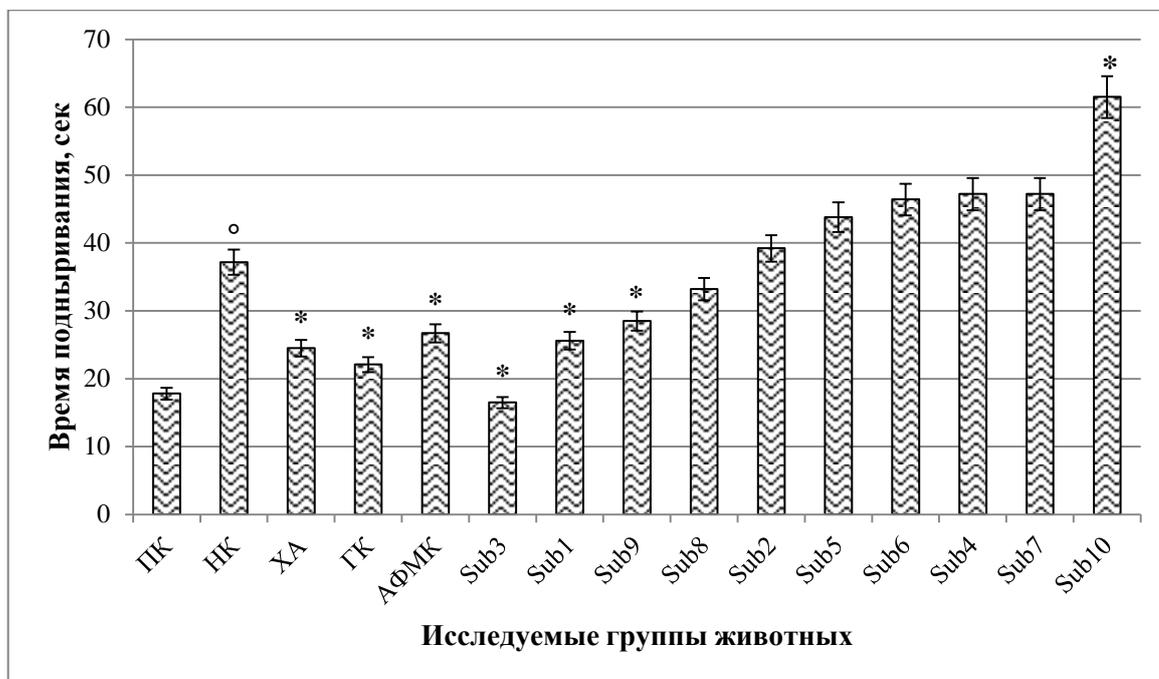


Рисунок 3 – Оценка когнитивных функций исследуемых групп крыс в тесте ТЭИ в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

ПК - группа крыс положительного контроля; НК - животные группы негативного контроля; ХА – группа крыс, которым вводили холина альфосцерат; ГК – группа животных, получавшая гопантеновую кислоту; АФМК – крысы группы, которым вводили аминифенилмасляную кислоту; Sub1 – группа животных, которая получала соединение № 1; Sub2 – группа крыс, которым вводили соединение № 2; Sub3 – группа животных, получавшая соединение № 3; Sub4 – группа крыс, которым вводили соединение № 4; Sub5 – группа животных, получавших соединение № 5; Sub6 – группа крыс, которым вводили соединение № 6; Sub7 – группа животных, получавшая соединение № 7; Sub8 – группа крыс, которым вводили соединение № 8; Sub9 – группа животных, получавшая соединение № 9; Sub10 – группа крыс, которым вводили соединение № 10.

При введении соединения, под лабораторным шифром Sub3, наблюдалось уменьшение необходимого для принятия решения времени по отношению к аналогичному показателю у группы крыс НК на 142,7% ($p < 0,05$). На фоне применения веществ Sub1 и Sub9 было отмечено снижение периода «избегания»

на 63,3% ($p < 0,05$) и 46,6% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы животных НК. Введение соединения Sub8 способствовало уменьшению количества времени, необходимого для принятия решения по сравнению с группой крыс НК на 26,2%. При применении веществ под шифрами Sub2, Sub5, Sub6, Sub4, Sub7, Sub10 было установлено, что время «избегания» достоверно не отличалось от соответствующего показателя группы животных НК.

3.2 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на когнитивные функции крыс в тесте УРПИ в условиях экспериментальной ХТЭ

По результатам теста УРПИ отмечено, что у крыс группы ПК период времени латентного захода в темный отсек составил 33 с (табл. 3). У группы животных НК данный показатель снизился на 66,9% ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК, что свидетельствует о развитии когнитивного дефицита [9].

У животных групп, получавших в качестве фармакологической поддержки холина альфосцерат, гопантеную кислоту и аминоксалициловую кислоту наблюдалось увеличение времени латентного захода в 2,8 ($p < 0,05$), 3,8 ($p < 0,05$) и 4,2 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК. Вещества под шифрами Sub1, Sub8 и Sub6 оказали благоприятное воздействие на когнитивные функции животных, в виде увеличения периода времени до захода в темный отсек в 3,2 ($p < 0,05$), 6,1 ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с показателем группы крыс НК. Применение соединения Sub2 позволило отсрочить время захода на 84,9% ($p < 0,05$) относительно животных группы НК. На фоне введения веществ под шифрами Sub4 и Sub10 было установлено увеличение периода до захода в темный отсек по сравнению со значением группы крыс НК на 66,1% ($p < 0,05$) и 55,7% ($p < 0,05$) соответственно. При применении соединений Sub3 и Sub5 наблюдалось увеличение времени латентного захода на 27,4% и 23,6%, соответственно относительно аналогичного показателя группы животных НК.

Исследуемые вещества Sub7 и Sub9 не оказали достоверно значимого воздействия на изменение изучаемого параметра по сравнению с крысами группы НК.

Таблица 3 – Оценка когнитивных функций исследуемых групп животных в тесте УРПИ в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции

Показатель	Количество заходов (M±m)	Время первого захода, с (M±m)	Время в светлом отсеке, с (M±m)
ПК	1,0±0,0	33,0±3,6	117,3±0,6
НК	1,2±0,5	11,0±2,1 [°]	117,0±1,4
ХА	1,5±0,5	30,0±2,6*	116,0±0,0
ГК	1,0±0,0	40,0±3,7*	118,4±3,9
АФМК	1,0±0,0	45,0±4,1*	117,3±5,9
Sub1	1,0±0,7	35,2±3,4*	117,9±3,1
Sub8	1,4±0,2	65,0±3,6*	117,2±0,4
Sub6	1,6±0,4	34,0±2,5*	115,6±1,1
Sub2	1,0±0,3	20,0±1,9*	116,4±1,7
Sub4	2,0±0,4	18,0±2,0*	111,8±3,5
Sub10	1,0±1,0	16,0±1,7*	118,0±2
Sub3	0,8±0,2	14,0±2,0	118,5±0,5
Sub5	1,4±0,5	13,0±1,3	117,2±1,0
Sub7	0,6±0,4	12,0±1,4	118,8±0,8
Sub9	0,6±0,2	10,0±1,3	118,6±0,6

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - p<0,05), относительно крыс НК группы (* - p<0,05).

Условные обозначения соответствуют рисунку №3.

3.3 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень сенсомоторных функций крыс в тесте «Beam walking test» в условиях экспериментальной ХТЭ

Следующий тест «Beam walking test» позволил оценить уровень СД у животных. По результатам исследования установлено, что значение данного показателя у группы крыс ПК составило 10,0±0,25% (рис. 4). В то время как у животных группы НК уровень СД достоверно увеличился в 5,8 раза (p<0,05) относительно группы крыс ПК. Введение препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты позволило снизить исследуемый показатель относительно животных группы НК на 131,4% (p<0,05) и 15,9% (p<0,05)

соответственно. При применении аминофенилмасляной кислоты было отмечено отсутствие достоверно значимого изменения уровня СД по сравнению с группой крыс НК.

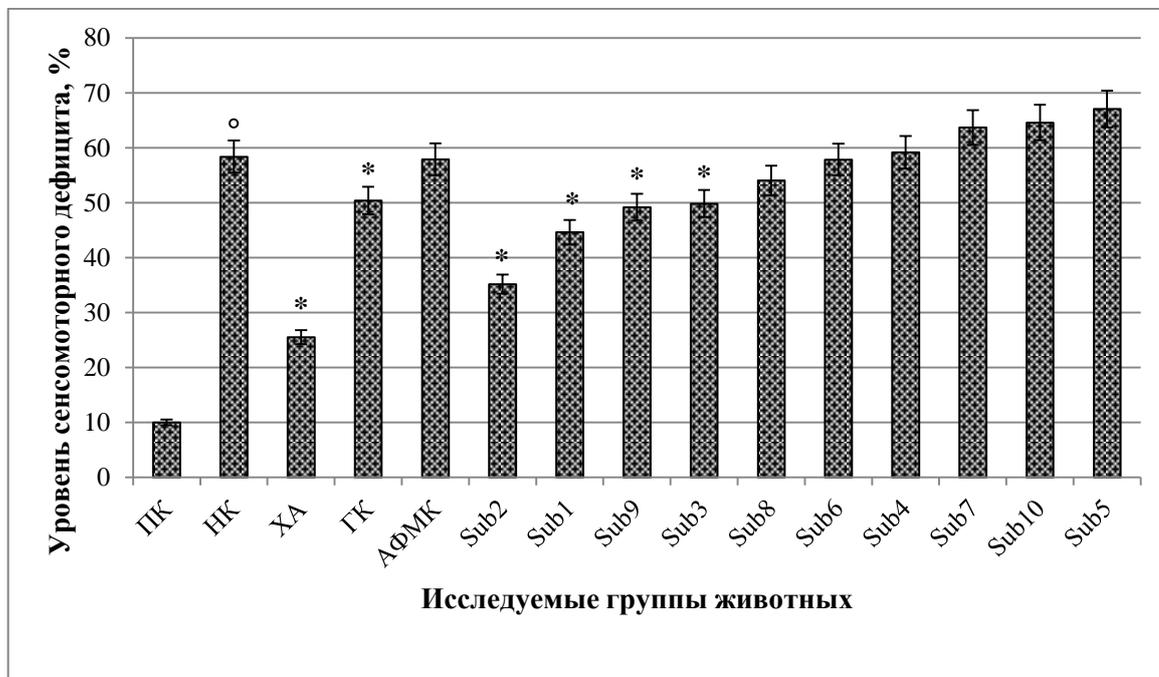


Рисунок 4 – Уровень сенсомоторного дефицита у исследуемых групп крыс, установленный с помощью теста «Beam walking test» в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку №3.

Введение крысам соединений под шифрами Sub2 и Sub1 позволило уменьшить уровень СД на 67,1% ($p < 0,05$) и 34,9% ($p < 0,05$) относительно животных группы НК. На фоне применения веществ Sub9 и Sub3 наблюдалось снижение изучаемого параметра по сравнению с группой крыс НК на 21,4% ($p < 0,05$) и 18,5% ($p < 0,05$). При введении животным соединений Sub10, Sub5, Sub6, Sub8, Sub7, Sub4 не было установлено достоверно отличающегося от крыс группы НК уровня СД.

3.4 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию некоторых биохимических показателей в условиях экспериментальной ХТЭ

ЧМТ, с последующим развитием ХТЭ, вызывает патологические изменения метаболизма головного мозга. Отмечается повышенное образование лактата, гомоцистеина и снижение секреции пировиноградной кислоты. Прогрессирование патобиохимических изменений приводит к кумулятивному повреждению клеток головного мозга, с последующим формированием когнитивного и сенсомоторного дефицитов [9].

Первым было определено содержание лактата в сыворотке крови, чрезмерное образование последнего характеризует развитие лактоацидоза, который, в свою очередь, свидетельствует о нарастающем уровне энергодефицита [9]. Изучаемый показатель у группы крыс ПК составил $1,01 \pm 0,083$ ммоль/л (рис. 5), что соответствует результатам ранее проведенных исследований. Отмечено изменение уровня лактата у группы животных НК, в виде достоверного повышения секреции в 4,4 раза ($p < 0,05$), что достоверно отличается от аналогичного показателя крыс группы ПК. Данный факт свидетельствует о том, что модельная ХТЭ вызывает нарушение метаболических функций тканей головного мозга в виде развития лактоацидоза [21]. Введение препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминоксиды привело к нормализации процессов метаболизма, что выражалось в уменьшении продукции лактата по сравнению с группой крыс НК на 74,7% ($p < 0,05$), 56,2% ($p < 0,05$) и 34,2% ($p < 0,05$) соответственно. На фоне применения исследуемых соединений под шифрами Sub1, Sub3, Sub10 наблюдалось снижение концентрации лактата на 110,5% ($p < 0,05$), 62,5% ($p < 0,05$) и 61,3% ($p < 0,05$), соответственно относительно группы животных НК.



Рисунок 5 – Изменение концентрации лактата в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

Введение животным веществ Sub6 и Sub2 позволило уменьшить содержание лактата на 57,9% ($p < 0,05$) и 52,4% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с аналогичным значением группы крыс НК. При применении соединений под шифрами Sub4, Sub8 наблюдалось снижение концентрации лактата на 47,4% ($p < 0,05$) и 44,4% ($p < 0,05$) относительно животных группы НК. На фоне введения веществ Sub9, Sub5, Sub7 было отмечено уменьшение содержания лактата по сравнению с группой крыс НК на 40,3% ($p < 0,05$), 29,1% ($p < 0,05$) и 25,9% ($p < 0,05$) соответственно.

Следующим исследуемым показателем стал уровень пировиноградной кислоты в сыворотке крови, патологическое снижение образования которой также свидетельствует о нарастающем уровне энергодефицита [21]. У группы животных ПК значение данного показателя составило $100,85 \pm 1,165$ мкмоль/л (рис. 6), что соответствует данным ранее проведенных исследований [52]. Было отмечено изменение содержания пировиноградной кислоты, в виде уменьшения

концентрации у группы крыс НК в 4,9 раза ($p < 0,05$), что достоверно отличается от значений показателя животных группы ПК. Данный факт свидетельствует о нарушении метаболизма головного мозга в условиях смоделированной ХТЭ [52]. На фоне применения препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантенной кислоты, аминифенилмасляной кислоты наблюдалось повышение содержания пировиноградной кислоты относительно крыс группы НК на 73,1% ($p < 0,05$), 132,6% ($p < 0,05$) и 12,1% соответственно. При введении животным исследуемых соединений, под лабораторными шифрами Sub3, Sub9, Sub1 отмечено увеличение концентрации пировиноградной кислоты в 6,2 ($p < 0,05$), 3,0 ($p < 0,05$) и 2,3 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой животных НК.



Рисунок 6 – Изменение концентрации пировиноградной кислоты в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

Применение веществ Sub6, Sub8, Sub7 способствовало повышению содержания пировиноградной кислоты, по отношению к аналогичному значению животных группы НК, на 102,4% ($p < 0,05$), 83,7% ($p < 0,05$) и 71,9% ($p < 0,05$),

соответственно. На фоне введения соединений Sub2 и Sub10 было отмечено увеличение концентрации исследуемого параметра относительно крыс НК группы на 31,1% ($p < 0,05$) и 20,9% ($p < 0,05$). При применении веществ Sub4 и Sub5 не наблюдалось достоверно значимого изменения уровня содержания пировиноградной кислоты, по отношению к группе животных НК.

Еще одним биохимическим показателем выступил уровень гомоцистеина. Как известно, повышенная концентрация данной аминокислоты в сыворотке крови наблюдается при различных нейродегенеративных заболеваниях. Чрезмерное образование гомоцистеина, то есть нарушение его метаболизма, потенцирует его цитотоксическое и ангиодеструктивное действие, поэтому исследование данного показателя является важным при изучении ХТЭ [42]. У группы животных ПК уровень гомоцистеина составил $10,34 \pm 0,591$ нг/мл (рис. 7), что подтверждается ранее проведенными исследованиями [52]. Было установлено, что концентрация исследуемой аминокислоты у крыс группы НК увеличилась в 4,1 раза ($p < 0,05$), что достоверно отличается от значения группы животных ПК. При применении препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминофенилмасляной кислоты наблюдалось снижение уровня гомоцистеина по сравнению с группой крыс НК, на 87,5 % ($p < 0,05$), 190,0 % ($p < 0,05$) и 62,5 % ($p < 0,05$) соответственно. На фоне введения животным исследуемых соединений под лабораторными шифрами Sub8, Sub5, Sub4 было отмечено уменьшение концентрации гомоцистеина в 13,5 раз ($p < 0,05$), 11,6 ($p < 0,05$) и 7,7 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно крыс группы НК.

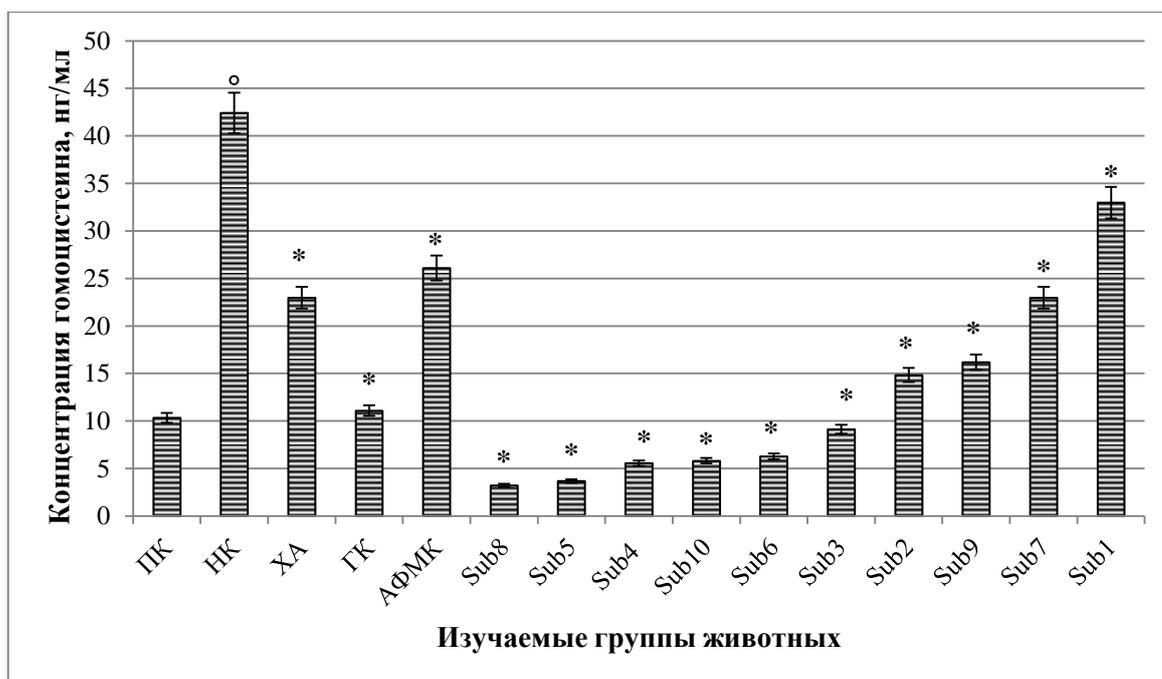


Рисунок 7 – Изменение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

При применении веществ Sub10, Sub6, Sub3 наблюдалось снижение содержания гомоцистеина по сравнению с группой крыс НК соответственно в 7,5 ($p < 0,05$), 6,8 ($p < 0,05$) и 4,7 раза ($p < 0,05$). Введение животным изучаемых соединений под лабораторными шифрами Sub2 и Sub9 способствовало уменьшению концентрации гомоцистеина на 191% ($p < 0,05$) и 167,9% ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК. На фоне применения веществ Sub7 и Sub1 наблюдалось снижение уровня гомоцистеина по сравнению с группой животных НК, на 88,2% ($p < 0,05$) и 31,3% ($p < 0,05$) соответственно.

3.5 Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию маркеров нейродеградации в условиях экспериментальной ХТЭ

Следующим этапом исследования послужил мониторинг изменений концентраций специфических маркеров нейродеградации. Было изучено

содержание GFAP, повышенный уровень которого свидетельствует о деструкции нейронов и нарушении целостности ГЭБ [108]. Значение исследуемого показателя у крыс группы ПК составило $312,27 \pm 11,320$ пг/мл (рис. 8). Исходя из результатов, полученных в ходе эксперимента, установлено увеличение концентрации GFAP у группы животных НК в 8 раз ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК. Данный факт свидетельствует о нейродеструкции в условиях экспериментальной модели ХТЭ [108]. При применении препаратов сравнения гопантеновой кислоты, холина альфосцерата, аминифенилмасляной кислоты было обнаружено уменьшение содержания GFAP по сравнению с данными животных группы НК, в 2,4 ($p < 0,05$), 3,2 ($p < 0,05$) и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно. Введение крысам соединений, под лабораторными шифрами Sub3, Sub1, Sub5, способствовало снижению концентрации GFAP соответственно в 3,5 ($p < 0,05$), 3,4 ($p < 0,05$) и 3,3 раза ($p < 0,05$) относительно группы животных НК.

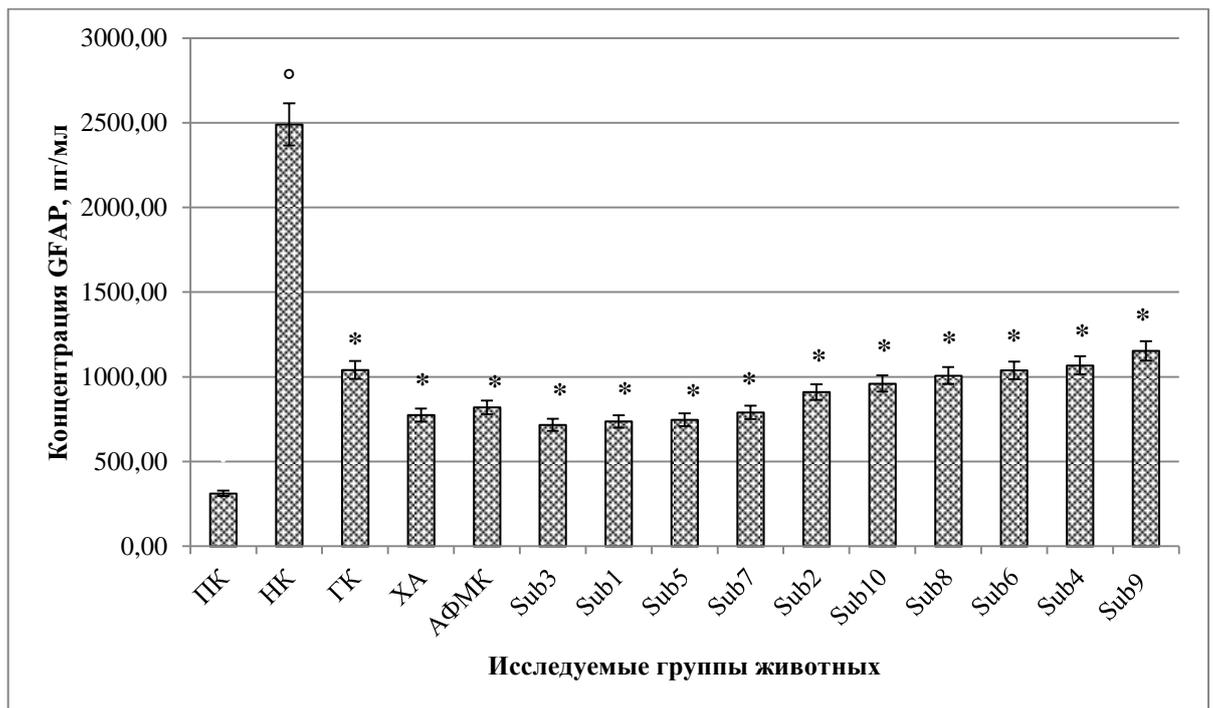


Рисунок 8 – Изменение концентрации GFAP в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

При применении исследуемых вещества Sub7, Sub2, Sub10 наблюдалось уменьшение содержания GFAP по сравнению со значением животных группы НК в 3,2 ($p<0,05$), 2,7 ($p<0,05$) и 2,6 раза ($p<0,05$), соответственно. На фоне введения крысам соединений Sub8, Sub6 было отмечено снижение концентрации GFAP в 2,5 ($p<0,05$) и 2,4 ($p<0,05$) раза соответственно относительно группы животных НК. Применение веществ под лабораторными шифрами Sub4 и Sub9 способствовало уменьшению содержания GFAP по сравнению с аналогичным показателем крыс группы НК, в 2,3 ($p<0,05$) и 2,2 ($p<0,05$) раза соответственно.

Повышенная концентрация A β приводит к его адгезии на стенках церебральных сосудов, способствуя их дисфункции. Также потенцируется нейротоксичность данного соединения, которая приводит, в свою очередь, к нейродеградации [207]. Значение уровня содержания A β у группы крыс ПК составило $12,64\pm 0,501$ пг/мл (рис. 9), что соответствует данным литературы [140]. Исходя из результатов эксперимента установлено изменение концентрации показателя у животных группы НК, в виде увеличения в 25,3 раза ($p<0,05$), относительно группы крыс ПК, что является свидетельством нейродеструкции [123]. Применение препаратов сравнения гопантеновой кислоты, холина альфосцерата, аминоксилот позволило снизить содержание A β по сравнению с животными группы НК в 4,7 ($p<0,05$), 4,5 ($p<0,05$) и 4,8 раза ($p<0,05$) соответственно. При введении крысам исследуемых соединений, под лабораторными шифрами Sub1, Sub2, Sub3, отмечено уменьшение концентрации A β в 3,2 ($p<0,05$), 3,1 ($p<0,05$) и 2,5 ($p<0,05$) раза соответственно относительно аналогичного значения у группы животных НК. На фоне применения веществ Sub9 и Sub4 наблюдалось снижение содержания A β по сравнению с показателем крыс группы НК, в 2,5 ($p<0,05$) и 2,4 ($p<0,05$) раза. Введение соединений Sub7, Sub5, Sub6 способствовало уменьшению концентрации A β соответственно в 2,2 ($p<0,05$), 2,1 ($p<0,05$) и 1,7 ($p<0,05$) раза по отношению к группе животных НК. При применении веществ Sub10 и Sub8 происходило снижение содержания A β относительно крыс группы НК, в 1,5 ($p<0,05$) и 1,4 ($p<0,05$) раза.

