

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Болотова Вера Цезаревна

**РАЗРАБОТКА НОВОГО НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ЭТАНОЛАМИНА, БУТАНДИОВОЙ И ТРАНС-БУТЕНДИОВОЙ КИСЛОТ
(экспериментальное исследование)**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени доктора фармацевтических наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Шустов Евгений Борисович

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Современные ноотропные средства и перспективы развития группы (обзор литературы).....	13
1.1. Фармакологическая характеристика современных ноотропных средств.....	15
1.2. Влияние интермедиантов цикла Кребса на функциональное состояние ЦНС.....	39
1.3. Механизмы ноотропного действия на уровне синаптических мембран.....	52
1.4. Перспективные направления развития фармакологического класса ноотропов.....	56
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	62
2.1. Общая организация и схема исследования.....	62
2.2. Методы моделирования патологических процессов.....	65
2.2.1. Методы моделирования острых гипоксических состояний.....	66
2.3. Методы моделирования ишемической патологии головного мозга.....	71
2.4. Модель скополаминовой амнезии.....	74
2.5. Модели <i>in vitro</i> по изучению механизма действия.....	75
2.6. Методы компьютерной оценки биологической активности.....	77
2.7. Методы оценки функций.....	81
2.7.1. Методы оценки поведения животных.....	81
2.7.2. Методы оценки когнитивных функций животных.....	82
2.7.3. Методы оценки координации животных и моторных функций.....	84
2.7.4. Методы оценки актопротекторной активности животных.....	86
2.8. Методы предварительной оценки безопасности исследуемого соединения.....	87
2.8.1. Методы оценки острой токсичности.....	87
2.8.2. Методы оценки хронической токсичности.....	91
2.9. Методы оценки фармакокинетики.....	93
2.9.1. Компьютерный прогноз метаболизма ФДЭС.....	104
2.10. Материалы и методы технологии производства таблеток.....	104
2.11. Статистическая обработка результатов.....	107
Глава 3. Скрининг новых эфиров аминоксанола с янтарной и фумаровой кислотой и их солей с кислотами цикла Кребса на наличие психоактивирующего и антигипоксического эффектов...	108
3.1. Скрининг психоактивирующей активности.....	110
3.2. Скрининг антигипоксической активности.....	112
Глава 4. Нейропротекторное действие ФДЭС.....	115
4.1. Характеристика нейропротекторного действия препаратов.....	115
4.2. Влияние ФДЭС на устойчивость мозга к критической гипоксии.....	120

4.3. Оценка нейропротекторного действия.....	124
4.3.1. Изучение влияния ФДЭС на выживаемость животных после перевязки общих сонных артерий.....	125
4.3.2. Изучение влияния ФДЭС на координаторные функции животных при фокальной ишемии головного мозга.....	125
4.3.3. Изучение влияния ФДЭС на пространственную ориентацию и память животных после фокальной ишемии головного мозга.....	126
4.3.4. Изучение влияния ФДЭС на модели фокальной черепно-мозговой травмы.....	127
Глава 5. Влияние ФДЭС на поведение и когнитивные функции лабораторных животных.....	133
5.1. Влияние ФДЭС на поведение	137
5.1.1. Влияние ФДЭС на поведение здоровых лабораторных животных.....	137
5.1.2. Влияние курсового введения ФДЭС на спонтанное поведение животных при создании ишемии головного мозга.....	139
5.2. Влияние введения ФДЭС на когнитивные функции.....	140
5.2.1. Обучение в Т-образном лабиринте.....	141
5.2.2. Влияние ФДЭС на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте «Экстраполяционное избавление».....	142
5.2.3. Антиамнестическое действие на модели скополаминовой амнезии.....	143
Глава 6. Изучение механизма действия.....	145
6.1. Механизм действия.....	145
6.2. Компьютерное моделирование взаимодействия ФДЭС с молекулярными мишенями.....	150
Глава 7. Фармакокинетика.....	153
7.1. Разработка методики количественного определения ФДЭС в биосредах.....	153
7.2. Определение соединения ФДЭС в крови и моче лабораторных животных при внутривенном введении.....	157
7.3. Фармакокинетические свойства таблеток ФДЭС при пероральном введении.....	160
7.4. Метаболизм соединения ФДЭС.....	163
Глава 8. Технология производства таблеток.....	168
8.1. Физико-химическая и технологическая характеристика субстанции ФДЭС.....	168
8.2.1. Получение таблеток производного ДЭАЭ с использованием метода влажного гранулирования.....	169
8.2.3. Обоснование состава таблеток ДЭАЭ и изучение их свойств.....	175

Глава 9. Предварительная оценка безопасности ФДЭС.....	179
9.1. Изучение острой токсичности субстанции ФДЭС	179
9.2. Изучение хронической токсичности таблеток ФДЭС	186
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	190
ВЫВОДЫ.....	198
Научно-практические рекомендации.....	200
Список сокращений.....	201
Список литературы.....	202

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заболевания центральной нервной системы и сопровождающие их расстройства психической деятельности являются не только одной из самых частых причин обращений за медицинской помощью, но и ведут к нарушениям социализации пациентов, их трудоспособности, способности к самообслуживанию. Наиболее распространёнными нарушениями являются восприятие, обработка, усвоение, хранение и обмен информацией, способность к планированию, построение и осуществление программы действий, ориентация во времени, пространстве и социальной среде [199]. Согласно популяционным исследованиям, около 5% лиц старше 65 лет страдают деменцией, у 12-17% выявляются когнитивные нарушения, выходящие за рамки возрастной нормы, но не достигающие выраженности слабоумия [267]. Распространенность умеренных когнитивных нарушений (УКН) среди лиц пожилого возраста достигает 12—17%, а среди неврологических больных у УКН встречается в 44% случаев [167, 376]. По статистике, не менее 5% деменций, возникших в пожилом возрасте, вызываются системными дисметаболическими расстройствами, не менее чем в 30% случаев имеется сочетание первичного органического поражения головного мозга и дисметаболических нарушений [377].

По прогнозам экспертов Всемирной организации здравоохранения, число больных, страдающих деменцией, с каждым годом увеличивается. Так, в 2000 г число пациентов с деменцией достигало 24,3 млн человек, а в 2010 г. – уже 35,6 млн человек. По оценкам, к 2030 г. ожидается увеличение числа больных деменцией до 65,7 млн человек, к 2040 г. – до 81,1 млн человек, а в 2050 г. их число составит 115,4 млн человек [341, 387].

По результатам международных эпидемиологических исследований, сосудистая этиология – третья по распространенности (после болезни Альцгеймера и дегенеративного процесса с тельцами Леви) причина деменции в пожилом и старческом возрасте [241].

Хроническая ишемия и гипоксия головного мозга являются факторами риска развития церебрального амилоидоза – главного патогенетического события болезни Альцгеймера, а инфаркты головного мозга способствуют более быстрой клинической манифестации асимптомного или малосимптомного нейродегенеративного процесса [408]. Известно, что отложение амилоидного белка происходит не только в паренхиме головного мозга, но и в церебральных сосудах, вызывая амилоидную микроангиопатию [148], которая усугубляет и видоизменяет сосудистые когнитивные нарушения [78].

Приоритетным в лечении пациентов с лёгкими и умеренными недементными когнитивными нарушениями является нейропротективная терапия, которая замедляет

прогрессирование патологического процесса и уменьшает заболеваемость деменцией. Основными представителями лекарственных препаратов с нейропротективным действием являются ноотропные средства. Среди ноотропных препаратов особый интерес представляют лекарственные средства, воспроизводящие физиологические эффекты эндогенных веществ, в частности, аминокетаны и его производные, интермедиаты цикла Кребса.

Группа нейропротекторных фармакологических средств представлена в клинической практике достаточно широко, эффективность их применения у пациентов с когнитивными нарушениями остается низкой, что и определяет актуальность проведения исследований по поиску новых, более эффективных в отношении когнитивных функций, представителей группы ноотропных средств.

Степень разработанности

Исследуемое соединение является новым фармакологически активным веществом, состоящим из продуктов взаимодействия транс-бутандиовой кислоты и диэтилэтаноламина (ДЭАЭ) с бутандиовой кислотой, представляющим собой янтарную соль фумарового эфира диэтилэтаноламина.