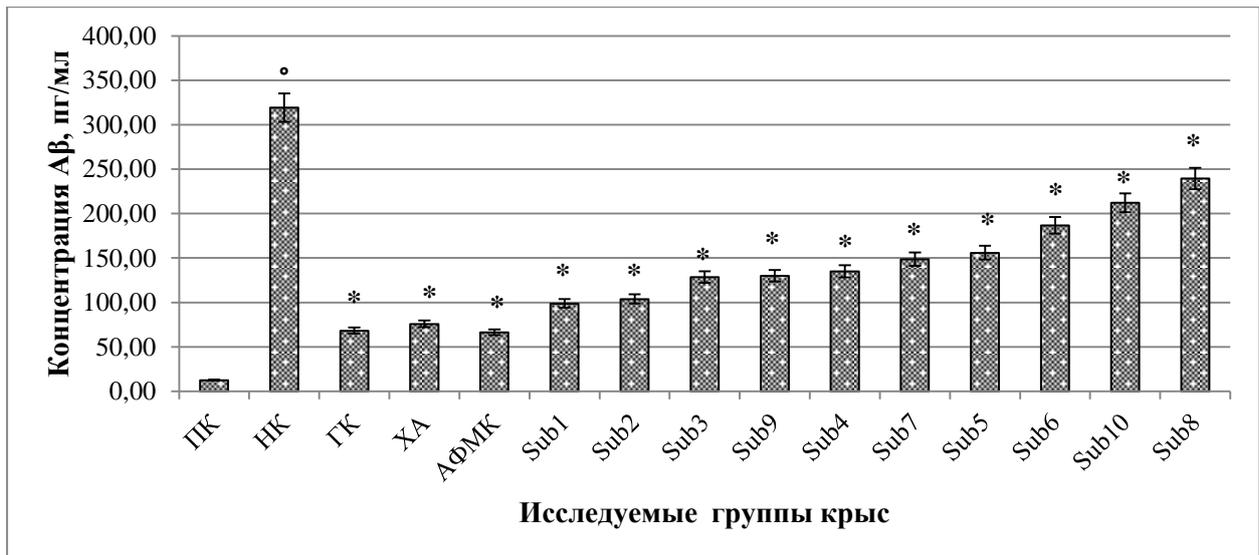


Рисунок 9 – Изменение концентрации Aβ в супернатанте мозговой ткани у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции (M±m)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

Белок S-100B отвечает за поддержание аксонального роста, стабилизацию тау-белка. Гиперпродукция данного биомаркера способствует активации проапоптических факторов [219]. Концентрация исследуемого показателя у животных группы ПК составила $12,92 \pm 0,445$ пг/мл (рис. 10), что подтверждается ранее проведенными экспериментами [181]. Значение уровня S-100B, согласно результатам исследования, у группы крыс НК увеличилось относительно животных группы ПК в 29 раз ($p < 0,05$). Применение препаратов сравнения гопантеновой кислоты, холина альфосцерата, аминоксалиновой кислоты позволило снизить концентрацию S-100B в 2,8 ($p < 0,05$), 2,5 ($p < 0,05$) и 2,7 ($p < 0,05$) раз соответственно по отношению к данным группы животных НК. На фоне введения крысам исследуемых соединений Sub4, Sub1, Sub5 было установлено, что уровень S-100B уменьшился относительно животных группы НК, примерно в 3 раза ($p < 0,05$) во всех случаях. При применении веществ под лабораторными шифрами Sub7 и Sub6 наблюдалось снижение концентрации S-100B, в 2,9 ($p < 0,05$) и 2,6 ($p < 0,05$) раз по отношению к группе крыс НК. Введение соединений Sub8, Sub9, Sub2 способствовало уменьшению содержания S-100B по сравнению

с животными группы НК в 2,4 ($p<0,05$), 2,4 ($p<0,05$) и 2,3 ($p<0,05$) раза соответственно. На фоне применения веществ Sub3, Sub10 наблюдалось снижение концентрации S-100B относительно группы крыс НК в 2,3 ($p<0,05$) и 2,2 ($p<0,05$) раза.

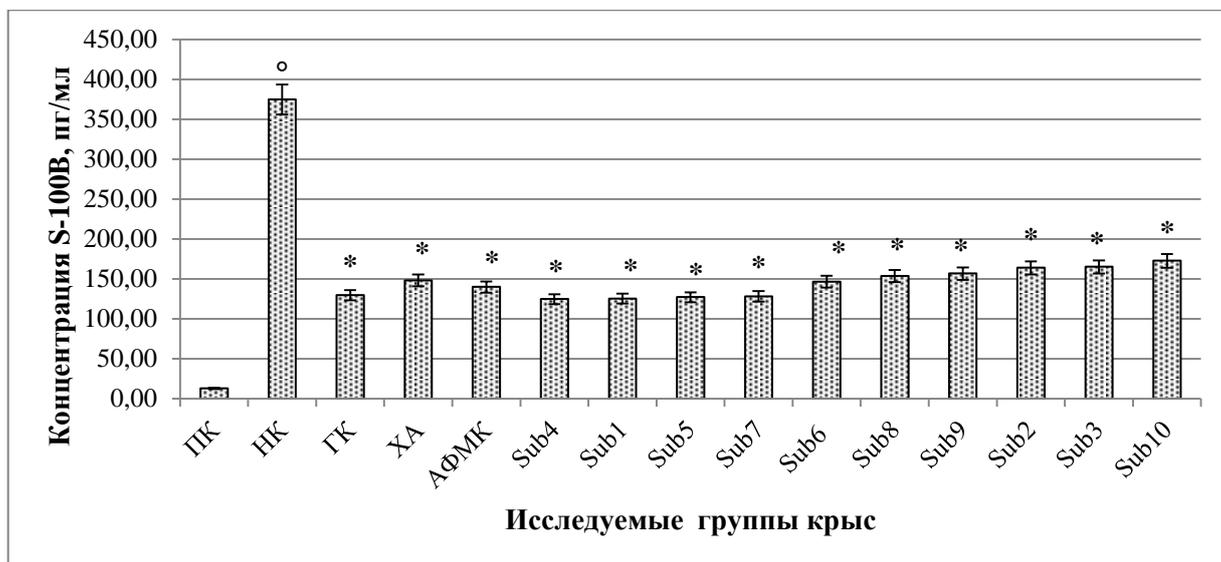


Рисунок 10 – Изменение концентрации S-100B в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

Следующим этапом стала оценка изменений концентрации фермента NSE, гиперпродукция которого играет немаловажную роль в развитии метаболических нарушений, воспалительных процессов, приводящих в свою очередь к нейродеструкции [169,117]. Значение данного показателя у животных группы ПК составило $342,65\pm 9,642$ пг/мл (рис. 11), что согласуется с ранее проведенными исследованиями [227]. Уровень содержания NSE, исходя из результатов эксперимента, у крыс группы НК повысился относительно группы животных ПК в 19 раз ($p<0,05$). При применении препаратов сравнения гопантеиновой кислоты, холина альфосцерата, аминифенилмасляной кислоты было отмечено снижение концентрации NSE в 2,6 ($p<0,05$), 2,5 ($p<0,05$) и 1,8 ($p<0,05$) раз соответственно по сравнению с крысами группы НК. Введение животным изучаемых соединений

под лабораторными шифрами Sub1, Sub8, Sub9 позволило уменьшить содержание NSE относительно группы крыс НК в 3,5 ($p<0,05$), 3,0 ($p<0,05$) и 2,6 ($p<0,05$) раза. На фоне применения веществ Sub10 и Sub7 было отмечено снижение концентрации NSE в 2,0 раза ($p<0,05$) по сравнению с аналогичным показателем животных группы НК. При введении крысам соединений Sub5, Sub2, Sub4 наблюдалось уменьшение содержания NSE относительно группы животных НК примерно в 1,8 ($p<0,05$) раза. Применение веществ Sub3, Sub6 способствовало снижению концентрации NSE в 1,6 ($p<0,05$) раз по сравнению с животными группы НК.

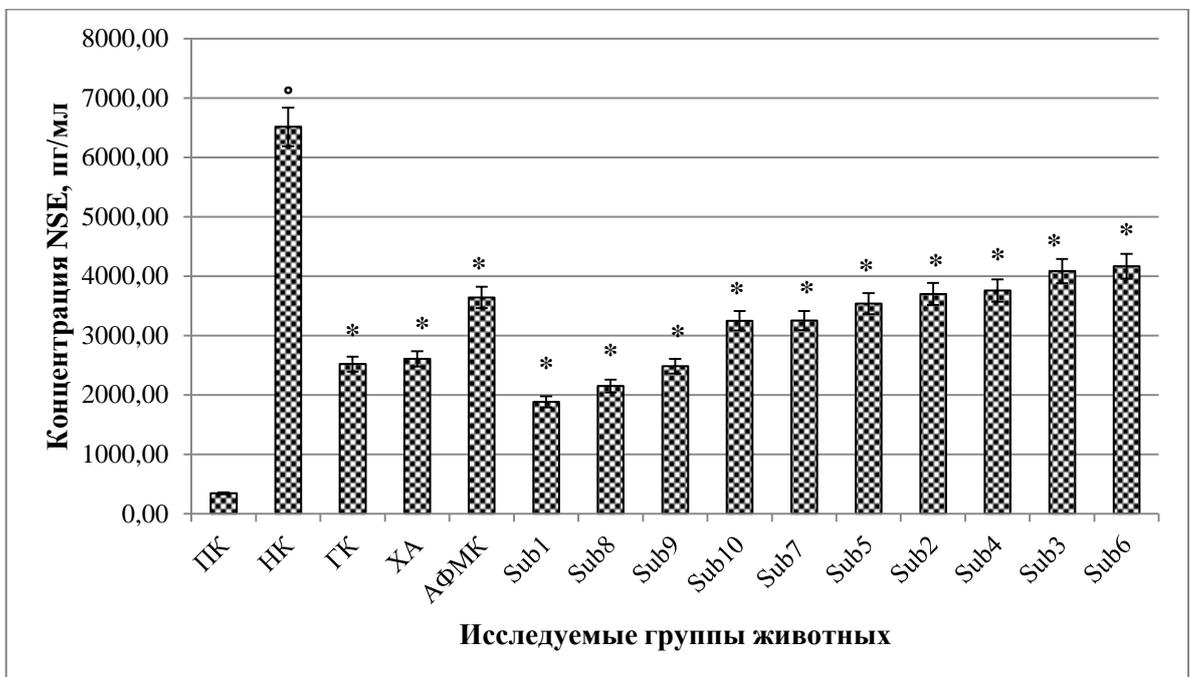


Рисунок 11 – Изменение концентрации NSE в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы ($*$ - $p<0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования установлено, что у крыс с экспериментально воспроизведенной ХТЭ наблюдается развитие когнитивного и сенсомоторного дефицитов, которые были определены с помощью тестов УРПИ, ТЭИ и «Beam walking test». Так, отмечено достоверно значимое снижение времени латентного захода в темный отсек на 66,9%, увеличение периода времени «избегания» в 2,5 раза, повышение уровня СД в 5,8 раза, относительно группы животных ПК. Выявлено изменение метаболизма в виде возрастания концентрации лактата и гомоцистеина в 4,4 и 4,1 раза, соответственно, снижения секреции пировиноградной кислоты в 4,9 раза, относительно группы крыс ПК. Также установлено повышенное содержание маркеров повреждения клеток ЦНС. Так, концентрации биомаркеров GFAP, A β , S-100B, NSE возросли относительно значений группы ПК в 8, 25, 29 и 19 раз, соответственно. Вышеперечисленное свидетельствует о течении процессов нейродеградации в условиях модельной ХТЭ.

При применении препаратов сравнения, холина альфосцерата, гопантеновой кислоты и аминофенилмасляной кислоты, отмечено некоторое восстановление когнитивных процессов в условиях экспериментальной ХТЭ, в виде сокращения периода принятия решения в тесте ТЭИ на 70,6%, 68,3% и 39,3%, соответственно, относительно крыс группы НК. В тесте УРПИ установлено увеличение времени латентного захода в 2,8, 3,8 и 4,2 раза, соответственно, по сравнению с аналогичным показателем группы животных НК. При определении уровня СД установлено его снижение на фоне введения крысам холина альфосцерата, гопантеновой кислоты относительно группы животных НК, на 131,4% и 15,9%, соответственно. Однако применение аминофенилмасляной кислоты не оказало достоверно значимого изменения сенсомоторных функций по сравнению с группой крыс НК.

При определении способности корректировать метаболические нарушения головного мозга в условиях ХТЭ, отмечено следующее действие холина

альфосцерата, гопантеновой кислоты и аминоксалициловой кислоты. По степени воздействия на нормализацию процессов секреции лактата, пировиноградной кислоты, гомоцистеина препараты сравнения можно расположить в ряду: гопантеновая кислота > холина альфосцерат > аминоксалициловая кислота. По уровню снижения концентрации биомаркера GFAP составлен следующий ряд: холина альфосцерат > гопантеновая кислота > аминоксалициловая кислота. В тоже время по способности уменьшать содержание A β препараты сравнения можно поставить в ряд активности: аминоксалициловая кислота > гопантеновая кислота > холина альфосцерат. По степени снижения концентрации показателя S-100B исследуемые препараты можно представить в порядке: гопантеновая кислота > аминоксалициловая кислота > холина альфосцерат. При изучении способности уменьшать содержание NSE установлено, что наибольшую активность проявляет гопантеновая кислота, затем холина альфосцерат, аминоксалициловая кислота.

Введение изучаемых соединений крысам оказало неоднозначное влияние на исследуемые параметры. Так, по уровню воздействия на когнитивные функции, определяемые в тесте ТЭИ, наиболее выраженный эффект оказали Sub3 и Sub1, в виде восстановления последних на 142,7% и 63,3%, соответственно, относительно крыс группы НК. По степени сохранения когнитивных процессов, оцененных в данном тесте, препараты сравнения и исследуемые соединения можно расположить в порядке: Sub3>гопантеновая кислота>холина альфосцерат> Sub1 >аминоксалициловая кислота > Sub9> Sub8 > Sub2 > Sub5 > Sub6 > Sub4 > Sub7 > Sub10.

Оценивая когнитивные функции животных в тесте УРПИ, установлено следующее, что при применении соединений Sub8, Sub1 и Sub6 отмечалось наибольшее сохранение когнитивных функций, что выражалось в увеличении периода до захода в темный отсек в 6,1, 3,2 и 3,2 раза соответственно. По степени воздействия на когнитивные процессы препараты сравнения и изучаемые вещества можно расположить в ряд активности: Sub8>аминоксалициловая

кислота>гопантенная кислота>Sub1>Sub6>холина альфосцерат> Sub2>Sub4>Sub10 > Sub3 > Sub5 > Sub7 > Sub9.

При оценке влияния исследуемых соединений на сенсомоторные функции в тесте «Beam walking test» установлено, что наиболее выраженный фармакологический эффект проявили вещества Sub2 и Sub1, в виде уменьшения СД на 67,1% и 34,9%, соответственно, относительно животных группы НК. При общем рассмотрении воздействия препаратов сравнения и изучаемых соединений на восстановление сенсомоторных функций выявлен следующий порядок: холина альфосцерат>Sub2>Sub1>Sub9>Sub3>гопантенная кислота>Sub8>Sub6>аминофенилмасляная кислота>Sub4>Sub7>Sub10>Sub5.

Наиболее выраженный эффект, проявляющийся в виде нормализации секреции лактата, наблюдался при применении изучаемого соединения под лабораторным шифром Sub1. Так установлено снижение содержания показателя по сравнению с группой крыс НК на 110,5%. По степени данной активности можно привести следующий ряд препаратов и исследуемых веществ: Sub1 > холина альфосцерат > Sub3 > Sub10 > Sub6 > гопантенная кислота > Sub2 > Sub4 > Sub8 > Sub9 > аминофенилмасляная кислота > Sub5 > Sub7.

При изучении влияния исследуемых соединений на восстановление физиологического обмена пировиноградной кислоты установлено, что наиболее выраженный эффект в виде повышения содержания в 6,2 раза и 3,0 раза оказало введение соединений Sub3 и Sub9 относительно крыс группы НК. В целом по уровню воздействия на метаболизм пировиноградной кислоты препараты сравнения и исследуемые вещества показали следующие результаты: Sub3>Sub9>гопантенная кислота>Sub1>Sub6>Sub8>холина альфосцерат>Sub7>Sub2>Sub10>аминофенилмасляная кислота>Sub4>Sub5.

Оценка влияния исследуемых соединений на уровень секреции гомоцистеина показала, что наибольшее снижение продукции данного показателя наблюдалось при введении вещества Sub8, в виде уменьшения концентрации в 13,5 раз, относительно крыс группы НК. По степени воздействия на содержание гомоцистеина у крыс исследуемых групп установлено следующее действие

препаратов сравнения и исследуемых соединений, которое можно выразить следующим рядом активности: Sub8 > Sub5 > Sub4 > Sub10 > Sub6 > Sub3 > гопантевая кислота > Sub2 > Sub9 > Sub7 > холина альфосцерат > аминофенилмасляная кислота > Sub1.

При оценке влияния изучаемых соединений на изменение концентрации биомаркера GFAP выявлено, что наибольшее снижение наблюдалось при введении Sub3 и Sub1, выражающееся в уменьшении содержания в 3,5 раза и 3,4 раза, соответственно относительно крыс группы НК. По степени воздействия препаратов сравнения и исследуемых веществ, в виде понижения концентрации GFAP, установлена зависимость: Sub3 > Sub1 > Sub5 > холина альфосцерат > Sub7 > аминофенилмасляная кислота > Sub2 > Sub10 > Sub8 > Sub6 > гопантевая кислота > Sub4 > Sub9.

Изучение действия исследуемых соединений на продукцию A β показало, что наиболее выраженный эффект, уменьшение содержания относительно крыс группы НК в 3,2 раза и 3,1 раза, наблюдался при введении Sub1 и Sub2. По уровню воздействия на снижение концентрации A β активность препаратов сравнения и изучаемых соединений можно расположить в следующий ряд: аминофенилмасляная кислота > гопантевая кислота > холина альфосцерат > Sub1 > Sub2 > Sub3 > Sub9 > Sub4 > Sub7 > Sub5 > Sub6 > Sub10 > Sub8.

Оценивая степень влияния исследуемых веществ на содержание S-100B, установлен наиболее выраженный эффект, уменьшение концентрации показателя при введении Sub4 и Sub1, примерно в 3 раза, относительно крыс группы НК. В целом по воздействию на изменение содержания показателя препараты сравнения и изучаемые соединения можно расположить в ряд активности: Sub4 > Sub1 > Sub5 > Sub7 > гопантевая кислота > аминофенилмасляная кислота > Sub6 > холина альфосцерат > Sub8 > Sub9 > Sub2 > Sub3 > Sub10.

При изучении влияния исследуемых соединений на содержание такого маркера, как NSE, выявлено наиболее значимое снижение показателя при применении Sub1 в 3,5 раза относительно животных группы НК. По степени уменьшения концентрации NSE препараты сравнения и изучаемые вещества

проявили себя следующим образом: Sub1 > Sub8 > Sub9 >гопантенвая кислота >холина альфосцерат >Sub10 >Sub7 > Sub5 >аминофенилмасляная кислота >Sub2 >Sub4 >Sub3 >Sub6.

Установленный характер влияния исследуемых соединений на когнитивные и сенсомоторные функции, на процессы метаболизма и образования маркеров повреждения головного мозга, вероятно, связан с вазодилатирующей, ангиопротекторной, антитромбоцитарной, антиоксидантной, нейропротекторной активностью производных пиримидина [5,4,33,16,28].

Таблица 4 – Результаты фармакологического скрининга

Предмет изучения	Исследуемые соединения, расположенные по степени убывания фармакологического эффекта, относительно крыс групп НК									
	Sub 3*	Sub 1	Sub 9	Sub 8	Sub 2*	Sub 5*	Sub 6*	Sub 4*	Sub 7*	Sub 10*
Когнитивные функции (ТЭИ)	Sub 3*	Sub 1	Sub 9	Sub 8	Sub 2*	Sub 5*	Sub 6*	Sub 4*	Sub 7*	Sub 10*
Когнитивные функции (УРПИ)	Sub 8*	Sub 1	Sub 6	Sub 2*	Sub 4*	Sub 10*	Sub 3*	Sub 5*	Sub 7*	Sub 9*
Сенсомоторные функции	Sub 2*	Sub 1	Sub 9	Sub 3*	Sub 8*	Sub 6*	Sub 4*	Sub 7*	Sub 10*	Sub 5*
Лактат	Sub 1	Sub 3*	Sub 10*	Sub 6*	Sub 2*	Sub 4*	Sub 8*	Sub 9*	Sub 5*	Sub 7*
Пировиноградная кислота	Sub 3*	Sub 9*	Sub 1	Sub 6*	Sub 8*	Sub 7*	Sub 2*	Sub 10*	Sub 4*	Sub 5*
Гомоцистеин	Sub 8*	Sub 5*	Sub 4*	Sub 10*	Sub 6*	Sub 3*	Sub 2*	Sub 9*	Sub 7*	Sub 1
GFAB	Sub 3	Sub 1	Sub 5	Sub 7	Sub 2*	Sub 10*	Sub 8*	Sub 6*	Sub 4*	Sub 9*
S100B	Sub 4	Sub 1	Sub 5	Sub 7	Sub 6*	Sub 8*	Sub 9*	Sub 2*	Sub 3*	Sub 10*
BA	Sub 1	Sub 2	Sub 3*	Sub 9*	Sub 4*	Sub 7*	Sub 5*	Sub 6*	Sub 10*	Sub 8*
NSE	Sub 1	Sub 8	Sub 9*	Sub 10*	Sub 7*	Sub 5*	Sub 2*	Sub 4*	Sub 3*	Sub 6*

Примечание: * - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно группы Sub1 ($p < 0,05$).

После анализа результатов, полученных при выполнении фармакологического скрининга среди 10 новых производных пиримидин-4(1H)-она (таб. 4), учитывая совокупность экспериментальных данных, установлено, что вещество под лабораторным шифром Sub1 обладает наиболее выраженным

церебропротекторным действием в условиях экспериментальной ХТЭ. Последнее выражалось в большем сохранении когнитивных и сенсомоторных функций крыс, также в нормализации процессов метаболизма клеток головного мозга, в сравнении с остальными соединениями. При этом степень изменения большинства изучаемых показателей на фоне введения Sub1 была сопоставима или выше таковой при применении препаратов сравнения. Вышесказанное позволяет выбрать в качестве соединения-лидера для дальнейшего изучения церебротропных эффектов в условиях ХТЭ вещество Sub1.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА В ИНТЕРВАЛЕ ДОЗ

4.1 Изучение параметра «острая» токсичность соединения-лидера

В эксперименте была оценена «острая» токсичность соединения-лидера, фармакологическая активность которого выявлена ранее. Задачей выступало установление целесообразности дальнейшего углубленного изучения вещества-лидера в условиях экспериментальной ХТЭ.

Исходя из результатов первого этапа эксперимента на переносимость предельно допустимой дозы установлено, при введении мышам соединения-лидера в дозе 5000 мг/кг погибло 3 животных из 5, что выступило фактором для завершения теста и выполнения основного исследования.

Для проведения основного эксперимента, учитывая рекомендации руководства OECD №425, был выбран следующий интервал вводимых доз соединения-лидера Sub1: 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 мг/кг.

Критерием завершения исследования служило то, что:

- более трех животных, последовательно введенных в эксперимент, выживают при введении максимальной дозы;
- происходит пять реверсирований у шести последовательно испытуемых животных;
- не менее четырех животных проявляют реверсирование после наблюдавшегося первого, и соответствующие отношения правдоподобия превышают критическое значение.

Погибшие экспериментальные животные подвергались вскрытию, с последующим описанием результатов некропсии.

Исходя из результатов основного эксперимента, погибло 5 животных при применении изучаемого соединения-лидера Sub1 в дозе 5000 мг/кг (таб. 5). Летальный исход был установлен на 4 сутки, после последнего введения исследуемого вещества. По результатам некропсии не было выявлено значимых отклонений в органах животного от физиологического состояния.

Таблица 5 – Результаты выполнения основного теста при исследовании «острой токсичности» изучаемого соединения-лидера Sub1

Животное	Доза, мг/кг	Показатель выживаемости	Отдаленный показатель выживаемости
1	1,75	O	O
2	5,5	O	O
3	17,5	O	O
4	55	O	O
5	175	O	O
6	550	O	O
7	1750	O	O
8	5000	X	X
9	1750	O	O
10	5000	X	X
11	1750	O	O
12	5000	X	X
13	1750	O	O
14	5000	X	X
15	1750	O	O
16	5000	X	X

Примечание: X – животное погибло; O – животное выжило.

Следовательно, по СГС-классификации химических веществ (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Part 3 Health Hazards, United Nations, 2017), исследуемое соединение относится к пятому классу токсичности веществ.

5.1 Определение эффективности применения соединения-лидера в дозах 25-150 мг/кг условиях ХТЭ

В данном эксперименте была исследована зависимость между введенной дозой и уровнем фармакологического эффекта соединения - лидера Sub1 в 4-х дозировках (25мг/кг, 50мг/кг, 100мг/кг и 150мг/кг). Изучаемыми параметрами выступали изменения концентрации маркеров нейродеградации, а именно: GFAP, A β , S-100B, NSE. Данные показатели были выбраны исходя из патологической роли вышеперечисленных соединений в формировании ХТЭ, уровень которых коррелирует с тяжестью поражения головного мозга.

По результатам исследования установлено, что концентрация показателя GFAP у группы животных ПК составила $312,27 \pm 11,320$ пг/мл (рис. 12). У крыс группы НК, содержание данного биомаркера выросло относительно животных группы ПК в 8 раз ($p < 0,05$). При введении крысам референтных препаратов холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминоксалиновой кислоты было отмечено снижение концентрации GFAP по сравнению с группой крыс НК в 3,2 ($p < 0,05$), 2,4 ($p < 0,05$) и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Применение соединения-лидера Sub1 в дозах 25 мг/кг, 50мг/кг, 150мг/кг, позволило уменьшить содержание GFAP в 3 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$) и 2,2 ($p < 0,05$) раза соответственно относительно значения показателя животных группы НК. В то время как, введение дозы 100мг/кг способствовало снижению концентрации GFAP по сравнению с группой крыс НК, в 3,5 раза ($p < 0,05$).



Рисунок 12 – Изменение концентрации GFAP в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

ПК - группа животных положительного контроля; НК - группа крыс негативного контроля; ХА - группа животных, получавшая холина альфосцерат; ГК - группа крыс, которым вводили гопантевую кислоту; АФМК - группа животных, получавшая аминифенилмасляная кислота; 25 мг/кг - группа крыс, которым вводили соединение-лидер в дозе 25 мг/кг; 50 мг/кг - группа животных, получавшая соединение-лидер в дозе 50 мг/кг; 100 мг/кг - группа крыс, которым вводили соединение-лидер в дозе 100 мг/кг; 150 мг/кг - группа животных, получавшая соединение-лидер в дозе 150 мг/кг.

Применение соединения-лидера Sub1 в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 150 мг/кг, позволило уменьшить содержание GFAP в 3 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$) и 2,2 ($p < 0,05$) раза соответственно относительно значения показателя животных группы НК. В то время как, введение дозы 100 мг/кг способствовало снижению концентрации GFAP, по сравнению с группой крыс НК, в 3,5 раза ($p < 0,05$).

Уровень показателя $A\beta$ у животных группы ПК составил $12,64 \pm 0,501$ пг/мл (рис. 13). Установлено, что у группы крыс НК содержание исследуемого биомаркера выросло в 26 раз ($p < 0,05$) относительно животных группы ПК. Применение препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантевой кислоты, аминифенилмасляной кислоты способствовало уменьшению уровня

концентрации Аβ в 4,2 ($p<0,05$), 4,7 ($p<0,05$) и 4,8 ($p<0,05$) раза соответственно по отношению к группе крыс НК.

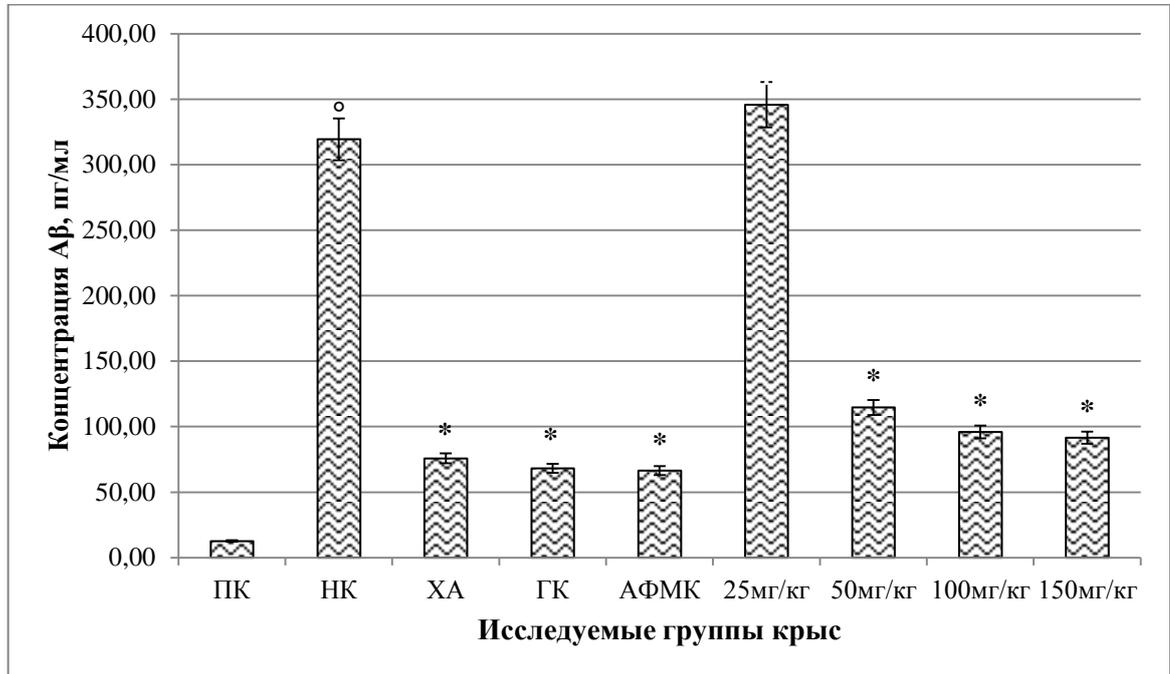


Рисунок 13 – Изменение концентрации Аβ в супернатанте мозговой ткани у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 12.

Введение соединения-лидера Sub1 в дозах 50мг/кг, 150мг/кг приводило к снижению содержания Аβ в 3,0 ($p<0,05$) и 3,5 раза ($p<0,05$) относительно группы крыс НК. При применении дозировки 25 мг/кг не было установлено достоверно значимого изменения концентрации Аβ от уровня животных группы НК. В то время как, введение дозы 100 мг/кг способствовало уменьшению содержания Аβ в 3,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с группой крыс НК.

Концентрация S-100В у животных группы ПК была равна $12,92\pm 0,445$ пг/мл (рис. 14). Уровень данного показателя у группы крыс НК увеличился относительно группы ПК в 29 раз ($p<0,05$). На фоне введения животным препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминоксалиновой кислоты было отмечено снижение концентрации S-100В в

2,6 ($p<0,05$), 2,8 ($p<0,05$) и 2,7 ($p<0,05$) раза соответственно по сравнению со значениями крыс группы НК. Применение соединения-лидера Sub1 в дозах 25мг/кг, 50мг/кг, 150мг/кг позволило уменьшить содержания S-100B по отношению к группе животных НК в 2,7 ($p<0,05$), 2,8 ($p<0,05$) и 2,8 ($p<0,05$) раза соответственно. Введение дозы 100мг/кг позволило снизить концентрацию S-100B в 3 раза ($p<0,05$) по сравнению с данными крыс группы НК.

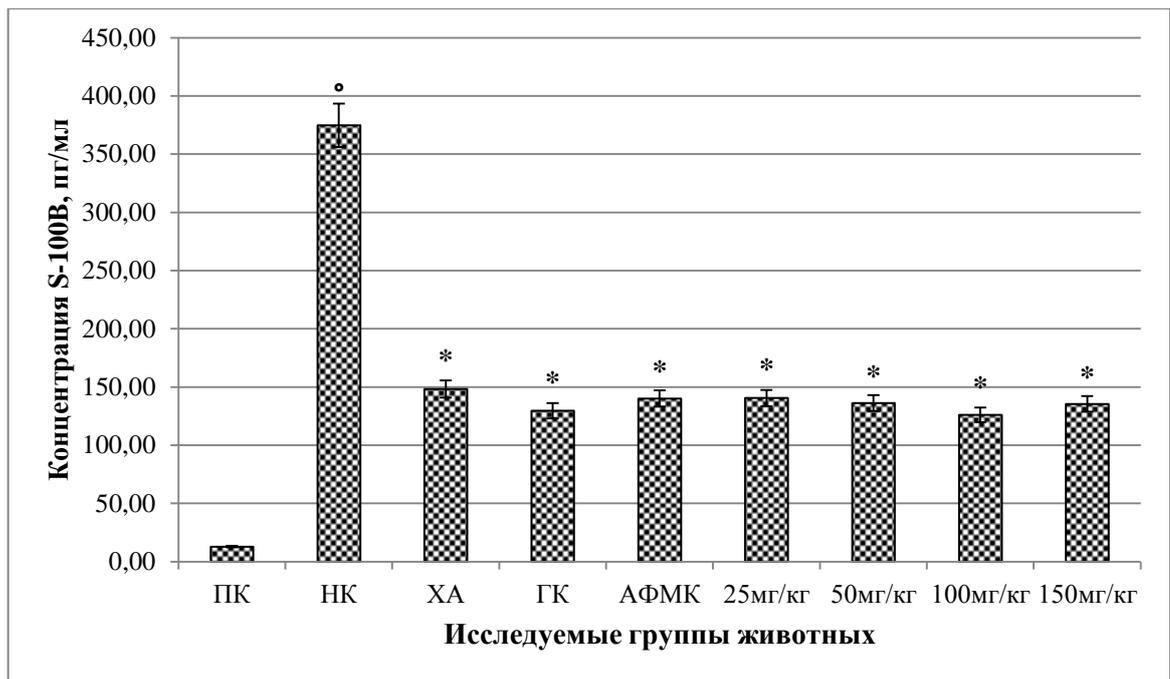


Рисунок 14 – Изменение концентрации S-100B в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 12.

Концентрация фермента NSE у крыс группы ПК составила $342,65\pm 9,642$ пг/мл (рис. 15). Данный показатель у группы животных НК, исходя из результатов исследования, был выше относительно крыс группы ПК в 19 раз ($p<0,05$). При применении препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминоксалиновой кислоты наблюдалось снижение содержания NSE по сравнению с группой животных НК в 2,5 ($p<0,05$), 2,6 ($p<0,05$) и 1,8 ($p<0,05$) раза соответственно.

На фоне введения крысам соединения-лидера Sub1 в дозах 25мг/кг, 50мг/кг, 150мг/кг было зафиксировано уменьшение концентрации NSE в 3,2 ($p<0,05$), 2,4 ($p<0,05$) и 2,6 ($p<0,05$) раза соответственно по отношению к животным группы НК. Применение дозы 100мг/кг позволило снизить уровень содержания NSE относительно группы крыс НК, в 3,4 раза ($p<0,05$).

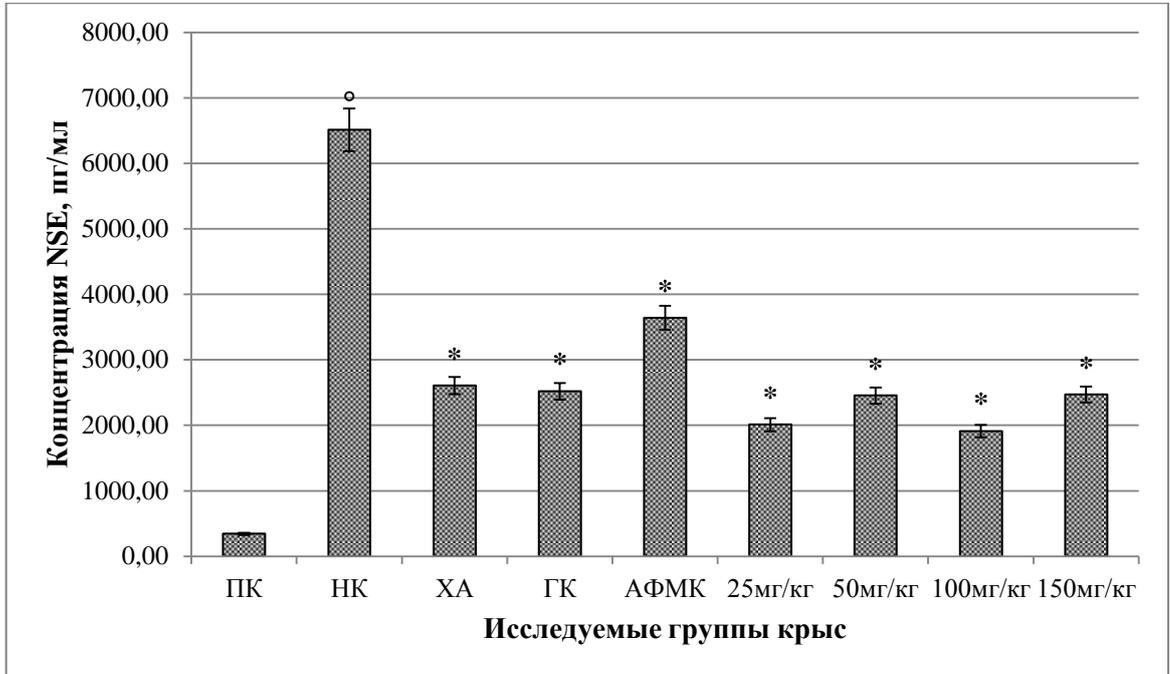


Рисунок 15 – Изменение концентрации NSE в сыворотке крови у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 12.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При оценке параметра «острая» токсичность в ходе исследования установлено, что новое сульфопроизводное пиримидина - 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид обладает низкой системной токсичностью при пероральном введении, что позволяет отнести данное соединение по СГС-классификации химических веществ (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Part 3 Health Hazards, United Nations, 2017) к пятому классу токсичности.

В исследовании по определению эффективности введения соединения-лидера в интервале доз 25-150 мг/кг отмечено, что наиболее выраженное действие, в виде уменьшения концентрации маркеров нейродеградации GFAP, A β , S-100B, NSE, соединение-лидер Sub1 оказывает в дозе 100 мг/кг. Так при применении в данной дозировке содержание GFAP снизилось относительно крыс групп, которым вводили дозы 25мг/кг, 50мг/кг, 150мг/кг на 13,8%, 91,7% и 56,9% соответственно. Введение животным соединения-лидера Sub1 в дозе 100мг/кг позволило добиться снижения содержания биомаркера S-100B по сравнению с группами крыс, которым вводили вышеназванные дозы на 11,3%, 8% и 7,4% соответственно. При применении дозы 100мг/кг установлено уменьшение концентрации A β относительно крыс, которым вводили соединение-лидер Sub1 в дозах 25мг/кг, 50мг/кг в 3,6 и 1,2 раза, в тоже время отмеченный уровень снижения достоверно не отличался от такового при использовании дозы 150мг/кг. Введение животным соединения-лидера Sub1 в дозе 100мг/кг способствовало уменьшению содержания фермента NSE, относительно групп крыс, которым вводили дозы 25мг/кг, 50мг/кг, 150мг/кг на 5,2%, 28,3% и 29,2% соответственно. Таким образом, для дальнейшего исследования церебропротекторной активности соединения-лидера Sub1 в условиях экспериментальной ХТЭ будет использоваться доза 100 мг/кг.

ГЛАВА 5. УГЛУБЛЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА SUB1 И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХТЭ

Проведенная серия экспериментов была посвящена изучению отсроченного фармакологического эффекта соединения-лидера Sub1 и препаратов сравнения в условиях ХТЭ, также исследованию данной патологии при использовании модели «Blast wave».

5.1 Оценка отсроченного влияния исследуемых соединений на течение экспериментальной ХТЭ

При рассмотрении фармакологического эффекта препаратов сравнения и вещества-лидера Sub1 по истечении двух месяцев после моделирования ХТЭ и введения крысам изучаемых соединений произвели оценку когнитивных функций с помощью теста УРПИ. Также было изучено содержание таких маркеров повреждения головного мозга как, фосфорилированный тау-белок и Аβ. Учитывая, что отличительным диагностическим признаком ХТЭ является отложение данных соединений в коре больших полушарий [220], исследование выполнено отдельно в супернатантах, полученных после центрифугирования гомогенатов коры больших полушарий и гиппокампа. Для других НДЗ, в частности болезни Альцгеймера, характерно накопление определяемых показателей в гиппокампе.

5.1.1 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на когнитивные функции крыс в условиях ХТЭ

По результатам изучения когнитивных функций крыс исследуемых групп в тесте УРПИ было отмечено, что у животных группы ПК период времени латентного захода в темный отсек составил 34 с (табл. 6). Значение данного показателя у группы крыс НК относительно животных группы ПК снизилось на 76,2% ($p < 0,05$), что является свидетельством развития когнитивного дефицита у крыс [9]. На фоне введения животным препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН наблюдалось

увеличение периода времени до захода животных в темный отсек в 1,5 ($p<0,05$); 1,6; 3 ($p<0,05$) и 2,8 ($p<0,05$) раза соответственно по сравнению с животными группы НК (таб. 5). Применение соединения-лидера Sub1 способствовало продливанию времени латентного захода в темный отсек по сравнению с аналогичным значением группы крыс НК в 2,9 ($p<0,05$) раза.

Таблица 6 – Результаты оценки когнитивных функций животных при изучении отстроченного эффекта соединения-лидера Sub1 и препаратов сравнения

Показатель	ПК	НК	ХА	ГК	ЦМ	ПДФТН	Sub1
Количество заходов ($M\pm m$)	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
Время первого захода, сек ($M\pm m$)	55,2 \pm 3,2	19,3 \pm 1,3 [°]	28,5 \pm 3,5*	30,7 \pm 8,4	57,3 \pm 11,9*	53,5 \pm 14,5*	55,2 \pm 8,3*
Время в светлом отсеке, сек ($M\pm m$)	117,5 \pm 0,6	116,6 \pm 1,3	118,5 \pm 0,5	117,5 \pm 0,5	116,3 \pm 1,6	118,0 \pm 0,0	118,5 \pm 0,5

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ([°] - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

ПК - группа животных положительного контроля; НК - группа крыс негативного контроля; ХА - группа животных, получавшая холина альфосцерат; ГК - группа крыс, которым вводили гопантеновую кислоту; ЦМ - крысы группы, которые получали цитруллина малат; ПДФТН – группа животных, которым вводили ПДФТН; Sub1 – группа крыс, получавшая соединение-лидер в дозе 100 мг/кг.

5.1.2 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на концентрацию специфических маркеров нейродеградации в условиях ХТЭ

По результатам исследования установлено, что в гиппокампе у животных группы ПК концентрация фосфорилированного тау-белка составила 2,30 \pm 0,653 пг/мл (рис. 16). Значение данного показателя у группы крыс НК возросло в 50,4 раза ($p<0,05$) относительно животных группы ПК. При применении препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН не наблюдалось достоверно значимого снижения концентрации фосфорилированного тау-белка по сравнению с крысами группы НК. На фоне введения животным соединения-лидера Sub1 происходило уменьшение

содержания фосфорилированного тау-белка относительно аналогичного показателя группы крыс НК в 3,3 раза ($p < 0,05$).

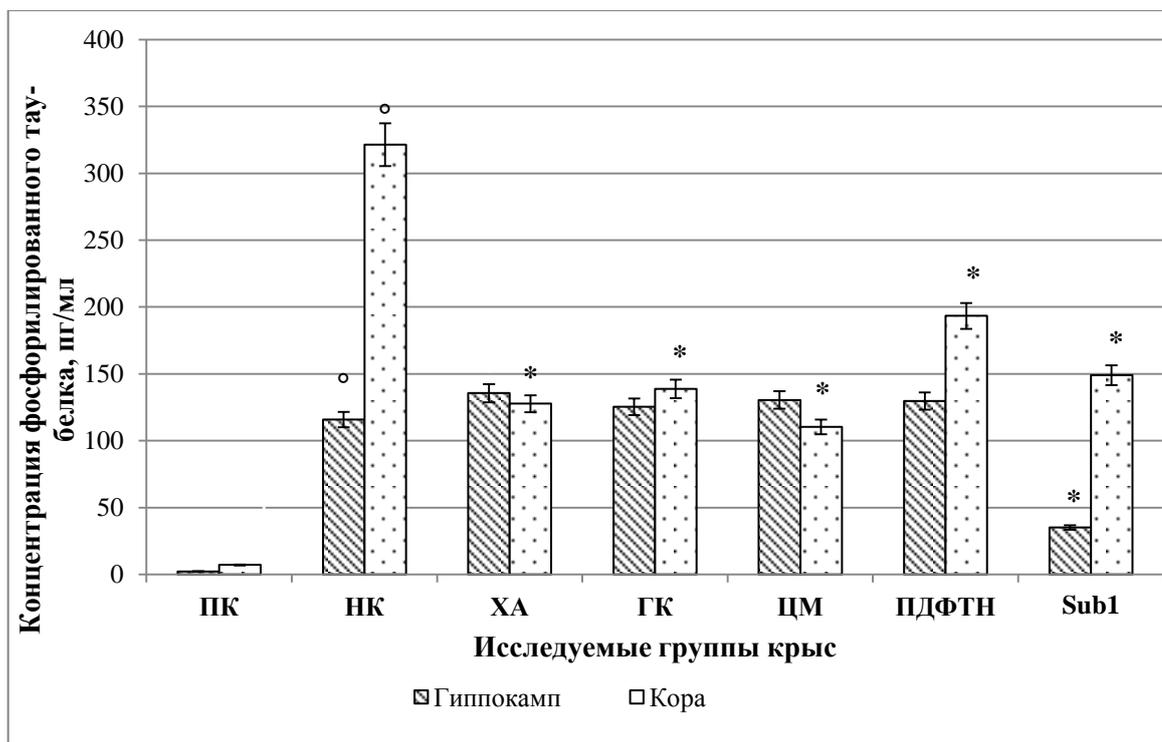


Рисунок 16 – Изменение концентрации фосфорилированного тау-белка в гиппокампе и коре больших полушарий в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Кора – определение выполнено в коре больших полушарий;

Гиппокамп – исследование произведено в гиппокампе.

Условные обозначения соответствуют таблице № 6.

При определении концентрации фосфорилированного тау-белка в коре больших полушарий было обнаружено, что у крыс группы ПК значение показателя было равно $7,2 \pm 0,261$ пг/мл (рис. 15). Содержание данного маркера у группы животных НК увеличилось в 44,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с крысами группы ПК. При введении животным в качестве фармакологической поддержки препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН было отмечено снижение концентрации фосфорилированного тау-белка относительно крыс группы НК в 2,5 ($p < 0,05$), 2,3 ($p < 0,05$), 2,9 ($p < 0,05$) и 1,7 ($p < 0,05$) раза соответственно (рис. 15). На фоне применения соединения-

лидера Sub1 установлено уменьшение содержания фосфорилированного таубелка в 2,2 ($p < 0,05$) раза по отношению к группе животных НК.

По результатам исследования концентрации Аβ в гиппокампе было отмечено, что его концентрация у животных группы ПК составила $15,20 \pm 0,984$ пг/мл (рис. 17). Уровень данного показателя у группы крыс НК вырос относительно животных группы ПК в 15 раз ($p < 0,05$). При введении крысам препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН было отмечено снижение концентрации Аβ по сравнению с группой животных НК в 2,2 ($p < 0,05$), 3 ($p < 0,05$), 2,4 ($p < 0,05$) и 3,1 ($p < 0,05$) раза соответственно. Применение соединения-лидера Sub1 позволило уменьшить содержание Аβ в 7 раз ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК.

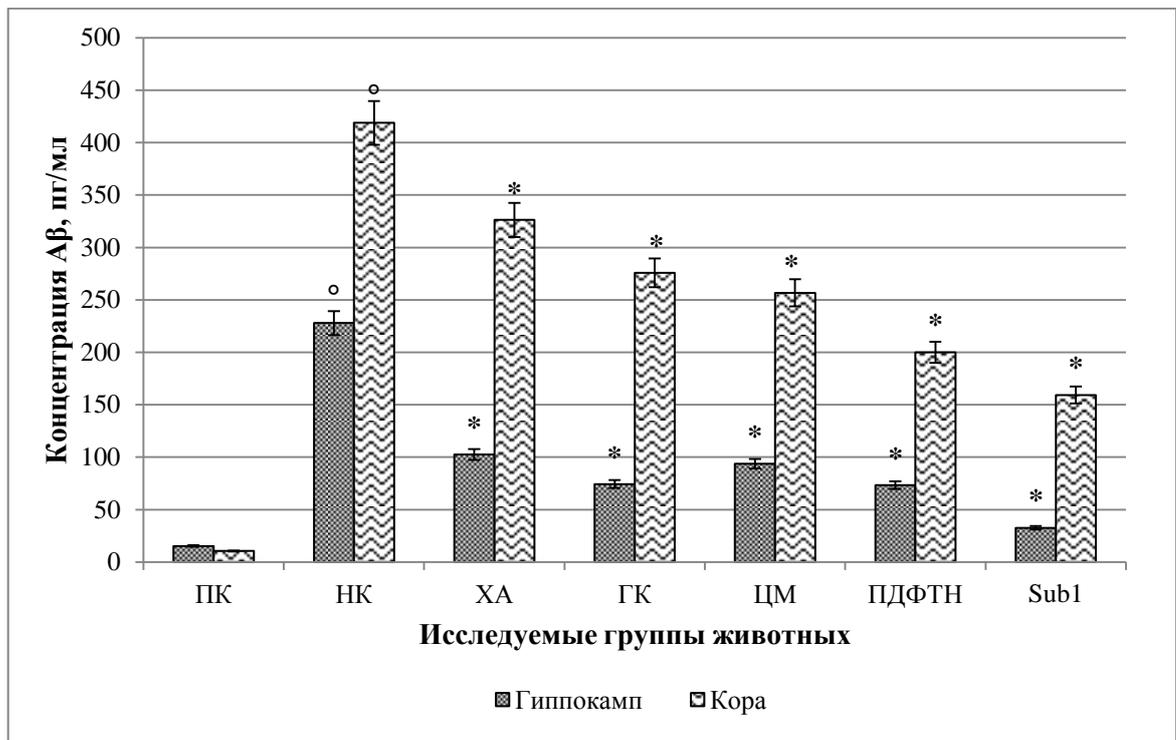


Рисунок 17 – Изменения концентрации Аβ в гиппокампе и коре больших полушарий в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения аналогичны рисунку № 16.

При определении концентрации Аβ в коре больших полушарий у группы крыс ПК было установлено ее значение равное $10,54 \pm 1,165$ пг/мл. Содержание данного маркера у животных группы НК увеличилось в 40 раз ($p < 0,05$) по

сравнению с крысами группы ПК. На фоне введения препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН наблюдалось снижение концентрации Аβ относительно животных группы НК в 1,3 ($p<0,05$), 1,5 ($p<0,05$), 1,6 ($p<0,05$) и 2,1 ($p<0,05$) раза соответственно. Применение соединения-лидера Sub1 способствовало уменьшению содержания Аβ в 2,7 ($p<0,05$) раза по отношению к аналогичному значению группы крыс НК.

5.2 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на течение ХТЭ в модели «Blast wave»

Для углубленного изучения действия препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 было предложено рассмотреть влияние последних на течение ХТЭ, смоделированной путем воздействия ударной волны. Исследуемыми параметрами выступали: уровень неврологического дефицита, концентрация маркеров нейродеградации (фосфорилированный тау-белок, Аβ, GFAP), также содержание фактора, индуцирующего апоптоз, белка AIF. Определение концентрации тау-белка, Аβ, GFAP, AIF проводили по прошествии 1 и 14 суток.

5.2.1 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на неврологические функции крыс в условиях ХТЭ в модели «Blast wave»

При оценке уровня неврологического дефицита у крыс группы ПК по сумме баллов психометрической шкалы *mNSS* значение последнего составило $0,6\pm 0,125$ усл. ед. (рис. 18). У животных группы НК установлено увеличение значения суммарного балла относительно группы крыс ПК в 13,3 раза ($p<0,05$). На фоне применения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты наблюдалось снижение степени неврологического дефицита в 2,6 ($p<0,05$), 2,3 ($p<0,05$) и 1,4 ($p<0,05$) раза соответственно по сравнению с аналогичным значением животных группы НК. Введение крысам соединения-лидера Sub1 позволило добиться уменьшения неврологического дефицита относительно группы крыс НК в 2,4 ($p<0,05$) раза.

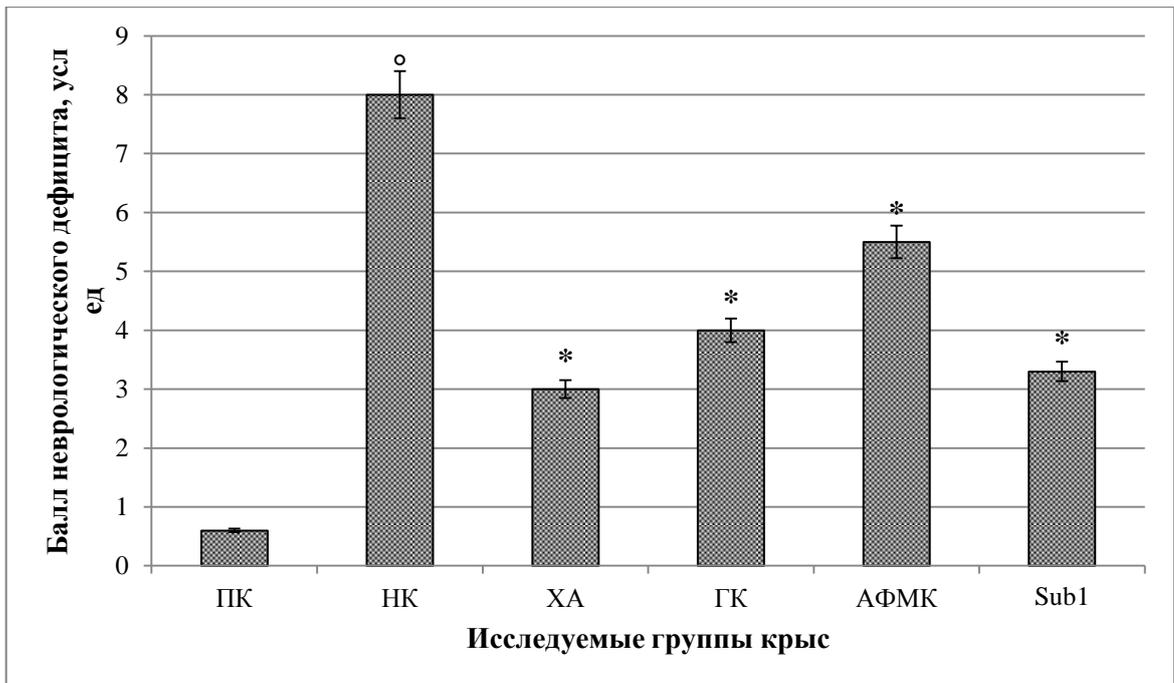


Рисунок 18 – Оценка уровня неврологического дефицита у крыс в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют таблице № 6.

5.2.2 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на содержание маркеров нейродеградации в условиях ХТЭ в модели «Blast wave»

При изучении изменения концентрации специфического маркера нейродеградации, фосфорилированного тау-белка, по истечении суток после моделирования патологии у крыс группы ПК установлено ее значение равно $8,22 \pm 0,213$ пг/мл (рис. 19). Содержание данного биомаркера у животных группы НК возросло относительно значения группы крыс ПК в 28 раз ($p < 0,05$). При введении животным холина альфосцерата отмечено снижение концентрации фосфорилированного тау-белка на 19,3% ($p < 0,05$) по сравнению со значением крыс группы НК. Применение гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты не оказало достоверно значимого изменения содержания исследуемого маркера нейродеградации. В тоже время введение животным соединения-лидера Sub1 позволило уменьшить концентрацию фосфорилированного тау-белка по отношению к группе крыс НК на 19,6% ($p < 0,05$).