В научной литературе изучены и описаны фармакологические свойства отдельных перспективных веществ, реализующиеся на рецепторном и субстратном уровнях. Диметилэтаноламин (ДМАЕ) – естественный компонент тканей мозга человека, повышает уровень ацетилхолина в головном мозге за счет субстратной активации его синтеза или торможения его окисления до бетаина, является прекурсором ацетилхолина, активирует холинергические рецепторы, обладает антиоксидантными свойствами, улучшает захват и перенос кислорода к тканям, выражено стимулирует когнитивные функции и способствует повышению умственной и физической работоспособности у пожилых людей [93, 289], после перенесённого ишемического инсульта и черепно-мозговой травмы, отравлении барбитуратами и хронического алкоголизма.

Входящий в состав разработанного вещества, диэтилэтаноламин, подобно диметилэтаноламину, обеспечивает синтез медиатора ацетилхолина и фосфатидилхолина - структурного компонента клеточных мембран нейронов, стимулирует передачу импульса в холинергических волокнах, выражено улучшает пластичность мембран нейронов, обладает антиоксидантным действием. В сумме, перечисленные плейотропные эффекты диэтилэтаноламина, способствуют повышению концентрации внимания, улучшают процессы запоминания и воспроизведения информации, оптимизируют познавательные и поведенческие реакции, устраняют эмоциональную раздражительность и неврологическую симптоматику.

Не меньший интерес представляют интермедиаты цикла Кребса янтарная и фумаровая кислоты, которые защищают клетки от гипоксии, препятствуют развитию митохондриальной

дисфункции, расширяют сосуды конечностей и почек. Янтарная кислота активирует специфические рецепторы (SUCNR1), оказывая метаболическое и гормоноподобное действие, повышает содержание сигнального белка, стимулирующего рост эндотелия сосудов (VEGF), выполняет роль нейронального регулятора высвобождения провоспалительных агентов после гипоксии/ишемии мозга, ограничивает размер очага инфаркта [108, 172, 173, 244, 249, 391].

Фумаровая кислота оказывает антигипоксическое действие в условиях выраженной гипоксии [138]. Производное фумаровой кислоты – диметилфумарат, ингибирует синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, препятствует развитию аутоиммунного воспаления нейронов и в настоящее время применяется для лечения рассеянного склероза [258].

Известно, что янтарный эфир диметилэтанолamina оказывает отчетливое позитивное влияние на работоспособность, устойчивость к гипоксии, стрессу и воздействию низких температур. В медицинской литературе известно описание антиастенического действия диметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты [308].

В целом, каждое в отдельности вещество не обладает достаточным спектром фармакологических свойств, чтобы в условиях монотерапии эффективно устранять когнитивные расстройства. Более того, на мировом фармацевтическом рынке отсутствуют препараты с ноотропной активностью широкого спектра действия, разработанные на основе фумаровой кислоты.

Соответствие исследований государственным и ведомственным программам:

Разработка новых, высокоэффективных средств в рамках восстановительной неврологии рассматривается как один из приоритетов отечественной медицинской науки (Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 №2580-р «Об утверждении стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года», п. 2.9. Научная платформа «Неврология и нейронауки», п. 2.7. Научная платформа «Фармакология», распоряжения Правительства Российской Федерации от 31.12.2020 г. №3684-р об утверждении «Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

Работа выполнена в соответствии с Государственным контрактом № 14. N08.12.0120 DI «Лекарственное средство на основе солей органических кислот с диэтиламиноэтанолом, обладающее нейропротекторным действием» (2016-2018).

Цель исследования. Разработка нового ноотропного препарата на основе структуры диэтилэтанолamina с интермедиатами цикла Кребса.

Задачи исследования:

1. Осуществить выбор наиболее активного соединения на основе структуры диэтилэтанолamina с интермедиатами цикла Кребса.