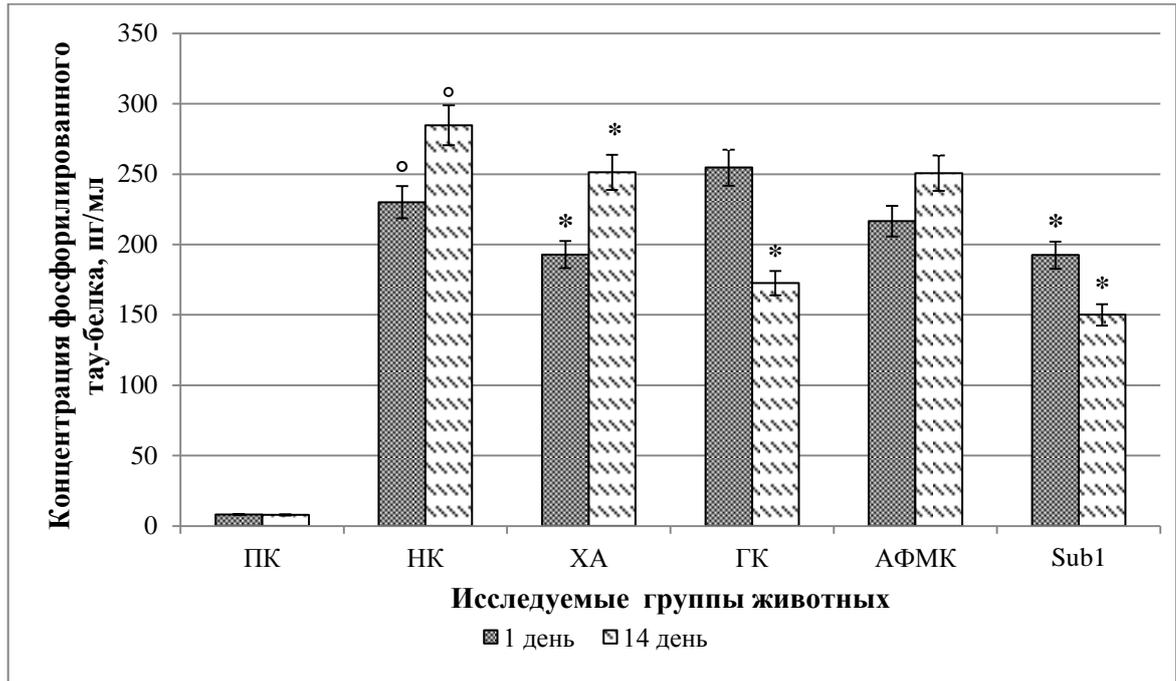


Рисунок 19 – Оценка изменения концентрации фосфорилированного тау-белка у крыс в модели «*Blast wave*» в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)
 Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ([°] - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).
 Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

При оценке содержания фосфорилированного тау-белка у животных группы ПК по истечении 14-дневного срока после моделирования ХТЭ, было отмечено его значение на уровне $7,91 \pm 0,185$ пг/мл. Концентрация изучаемого маркера нейродеградации у группы крыс НК возросла в 36 раз ($p < 0,05$) по отношению к животным группы ПК. Применение холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты способствовало снижению содержания фосфорилированного тау-белка относительно крыс группы НК на 13,3% ($p < 0,05$), 65,2% ($p < 0,05$) и 13,6% соответственно. На фоне введения животным соединения-лидера Sub1 установлено уменьшение концентрации фосфорилированного тау-белка на 89,9% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным значением крыс группы НК.

При изучении изменения уровня $A\beta$, по прошествии 1 суток после моделирования патологии, у животных группы ПК установлено его значение равное $22,17 \pm 0,362$ пг/мл (рис. 20). Содержание данного биомаркера у группы крыс НК выросло относительно животных группы ПК в 22 раза ($p < 0,05$).

Применение холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты позволило снизить концентрацию Аβ в 2,2 ($p<0,05$), 2,9 ($p<0,05$) и 2,2 ($p<0,05$) раза соответственно по сравнению с группой крыс НК. На фоне введения соединения-лидера Sub1 животным отмечено уменьшение содержания Аβ относительно аналогичного показателя у крыс группы НК в 3 раза ($p<0,05$).

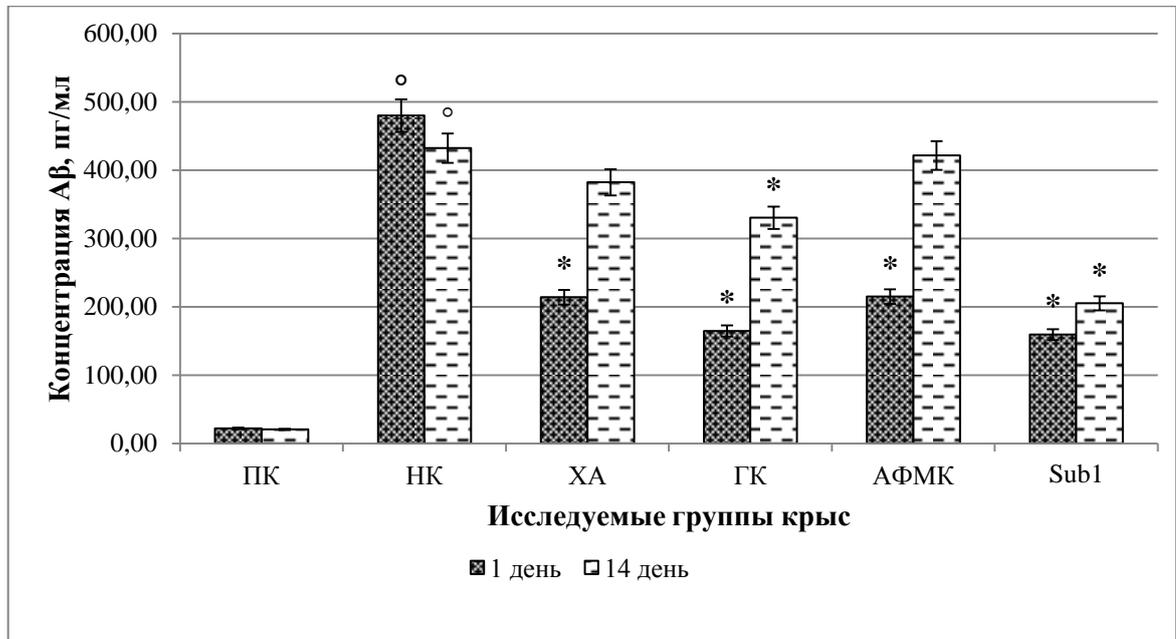


Рисунок 20 – Оценка изменения концентрации Аβ у крыс в модели «*Blast wave*» в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

Оценивая изменение концентрации Аβ по истечении 14-дневного срока, было отмечено у группы крыс ПК ее значение на уровне $20,63\pm 1,211$ пг/мл. Содержание данного показателя у животных группы НК возросло в 21 раз ($p<0,05$) по отношению к крысам группы ПК. При применении холина альфосцерата, гопантеновой кислоты установлено снижение концентрации Аβ относительно группы животных НК в 1,1 и 1,2 раза ($p<0,05$) соответственно. В тоже время введение крысам аминокислоты не привело к достоверно значимому уменьшению содержания данного маркера по отношению к животным группы НК. Применение соединения-лидера Sub1 способствовало

снижению концентрации $A\beta$ в 2,1 раза ($p<0,05$), по сравнению с группой животных НК.

По результатам оценки изменения содержания GFAP по истечении суток после моделирования патологии установлено, что у крыс группы ПК его значение составило $290,35\pm 8,254$ пг/мл (рис. 21). Концентрация данного биомаркера нейродеградации у группы животных НК выросла относительно группы крыс ПК в 12,8 раза ($p<0,05$). На фоне введения животным холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты отмечено снижение концентрации GFAP в 1,9 ($p<0,05$), 1,8 ($p<0,05$) и 2,2 раза ($p<0,05$) соответственно по сравнению с крысами группы НК (рис. 20). Применение соединения-лидера Sub1 позволило уменьшить содержание GFAP относительно крыс группы НК в 4,3 раза ($p<0,05$).

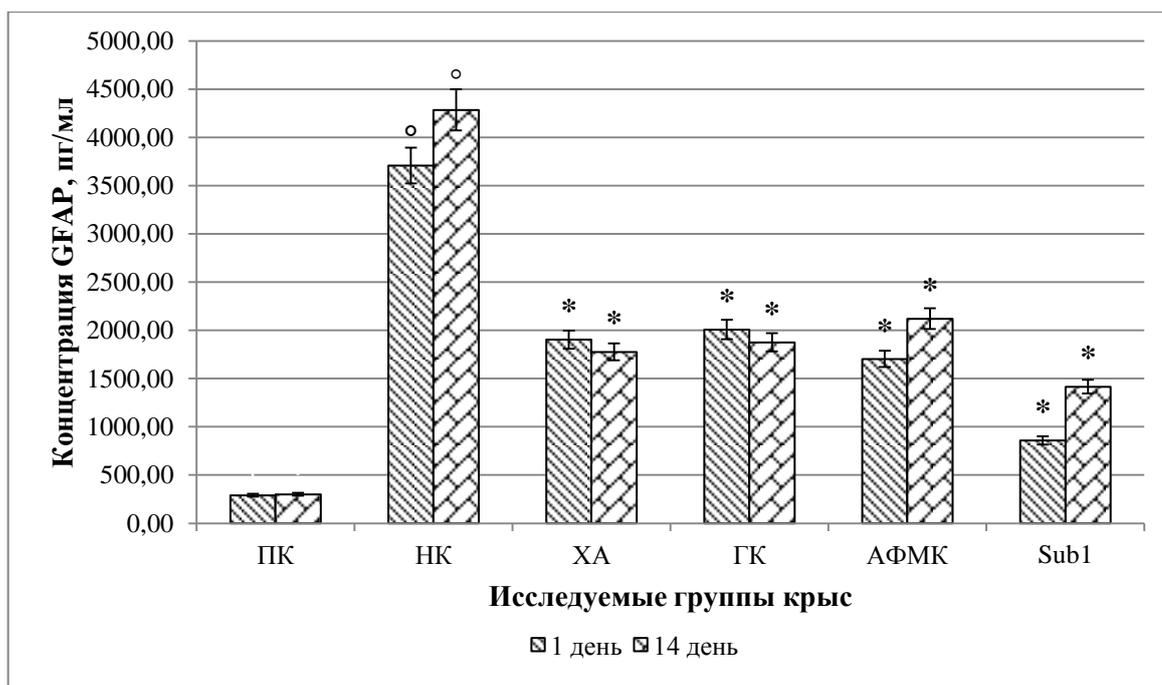


Рисунок 21 – Оценка изменения концентрации GFAP у крыс в модели «*Blast wave*» в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

При оценке изменения концентрации GFAP у животных группы ПК по прошествии 14 дней после воспроизведения ХТЭ было отмечено ее значение на уровне $301,61\pm 6,362$ пг/мл. Содержание данного маркера у крыс группы НК

выросло относительно группы животных ПК в 14,3 раза ($p < 0,05$). При введении крысам холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты установлено снижение концентрации GFAP в 2,4 ($p < 0,05$), 2,3 ($p < 0,05$) и 2,0 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению со значением животных группы НК. На фоне применения соединения-лидера Sub1 наблюдалось уменьшение содержания GFAP относительно группы крыс НК в 3 раза ($p < 0,05$).

5.2.3 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на концентрацию белка AIF в условиях ХТЭ в модели «Blast wave»

При изучении изменения концентрации эффектора апоптоза, AIF, спустя сутки после моделирования патологии установлено, что у крыс группы ПК ее значение составило $9,51 \pm 0,326$ нг/мл (рис. 22). Содержание данного показателя у группы животных НК выросло, относительно крыс группы ПК, на 41,2% ($p < 0,05$). При введении животным холина альфосцерата, гопантеновой кислоты установлено снижение концентрации AIF на 115,9% ($p < 0,05$) и 66,9% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с аналогичным показателем группы крыс НК. На фоне применения аминифенилмасляной кислоты не было установлено достоверно значимого уменьшения содержания исследуемого маркера по отношению к животным группы НК. Введение крысам соединения-лидера Sub1 позволило снизить концентрацию AIF, относительно группы животных НК, на 26,9 % ($p < 0,05$).

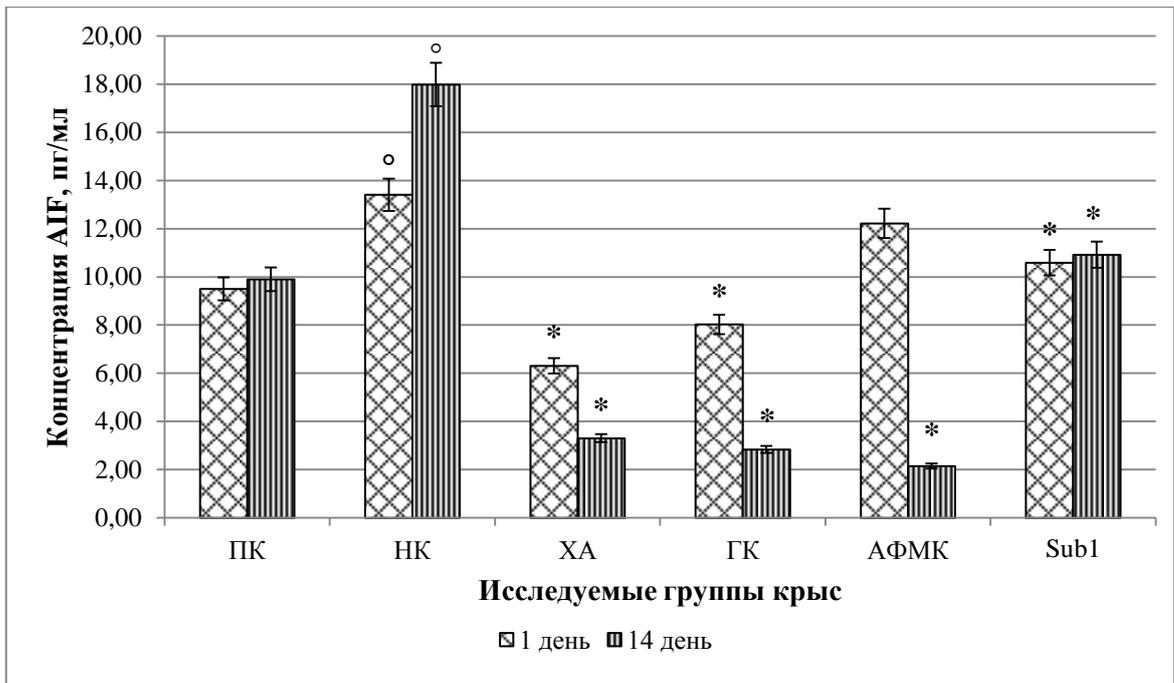


Рисунок 22 – Оценка изменения концентрации AIF у крыс в модели «*Blast wave*» в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

По результатам исследования изменения содержания AIF, по истечении 14 суток после воспроизведения ХТЭ, у крыс группы ПК установлено его значение на уровне $9,91 \pm 0,268$ нг/мл. Концентрация данного эффектора апоптоза у группы животных НК возросла по сравнению с крысами группы ПК в 1,8 раза ($p < 0,05$). На фоне применения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты установлена концентрация AIF в 5,4 ($p < 0,05$), 6,3 ($p < 0,05$) и 8,3 раза ($p < 0,05$) относительно животных группы НК. При введении крысам соединения-лидера Sub1 наблюдалось снижение концентрации AIF в 1,7 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе животных НК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении отсроченного фармакологического эффекта соединения-лидера Sub1 и препаратов сравнения в условиях ХТЭ установлено развитие когнитивного дефицита у крыс группы НК по результатам теста УРПИ. Данное состояние выражалось в уменьшении периода времени латентного захода животных в темный отсек на 76,2% относительно крыс группы ПК. Также выявлено увеличение содержания фосфорилированного тау-белка в коре больших полушарий и гиппокампе, по сравнению с группой животных ПК, в 44,6 и 50,4 раза соответственно. Концентрация А β возросла в коре и гиппокампе в 40 и 15 раз соответственно относительно крыс группы ПК. Вышеперечисленное свидетельствует о развитии процессов нейродеградации в условиях экспериментальной ХТЭ.

На фоне введения крысам препаратов сравнения установлено некоторое восстановление когнитивных функций по сравнению с группой животных НК. Так при применении холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН наблюдалось увеличение периода времени до захода животных в темный отсек в 1,5, 1,6, 3 и 2,8 раза соответственно по сравнению с крысами группы НК. При оценке изменения концентрации фосфорилированного тау-белка в гиппокампе, при применении холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН не наблюдалось достоверно значимого снижения по сравнению с животными группы НК. Определение содержания данного белка в коре показало, что при введении крысам холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН отмечалось уменьшение уровня относительно животных группы НК в 2,5, 2,3, 2,9 и 1,6 раза соответственно. Применение холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата, ПДФТН способствовало снижению концентрации А β в гиппокампе по сравнению с группой крыс НК в 2,2, 3, 2,4 и 3,1 раза соответственно. На фоне введения животным холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, цитруллина малата,

ПДФТН наблюдалось уменьшение содержания $A\beta$ в коре больших полушарий относительно крыс группы НК в 1,3, 1,5, 1,6 и 2,1 раза соответственно.

Применение соединения-лидера Sub1 способствовало снижению когнитивного дефицита животных по сравнению с аналогичным значением группы крыс НК в 2,9 раза, при этом уровень эффекта был достоверно ниже такового при введении холина альфосцерата в 1,9 раза. На фоне применения соединения-лидера Sub1 наблюдалось уменьшение содержания фосфорилированного тау-белка в гиппокампе, относительно группы животных НК, в 3,3 раза, что превосходит по величине фармакологического эффекта препараты сравнения. При введении крысам соединения-лидера Sub1 установлено снижение содержания фосфорилированного тау-белка в коре в 2,2 раза по отношению к группе животных НК, что достоверно меньше уровня эффекта ПДФТН в 1,3 раза. Применение соединения-лидера Sub1 позволило уменьшить концентрацию $A\beta$ в гиппокампе в 7 раз, относительно крыс группы НК, данное снижение достоверно выше такового у ПДФТН в 2,3 раза. Введение соединения-лидера Sub1 животным способствовало уменьшению содержания $A\beta$ в коре больших полушарий в 2,7 раза по отношению к аналогичному значению группы крыс НК, что в свою очередь ниже эффекта от применения холина альфосцерата в 2 раза.

При оценке уровня неврологических функций животных в модели «Blast wave» у группы крыс НК по истечении 14 дней установлено увеличение значения суммарного балла НД относительно группы крыс ПК в 13,3 раза. Концентрация изучаемых маркеров нейродеградации, фосфорилированного тау-белка, $A\beta$, GFAP и белка AIF у группы крыс НК возросла в 36, 21, 14,3 и 1,8 раза соответственно по сравнению с крысами группы ПК.

На фоне применения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты наблюдались снижение степени неврологического дефицита в 2,6, 2,3 и 1,4 раза соответственно по сравнению животными группы НК. Введение крысам холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминокислоты позволило уменьшить содержания

фосфорилированного тау-белка относительно животных группы НК на 13,3%, 65,2% и 13,6% соответственно. При применении холина альфосцерата, гопантевой кислоты установлено снижение концентрации Аβ относительно группы крыс НК в 1,1 и 1,2 раза соответственно. Однако введение животным аминифенилмасляной кислоты не позволило уменьшить содержания данного маркера по отношению к крысам группы НК. На фоне применения вышеперечисленных препаратов наблюдалось снижение концентрации GFAP в 2,4, 2,3 и 2,0 раза соответственно по сравнению со значениями животных группы НК. При введении крысам холина альфосцерата, гопантевой кислоты, аминифенилмасляной кислоты установлено снижение содержания AIF в 5,4, 6,3 и 8,3 раза, относительно животных группы НК.

На фоне применения соединения-лидера Sub1 отмечено уменьшение уровня неврологического дефицита крыс относительно группы животных НК в 2,4 раза. Введение животным соединения-лидера Sub1 позволило снизить концентрацию фосфорилированного тау-белка в 1,9 раза по сравнению с крысами группы НК, данный фармакологический эффект выше такового у холина альфосцерата в 1,7 раза. Применение соединения-лидера Sub1 способствовало уменьшению содержания Аβ в 2,1 по сравнению с группой животных НК, что в свою очередь ниже показателя аминифенилмасляной кислоты в 2,1 раз. На фоне введения крысам соединения-лидера Sub1 наблюдалось снижение концентрации GFAP относительно группы животных НК в 3 раза, данный фармакологический эффект выше такового у холина альфосцерата в 1,3 раза. При применении соединения-лидера Sub1 отмечено уменьшение содержания AIF на 1,7, по отношению к группе крыс НК.

Исходя из полученных данных, следует, что соединение-лидер Sub1 обладает выраженным церебропротекторным действием. Последнее выражается в нивелировании развития когнитивного дефицита у крыс спустя 60 дней после введения фармакологической поддержки, при этом степень влияния превосходила или достоверно не отличалась от эффекта применения препаратов сравнения. Оценивая состояние нейродегенеративных процессов, можно сказать, что

введение соединения-лидера Sub1 позволило сократить концентрацию маркеров нейродеградации, при этом степень изменения достоверно значимо не отличалась или превосходила эффекты препаратов сравнения.

При исследовании воздействия соединения-лидера Sub1 на течение ХТЭ при использовании модели «Blast wave» установлено, что уровень НД был сопоставим с таковым при введении препаратов сравнения. В тоже время введение соединения-лидера Sub1 позволило сократить концентрацию маркеров нейродеградации, при этом степень снижения превосходила действие препаратов сравнения, что свидетельствует об уменьшении деструкции клеток головного мозга.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА SUB1 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХТЭ

Исходя из данных литературных источников, ведущими механизмами развития ХТЭ, вероятно, выступают церебральная эндотелиальная и митохондриальная дисфункции. Изучению данных процессов была посвящена следующая серия экспериментов.

6.1 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на эндотелиальные функции церебральных сосудов в условиях ХТЭ

Физиологическое функционирование сосудистого эндотелия, по данным литературы, выступает одним из ведущих факторов, регулирующих тонус сосудов, реологические свойства крови, процессы воспаления и пролиферации. При ХТЭ наблюдаются процессы, стимулирующие повышение тонуса сосудов, образование тромбов, воспаление [225], что способствует гибели клеток ЦНС, приводящей в свою очередь к развитию неврологического, сенсомоторного дефицитов, нарушению когнитивных функций.

Для изучения эндотелиотропного действия препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 в условиях экспериментальной ХТЭ было рассмотрено влияние исследуемых соединений на вазодилатирующую активность эндотелия сосудов головного мозга, степень агрегационной способности тромбоцитов, как противотромботическая функция эндотелия церебральных сосудов. Также изучены параметры плазменного гемостаза и активность противосвертывающей системы.

6.1.1 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов и уровень церебрального кровотока в условиях ХТЭ

При оценке вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга было установлено, что у группы животных ПК исходная СМК составила $4,053 \pm 0,185$ см/сек (рис. 23). При введении крысам АЦХ происходило увеличение

СМК на 46,9% ($p < 0,05$), инъекция L-NAME, блокатора продукции NO, способствовала снижению скорости на 23,9% ($p < 0,05$) (рис. 25). При внутривенном введении L-аргинина у данной группы животных не было отмечено достоверно значимого изменения СМК относительно исходного уровня церебральной гемодинамики. Изучая эндотелий-независимую вазодилатацию у крыс группы ПК, при инстилляции нитроглицерина наблюдалось возрастание СМК по сравнению с первоначальной скоростью на 52,1% ($p < 0,05$) (рис. 24). Полученные экспериментальные данные сопоставимы со сведениями литературных источников [13].

У группы крыс НК в условиях модельной ХТЭ относительно животных группы ПК наблюдалось снижение СМК в 3,3 раза ($p < 0,05$). При введении крысам АЦХ было установлено увеличение последней по отношению к исходному уровню на 18,5%, что значительно меньше аналогичного значения у животных группы ПК. В тоже время внутривенная инъекция L – аргинина способствовала возрастанию СМК на 28,9% ($p < 0,05$) от ее исходного уровня. Введение L-NAME группе крыс НК привело к снижению СМК в 1,2 раза, относительно исходной скорости, данное значение меньше аналогичной сосудистой реакции у животных группы ПК в 4,3 раза ($p < 0,05$). Проанализировав полученные в ходе исследования данные, можно судить о снижении уровня мозговой гемодинамики у крыс группы НК, характеризующееся развитием эндотелиальной дисфункции с нарушением функций NO-образующей системы и эндотелий-зависимой регуляции тонуса сосудов, также о развитие феномена «L-аргининового парадокса». Введение животным нитроглицерина привело к увеличению СМК относительно исходного значения на 53,8% ($p < 0,05$), что достоверно не отличается от показателя крыс группы ПК.

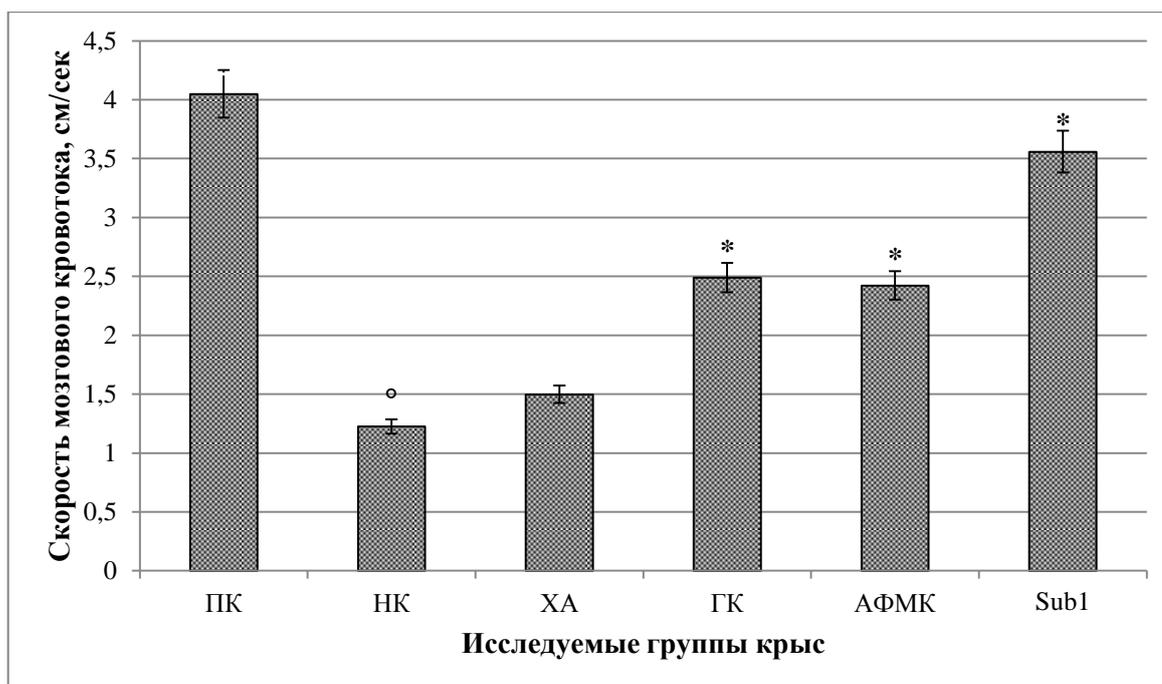


Рисунок 23 - Изменение скорости локального мозгового кровотока в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы ($*$ - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

На фоне применения у крыс холина альфосцерата не установлено достоверно значимого увеличения СМК по сравнению с животными группы НК. При введении крысам АЦХ происходило возрастание СМК на 42,7% ($p < 0,05$) относительно исходного значения. Внутривенная инъекция животным L – аргинина способствовала увеличению СМК по сравнению с исходным показателем на 41,8% ($p < 0,05$). При инстиляции крысам L-NAME наблюдалось снижение уровня церебрального кровотока на 47,7% ($p < 0,05$) по отношению к первоначальному значению. Внутривенное введение животным нитроглицерина приводило к увеличению СМК на 49,9% ($p < 0,05$) относительно исходного уровня кровотока.