2. Изучить антигипоксическое действие различных доз выбранного соединения при однократном введении в условиях острой (нормобарической, гемической и гистотоксической) гипоксии.
3. Изучить нейропротекторное действие соединения на моделях глобальной ишемии головного мозга, окклюзии средней мозговой артерии и направленного кортикального шока.
4. Изучить влияние нового фармакологически активного соединения на поведение, когнитивные функции, пространственную ориентацию и память животных.
5. Установить возможные нейропротекторные механизмы действия бутандиовой соли транс-бутендиового эфира диэтилэтанолamina (янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтанолamina, ФДЭС) с использованием методов компьютерного моделирования биологического действия и модели амилоидной токсичности *in vitro*.
6. Исследовать фармакокинетические характеристики ФДЭС при пероральном поступлении в организм лабораторных животных.
7. Составить алгоритм лабораторной технологии производства таблеток.
8. Провести первичную оценку безопасности субстанции ФДЭС при однократном введении и изучить безопасность таблеток ФДЭС при курсовом введении.

Научная новизна:

1. Впервые показано наличие нейропротекторного, нейрореабилитационного и когнитивного компонентов действия, характерного для ноотропных средств, для нового производного транс-бутендиового эфира диэтиламиноэтанола – его янтарнокислой соли.
2. Впервые изучено нейропротекторное действие ФДЭС. Установлено, что данное вещество в условиях гипоксического, ишемического и травматического поражения головного мозга уменьшает выраженность когнитивно-мнестических и эмоциональных нарушений, а также препятствует развитию дегенеративных гистоморфологических изменений ткани головного мозга.
3. Впервые показано, что янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтанолamina не только предотвращает развитие нейродегенеративных процессов в структурах головного мозга, но и устраняет неврологический дефицит, вызванный гипоксически-ишемическими процессами. Выявлена способность этого соединения повышать выживаемость лабораторных животных и восстанавливать их когнитивную и двигательную активность.
4. Впервые было установлено, что механизм нейропротекторного действия ФДЭС связан с его способностью активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики, защищать грибовидные шипики дендритных синапсов от амилоидной синаптотоксичности и повышать нейропластичность в гиппокампе.

5. Впервые проведён компьютерный прогноз фармакологической активности исследуемого соединения, согласно которому ФДЭС способствует увеличению когнитивной активности и снижению последствий, вызванных ишемией головного мозга и черепно-мозговой травмой. Эти эффекты в дальнейшем были подтверждены в экспериментах на животных.
6. Впервые изучена безопасность исследуемого вещества. Однократное пероральное введение соединения ФДЭС в дозе 2000 мг/кг не вызывало гибели мышей обоего пола, что позволяет отнести исследуемое вещество к «5 классу токсичности или не классифицируется».
7. Впервые изучена безопасность таблеток ФДЭС при курсовом пероральном введении в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг. Установлено, что таблетки ФДЭС в терапевтической дозе и превышающей ее в 10 раз не вызывает статистически значимого увеличения реакции гиперчувствительности замедленного типа, токсического воздействия на внутренние органы, не оказывает тератогенного и эмбриотоксического действия на плод по сравнению с контрольной группой животных, получавшей воду очищенную.
8. Впервые изучены фармакокинетические параметры ФДЭС при пероральном введении его таблетированной лекарственной формы. Установлено, что фармакокинетическая кривая для однократного перорального введения таблеток ФДЭС носит моноэкспоненциальный характер. Биодоступность таблеток составила 25,0%, пик концентрации в плазме крови наблюдался через 30 мин после однократного перорального введения, объем распределения равен 28,09 л/кг, период полувыведения - 0,37 ч (22,2 мин), среднее время удержания в организме крысы - 14,79 ч. ФДЭС определялся в плазме крови и моче более 24 ч.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретически и экспериментально обосновано новое перспективное направление создания ноотропного вещества широкого спектра, сочетающего нейропротекторные и антиамнестические свойства, для профилактики и лечения когнитивных нарушений ЦНС, вызванных гипоксически-ишемическими процессами, на основе янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтаноламина.

Исследование ноотропных свойств нового производного фумаровой кислоты позволило установить, что ФДЭС обладает высокой нейропротекторной и антиамнестической активностями, превосходит по эффективности используемый препарат цитофлавин, обосновать перспективность создания на его основе эффективного ноотропного средства с широким спектром действия для профилактики и лечения когнитивных нарушений в комплексной терапии гипоксических состояний, ишемического инсульта и травмы головного мозга.