При применении у крыс гопантеновой кислоты было отмечено возрастание скорости церебрального кровотока на 103,1% ($p < 0,05$) по отношению к аналогичному показателю животных группы НК. Внутривенная инъекция крысам АЦХ способствовала увеличению СМК относительно исходного уровня на 45,4% ($p < 0,05$). При введении животным L – аргинина наблюдалось возрастание СМК на

12,3% по сравнению с первоначальным значением. Внутривенная инстиляция крысам L-NAME приводила к уменьшению СМК по отношению к исходному уровню кровотока на 16,8%, что достоверно не отличалось от показателя НК группы животных. При введении крысам нитроглицерина наблюдалось увеличение СМК на 49,6% ($p < 0,05$) относительно первоначального значения.

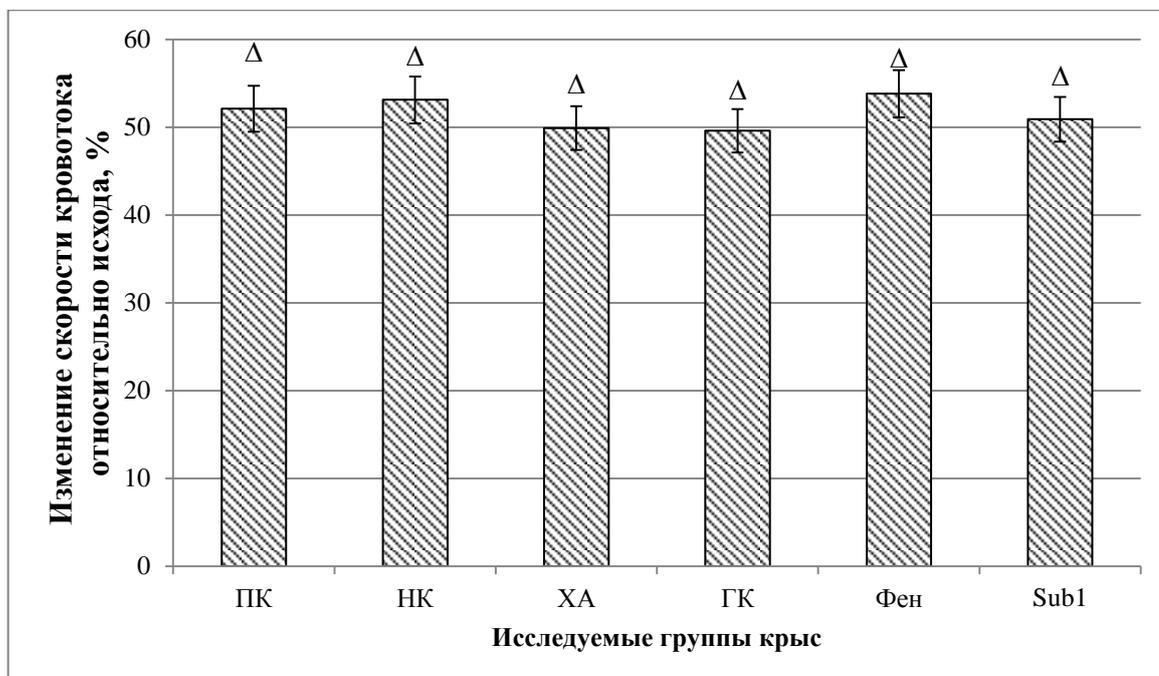


Рисунок 24 - Изменение эндотелий-независимой вазодилатации в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно исходного уровня кровотока (Δ - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

У группы животных, которым вводили аминифенилмасляную кислоту, наблюдалось возрастание СМК по сравнению с крысами группы НК на 97,6% ($p < 0,05$). При введении животным АЦХ было отмечено увеличение СМК на 20,2% относительного исходного значения, что достоверно не отличается от показателя НК группы крыс. На фоне внутривенной инъекции животным L – аргинина происходило возрастание СМК по отношению к первоначальной на 10,7%. Введение крысам L-NAME приводило к уменьшению СМК на 11,1% в сравнении с исходным уровнем. Внутривенная инстиляция животным нитроглицерина способствовала увеличению СМК на 53,8% ($p < 0,05$) относительно первоначального значения.

На фоне применения у животных соединения-лидера Sub1 установлено увеличение СМК на 190,3% ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс НК. При введении животным АЦХ наблюдалось возрастание СМК по сравнению с исходным значением на 40,1% ($p < 0,05$), что достоверно не отличается от показателя группы крыс ПК. Внутривенная инстилляционная животным L – аргинина способствовала увеличению СМК на 11,8% ($p < 0,05$) относительно первоначального уровня. Введение крысам L-NAME приводило к уменьшению СМК по сравнению с исходным значением на 20,3% ($p < 0,05$), что достоверно не отличается от показателя группы животных ПК. При внутривенной инъекции нитроглицерина крысам наблюдалось увеличение СМК относительно первоначального уровня на 50,9% ($p < 0,05$).

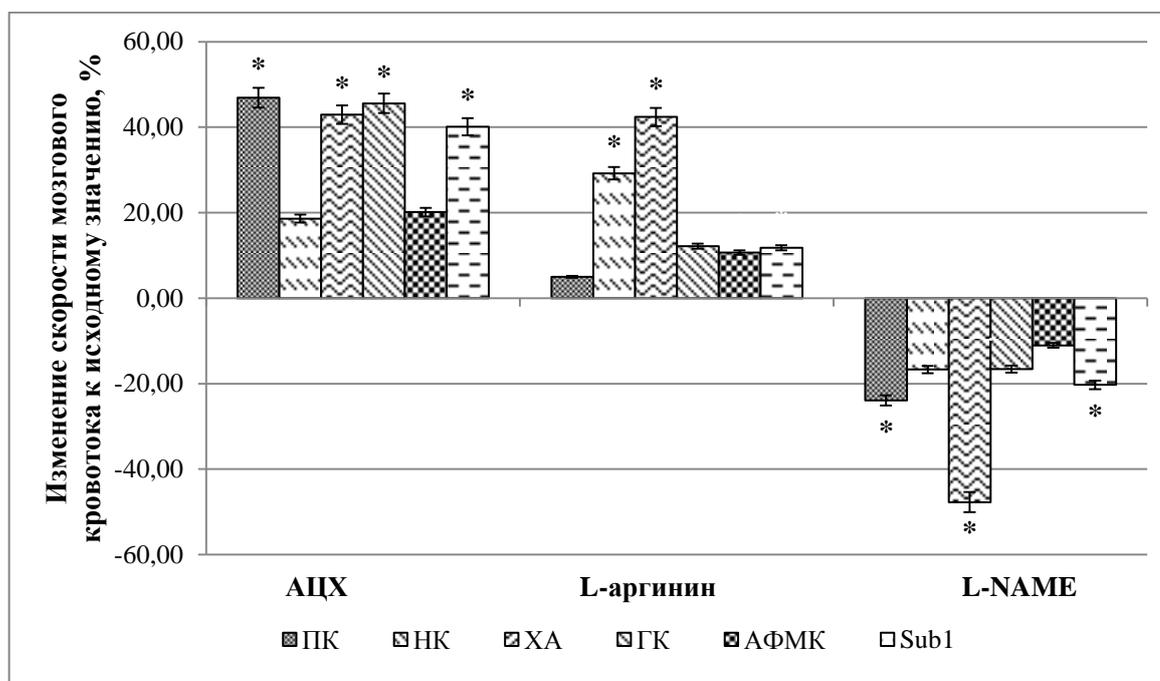


Рисунок 25 - Изменение состояния вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно исходного уровня церебральной гемодинамики (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

6.1.2 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на степень агрегационной способности тромбоцитов в условиях ХТЭ

При изучении противотромботической функции эндотелия церебральных сосудов установлено, что степень и скорость агрегации тромбоцитов у группы

крыс ПК были равные соответственно $1,487 \pm 0,201$ и $1,096 \pm 0,126$ усл. ед (рис. 26). У животных группы НК на фоне экспериментальной ХТЭ отмечено увеличение степени в 8,7 раза ($p < 0,05$) и скорости агрегации тромбоцитов в 14,7 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс ПК. Концентрация тромбоцитов в крови исследуемых крыс достоверно значимо не отличалась.

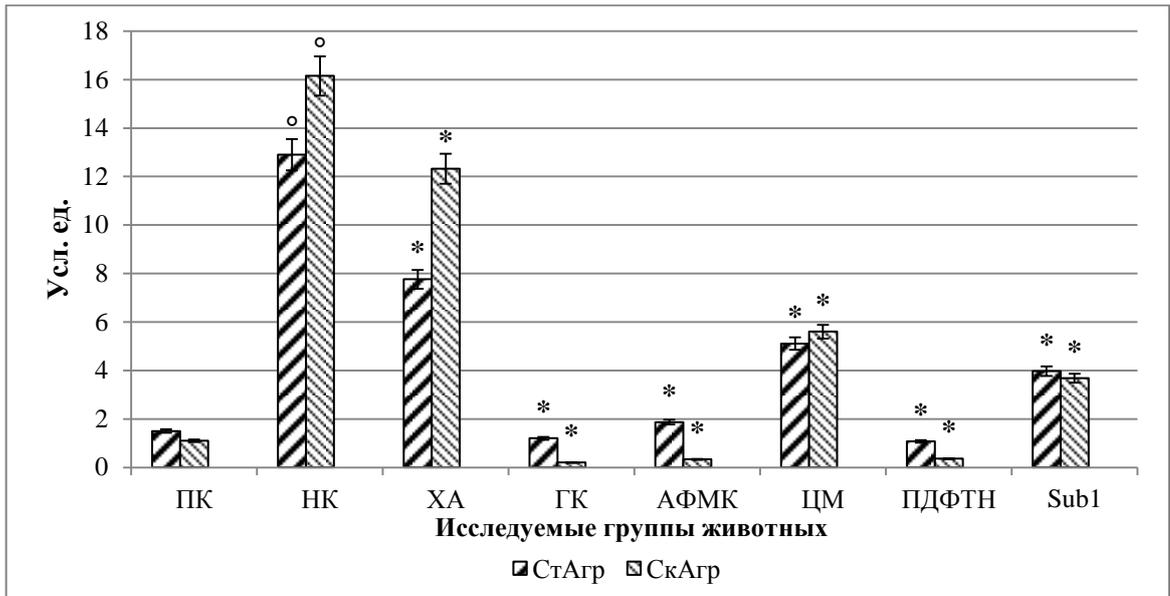


Рисунок 26 – Оценка изменения антитромботической функции эндотелия церебральных сосудов в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

СкАгр – скорость агрегации тромбоцитов

СтАгр – степень агрегации тромбоцитов

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

На фоне введения животным гопантеновой кислоты, аминокислоты, ПДФТН установлено уменьшение степени агрегации тромбоцитов по сравнению с крысами группы НК в 10,8 ($p < 0,05$), 6,9 ($p < 0,05$) и 12 раз ($p < 0,05$) соответственно. В тоже время отмечено снижение скорости агрегации тромбоцитов при применении указанных препаратов в 80,8 ($p < 0,05$), 49,8 ($p < 0,05$) и 44,8 раза ($p < 0,05$) относительно животных группы НК. Введение крысам холина альфосцерата и цитруллина малата позволило уменьшить степень агрегации тромбоцитов по сравнению с животными группы НК в 1,7 ($p < 0,05$) и 2,5 раза

($p < 0,05$), и скорость агрегации в 1,3 ($p < 0,05$) и 2,9 раза ($p < 0,05$) соответственно. На фоне применения у крыс соединения-лидера Sub1 установлено снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов в 3,2 ($p < 0,05$) и 4,4 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно животных группы НК.

6.1.3 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на некоторые параметры плазменного гемостаза, активность противосвертывающей системы в условиях ХТЭ

При оценке АЧТВ у группы крыс ПК установлено значение равное $33,2 \pm 1,023$ с (рис. 27). В тоже время у животных группы НК в условиях экспериментальной ХТЭ отмечалось снижение исследуемого показателя на 149,6% ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК. Применение у животных холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты позволило увеличить АЧТВ по сравнению с группой крыс НК на 51,4% ($p < 0,05$), 14,3% ($p < 0,05$) и 30,1% ($p < 0,05$) соответственно. При введении животным соединения-лидера Sub1 установлена нормализация значения показателя на 36,8% ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК.

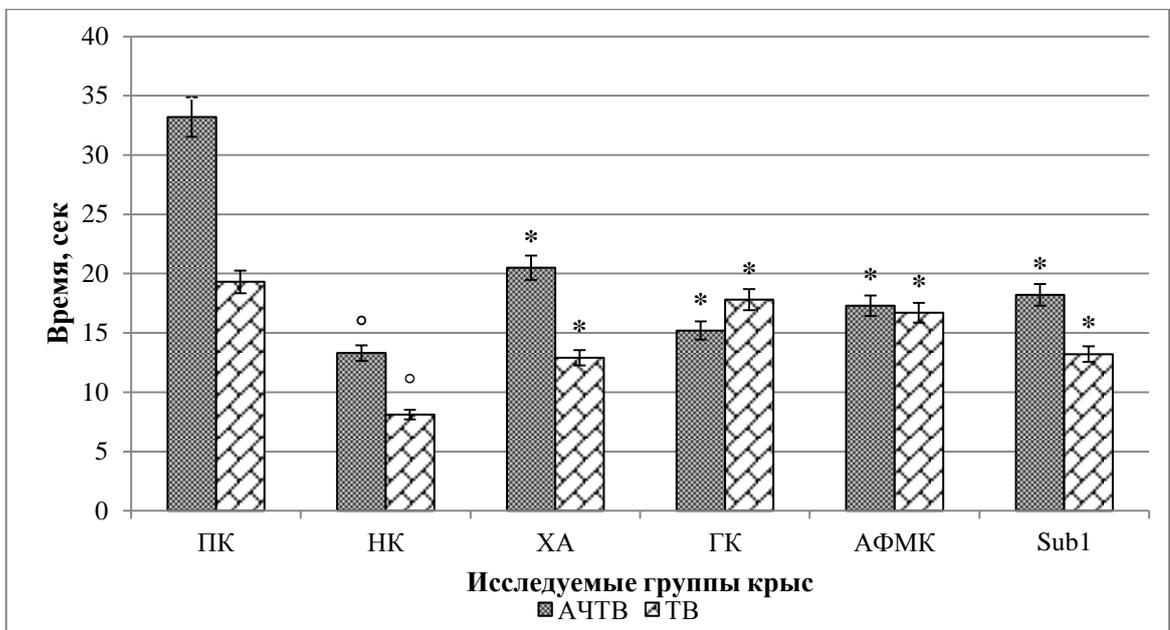


Рисунок 27 – Оценка изменения АЧТВ и ТВ в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

В ходе определения ТВ у группы животных ПК его значение составило $19,3 \pm 1,382$ с. У крыс группы НК данный показатель уменьшился по сравнению с группой животных ПК на 138,3% ($p < 0,05$). На фоне применения у крыс холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты установлено увеличение ТВ на 59,2% ($p < 0,05$), 119,7% ($p < 0,05$) и 106,2% ($p < 0,05$) соответственно относительно животных группы НК. Введение крысам соединения-лидера Sub1 привело к нормализации данного показателя плазменного гемостаза по сравнению с животными группы НК на 62,9% ($p < 0,05$).

При оценке концентрации фибриногена установлено, что у животных группы ПК ее значение составило $1,49 \pm 0,145$ г/л (табл. 7). Содержание данного показателя у группы крыс НК увеличилось относительно животных ПК группы в 4 раза ($p < 0,05$). При применении у крыс холина альфосцерата, аминифенилмасляной кислоты отмечено снижение концентрации фибриногена в 1,6 ($p < 0,05$) и 1,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными группы НК. Введение крысам гопантеновой кислоты не привело к достоверно значимому изменению содержания исследуемого показателя относительно животных группы НК. Применение у крыс соединения-лидера Sub1 позволило нормализовать концентрацию фибриногена в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными группы НК.

Таблица 7 – Результаты оценки изменения показателей плазменного гемостаза в условиях ХТЭ и ее коррекции

Показатель	ПК	НК	ХА	ГК	АФМК	Sub1
Фибриноген, г/л (M±m)	$1,49 \pm 0,14$	$5,90 \pm 0,35^\circ$	$3,70 \pm 0,25^*$	$5,53 \pm 0,51$	$3,37 \pm 0,33^*$	$2,60 \pm 0,88^*$
НО, усл.ед. (M±m)	$1,02 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02^\circ$	$0,92 \pm 0,05^*$	$0,89 \pm 0,03^*$	$0,83 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,02^*$

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^\circ$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

НО – нормализованное отношение, характеризует активность системы протеина С.

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

Оценивая активность противосвертывающей системы протеина С у крыс группы ПК установлено, что ее значение было равно $1,02 \pm 0,008$ усл. ед. В тоже время у группы животных НК данный показатель снизился относительно крыс ПК группы на 29% ($p < 0,05$). Применение у животных холина альфосцерата,

гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты позволило добиться увеличения активности системы протеина С на 26% ($p < 0,05$), 21,9% ($p < 0,05$) и 13,7% по отношению к животным группы НК. При введении крысам соединения-лидера Sub1 установлено увеличение исследуемого показателя по сравнению с животными группы НК на 17,8% ($p < 0,05$).

6.2 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на митохондриальные функции в условиях экспериментальной ХТЭ

Данная серия экспериментов была посвящена изучению действия препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на митохондриальную дисфункцию, которая является одним из ведущих параметров патогенеза ХТЭ [211]. Были исследованы такие функции митохондрий, как респирометрическая, антиоксидантная и регулирующая апоптоз. Физиологическая активность последних обеспечивает необходимый уровень метаболизма, способствующий функционированию клеток нервной системы.

6.2.1 Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на респирометрическую функцию в условиях экспериментальной ХТЭ

Исследуемыми параметрами выступали: АТФ-генерирующая активность, степень которой напрямую характеризует состояние энергодефицита; интенсивность гликолиза, свидетельствующая об уровне развития лактат-ацидоза, снижения содержания макроэргов, образования недоокисленных продуктов в условиях экспериментальной ХТЭ.

При оценке респирометрической функции митохондрий у животных группы ПК было установлено, что АТФ-генерирующая способность составила $1,02 \pm 0,256$ ppm (рис. 28) [27]. В тоже время значение данного показателя у группы крыс НК снизилось в 2 раза ($p < 0,05$) относительно животных группы ПК. При применении у крыс препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты отмечено увеличение АТФ-генерирующей

способности митохондрий по отношению к животным группы НК в 4,2 ($p<0,05$), 5,3 ($p<0,05$) и 3,3 раза ($p<0,05$) соответственно. На фоне введения крысам цитруллина малата, ПДФТН наблюдалось повышение АТФ-генерирующей активности в 4,1 ($p<0,05$) и 2,7 раза ($p<0,05$) относительно группы животных НК. Применение у крыс соединения-лидера Sub1 позволило увеличить АТФ-генерирующую способность митохондрий по сравнению с аналогичным значением животных группы НК в 6,5 раза ($p<0,05$).

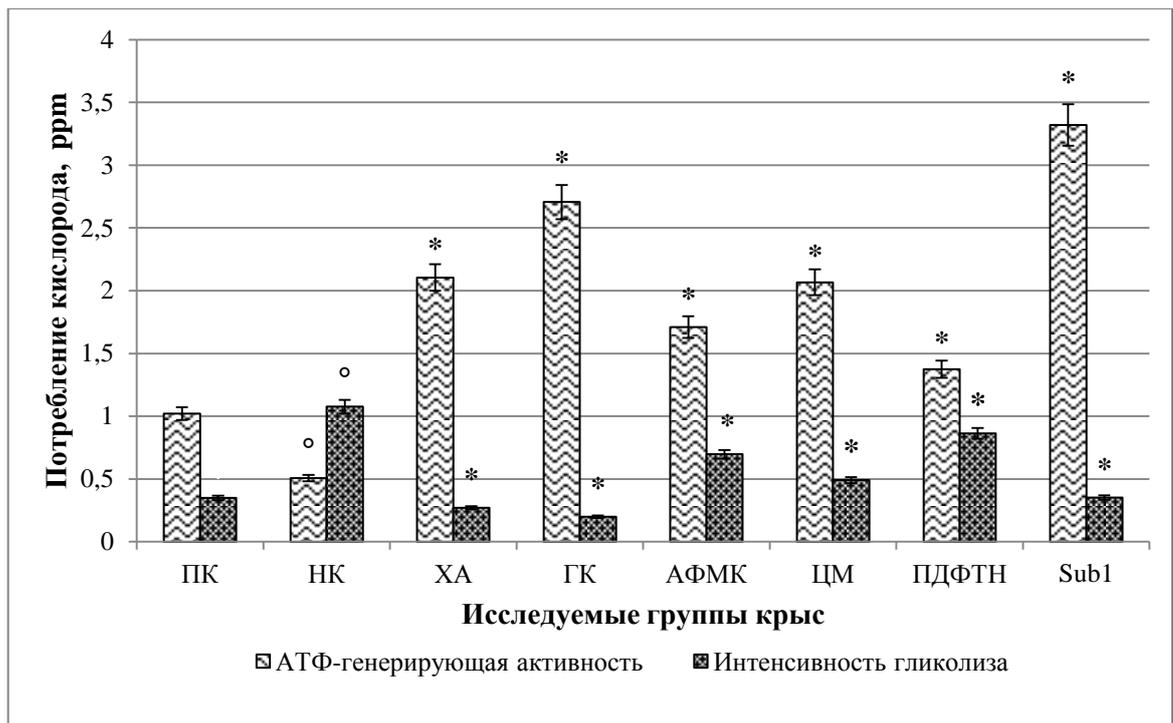


Рисунок 28 – Изменения респирометрической функции митохондрий у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M\pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$)

ПК - группа животных положительного контроля; НК - группа крыс негативного контроля; ХА – группа животных, получавшая холина альфосцерат; ГК – группа крыс, которым вводили гопантеновую кислоту; АФМК - группа животных, получавших аминифенилмасляная кислота; ЦМ – крысы группы, которым вводили цитруллина малат; ПДФТН – группа животных, получавшая ПДФТН; Sub1 – группа крыс, которым вводили соединение-лидер Sub1 в дозе 100 мг/кг.

При определении уровня гликолитических процессов было отмечено следующее, у группы животных ПК интенсивность гликолиза составила $0,35\pm 0,020$ ppm, что соответствует данным литературы [27]. В тоже время у крыс группы НК значение данного показателя выросло в 3,6 раза ($p<0,05$) относительно

группы животных ПК. На фоне введения крысам препаратов сравнения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты наблюдалось снижение интенсивности гликолиза по сравнению с животными группы НК в 4,0 ($p < 0,05$), 5,4 ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно. При применении у крыс цитруллина малата, ПДФТН было отмечено уменьшение уровня гликолитических процессов в 2,2 ($p < 0,05$) и 1,2 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе животных НК. Введение крысам соединения-лидера Sub1 способствовало снижению интенсивности гликолиза относительно животных группы НК в 3,1 раза ($p < 0,05$).

6.2.2 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на антиапоптотическую функцию в условиях экспериментальной ХТЭ

При формировании ХТЭ одним из ведущих факторов патогенеза выступает гиперактивация апоптотической гибели клеток. Деградация нейронов и глии приводит к прогрессированию заболевания, увеличивая степень тяжести клинических проявлений, выражающихся в виде поведенческих, когнитивных, сенсомоторных расстройств [137]. В условиях ХТЭ наблюдается повышенная концентрация основного эффектора собственного пути апоптоза, АИФ, уменьшение концентрации которого, вероятно, будет свидетельствовать о снижении апоптотической гибели клеток головного мозга.

При изучении антиапоптотической активности исследуемых соединений в виде снижения концентрации АИФ установлено, что у крыс группы ПК ее значение составило $9,5 \pm 0,251$ нг/мл (рис. 29). Содержание данного показателя у группы животных НК выросло относительно крыс группы ПК в 2 раза ($p < 0,05$). На фоне применения у животных холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты установлено снижение концентрации АИФ в 3,0 ($p < 0,05$), 4,6 ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно по отношению к значению группы крыс НК. В тоже время введение животным соединения-лидера Sub1 позволило добиться достоверного уменьшения содержания АИФ по сравнению с аналогичным показателем крыс группы НК в 1,9 раза ($p < 0,05$).

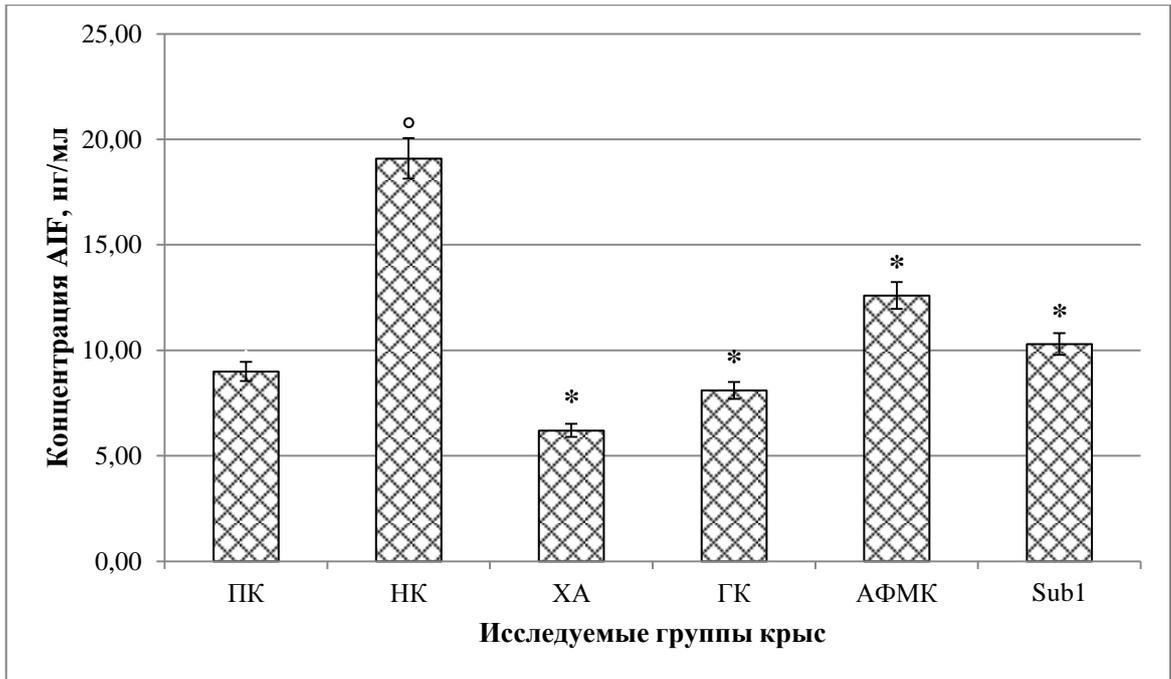


Рисунок 29 – Оценка изменения концентрации АИФ у крыс в условиях ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 3.

6.3 Оценка влияния препаратов сравнения и соединения-лидера Sub1 на антиоксидантную функцию в условиях экспериментальной ХТЭ

Дисфункция антиоксидантной системы клетки, вероятно, является одним из ключевых параметров патогенеза ХТЭ. Повышенное содержание свободных радикалов приводит к прямому повреждению клеточных структур ЦНС, также способствуя активации апоптотической гибели. Антиоксидантная защита клетки осуществляется посредством действия ферментов СОД, ГП, ГР. Следовательно, индукция вышеназванных ферментов способна уменьшить концентрацию АФК, тем самым снизить церебротропное повреждающее действие.

При определении концентрации ТБК-активных продуктов, в пересчете на МДА, установлено ее значение у крыс группы ПК равное $10,1 \pm 0,576$ нмоль/мг (табл. 8). В тоже время у группы животных НК данный показатель увеличился на 92,1% ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК. На фоне введения животным холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты,

цитруллина малата, ПДФТН установлено снижение содержания ТБК-активных продуктов по сравнению с крысами группы НК на 61,9% ($p<0,05$), 107,4% ($p<0,05$), 29,9% ($p<0,05$), 45,8% ($p<0,05$) и 12,6% ($p<0,05$) соответственно. Применение у животных соединения-лидера Sub1 позволило добиться достоверно значимого уменьшения концентрации ТБК-активных продуктов по отношению к крысам группы НК на 116,8% ($p<0,05$).

Таблица 8 – Результаты оценки изменения концентрации ТБК-активных продуктов в условиях ХТЭ и ее коррекции

Показатель	ПК	НК	ХА	ГК	АФМК	ЦМ	ПДФТН	Sub1
Концентрация, нмоль/мг (M±m)	4,93 ±0,477	19,39 ±0,679°	11,97 ±1,064 *	9,35 ±0,279 *	14,92 ±1,861 *	13,16 ±1,552 *	17,2 2±1,164*	8,81 ±0,193 *

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных (° - $p<0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p<0,05$).

Условные обозначения соответствуют рисунку № 28.

Активность СОД у группы животных ПК составила $307,75 \pm 2,012$ ед. акт/мг (рис. 30). В тоже время у крыс группы НК значение исследуемого показателя снизилось относительно животных ПК на 150,4% ($p<0,05$). На фоне применения у крыс холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты установлено восстановление активности СОД на 83,7% ($p<0,05$), 73,3% ($p<0,05$) и 48,1% ($p<0,05$) по сравнению с животными группы НК. Введение крысам цитруллина малата, ПДФТН позволило увеличить значение исследуемого показателя относительно группы животных НК на 71,6% ($p<0,05$) и 60,3% ($p<0,05$) соответственно. Применение у крыс соединения-лидера Sub1 способствовало повышению активности СОД на 113,3% ($p<0,05$) по отношению к животным группы НК.

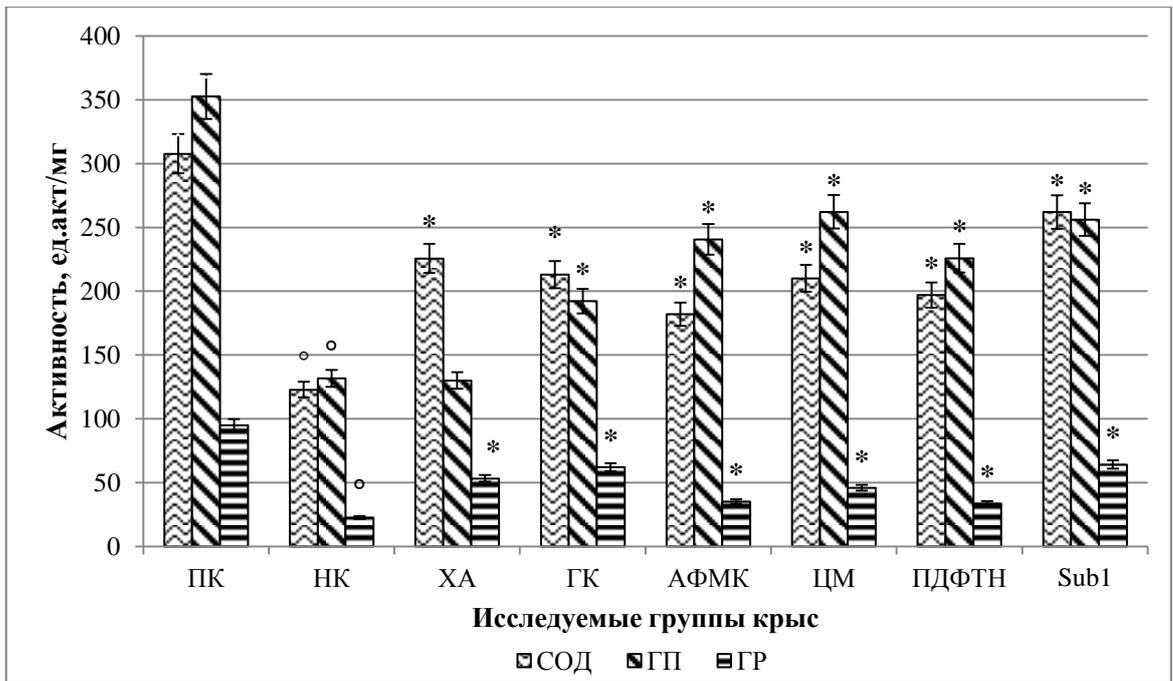


Рисунок 30 – Изменения антиоксидантной функции митохондрий у исследуемых групп животных в условиях экспериментальной ХТЭ и ее коррекции ($M \pm m$)

Примечание: статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейлса) относительно ПК группы животных ($^{\circ}$ - $p < 0,05$), относительно крыс НК группы (* - $p < 0,05$). Условные обозначения соответствуют рисунку № 28.

При определении степени активности ГП установлено, что у группы животных ПК ее значение составило $352,64 \pm 5,786$ ед. акт/мг. В тоже время у крыс группы НК данный показатель снизился относительно группы животных ПК на 167,7% ($p < 0,05$). Введение крысам холина альфосцерата не привело к достоверно значимому изменению активности ГП по сравнению с аналогичным значением животных группы НК. Применение у крыс гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты, цитруллина малата, ПДФТН способствовало увеличению исследуемого показателя по отношению к животным группы НК на 45,9% ($p < 0,05$), 82,6% ($p < 0,05$), 99,1% ($p < 0,05$) и 71,4% ($p < 0,05$) соответственно. При введении животным соединения-лидера Sub1 установлено достоверно значимое повышение активности ГП на 94,4% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

При определении уровня активности ГР у животных группы ПК отмечено значение на уровне $94,93 \pm 2,356$ ед. акт/мг. У группы крыс НК установлено

уменьшение данного показателя по сравнению с аналогичным у животных группы ПК в 4,2 раза ($p < 0,05$). Применение у крыс холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты позволило увеличить активность ГР в 2,4 ($p < 0,05$), 2,7 ($p < 0,05$) и 1,5 ($p < 0,05$) раза относительно животных группы НК. На фоне введения крысам цитруллина малата и ПДФТН установлено восстановление функции данного фермента по сравнению с животными группы НК в 2,0 ($p < 0,05$) и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. Применение у крыс соединения-лидера Sub1 способствовало увеличению активности ГР в 2,9 раза ($p < 0,05$) относительно животных группы НК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучая потенциальные механизмы церебропротекторного действия соединения-лидера Sub1 в условиях ХТЭ у крыс группы НК установлено нарушение структурно-функциональной целостности эндотелия церебральных сосудов (эндотелиальная дисфункция). Данное состояние проявлялось в виде нарушения вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия, что, в свою очередь, выразилось в снижении СМК у НК группы крыс в 3,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с ПК группой животных. Также в условиях экспериментальной ХТЭ у крыс без фармакологической поддержки отмечалось увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов в 8,7 ($p < 0,05$) и 14,7 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно крыс группы ПК. Кроме того у данной группы животных установлены нарушения плазменного гемостаза в виде сокращения времени АЧТВ, ТВ в 2,5 ($p < 0,05$) и 2,4 раза ($p < 0,05$), сопровождаемое повышением концентрации фибриногена в 4 раза ($p < 0,05$) и уменьшением активности противосвертывающей системы протеина С в 1,3 раза ($p < 0,05$), что в совокупности может свидетельствовать о нарушении антитромботической функции эндотелия. В тоже время у НК группы крыс отмечено развитие митохондриальной дисфункции, проявляющейся в виде снижения АТФ-генерирующей способности в 2 раза ($p < 0,05$), интенсификация процессов гликолиза в 3,6 раза ($p < 0,05$), достоверно значимого уменьшения активности ферментов системы антиоксидантной защиты организма, что, в свою очередь, приводило к усилению продукции фактора апоптоза AIF в 2 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК.

Применение препаратов сравнения привело к некоторому восстановлению функции митохондрий и эндотелия сосудов. При этом наиболее выраженный эффект был отмечен при применении гопантеновой кислоты. На фоне введения крысам данного препарата сравнения отмечено восстановление уровня церебрального кровотока в 2 раза ($p < 0,05$), сосудистой реакции в ответ на внутривенное введение эндотелий-специфичных анализаторов,

антитромботической функции эндотелия сосудов, что подтверждается уменьшением степени и скорости агрегации тромбоцитов в 10,8 ($p < 0,05$) и 80,8 раза ($p < 0,05$), и нормализацией плазменного компонента гемостаза относительно крыс группы НК. В тоже время применение гопантеновой кислоты привело к восстановлению АТФ-генерирующей способности в 5,3 раза ($p < 0,05$), снижению интенсивности гликолиза в 5,4 раза ($p < 0,05$). Также установлено восстановление активности СОД в 1,7 раза ($p < 0,05$), уменьшение концентрации МДА в 2,1 раза ($p < 0,05$) и апоптоз-индуцирующего фактора АИФ в 4,6 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК. Введение животным аминокислоты, цитруллина малата, ПДФТН и холина альфосцерата оказало менее выраженное по силе фармакологического эффекта действие на изучаемые патогенетические механизмы ХТЭ.

Применение соединения-лидера Sub1 способствовало увеличению СМК относительно крыс группы НК в 2,9 раза ($p < 0,05$), что достоверно больше аналогичного значения животных группы, получавших гопантеновую кислоту, в 1,4 раза ($p < 0,05$). При внутривенном введении эндотелий-специфичных анализаторов, АЦХ, L-NAME, L – аргинина уровень сосудистой реакции достоверно не отличался от показателя группы животных ПК. Установлено снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов в 3,2 ($p < 0,05$) и 4,4 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, что меньше эффекта при введении холина альфосцерата в 2,0 ($p < 0,05$) и 3,3 ($p < 0,05$) раза соответственно. Также при применении Sub1 отмечена нормализация показателей АЧТВ, ТВ на 36,8% ($p < 0,05$) и 62,9% относительно крыс группы НК. В тоже время активность противосвертывающей системы протеина С увеличилась на 17,8% ($p < 0,05$), концентрация фибриногена снизилась на 126,9% ($p < 0,05$) по отношению к крысам группы НК.

При оценке влияния соединения-лидера Sub1 на митохондриальные функции в условиях ХТЭ установлено увеличение АТФ-генерирующей способности по сравнению с крысами группы НК, в 6,2 раза ($p < 0,05$), что достоверно превосходило значение группы животных, получавших гопантеновую

кислоту на 23% ($p < 0,05$). При этом интенсивность гликолиза, относительно крыс группы НК, снизилась в 3,1 раза ($p < 0,05$), что меньше аналогичного значения животных группы, которым вводили ПДФТН в 2,5 раза ($p < 0,05$). Установлено, что концентрация ТБК-активных продуктов по отношению к крысам группы НК сократилась в 2,2 раза ($p < 0,05$), что было достоверно ниже показателя животных, получавших холина альфосцерат на 35,8% ($p < 0,05$). При этом активность СОД восстановилась в 2,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с крысами группы НК, что превосходит фармакологический эффект аминофенилмасляной кислоты в 1,5 раза ($p < 0,05$). Также содержание АИФ у крыс, получавших соединение-лидер Sub1, относительно группы животных НК снизилось в 1,8 раза ($p < 0,05$), что выразеннее действия аминофенилмасляной кислоты в 1,2 раза ($p < 0,05$).

Исходя из вышесказанного, следует, что соединение Sub1 оказывает непосредственное влияние на вероятные звенья патогенеза. Так, при его введении установлена скорость церебрального кровотока, достоверно не отличающаяся от таковой у группы крыс ПК, при этом эффект от применения Sub1 достоверно выше значений групп крыс, которым вводили препараты сравнения. В тоже время введение соединения лидера Sub1 позволило нормализовать вазореактивность сосудов, при этом степень реакции не отличалась от таковой у группы животных ПК и была сопоставима или превосходила значения групп препаратов сравнения. Оценивая степень влияния на состояние антиагрегационной и антикоагуляционной систем, установлено повышение активности последних до уровня сопоставимого с показателями животных групп, которым вводили препараты сравнения. Вместе с тем, отмечено восстановление митохондриальных функций и состояния антиоксидантной системы до значений превосходящих или сопоставимых с таковыми на фоне введения препаратов сравнения. Вышесказанное позволяет судить о многотаргетном механизме действия Sub1, что является важным показателем для лечения цереброваскулярных заболеваний.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ХТЭ представляет собой одну из основных причин инвалидизации и смертности населения. Известно, что главным этиологическим фактором развития данной патологии выступают периодически повторяющиеся СГМ [95]. По сведениям ВОЗ ежегодно подвергаются ЧМТ, легкой и средней тяжести, около 42 миллионов человек [162]. Однако существует проблема в системе учета количества ЧМТ, так как 75-85% случаев травмы головного мозга выпадает на долю легкой степени, при которой отсутствуют обращения в лечебно-профилактические учреждения [204]. Следует отметить, что подверженность ЧМТ отмечается у лиц, наиболее трудоспособного возраста (25-50 лет). Несмотря на высокий уровень развития мировой медицины и фармакологии, на сегодняшний день отсутствуют препараты для достаточно эффективной, безопасной, экономически выгодной фармакотерапии ХТЭ. Таким образом, учитывая вышесказанное, поиск средств для лечения данной патологии представляет собой одну из важнейших социально-экономических и медицинских проблем современного общества [47].

На сегодняшний день подход к терапии ХТЭ заключается в фармакологическом воздействии, основанном на нивелировании вторичных механизмов повреждения клеток головного мозга в условиях данного заболевания – окислительного стресса, эндотелиальной дисфункции, патологического изменения процессов клеточного дыхания, нейронального апоптоза [75]. Следовательно, для эффективного влияния на патогенез и течение ХТЭ необходимо восстановление функций митохондрий и эндотелия сосудов, о чем свидетельствуют данные литературы [223,124].

Митохондрии являются клеточными высокоорганизованными структурами, функциями которых выступают: обеспечение синтеза макроэргических соединений на этапах клеточного дыхания - респирометрическая, инактивация АФК - антиоксидантная, регуляция осуществления запрограммированной гибели клетки - апоптоз-регулирующая. Данные органеллы являются динамично

изменяющимися, способны к слиянию, делению [145]. Установлено движение митохондрий между клетками нервной системы в области повышенного использования макроэргов с целью компенсации энергетических затрат [61]. Также существуют механизмы для удаления дисфункциональных органелл из митохондриальной сети [115,86]. Патологические изменения функций митохондрий как «метаболического центра» приводит к неминуемой гибели самой органеллы и всей клетки. Так в условиях «окислительного стресса», накопления дефектной ДНК, воздействия нейротоксичных белков изменяется проницаемость митохондриальной мембраны [31]. В свою очередь, это приводит к поступлению в митохондрии ионов кальция и активаторов апоптоза, что и определяет необратимость процесса гибели нейронов.

Эндотелий сосудов - это монослой клеток, выполняющий ряд важнейших физиологических функций. За счет секреции антисвертывающих, вазодилатирующих и противовоспалительных соединений происходит регуляция проницаемости и тонуса сосудов, гемостатических реакций, воспаления и ангиогенеза, тем самым способствуя поддержанию необходимого уровня церебральной гемодинамики [85]. Сосудистый эндотелий является высокоорганизованной системой, подвергающейся неблагоприятному воздействию различных факторов, приводящему к нарушению структурно-функциональной целостности, при которой наблюдается эндотелиальная дисфункция. Данное состояние проявляется в виде стимуляции процессов вазоконстрикции, тромбоза, окислительного стресса, коагуляции [12,180,198].

При развитии нарушений митохондриальной и эндотелиальной функций наблюдаются следующие процессы: недостаточный приток кислорода в клетки, нарушение клеточного дыхания, преобладание анаэробного пути утилизации субстратов, приводящий к ацидозу. Также происходит патологическое образование АФК, что в свою очередь вызывает чрезмерное перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием токсичных продуктов, таких как гидропероксиды липидов [88,98,190]. Данные соединения проявляют цитотоксическое действие посредством молекулярных повреждений

клеточных и тканевых белков, структур ДНК. В ответ на перекисное окисление липидов мембран и в соответствии с конкретными клеточными метаболическими условиями, способностями к репарации, возможно структурно-функциональное восстановление клеток или гибель. При физиологическом уровне АФК (субтоксических условиях) наблюдается активация антиоксидантных защитных систем или сигнальных путей, которые обеспечивают адаптивный ответ на стресс. Однако, в условиях повышенного содержания (токсические условия) степень повреждения превышает физиологическую способность к восстановлению, тем самым индуцируются процессы апоптоза или некроза [175,186]. Еще в 1972 году Kerr, Wyllie и Currie выделили данные два типа гибели клеток [105]. Они определили, что апоптотические клетки подвергаются ядерной и цитоплазматической конденсации с последующей утилизацией посредством фагоцитоза. В тоже время некротические клетки идентифицировали как увеличенные в размере с набухшими органеллами, впоследствии наблюдается разрыв мембраны, приводящий к высвобождению содержимого во внеклеточное пространство. Последнее в конечном итоге приводит к молекулярному повреждению клеток, вызывая деградацию и деструкцию, что может способствовать развитию различных патологических состояний [187,137]

Для скрининга потенциальных средств для коррекции митохондриальной и эндотелиальной дисфункций были выбраны производные пиримидина, обладающих исходя из данных литературы антиоксидантной, нейропротекторной, ангиопротективной активностями [8,7,9,3]. По этой причине нами было исследовано 10 веществ, относящихся к классу сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она. Фармакологический скрининг выявил соединение-лидер, которое в выбранном ряду веществ проявило наиболее выраженную церебропротекторную активность - 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид (лабораторный шифр – Sub1).

Учитывая ведущую патогенетическую роль окислительного стресса при развитии ХТЭ была исследована антиоксидантная функция митохондрий. На фоне введения соединения-лидера Sub1 установлено восстановление активности

естественной антиоксидантной защиты клетки, тем самым предотвращая активацию апоптотических эффекторов гибели. Установлено достоверное увеличение активности СОД на 113,3% ($p < 0,05$) по отношению к крысам группы НК, данный эффект превосходил таковые на фоне введения препаратов сравнения ($p < 0,05$), что свидетельствует о большей инактивации АФК. Также отмечено повышение активности ГП и ГР на 94,4% ($p < 0,05$) и 185,8% ($p < 0,05$) соответственно относительно крыс группы НК, что характеризует усиление глутатион-опосредованной антиоксидантной защиты. Увеличение активности ГП на фоне введения Sub1 было выраженнее, чем при применении холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, ПДФТН ($p < 0,05$), но сопоставимо с группой крыс аминокислоты и цитруллин малата. В тоже время индукция активности ГР при введении соединения-лидера достоверно не отличалась от показателя гопантеновой кислоты, но была выше остальных препаратов сравнения ($p < 0,05$). Увеличение активности данных ферментов приводит к устранению патологического перекисного окисления липидов, вызывающего неоправданную деструкцию полиненасыщенные жирных кислот клеточных структур с образованием токсичных продуктов. Данный факт подтверждается снижением концентрации ТБК-активных продуктов, в том числе МДА, у животных группы, которой вводили соединение-лидер Sub1 относительно крыс группы НК на 116,8% ($p < 0,05$). Следует отметить, что данный эффект превосходил аналогичные значения у групп, которым вводили препараты сравнения ($p < 0,05$). Подобное действие производных пиримидина, в виде подавления процессов перекисного окисления липидов, посредством активации антиоксидантных систем соответствует данным литературных источников [19,1].

Реакционная способность МДА, как бифункционального электрофильного альдегида, зависит от рН среды. Так в условиях физиологического значения рН существует в виде енолят-иона (конъюгатных оснований, имеющих отрицательный заряд на кислороде с соседней двойной связью С-С), обладая низкой реакционной способностью. При снижении рН МДА находится в виде бета-гидроксиакролеина, и его реакционная способность увеличивается [62].

Высокая активность главным образом основана на его электрофильности, что делает его реактивным по отношению к нуклеофилам, таким как основные аминокислотные остатки (лизин, гистидин или аргинин). Реакции между МДА и аминокислотами приводят к образованию продуктов - оснований Шиффа [151,153]. Получаемые аддукты участвуют во вторичных патологических реакциях, способствуя внутримолекулярному или межмолекулярному сшиванию молекул белков, ДНК, тем самым способствуя глубоким изменениям биохимических свойств данных соединений, усугубляя течение хронических заболеваний [182,182,217]. Также снижение нейротоксического действия МДА на фоне введения соединения-лидера Sub1, вероятно, возможно благодаря восстановлению физиологического значения рН.

При оценке влияния соединения-лидера Sub1 на респирометрическую функцию митохондрий в условиях экспериментальной ХТЭ установлено, что АТФ-генерирующая способность на фоне введения соединения-лидера Sub1 увеличилась в 6,2 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, при этом данный эффект был выраженнее таковых при применении препаратов сравнения ($p < 0,05$). Также отмечено снижение интенсивности анаэробного пути утилизации субстратов, по сравнению с крысами группы НК, в 3,1 раза ($p < 0,05$), что превосходило показатели групп, которым вводили ПДФТН, цитруллина малат и аминокислоты (аминофенилмасляную кислоту ($p < 0,05$), но не превышало значения групп холина альфосцерата и гопантеновой кислоты. В тоже время наблюдалось снижение концентрации лактата в 2,1 раза ($p < 0,05$) по отношению к крысам группы НК, что было выраженнее действия препаратов сравнения ($p < 0,05$), подобное действие производных пиримидина соответствует данным литературных источников [44]. Данные явления свидетельствуют об устранении ацидоза в клетках головного мозга, также энергодефицита, запускающего каскад метаболических изменений, приводящих в свою очередь к некротической гибели клеток головного мозга в условиях ХТЭ.

Некроз представляет собой особую форму дегенерации нейронов, которую индуцируют ишемия, дисфункция митохондрий, чрезмерное потребление АТФ

[168]. Недостаточное кровоснабжение клеток приводит к нехватке энергетических субстратов, что, в свою очередь, выражается в истощении запасов АТФ. Данный процесс способствует дисфункции натриевого насоса, при этом отмечается набухание клетки, приводящее в конечном итоге к разрыву плазматической мембраны [176]. Также вероятно развитие деполяризации плазматической мембраны, что влечет за собой открытие потенциал-зависимых натриевых каналов. Энергодефицит также приводит к нарушению функционирования кальциевых насосов, тем самым повышая уровень цитозольного кальция, который может вызывать некроз посредством активации протеаз, фосфолипаз и изменения проницаемости митохондриальной мембраны [230,128].

Известно, что при увеличении проницаемости митохондриальной наружной мембраны, вследствие нарушения функционирования митохондрий, из последних наблюдается высвобождение в цитоплазму апоптотических факторов, включая АИФ (рис. 31). Апоптотическая гибель клеток может быть устойчивой к ингибиторам каспазы, потому что данный эффектор вызывает расщепление ДНК и независимую от каспазы гибель клеток [111,144].



Рисунок 31 – Механизм развития каспазозависимой гибели клетки при митохондриальной дисфункции

Изучая клеточный, каспаза-независимый, путь апоптоза, как регулируемую функцию митохондрий, посредством определения главного эффектора митохондриального апоптоза – белка AIF установлено, что его концентрация на фоне введения соединения-лидера Sub1 снизилась на 85,5% ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, что достоверно значимо не отличалось от показателя аминокислоты, и было ниже эффекта холина альфосцерата и гопантеновой кислоты. Клетки, подверженные апоптозу, утилизируются фагоцитами в процессе, называемом эффероцитозом, при котором предотвращается выход внутриклеточных компонентов во внеклеточную среду, тем самым нивелируя нейротоксические реакции [77]. Однако при нарушении течения эффероцитоза, вследствие перегрузки системы, клетки подвергаются некрозу, при котором происходит разрыв плазматической мембраны с последующим развитием патологических процессов. Фармакологическая модуляция выделения AIF обеспечивает нейропротекцию в условиях экспериментальной ЧМТ [168,179].

Восстановление функций митохондрий на фоне введения соединения-лидера в условиях экспериментальной ХТЭ, вероятно, связано с нормализацией процессов клеточного дыхания, что подтверждается увеличением образования макроэргов, с преобладанием энергетически выгодного аэробного пути утилизации субстратов, о чем свидетельствуют физиологические концентрации продуктов обмена.

Физиологическое течение процессов клеточного метаболизма способствует устранению дисбаланса продуктов обмена, в частности гиперсекреции гомоцистеина. Гомоцистеин – эндогенная аминокислота, представляющая собой деметилированную молекулу метионина. Данное соединение является основным фактором патогенеза эндотелиальной дисфункции [127]. Повышенная концентрация гомоцистеина приводит к прямому повреждающему действию на эндотелий, также отмечается снижение продукции оксида азота, модуляция чувствительности к нему. При этом наблюдаются изменения реологических свойств крови и эластичности сосудистой стенки, увеличение интенсивности

атеросклеротических процессов [63,222]. Также рядом ученых показана немаловажная роль повышенной концентрации гомоцистеина в секреции АФК, вызывающих окислительное повреждение эндотелия [138]. В тоже время данная аминокислота посредством образования дисульфидной связи ингибирует активность СОД, тем самым инактивируя антиоксидантную защиту, что приводит к экспрессии провоспалительных генов и сосудистому воспалению [214]. На фоне применения соединения-лидера Sub1 наблюдалось снижение уровня гомоцистеина, по сравнению с группой крыс НК на 31,3% ($p < 0,05$), которое не превышало действие референтных препаратов. Данное сокращение концентрации, вероятно, способствовало восстановлению структурно-функционального состояния эндотелия в условиях экспериментальной ХТЭ.

Продукты деструкции клеток оказывают прямое и опосредованное патологическое влияние на эндотелий сосудов, способствуя эндотелиальной дисфункции, приводящей к недостаточному уровню кровоснабжения нейронов и глиии головного мозга, что, в свою очередь, вызывает повторяющийся каскад процессов, который, в конечном счете, приводит к прогрессирующей гибели клеток, вызывая развитие ХТЭ (рис. 32).