Показана безопасность субстанции ФДЭС при однократном введении в дозах до 3000 мг/кг и таблеток ФДЭС при курсовом пероральном введении в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг.

Методология и методы исследования

Настоящее исследование носило комплексный характер, предполагающий сочетание экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* и методов компьютерного моделирования *in silico*.

Экспериментальные исследования выполнены с использованием белых беспородных крыс и мышей в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств. Механизм нейропротекторного действия нового ноотропного вещества ФДЭС изучен на модели амилоидной синаптотоксичности *in vitro*.

Использован физико-химический метод - ВЭЖХ для изучения фармакокинетики ФДЭС.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили в пакете программ «Statistica 6.0» (США) с использованием стандартных параметрических и непараметрических методов.

Все исследования, проведенные с использованием животных, были одобрены комиссией по этике Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Бутановая соль транс-бутендиового эфира диэтилэтанолamina (ФДЭС) оказывает нейропротекторную активность в условиях острой гипоксии, значительно повышает устойчивость животных к гипоксии.
2. В условиях тотальной ишемии мозга ФДЭС значительно повышает выживаемость животных и снижает неврологический дефицит у крыс после окклюзии средней мозговой артерии и дозированного кортикального удара, способствует восстановлению координаторных и сенсомоторных функций, уменьшает степень повреждения мозга.
3. ФДЭС выражено повышает когнитивные функции лабораторных животных, в том числе в условиях экспериментального их нарушения.
4. Нейропротекторная активность ФДЭС в поддержании уровня нейронального депонированного входа кальция и оптимальной структуры шипикового аппарата синапса проявляется на модели амилоидной токсичности.
5. ФДЭС – безопасная фармацевтическая субстанция, характеризующаяся приемлемой для перорального применения фармакокинетикой.

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методологических подходов, соответствующих целям и критериям доказательной медицины. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы и статистической обработкой результатов.

Основные результаты работы обсуждались на: научно-практических конференциях с международным участием «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область, 2014, 2017-2022), всероссийской научной конференции «Фармакология экстремальных состояний», посвященной 150-летию Н.П. Кравкова (г. Санкт-Петербург, 2015), III, IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 2015, 2016), международной конференции «Новые тенденции в разработке лекарственных средств» (г. Турку, Финляндия, 2015), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития», посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (г. Курск, 2016), V конгрессе фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарственных средств» (г. Ярославль, 2018), научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии», посвященной 100-летию со дня рождения академика С.Н. Голикова (г. Санкт-Петербург, 2019), республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современное состояние фармацевтической промышленности: проблемы и перспективы» (г. Ташкент, 2019, 2020), международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учебного заведения «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «Современные достижения фармацевтической науки и практики» (г. Витебск, 2019), на заседании Санкт-Петербургского научного общества фармакологов (г. Санкт-Петербург, 2020-2021).

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автор сформулировал цели и задачи исследования, спланировал и выполнил ряд экспериментов, провел работу по обработке и интерпретации полученных данных, а также подготовил и опубликовал результаты собственных экспериментальных исследований.

Публикации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 33 печатные работы, из них 13 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, получено 2 патента на изобретение, опубликована 1 монография, внедрены 2 методические рекомендации по доклиническому изучению новых лекарственных средств, обладающих антигипоксическим и актопротекторным действием.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертационного исследования представлены на 238 страницах машинописного текста и состоят из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 7 глав с результатами собственных исследований и их обсуждением, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 445 источников, в том

числе 240 на русском и 205 на иностранных языках. Работа проиллюстрирована 75 таблицами и 40 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ НООТРОПНЫЕ СРЕДСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ (обзор литературы)

Центральная нервная система человека и головной мозг, как ее основной морфофункциональный орган, в силу своей структурной сложности и многогранности, есть один из самых чувствительных органов организма человека. Заболевания нервной системы и сопутствующие им нарушения психической деятельности являются не только одной из наиболее частых причин посещения врача, но и приводят к нарушениям социализации больных, их трудоспособности, неспособности к самообслуживанию. Следует отметить, что такая патология охватывает весь возрастной диапазон жизни человека, от рождения (последствия внутриутробной гипоксии плода, детский церебральный паралич) до пожилого возраста (болезнь Альцгеймера, возрастная и сосудистая деменция). Согласно популяционным исследованиям, около 5% людей 65 лет и старше склонны к слабоумию. Еще 12-17% имеют когнитивные нарушения, выходящие за пределы возрастной нормы, но не достигающие выраженности деменции. [267].