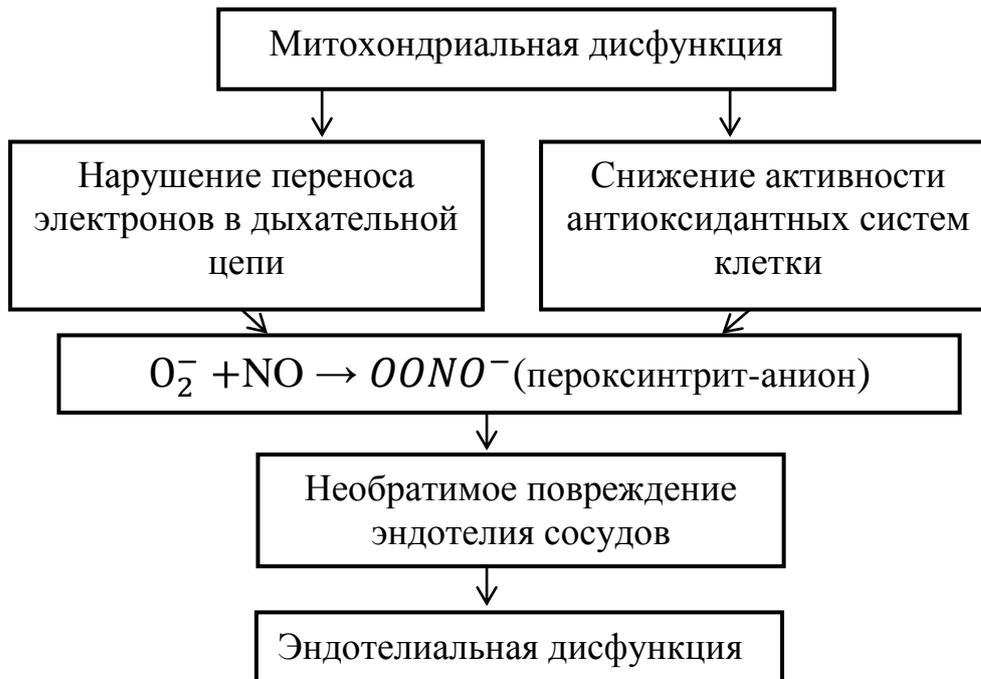


Рисунок 32 – Механизм развития эндотелиальной дисфункции при нарушении физиологического функционирования митохондрий

Так на фоне применения соединения-лидера Sub1 установлено восстановление уровня мозговой гемодинамики, в виде увеличения СМК в 2,9 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс НК, при этом последнее превосходило значение групп крыс, которым вводили препараты сравнения ($p < 0,05$). Данное проявление, в форме активации вазодилатирующей функции эндотелия сосудов, было возможно благодаря стабилизации работы NO – синтазной системы у животных в условиях ХТЭ. Так при введении соединения-лидера Sub1 отмечалось восстановление функции эндотелия сосудов как к модулируемому, так и к базальному синтезу NO, что выражалось в достоверно значимом увеличении СМК на фоне инстилляций АЦХ и снижении L-NAME, относительно крыс группы НК, данное значение достоверно не отличалось от аналогичных показателей группы животных ПК. В тоже время, проявление феномена «L-аргининового парадокса» носило менее выраженный характер, что также достоверно не отличалось от значений крыс группы ПК. Следовательно, на фоне применения соединения-лидера Sub1 степень активности NO-синтазной системы обладала большей стабильностью по отношению к показателям группы животных НК.

Также при оценке влияния соединения-лидера Sub1 на антитромботическую функцию эндотелия сосудов головного мозга установлено сохранение последней. Что выражалось в снижении степени и скорости агрегации тромбоцитов в 3,2 ($p < 0,05$) и 4,4 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, при этом данные эффекты были выраженнее таковых при применении холина альфосцерата ($p < 0,05$), значимо не отличались от цитруллина малата и не превышали гопантеновую кислоту, цитруллина малат, ПДФТН. Подобное действие возможно благодаря наличию у производных пиримидина способности ингибировать аденозиндезаминазу и фосфодиэстеразу III, тем самым повышая в крови содержание эндогенных антиагрегантов — аденозина и цАМФ. В тоже время стимулируется высвобождение простациклина эндотелиальными клетками, блокируя захват АТФ эндотелием, что ведет к увеличению его содержания на границе между тромбоцитами и эндотелием [4].

При изучении некоторых параметров плазменного гемостаза, таких как АЧТВ, ТВ установлена нормализация данных показателей на фоне введения соединения-лидера Sub1 относительно животных группы НК на 36,8% ($p < 0,05$) и 62,9% ($p < 0,05$) соответственно. При этом повышение АЧТВ при применении Sub1 достоверно не отличалось от введения холина альфосцерата, аминокислоты, но было выраженнее гопантеновой кислоты ($p < 0,05$). В тоже время изменение ТВ было сопоставимо с эффектом холина альфосцерата, но не превышало гопантеновую кислоту и аминокислоту. Также отмечено снижение концентрации фибриногена на 126,9% ($p < 0,05$) по сравнению с группы крыс НК, что достоверно значимо не отличалось от аминокислоты, но было выраженнее холина альфосцерата и гопантеновой кислоты ($p < 0,05$). Активность противосвертывающей системы протеина С при введении Sub1 увеличилась на 17,8% ($p < 0,05$) относительно животных группы НК, данный эффект был сопоставим с таковыми у групп крыс, которым вводили препараты сравнения. Данные состояния вероятно связано с уменьшением концентрации гомоцистеина, который является потенциальным прокоагулянтом благодаря способности ингибировать систему протеина С, тем самым способствуя процессам тромбообразования, усугубляя нарушения мозговой гемодинамики [135,58,139,30]

Рассматривая состояние антитромботической активности установлено, что на фоне применения соединения-лидера Sub1 наблюдалось снижение концентрации и степени проявления факторов, способствующих тромбообразованию, что, в свою очередь, приводило к нормализации кровоснабжения клеток головного мозга в условиях экспериментальной ХТЭ. При этом восстановление эндотелиальной функции, при применении исследуемого соединения-лидера Sub1, вероятно, способствовало уменьшению микроразрывов сосудов микроциркуляторного русла вследствие снижения тромбогенности [88].

Восстановление функций митохондрий и сосудистого эндотелия в условиях ХТЭ при применении соединения-лидера Sub1 способствует нивелированию

патологических каскадов реакций, приводящих к повреждению структур жизнеобеспечения с последующей гибелью клеток головного мозга (рис. 33).



Рисунок 33 – Вероятный механизм нивелирования клинических проявлений в условиях ХТЭ при применении соединения-лидера Sub1

Данный факт выражается в снижении концентрации специфических маркеров нейродеградации, характеризующих развитие ХТЭ. Так установлено уменьшение содержания на фоне введения соединения-лидера Sub1 фосфорилированного тау-белка на 116,5% ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, при этом уровень изменения достоверно значимо не отличался от применения холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, в тоже время был выше ПДФТН ($p < 0,05$), но ниже цитруллина малата ($p < 0,05$). Учитывая важную физиологическую роль тау-белка в виде поддержания цитоскелета нейронов и

обеспечения транспортировки макромолекул от центра клетки к дистальным частям нейрона (дендритные и аксонные терминалы), следует отметить, что уменьшение количества фосфорилированного белка способствует поддержанию функционирования нервных клеток. Коуэн и соавторы показали, что патологические концентрации фосфорилированного тау-белка у человека вызывают поведенческий дефицит, возникающий в результате синаптической дисфункции, нарушения аксонального транспорта и дестабилизации цитоскелета *in vivo* [199,100].

Также на фоне введения соединения-лидера Sub1 установлено снижение концентрации $A\beta$ в 2,6 раза ($p < 0,05$) относительно крыс группы НК, данный эффект был выраженнее таковых у холина альфосцерата, гопантеновой кислоты ($p < 0,05$), но достоверно значимо не различался с цитруллина малатом, ПДФТН. Данное явление способствует устранению отложений бета-амилоидных бляшек в кровеносных сосудах, препятствуя прогрессирующей дисфункции стенки сосуда с последующим разрывом и внутримозговым кровоизлиянием [208,82]. Также рядом исследователей установлено, что гиперсекреция $A\beta$ вызывает генерацию АФК в астроцитах [56,60]. Снижение концентрации данного пептида способствует нивелированию когнитивной дисфункции посредством устранения вышеназванных механизмов [82,84].

При применении соединения-лидера Sub1 отмечено уменьшение концентрации астроглиальных биомаркеров нейродегенерации, S-100B в 3 раза ($p < 0,05$) и GFAP в 3,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с крысами группы НК. При этом сокращение содержания GFAP было сопоставимо с ПДФТН и холина альфосцератом, но было выраженнее эффекта гопантеновой кислоты, цитруллина малата, аминокислоты (p < 0,05). В тоже время снижение уровня S-100B достоверно значимо не отличалось от гопантеновой кислоты, но было выраженнее действия остальных препаратов сравнения ($p < 0,05$). Снижение концентрации данных показателей свидетельствует о меньшей деструкции астроглии относительно группы животных НК в условиях экспериментальной ХТЭ, что, в свою очередь, способствует аксональному росту, синаптогенезу,

репарации нейронов, стабилизации тубуло-ассоциированные белка – тау-протеина [83,69,48]. Рядом исследователей была выявлена достоверная корреляция между уровнем S-100B, GFAP и нейропсихологическими нарушениями [116].

Введение соединения-лидера Sub1 способствовало снижению концентрации NSE в 3,5 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс НК, что свидетельствует о снижении деградации нейронов. Следует отметить, что степень сокращения NSE достоверно значимо превосходила препараты сравнения ($p < 0,05$). Исходя из данных литературных источников повышенное содержание NSE стимулирует экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α), усугубляя прямое повреждающее действие, вызывая апоптоз в нейрональных клетках [68].

Таким образом, уменьшение деградации и деструкции нейронов в условиях экспериментальной ХТЭ при применении соединения-лидера Sub1 способствует сохранению когнитивных, сенсомоторных, поведенческих функций, дефициты которых являются основными клиническими проявлениями ХТЭ.

Учитывая вышеизложенные данные, можно предположить, что соединение 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид является перспективным объектом для проведения дальнейших исследований с целью создания на его основе лекарственного препарата для терапии хронической травматической энцефалопатии.

ВЫВОДЫ

1. В ряду новых сульфопроизводных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений) наиболее выраженную церебропротекторную активность в условиях экспериментальной ХТЭ оказывает 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид. Фармакологический эффект данного соединения, в виде снижения концентрации маркеров нейродегенерации GFAP, S100B, NSE, A β , достоверно превосходил ($p < 0,05$) или был сопоставим с эффектами остальных изучаемых соединений.

2. Соединения 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид относится к 5-му классу токсичности по СГС-классификации химических веществ.

3. Эффективность соединения 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид, в виде снижения концентрации маркеров нейродегенерации GFAP, S100B, A β , в достоверно большей степени проявлялась в дозе 100 мг/кг, чем в дозах 25, 50, 150 мг/кг.

4. В условиях ХТЭ на фоне введения крысам соединения 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид наблюдалось сохранение респирометрической функции митохондрий (АТФ-генерирующая способность увеличилась в 6,2 раза ($p < 0,05$)), антиоксидантной активности клеток головного мозга (концентрация ТБК-активных продуктов снизилась в 2,2 раза ($p < 0,05$)), при этом данные эффекты были выраженнее действия препаратов сравнения ($p < 0,05$), что, в свою очередь, способствовало снижению деградации клеток головного мозга.

5. Соединение 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил)-бензсульфамид способствовало нормализации церебральной гемодинамики (скорость кровотока увеличилась в 3 раза ($p < 0,05$)), значимо превосходя эффекты препаратов сравнения ($p < 0,05$)), благодаря сохранению структурно-функциональной целостности эндотелия сосудов головного мозга, что выражалось в виде поддержания вазодилатирующей и антитромботической

активностей. Установлено восстановление баланса параметров плазменного гемостаза, так концентрация фибриногена уменьшилась в 2,3 раза ($p < 0,05$), что достоверно выраженнее эффектов препаратов сравнения ($p < 0,05$).

6. Совокупное действие 4-(2-метил-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида приводит к сохранению структурно-функциональной целостности клеток коры головного мозга, о чем свидетельствует снижение концентрации высокоспецифичных биомаркеров повреждения: фосфорилированного тау-белка и $A\beta$ в 2,2 ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$) соответственно. Уменьшение деградации нейронов и глии, в свою очередь, характеризует нормализацию когнитивных, сенсомоторных, неврологических функций крыс в условиях экспериментальной ХТЭ.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо продолжить исследование соединения Sub1 с целью создания на его основе церебропротекторного лекарственного препарата для лечения хронической травматической энцефалопатии.

2. Полученные результаты диссертационной работы позволяют рекомендовать химикам-синтетикам целенаправленный поиск и синтез новых биологически активных соединений из ряда пиримидинов для создания средств с церебропротекторным действием.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ХТЭ – хроническая травматическая энцефалопатия
- ЧМТ - черепно-мозговая травма
- СГМ - сотрясение головного мозга
- HLA - человеческий лейкоцитарный антиген
- НФК - нейрофибриллярные клубки
- ЦНС - центральная нервная система
- ГЭБ - гематоэнцефалический барьер
- Аβ - β-амилоид
- NSE - нейрон-специфичная енолаза
- GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок
- APP - белок-предшественник β-амилоида
- БА - болезнь Альцгеймера
- АФК – активные формы кислорода
- АТФ – аденозинтрифосфат
- AIF – апоптоз индуцирующий фактор
- ЭПР – эндоплазматический ретикул
- ТЭИ - тест «экстраполяционное избавление»
- УРПИ - условный рефлекс пассивного избегания
- СД - сенсомоторный дефицит
- СОД – супероксиддисмутаза
- ГП – глутатионпероксидаза
- ГР – глутатионредуктаза
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- ЭДТА – этилендиаминтетрацетат
- АДФ – аденозиндифосфат
- СМК - скорость мозгового кровотока
- АЦХ – ацетилхолин
- L-NAME - нитро-L-аргинин метиловый эфир
- АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

ТВ - тромбиновое время

НО - нормализованного отношения

ФССТР - 4 – (((трифлуорометокси)фенил)гидразоно)малононитрил

ПК - положительный контроль

НК – негативный контроль

МДА – малоновый диальдегид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.Аненко, Д.С. Синтез и изучение взаимосвязи структура-активность 2,6-диалкилсульфамидных производных пиримидин-4(1H)-она и их ациклических предшественников: автореф. дис. канд. фарм. наук / Д.С. Аненко. – Пятигорск, 2022. – С. 12.

2.Антиоксидантные свойства производных пиримидина / И.В. Петрова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8. – №4. – С. 64-67.

3.Антитоксическая активность пиримидинов (структура - активность) / В.А. Мышкин [и др.] // Медицина труда и экология человека. – 2018. – №4(16). – С.117-123.

4.Барышникова, Г. А. Дипиридамол в общетерапевтической практике / Г.А. Барышникова // Проблемы женского здоровья. – 2007. – Т. 2. – № 1. – С. 88–97.

5.Белов, А.Е. Токсико-фармакологические свойства новых производных пиримидина : автореф. дис. канд. ветеринар. наук / А.Е. Белов. – Уфа, 2000. – С. 20.

6.Бондаренко, Н.А. Изучение возможности формирования целенаправленного поведения у крыс с «одной пробы» в тесте «Экстраполяционное избавление» / Н.А. Бондаренко // Эволюционная и сравнительная психология в России: традиции и перспективы / Под ред. А.Н. Харитонов. М.: Институт психологии РАН. – 2013. – С.122 –130.

7.Влияние антиоксидантов на эндотоксикоз при экспериментальном перитоните / А.П. Власов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – № 6. – С.58-61.

8.Влияние ксимедона на регенерацию периферического нерва / Р.Х. Хафизьянова, И.С. Рагинов, А.Ю. Вафин, Ю.А. Челышев // Фармакология и токсикология фосфорорганических и других биологически активных веществ. – 1996. – №3. – С. 145.

9.Влияние новых производных пиримидин-4(1н)-она на психоэмоциональный дисбаланс и некоторые нарушения энергетического обмена

у крыс на фоне ишемии головного мозга / А.В. Воронков [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – С. 13.

10.Воронков, А.В. Влияние новых производных пиримидин-4-она на показатели ауторегуляции мозгового кровообращения и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга крыс на фоне хронической гемической гипоксии // А.В Воронков, А.С. Лысенко, А.Ф. Бандура // Анализ риска здоровью. – 2018. – №1.

11.Воронков, А.В. Изучение влияния 2-стирилпроизводных пиримидин-4 (1Н)-она на состояние антитромботического потенциала, на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов / Воронков А.В., Мамлеев А.В., Поздняков Д.И. // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18. – №. 2.

12.Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: автореф. дис. д-ра мед. наук.- Волгоград: ВолгГМУ, 2011.-46 с.

13.Воронков, А.В. Сравнительная оценка влияния атакл, мексидола и тиоктовой кислоты на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, А.В. Мамлеев // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С.152.

14.Гланц, С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика. – 1999. – С. 459.

15.Гончар, И.А. Прогрессирующий ишемический инсульт: патогенетические механизмы развития / И.А. Гончар // Здоровоохранение. – 2012. – №10. –С.55-59.

16.Громова, О.А. Мышечные судороги, повышенная судорожная готовность: роли магния и оротовой кислоты / О.А. Громова, Е.Ю. Егорова, И.Ю. Торшин // Неврология. – 2013.– № 1 (302). – С. 24-25.

17.Егорова, М.В. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // СМЖ. – 2011. – № 1. – С. 22-28.

18.Жарова, Е.Н. Оптимизация сочетанного лечения физическими факторами пациентов с черепно-мозговой травмой в ранний период: автореф. дис. док. мед. наук. – Санкт-Петербург, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2019. – С. 3-4.

19.Измайлова, А.Х. Препараты пиримидинового ряда в экспериментальных и клинических исследованиях / А.Х. Измайлова, Д.Х. Шакирова, А.Г. Измайлов // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6. – С. 31-36.

20.Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных / И.А. Титович [и др.] // Биомедицина. – 2017. – №3. – С. 102-110.

21.Изучение влияния субстанции atacl на физическое и психическое состояние животных в условиях длительных истощающих нагрузок / А.В. Воронков, В.Т. Абаев, Э.Т. Оганесян, Д.И. Поздняков // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.

22.Исследование взаимодействия янтарной и фумаровой кислот с урацилом и его производными / Н.С. Борисова [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2012. – Т. 17. – № 4. – С. 1687-1690.

23.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.

24.Моделирование черепно-мозговой травмы в условиях эксперимента у крыс / А.В. Воронков, С.А. Калашникова, Е.И. Хури, Д.И. Поздняков // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 75.

25.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.

26. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов [и др.] // Лабораторное дело. – 1989. – №10. – С.15-18.

27. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза / А.В. Воронков [и др.] // Фармация и фармакология. – 2019. – № 7(1). – С. 20–31.

28. Перспективный антидепрессант с анксиолитическим действием в ряду четвертичных солей пиридопиримидинов / М.М. Козловская, С.В. Никитин, Г.М. Молодавкин, Т.А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. – 2004. – Т. 4. – № 1. – С. 575-580.

29. Психоиммуномодулирующая активность фенибута при экспериментальном гипертиреозе / М.А. Самотруева [и др.] // КЭТ. – 2012. – №1. – С. 105-11.

30. Роль гипергомоцистеинемии в механизмах развития гиперкоагуляции у больных ИБС / Е. В. Фефелова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2019. – №. 2. – С. 90-98.

31. Роль митохондрий в реализации механизмов программированной гибели клетки / Н.П. Судаков, С.Б. Никифоров, Ю.М. Константинов, С.А. Лепехова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 1(53). – С.103–107.

32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н.Миронов [и др.] // М.: Гриф и К. – 2012. – С. 455.

33. Синтез и биологическая активность производных пириимидина / А.Р. Гимадиева, Ю.Н. Чернышенко, А.Г. Мустафин, И.Б. Абдрахманов // Башкирский химический журнал. – 2007. – Т. 14. – № 3. – С. 5–21.

34. Слободенюк, Т.Ф. Нейропротекторные свойства ноотропов при черепно-мозговой травме в условиях нормобарической гипоксической тренировки / Т.Ф. Слободенюк // Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – №. 1. – С. 128-136.

35. Сочнев, В.С. Поиск новых ингибиторов цог-2 в ряду сульфаниламидных производных 1н-пириимидин-4-она / В.С. Сочнев // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №. 11. – С. 694-695.

36. Сравнительная антиоксидантная и антигипоксическая активность нового производного 1,4-дигидро-4-оксопиримидина — соединения PDMPТ · HCL имексидола / Е.В. Петрова, Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди, Е.Н. Жогло // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 6. – С. 38-40.

37. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина. – 1977. – С. 44-46.

38. Сысоев, Ю.И. Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы / Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый, Б. Узуегбунам // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 95-105.

39. Татарникова, О.Г. Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и приноподобные свойства / О.Г. Татарникова, М.А. Орлов, Н.В. Бобкова // Успехи биологической химии. – 2015. – Т. 55. – С. 351-390.

40. Тюренков, И.Н. Изменение мнестической и психоэмоциональной функции у животных с недостаточностью половых гормонов и коррекция их ГАМК-ергическими средствами / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А. И. Робертус // ПФБН. – 2008. – №1. – С. 2.

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

42. Федин, А.И. Ишемический каскад в остром периоде инсульта и способы его коррекции / А.И. Федин, Е.А. Тютюмова, К.Р. Бадалян // Фарматека. – 2017. – № 9(342). – С. 99-104.

43. Церебропротективное действие N-арилзамещенных производных 1,4-дигидро-4-оксопиримидина и их влияние на мозговое кровообращение / И.Н. Тюренков [и др.] // Вестник ВолГМУ. – 2011. – Т. 4(40). – С. 22-25.

44. Церебропротекторная активность новых производных пиримидин41hона pir9 и pir10 при необратимой окклюзии общих сонных артерий / А.В. Воронков,

Н.Б. Шабанова, И.П. Кодониди, И.С. Шаталов // Фармация и фармакология. – 2018. – Т. 6. – № 2. – С.167-181.

45. A lack of amyloid beta plaques despite persistent accumulation of amyloid beta in axons of long-term survivors of traumatic brain injury / X.H. Chen [et al.] // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 214–23.

46. A new avenue for lithium: Intervention in traumatic brain injury/ P.R. Leeds [et al.] // *ACS Chem. Neurosci.* – 2014. – Vol. 5. –P. 422-433.

47. A State-of-the-Science Overview of Randomized Controlled Trials Evaluating Acute Management of Moderate-to-Severe Traumatic Brain Injury / P. Bragge [et al.] // *J Neurotrauma.* – 2016. – Vol. 33(16). – P. 1461-78.

48. A systematic review of the biomarker S100B: implications for sport-related concussion management / S. Schulte [et al.] // *J Athl Train.* – 2014. – Vol.49 (6). – P.830-850.

49. Ablation of caspase-1 protects against TBI-induced pyroptosis in vitro and in vivo / W. Liu [et al.] // *J Neuroinflammation.* – 2012. – Vol. 15 (1). – P. 48.

50. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy / S. W. Min [et al.] // *Neuron.* – 2010. – Vol. 67. – P. 953-966.

51. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival / M. Khacho [et al.] // *Nat Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3550.

52. Adult-onset of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) syndrome with hypothyroidism and psychiatric disorders / Y.X. Ge [et al.] // *eNeurologicalSci.* – 2016. – Vol. 6. –P. 16–20.

53. Aging-related tau astrogliopathy (ARTAG) : harmonized evaluation strategy / G.G. Kovacs [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2016. – Vol. 131(1). – P. 87-102.

54. Agoston, D.V. Editorial: When Physics Meets Biology; Biomechanics and Biology of Traumatic Brain Injury / D.V. Agoston, M.K. Sköld // *Front. Neurol.* – 2016. – Vol.7. – P.91-111.

55. Alpha-synuclein prevents the formation of spherical mitochondria and apoptosis under oxidative stress / S. Menges [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 42942.

56. Amyloid beta-induced astrogliosis is mediated by beta1-integrin via NADPH oxidase 2 in Alzheimer's disease / A. Wyssnabach [et al.] // *Aging Cell*. – 2016. – Vol.15. – P.1140-1152.

57. Anti-Phospho-Tau Gene Therapy for Chronic Traumatic Encephalopathy / C.B. Sacramento [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 2019. – Vol.31. – P. 57-69.

58. Antithrombin III associated with fibrinogen predicts the risk of cerebral ischemic stroke / R Meng [et al.] // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2011. – Vol. 113(5). – P. 380-386.

59. Apoptosis, autophagy, necrosis and their multi galore crosstalk in neurodegeneration / S. Saleem // *Neuroscience*. – 2021. – Vol. 469. – P. 162-174.

60. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against Aβ oligomers in Alzheimer's disease model / L.P. Diniz [et al.] // *J Neurosci*. – 2017. – Vol.37. – P.6797-6809.

61. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation / S. Maday, A.E. Twelvetrees, A.J. Moughamian, E.L. Holzbaur // *Neuron*. – 2014. – Vol. 84(2). – P. 292-309.

62. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles // *Oxid Med Cell Longev*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 360438.

63. Azzini, E. Homocysteine: its possible emerging role in at-risk population groups / E. Azzini, S. Ruggeri, A. Polito // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – №. 4. – P. 1421.

64. Barber, P.A. Experimental neuroprotection: translation to human stroke trials / P.A. Barber, B. Bruederlin, A.M. Buchan // *Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia V*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. – P. 137-156.

65. Beaudeau, J. Pathophysiologic aspects of S100 beta protein: A new biological marker of brain pathology / J. Beaudeau, L. Dequen, M. Foglietti // *An. Biol.Clin.* – 1999. – Vol. 57(3). – P. 261–272.

66. Bergman, O. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes / O. Bergman, D. Ben-Shachar // *Can J Psychiatry*. – 2016. – Vol. 61. – №8. – P. 457–469.

67. Bibliometric Analysis of Chronic Traumatic Encephalopathy Research from 1999 to 2019 / B. Qi, S. Jin, H. Qian, Y. Zou // *Int J Environ Res Public Health*. – 2020. – Vol. 17(15). – P. 5411.

68. Biomarkers in spinal cord injury: prognostic insights and future potentials / A. Albayar [et al.] // *Frontiers in neurology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 27.

69. Biomarkers track damage after graded injury severity in a rat model of penetrating brain injury / J.S. Zoltewicz [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2013. – Vol. 30(13). – P. 1161-1169.

70. Biomechanics of traumatic brain injury: influences of the morphologic heterogeneities of the cerebral cortex / R.J. Cloots, H.M. Gervaise, J.A. van Dommelen, M.G. Geers // *Annals of biomedical engineering*. – 2008. – Vol. 36. – №. 7. – P. 1203-15.

71. Biophysical mechanisms of traumatic brain injuries / L.A. Young, G.T. Rule, R.T. Bocchieri, J.M. Burns // *Seminars in neurology*. – 2015. – Vol. 35. – №. 01. – P. 5-11.

72. Bock, E. Nervous systems specific proteins / E. Bock // *J. Neurochem*. – 1978. – Vol. 30(1). – P. 7-14.

73. Born, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V. Born // *Nature*. – 1962. – Vol. 194. – P. 927-929.

74. Breen, P. Recent Preclinical Insights Into the Treatment of Chronic Traumatic Encephalopathy / P.W. Breen, V. Krishnan // *Front Neurosci*. – 2020. – Vol. 14. – P. 616.

75. Brown, J.M. From contemporary rehabilitation to restorative neurology / J.M. Brown, D.M. Deriso, K.E. Tansey // *Clin Neurol Neurosurg*. – 2012. – Vol. 114(5). – P. 471–4.