В большинстве случаев заболеваний головного мозга у человека нарушается возможность адекватного взаимодействия с окружающим миром, что проявляется расстройствами когнитивных функций. Под когнитивными понимаются наиболее сложные функции мозга, с помощью которых происходит рациональное познание окружающего мира и обеспечивается целенаправленное взаимодействие с ним. К ним относятся восприятие, обработка и анализ информации, запоминание, хранение и обмен информацией, построение и реализация программы действий, ориентация во времени, пространстве и социальной среде [199].

Когнитивные нарушения являются полиэтиологическими состояниями. Существует несколько десятков нозологических форм, в рамках которых развиваются когнитивные нарушения. К этим нозологическим формам относятся как первичные заболевания головного мозга, так и различные соматические, неврологические и психические расстройства, негативно влияющие на когнитивные функции. Основными причинами когнитивных нарушений могут быть:

- Нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорей Гентингтона и др.);
- Сосудистые заболевания головного мозга (инфаркт мозга, мультиинфарктное состояние, хроническая церебральная ишемия, последствия геморрагического поражения головного мозга, сочетанное сосудистое поражение головного мозга);
- Смешанные (сосудисто-дегенеративные) когнитивные нарушения;

- Дисметаболические энцефалопатии (гипоксическая, печёночная, почечная, диабетическая, гипогликемическая, дистиреоидная, дефицитарные состояния (дефицит В₁, В₁₂, фолиевой кислоты, белков),
- Токсическая энцефалопатия при промышленных и бытовых отравлениях;
- Ятрогенные когнитивные нарушения (на фоне применения холинолитиков, барбитуратов, бензодиазепинов, нейролептиков, солей лития и др.);
- Нейроинфекции и демиелинизирующие заболевания (ВИЧ-ассоциированная энцефалопатия, губчатый энцефалит, последствия острых и подострых менингоэнцефалитов, рассеянный склероз);
- Черепно-мозговая травма,
- Опухоли головного мозга,
- Ликвородинамические нарушения и другие заболевания.

Когнитивные нарушения подразделяются на лёгкие, умеренные и тяжёлые. Исторически проблемы когнитивных расстройств рассматривались преимущественно в рамках понятия «деменция»: термины «деменция», «слабоумие» означают наиболее тяжёлые когнитивные нарушения, приводящие к дезадаптации в повседневной жизни. Лишь в дальнейшем большое внимание стали уделять менее выраженным расстройствам. Умеренные когнитивные расстройства (УКР) представляют собой нарушения, которые выражено выходят за рамки возрастной нормы, но не способствующие дезадаптации человека в повседневной жизни [240, 243, 343]. УКР, как правило, отображаются в жалобах индивида и привлекают на себя внимание окружающих, могут мешать выполнять наиболее сложные формы интеллектуальной деятельности. По данным исследований распространенность УКР среди пожилых лиц достигает 12—17%. Среди неврологических пациентов синдром УКР встречается в 44% случаев [167, 239, 376, 377]. В соответствии с критериями МКБ-10 для постановки диагноза УКР необходимо наличие жалобы пациента на повышенную усталость при выполнении умственной работы, нарушение внимания, памяти или способности к обучению, которые не достигают уровня деменции, имеют в своей основе органическое происхождение, не связанных с делирием.