76. Calpain-2 as a therapeutic target in repeated concussion-induced neuropathy and behavioral impairment / Y. Wang [et al.] // *Sci. Adv*. – 2020. – Vol. 6.

77.Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury / J.E. Slemmer [et al.] // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 173(6). – P. 1795–1805.

78.Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy / A. Datta [et al.] // *Translational Stroke Research.* – 2020. – Vol. 11. – №. 6. – P. 1185-1202.

79.Cell Proliferation, Survival, Necrosis and Apoptosis / C. T. Mierke [et al.] // *Cellular Mechanics and Biophysics.* – Springer, Cham, 2020. – P. 743-824.

80.Centers for Disease Control and Prevention. Nonfatal injury data. CDC <https://www.cdc.gov/injury/wisqars/nonfatal.html> (2015).

81.Cerebral amyloid- β accumulation and deposition following traumatic brain injury - a narrative review and meta-analysis of animal studies / S.M. Bird [et al.] // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* – 2016. – Vol. 64. – P. 215-228.

82.Cerebral small vessel disease / J. Litak [et al.] // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – Vol. 21. – №. 24. – P. 9729.

83.Cerebrospinal fluid protein biomarker panel for assessment of neurotoxicity induced by kainic acid in rats / O.Y. Glushakova [et al.] // *Toxicological Sciences.* – 2012. – Vol.130 (1). – P.158-167.

84.Charidimou, A. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum / A. Charidimou, Q. Gang, D.J. Werring // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2012. – Vol.83 – P.124-137.

85.Chatterjee, S. Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways / S. Chatterjee // *Front Physiol.* – 2018. – № 9. – P.524.

86.Chen, H. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases / H. Chen, D.C. Chan // *Hum Mol Genet.* – 2009. – Vol. 18. – P. 169-76.

87.Chinnery, P.F. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? / P.F. Chinnery // *EMBO Mol Med.* – 2015. – Vol. 7. – №12. – P. 1503-1512.

88. Chronic cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury / A. Jullienne [et al.] // *J Neurosci Res.* – 2016. – Vol. 94(7). – P.609-622.

89. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury / A.C. McKee [et al.] // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* – 2009. – Vol. 68. – №. 7. – P. 709-735.

90. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model / L.E. Goldstein [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2012. – № 4. – P. 134.

91. Chronic Traumatic Encephalopathy in Professional American Football Players: Where Are We Now? / T. Tharmaratnam [et al.] // *Front Neurol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 445.

92. Chronic traumatic encephalopathy is a common co-morbidity, but less frequent primary dementia in former soccer and rugby players / E.B. Lee [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2019. – Vol. 138. – P. 389–99.

93. Chronic traumatic encephalopathy like neuropathological findings without a history of trauma / A.F. Gao [et al.] // *Int J Pathol Clin Res.* – 2017. – Vol. 3(1). – P. 1-4.

94. Chronic traumatic encephalopathy neuropathology might not be inexorably progressive or unique to repetitive neurotrauma / G.L. Iverson [et al.] // *Brain.* – 2019. – Vol. 142(12). –P.3672-3693.

95. Chronic Traumatic Encephalopathy: Update on Current Clinical Diagnosis and Management / K. Pierre [et al.] // *Biomedicines.* – 2021. – Vol. 9. – №4. – P. 415.

96. Clinical presentation of chronic traumatic encephalopathy / R.A. Stern [et al.] // *Neurology.* – 2013. – Vol. 81, №. 13. – P. 1122-1129.

97. Clinical subtypes of chronic traumatic encephalopathy: literature review and proposed research diagnostic criteria for traumatic encephalopathy syndrome / P.H. Montenegro [et al.] // *Alzheimers Res Ther.* – 2014. – Vol. 6(5). – P. 68.

98. Combination therapies for neurobehavioral and cognitive recovery after experimental traumatic brain injury: is more better? / A.E. Kline [et al.] // *Progress in neurobiology.* – 2016. –Vol. 142. – P.45-67.

99.Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport / P. McCrory [et al.] // *Br. J. Sports Med.* – 2013. – Vol. 47(5). – P. 250-258.

100.Cowan, C.M. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? / C.M. Cowan, A. Mudher // *Front Neurol.* – 2013. – Vol.13. – P.4-114.

101.Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits / S.W. Min [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – Vol. 21. – P. 1154-1162.

102.Crosstalk between oxidative stress and ferroptosis/oxytosis in ischemic stroke: possible targets and molecular mechanisms / J. X. Ren [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2021. – Vol. 2021.

103.Cuadrado, A. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy / A. Cuadrado, S. Kügler, I. Lastres-Becker // *Redox Biol.* – 2018. – Vol.14. – P. 522 -534.

104.Cumulative effects associated with recurrent concussion in collegiate football players: the NCAA Concussion Study / K.M. Guskiewicz [et al.] // *Jama.* – 2003. – Vol. 290. – №. 19. – P. 2549-2555.

105.Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice / D. Kieran [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104(51). – P. 20606-11.

106.Demock, M. Mechanism for the Development of Chronic Traumatic Encephalopathy From Persistent Traumatic Brain Injury / M. Demock, S.A. Kornguth // *Journal of experimental neuroscience.* – 2019. – Vol. 13. – P. 1179069519849935.

107.Deng, Y. Synthesis and biological activity of a novel series of 6-substituted thieno[2,3-d]pyrimidine antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors over the reduced folate carrier and proton-coupled folate transporter for cellular entry / Y. Deng, X. Zhou, D.S. Kugel // *J Med Chem.* – 2009. – Vol. 52. – №9. – P. 2940-2951.

108.Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with

symptoms of acute stroke / C. Foerch [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2012. – Vol. 58 (1). – P. 237-45.

109. Diaz-Arrastia, R. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup / R. Diaz-Arrastia, P.M. Kochanek, P. Bergold // *J Neurotrauma*. – 2014. – Vol. 31(2). – P. 135-58.

110. Differential rate of recovery in athletes after first and second concussion episodes / S. Slobounov [et al.] // *Neurosurgery*. – 2007. – Vol. 61. – №. 2. – P. 338-344.

111. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis / E.C. Cheung [et al.] // *EMBO J*. – 2006. – Vol. 25(17). – P. 4061–4073.

112. Dixon, W.J. Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method / W.J. Dixon // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1991. – Vol. 15. – P. 47-50.

113. Dujardin, S. Tau prion-like propagation: state of the art and current challenges / S. Dujardin, B.T. Hyman // *Tau Biology*. – 2019. – P. 305-325.

114. Edinger, A.L. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy / A.L. Edinger, C.B. Thompson // *Current opinion in cell biology*. – 2004. – Vol. 16. – №. 6. – P. 663-669.

115. Eisner, V. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses / V. Eisner, V. Picard, G. Hajnóczky // *Nature cell biology*. – 2018. – Vol. 20. – №. 7. – P. 755-765.

116. Elevated Serum S-100B Protein as a Predictor of Failure to Short-Term Return to Work or Activities after Mild Head Injury / G. Stranjalis [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2004. – № 21. – P.1070-1075.

117. Elevation of neuron-specific enolase and S-100beta protein level in experimental acute spinal cord injury / F. Cao [et al.] // *J Clin Neurosci*. – 2008 – № 15. – P. 541-544.

118. Emerging histomorphologic phenotypes of chronic traumatic encephalopathy in American athletes / B. Omalu [et al.] // *Neurosurgery*. – 2011. – Vol. 69. – P. 173–183.

119. Endothelial nitric oxide synthase single nucleotide polymorphism and left ventricular function in early chronic kidney disease / S. Chand [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 116-120.

120. Enhanced Endothelial Cell Senescence by Lithium-induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression / I.T. Struwing, S.N. Durham, C.D. Barnett, C.D. Mao // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – P. 17595-606

121. Enolase and acute spinal cord injury / R. Polcyn [et al.] // *J. Clin. Cell. Immunol.* – 2017. – Vol. 8(6). – P. 536.

122. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe / W. Peeters [et al.] // *Acta Neurochir. (Wien)*. – 2015. – Vol. 157(10). – P. 1683-1696.

123. Familial prion disease with Alzheimer disease-like tau pathology and clinical phenotype / S. Jayadev [et al.] // *Annals of neurology*. – 2011. – Vol. 69. – №. 4. – P. 712-720.

124. Fehily, B. Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage / B. Fehily, M. Fitzgerald // *Cell Transplant*. – 2017. – Vol. 26(7). – P. 1131–1155.

125. 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.

126. Fesharaki-Zadeh, A. Chronic Traumatic Encephalopathy: A Brief Overview / A. Fesharaki-Zadeh // *Front. Neurol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 713.

127. Fu, Y. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets / Y. Fu, X. Wang, W. Kong // *Br J Pharmacol.* – 2018. – Vol. 175(8). – P. 1173–1189.

128. Furman, J.L. Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond / J.L. Furman, C.M. Norris // *J Neuroinflammation*. – 2014. – Vol. 11. – P. 158.

129.Gardner, R.C. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease / R.C. Gardner, K.Yaffe // *Mol Cell Neurosci.* – 2015. – Vol. 66. – P.75-80.

130.Gerhardt, V. Cocrystals of 6-chlorouracil and 6-chloro-3-methyluracil: exploring their hydrogen-bond-based synthon motifs with several triazine and pyrimidine derivatives / V. Gerhardt, E. Egert // *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials.* – 2015. – Vol. 71. – P. 209-220.

131.Ghajar, J. Traumatic brain injury / J. Ghajar // *The Lancet.* – 2000. – Vol. 356. – №. 9233. – P. 923-929.

132.Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury / P.E. Vos [et al.] // *Neurology.* – 2004. – Vol. 62(8). – P. 1303–1310.

133.Glynn. N. The frequency and the diagnosis of pituitary dysfunction after traumatic brain injury / N. Glynn, A. Agha // *Pituitary.* – 2019. – Vol. 22. – №. 3. – P. 249-260.

134.Goldberg, D.M. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.V. Ed.) 3rd edn / D.M. Goldberg, R.J. Spooner // *VerlogChemie, Deerfield Beach, Fl.* – 1983. – Vol. 3. – P. 258-265.

135.Guidelines for the primary prevention of stroke. A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / L.B. Goldstein [et al.] // *Stroke.* – 2011. – Vol. 42(2). – P. 517-84.

136.Hernandez, F. GSK3 and tau: Two convergence points in Alzheimer's disease / F. Hernandez, J.J. Lucas, J. Avila // *J. Alzheimers Dis.* – 2013. – Vol. 33. – P. 141-144.

137.HidroX® Roles in Neuroprotection: Biochemical Links between Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease / Cordaro M. [et al.] // *Antioxidants.* – 2021. – Vol. 10. – №. 5. – P. 818.

138.Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems / D. Djuric [et al.] // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* – 2018. – Vol. 96. – №. 10. – P. 991-1003.

139.Homocysteine in neurology: a possible contributing factor to small vessel disease / R. Moretti [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 4. – P. 2051.

140.Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal damage in the brainstem / D.H. Smith [et al.] // Journal of neurosurgery. – 2000. – Vol. 93. – №. 2. – P. 315-322.

141.Impaired cerebral haemodynamic function associated with chronic traumatic brain injury in professional boxers / D.M. Bailey [et al.] // Clinical science. – 2013. – Vol. 124. – №. 3. – P. 177-189.

142.Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury / V.E. Johnson [et al.] // Brain. – 2013. – Vol. 136. – P. 28–42.

143.Inhibition of monoacylglycerol lipase prevents chronic traumatic encephalopathy-like neuropathology in a mouse model of repetitive mild closed head injury / J. Zhang [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2015. – Vol. 35. – P. 443-453.

144.Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress / N. Doti [et al.] // Cell Death Dis. – 2014. – Vol. 5(1). – P. 993.

145.Iwata, R. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis / R. Iwata, P. Casimir, P. Vanderhaeghen // Science. – 2020. – Vol. 369. – №. 6505. – P. 858-862.

146.Johnson, V.E. Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans / V.E. Johnson, W. Stewart, D.H. Smith // Brain Pathol. – 2012. – Vol. 22. – P. 142-9.

147.Kabadi, S. Selective CDK inhibitors: Promising candidates for future clinical traumatic brain injury trials. / S. Kabadi, A. Faden // Neural Regen. – 2014. – Vol. 9. – P. 1578-1580.

148.Kinder, H. A. The pig as a preclinical traumatic brain injury model: current models, functional outcome measures, and translational detection strategies / H. A. Kinder, E. W. Baker, F. D. West // Neural regeneration research. – 2019. – Vol. 14. – №. 3. – P. 413.

149.Lapchak, P.A. Neuroprotective and neurotrophic curcuminoids to treat stroke: a translational perspective / P.A. Lapchak // *Expert Opin Investig Drugs*. –2011. – № 20. – P.13-22.

150.LaPlaca, M.C. Bioengineering in Brain Trauma Research / M.C. LaPlaca // *Neurotrauma: A Comprehensive Textbook on Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury*. – 2018. – P. 347.

151.Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in neurodegenerative diseases: a review of human studies / S. Petrovic [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – №. 11. – P. 1128.

152.Long-term consequences: effects on normal development profile after concussion / D.H. Daneshvar [et al.] // *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* – 2011. - Vol. 22, № 4. – P. 683-700.

153.Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins / N. Traverso [et al.] // *Journals of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2004. – Vol. 59(9). – P. 890–895.

154.Margulies, S. Combination Therapies for Traumatic Brain Injury Workshop Leaders. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations / S. Margulies, R. Hicks // *J Neurotrauma*. – 2009. – Vol. 26. – №6. – P.925-39.

155.McAllister, T.W. Neurobiological consequences of traumatic brain injury / T.W. McAllister // *Dialogues Clin Neurosci*. – 2011. – Vol. 13(3). – P. 287–300.

156.McKee, A.C. The neuropathology of traumatic brain injury / A.C. McKee, D.H. Daneshvar // *Handbook of clinical neurology*. – 2015. – Vol. 127. – P. 45-66.

157.Meaney, D.F. Biomechanics of concussion / D.F. Meaney, D.H. Smith // *Clinics in sports medicine*. – 2011. – Vol. 30. – №. 1. – P. 19-31.

158.Messing, A.GFAP at 50 / A. Messing, M. Brenner // *ASN neuro*. – 2020. – Vol. 12. – P. 1759091420949680.

159.Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture / M. Redmann [et al.] // *Redox Biol*. – 2018. – Vol. 17. – P. 59-69.

160. Methylene blue attenuates traumatic brain injury-associated neuroinflammation and acute depressive-like behavior in mice / A.M. Fenn [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2015. – Vol. 32. – P. 127–138.

161. Methylene Blue Reduces Neuronal Apoptosis and Improves Blood-Brain Barrier Integrity After Traumatic Brain Injury / J. Shen [et al.] // *Front. Neurol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1133.

162. Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study / R.C. Gardner [et al.] // *Neurology*. – 2018. – Vol. 90(20). – P. e1771–e1779.

163. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications / J. Zielonka [et al.] // *Chem Rev.* – 2017. – Vol. 117. – №15. – P. 10043–10120.

164. Moreno-Gonzalez, I. Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission / I. Moreno-Gonzalez, C. Soto // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2011. – Vol. 22. – №. 5. – P. 482-487.

165. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma / S.P. Patel [et al.] // *Exp Neurol*. – 2014. – Vol. 257. – P. 95-105.

166. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke / R. L. Jayaraj [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2019. – Vol. 16. – №. 1. – P. 1-24.

167. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke / C. Yang [et al.] // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2019. – Vol. 316. – №. 2. – P. 135-153.

168. Neuronal Cell Death / M. Fricker [et al.] // *Physiol Rev.* – 2018. – Vol. 98(2). – P. 813–880.

169. New insights into the role of neuron-specific enolase in neuro-inflammation, neurodegeneration, and neuroprotection / A. Haque [et al.] // *Brain sciences*. – 2018. – Vol. 8. – №. 2. – P. 33.

170. Ng, S. Y. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets / S. Y. Ng, A. Y. W. Lee // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 528.

171. Novel pyrimidine and its triazole fused derivatives: synthesis and investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity / C.M. Bhalgat, M.I. Ali, B. Ramesh, G. Ramu // *Arab J Chem*. – 2014. – Vol. 7. – P.986-993.

172. Okawa, Y. Stress-induced hyperphosphorylation of tau in the mouse brain / Y. Okawa, K. Ishiguro, S.C. Fujita // *FEBS Lett*. – 2003. – Vol. 535. – P. 183–189.

173. Omalu, B. Chronic traumatic encephalopathy / B. Omalu // *Prog Neurol Surg*. – 2014. – Vol. 28. – P.38–49.

174. Oxidative stress and new pathogenetic mechanisms in endothelial dysfunction: potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets / M. G. Scioli [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9. – №. 6. – P. 1995.

175. Oxidative stress in cancer cell metabolism / S. Arfin [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – №. 5. – P. 642.

176. Persistent oxygen-glucose deprivation induces astrocytic death through two different pathways and calpain-mediated proteolysis of cytoskeletal proteins during astrocytic oncosis / X. Cao [et al.] // *Neurosci Lett*. – 2010. – Vol. 479(2). – P. 118–122.

177. Panda, S.S. Synthesis of novel indolyl-pyrimidine antiinflammatory, antioxidant and antibacterial agents / S.S. Panda, P.V.R. Chowdary // *Indian journal of pharmaceutical sciences*. – 2008. – Vol. 70, № 2. – P. 208.

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

179. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) / Y. Wang [et al.] // *Sci Signal*. – 2011. – Vol. 4. – P. 20.

180. Poredos, P. Endothelial dysfunction and its clinical implications / P. Poredos, A. V. Poredos, I. Gregoric // *Angiology*. – 2021. – Vol. 72. – №. 7. – P. 604-615.

181. Prediction of neuropsychological outcome after mild traumatic brain injury using clinical parameters, serum S100B protein and findings on computed tomography / K. Heidari [et al.] // *Brain injury*. – 2015. – Vol. 29. – №. 1. – P. 33-40.

182. Protein oxidation-formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases / R. Kehm [et al.] // *Redox Biology*. – 2021. – Vol. 42. – P. 101-901.

183. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway / A. A. Khutorenko [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – №29. – P. 12828-12833.

184. Qian, J. Neuronal and axonal degeneration in experimental spinal cord injury: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy and histology / J. Qian, J.J. Herrera, P.A. Narayana // *J. Neurotrauma*. – 2010. – Vol. 27. – P. 599–610.

185. Quantitative Proteomic Analysis Reveals Impaired Axonal Guidance Signaling in Human Postmortem Brain Tissues of Chronic Traumatic Encephalopathy / B. Bi [et al.] // *Experimental neurobiology*. – 2019. – Vol. 28(3) – P. 362-375.

186. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases / Q. Chen [et al.] // *British journal of pharmacology*. – 2018. – Vol. 175. – №. 8. – P. 1279-1292.

187. Reis, A. Chemistry of phospholipid oxidation / A. Reis, C.M. Spickett // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1818(10). – P. 2374–2387.

188. Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease / B. Ray [et al.] // *Translational psychiatry*. – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-17.

189. Rojo, A.I. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: Relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress / A.I. Rojo, M.R. Sagarra, Cuadrado A. // *J. Neurochem*. – 2008. – Vol. 105. – P. 192-202.

190. Role of microvascular disruption in brain damage from traumatic brain injury / A.F. Logsdon [et al.] // *Comprehensive Physiology*. – 2015. – Vol. 5(3). – P. 1147-1160.

191. Role of Tau Acetylation in Alzheimer's Disease and Chronic Traumatic Encephalopathy: The Way Forward for Successful Treatment / B. Lucke-Wold [et al.] // *J. Neurol. Neurosurg.* – 2017. – Vol. 4. – P. 1129-1138.

192. Roozenbeek, B. New considerations in the design of clinical trials for traumatic brain injury / B. Roozenbeek, H.F. Lingsma, A.I. Maas // *Clin Investig.* – 2012. – №2(2). – P.153-162.

193. Saleem, S. Apoptosis, autophagy, necrosis and their multi galore crosstalk in neurodegeneration / S. Saleem // *Neuroscience.* – 2021. – Vol. 469. – P. 162-174.

194. Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity / K. Shirakawa // *eLife.* – 2016. – Vol. 5. – P. e11156.

195. Salsalate treatment following traumatic brain injury reduces inflammation and promotes a neuroprotective and neurogenic transcriptional response with concomitant functional recovery / M. Lagraoui [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2017. – Vol. 61. – P. 96-109.

196. Salubrinal reduces oxidative stress, neuroinflammation and impulsive-like behavior in a rodent model of traumatic brain injury. / A.F. Logsdon [et al.] // *Brain Res.* – 2016. – Vol. 1643. – P. 140-151.

197. Schallert, T. Disentangling multiple types of recovery from brain injury: Recovery of function / T. Schallert, M.T. Woodlee, S.M. Fleming. // *Pharmacology of Cerebral Ischemia.* – 2002. – P. 201-216.

198. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease) / J. F. Bermejo-Martin [et al.] // *Journal of clinical medicine.* – 2018. – Vol. 7. – №. 11. – P. 400.

199. Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo / C.M. Cowan [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol.120 – P.593-604.

200. Strang, K. H. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration / K.H. Strang, T.E. Golde, B.I. Giasson // *Laboratory investigation.* – 2019. – Vol. 99. – №. 7. – P. 912-928.

201.Synthesis and Antioxidant Activity of New Pyrazolo[1,5-a]Pyrimidine Derivatives Incorporating a Thiazol-2-ylidiazenyl Moiety / A. El-Mekabaty [et al.] // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 2016. – Vol. 53, № 6. – P. 1820-1826.

202.Synthesis and biological evaluation of thieno [2',3':4,5]pyrimido[1,2-b][1,2,4]triazines and thieno[2,3-d] [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines as anti-inflammatory and analgesic agents / H.M. Ashour, O.G. Shaaban, O.H. Rizk, I.M. El-Ashmawy // *Eur J Med Chem*. – 2013. – Vol. 62. – P. 341-351.

203.Tau Antibody Targeting Pathological Species Blocks Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro / Nobuhara C.K. [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2017. – Vol. Vol.187. – P. 1399-1412.

204.TBI in the United States: emergency department visits, hospitalizations, and deaths 2002–2006 / M.D. Faul [et al.] // Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control. – 2010.

205.The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation / T. J. Cohen [et al.] // *Nat. Commun.* – 2011. – Vol. 2. – P. 252.

206.The Administration of the New Pyrimidine Derivative—4-{2-[2-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-Vinyl]-6-Ethyl-4-Oxo-5-Phenyl-4H-Pyrimidine-1-Il} Benzulfamide Restores the Activity of Brain Cells in Experimental Chronic Traumatic Encephalopathy by Maintaining Mitochondrial Function / D.I. Pozdnyakov, K.A. Miroshnichenko, A.V. Voronkov, T.G. Kovaleva. // *Medicina*. – 2019. – Vol. 55. – №. 7. – P. 386.

207.The amyloid- β pathway in Alzheimer's disease / Hampel H. [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2021. – Vol. 26. – №. 10. – P. 5481-5503.

208.The coarse-grained plaque: a divergent A β plaque-type in early-onset Alzheimer's disease / B. D. C. Boon [et al.] // *Acta neuropathologica*. – 2020. – Vol. 140. – №. 6. – P. 811-830.

209.The early events that initiate β -amyloid aggregation in Alzheimer's disease / X. Zhang [et al.] // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2018. – Vol. 10. – P. 359.

210. The first NINDS/NIBIB consensus meeting to define neuropathological criteria for the diagnosis of chronic traumatic encephalopathy / A.C. McKee [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2016. – Vol. 131. – P. 75–86.

211. The genetics and pathology of mitochondrial disease / C.L. Alston [et al.] // *JPathol.* – 2017. – Vol. 241. – №2. – P. 236–250.

212. The history of pituitary dysfunction after traumatic brain injury/ S. Benvenega [et al.] // *Pituitary.* – 2019. – Vol. 22. – №. 3. – P. 229-235.

213. The model of local axon homeostasis-explaining the role and regulation of microtubule bundles in axon maintenance and pathology / I. Hahn [et al.] // *Neural development.* – 2019. – Vol. 14. – №. 1. – P. 1-28.

214. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health / H. Škovierová [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 17(10). – P. 1733.

215. The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy / A.C. McKee, T.D. Stein, P.T. Kiernan, V.E. Alvarez // *Brain pathology.* – 2015. – Vol. 25. – №. 3. – P. 350-364.

216. The neuropathology of sport / A.C. McKee, D.H. Daneshvar, V.E. Alvarez, T.D. Stein // *Acta Neuropathol.* – 2014. – Vol. 127. – P. 29-51.

217. The neuroprotective properties of carnosine in a mouse model of manganism is mediated via mitochondria regulating and antioxidative mechanisms / M. M. Ommati [et al.] // *Nutritional Neuroscience.* – 2020. – Vol. 23. – №. 9. – P. 731-743.

218. The pathophysiology underlying repetitive mild traumatic brain injury in a novel mouse model of chronic traumatic encephalopathy / A.L. Petraglia [et al.] // *Surg Neurol Int.* – 2014. – Vol. 23 (5). – P. 184.

219. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury / F. Michetti [et al.] // *Journal of Neurochemistry.* – 2019. – Vol. 148. – №. 2. – P. 168-187.

220. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy / A.C. McKee [et al.] // *Brain.* – 2013. – Vol. 136. – №. 1. – P. 43-64.

221. Traumatic brain injuries / K. Blennow [et al.] // *Nature reviews Disease primers.* – 2016. – Vol. 2. – P. 16084.

222. Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology / P.K. Dash [et al.] // *Front Syst Neurosci.* – 2016. – Vol. 10. – P. 36.

223. Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link / J. Ramos-Cejudo [et al.] // *EBioMedicine.* – 2018. – Vol. 28. – P. 21-30.

224. Traumatic brain injury and risk of long-term brain changes, accumulation of pathological markers, and developing dementia: a review / C. LoBue [et al.] // *Journal of Alzheimer's disease.* – 2019. – Vol. 70(3). – P. 629-654.

225. Traumatic brain injury in vivo and in vitro contributes to cerebral vascular dysfunction through impaired gap junction communication between vascular smooth muscle cells / G.X. Yu [et al.] // *J Neurotrauma.* – 2014. – Vol. 31. – P. 739-748.

226. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep / J.A. Woolliams, G. Wiener, P.H. Anderson, C.H. McMurray // *Res Vet Sci.* – 1983. – Vol. 34(3). – P. 253-6.

227. Whalley, K. Changes in response to spinal cord injury with development: Vascularization, hemorrhage and apoptosis / K. Whalley, P. O'Neill, P. Ferretti // *Neuroscience.* – 2006. – №137. – P. 821-832.

228. Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? / R. M. Anderson, C. Hadjichrysanthou, S. Evans, M.M. Wong // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390. – P. 2327–2329.

229. Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? / S. Gauthier [et al.] // *Alzheimers Dement.* – 2016. – Vol. 12. – P. 60-64.

230. Yagami, T. Pathophysiological roles of intracellular proteases in neuronal development and neurological diseases / T. Yagami, Y. Yamamoto, H. Koma // *Molecular neurobiology.* – 2019. – Vol. 56. – №. 5. – P. 3090-3112.

231. Yuan, J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death / J. Yuan // *Molecular cell.* – 2006. – Vol. 23. – №. 1. – P. 1-12.

232. Zong, W.X. Necrotic death as a cell fate / W.X. Zong, C.B. Thompson // *Genes & development.* – 2006. – Vol. 20. – №. 1. – P. 1-15.

233.Zorov, D.B. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott // *Physiol Rev.* – 2014. – Vol. 94. – №3. – P. 909–950.