Следовательно, исходя из этиологических причин и патогенетического механизма развития когнитивных расстройств, ключевыми в направлениях фармакопрофилактики и фармакореконструкции когнитивных нарушений могут считаться:

А) Увеличивающие церебральный кровоток и перенос кислорода и глюкозы к нейронам (цереброваскулярные средства, антиагреганты, ноотропы);

Б) Уменьшающие восприимчивость нервных клеток к повреждающему воздействию (антиоксиданты и антигипоксанты, ноотропы, некоторые блокаторы кальциевых каналов, блокаторы глутаматных рецепторов, барбитураты, ГАМК-агонисты, бензодиазепины и др.);

В) Усиливающие обменные процессы в нервной ткани (ноотропы, энергодающие соединения, субстраты и кофакторы пластического обмена);

Г) Улучшающие регенераторные процессы в нейроглие и нейрональную пластичность (ноотропы, биогенные стимуляторы, адаптогены, анаболические нейроромоны);

Д) Ликвидирующие результаты возникшего нейронального повреждения (ноотропы, нейропептиды и их аналоги, фосфолипиды и их предшественники, холинэргические средства, стимуляторы других медиаторных систем мозга).

Поражения ЦНС различного генеза сказываются на качестве жизни пациента, в первую очередь на его способность вести привычный активный образ жизни [71, 77, 295]. Поэтому восстановление физической и умственной работоспособности у таких больных является одной из основных целей терапии. Восстановление физической работоспособности осуществляется на ранних и поздних стадиях заболевания. На ранних стадиях для этой цели служат фармакологические средства, которые не только могут восстанавливать/повышать физическую работоспособность, но и препятствовать развитию осложнений, которые приводят к ее утрате.

Ноотропные средства часто применяются при нарушениях речи, когнитивных расстройствах, сниженной психической и двигательной активности [21, 49, 63, 71, 97, 98, 101, 143, 402]. Следовательно, с учетом полиэтиологичности когнитивных нарушений, их профилактика и лечение становятся невозможными без применения специализированной группы лекарственных препаратов - ноотропных средств.

1.1. Фармакологические характеристики современных ноотропных препаратов

Ноотропы (от *греч.* «*ноос*» – мышление, разум; «*тропос*» – стремление, средство) – группа лекарственных средств, которые оказывают специфическое влияние на высшие интегративные функции мозга, стимулируют обучение и память, улучшают умственную деятельность, повышают устойчивость ткани мозга к повреждающим факторам, улучшают кортикально-субкортикальные и межполушарные связи [302, 342]. Их ведущим эффектом является нейрометаболическое и церебропротекторное действие, т.е. способность стимулировать обменные процессы в нервной ткани, особенно при различных нарушениях (ишемии, интоксикации, травме), восстанавливая уровень обмена веществ, измененного патологическим состоянием, до уровня оптимально функционирующих нейронов.

В основе ноотропного действия препаратов лежат два нейрометаболических эффекта: улучшение энергетического статуса клеток мозга и активация пластических процессов в ЦНС за счёт усиления синтеза РНК и белков. Энергетический потенциал нейрона увеличивается в результате облегчения синтеза АТФ, повышения ее концентрации и метаболического оборота.

Например, пирацетам усиливает обмен АТФ, активируя аденилатциклазу в нейронах, повышает активность фермента синтеза АТФ в митохондриях – аденилаткиназы, увеличивает активность ферментов дыхательной цепи, активизирует гликолитические процессы, повышает утилизацию глюкозы мозгом, препятствует набуханию митохондриальных мембран и разобщению окисления и фосфорилирования при неблагоприятных воздействиях на нейроны [49, 96, 169, 279, 304, 305, 347, 402]. Известно, что пиритинол и ацефен способны усиливать транспорт глюкозы, аминокислот и жирных кислот через гематоэнцефалический барьер, снижать уровень лактата [140, 141, 238].

Усиление синтеза РНК и белков составляет вторую особенность нейрометаболического действия ноотропов. В опытах с включением радиоактивного фосфора установлено, что под влиянием пирацетама активируется биосинтез РНК, белков, липидов [104, 267]. Выявлена способность лекарственного препарата предупреждать свойственное для старения организма уменьшение активности полирибосомального аппарата, ответственного за синтез белков [305]. Кроме того, важное значение имеет и способность ноотропов влиять на нейромедиаторные системы мозга. В частности, установлена способность пирацетама предотвращать возрастное снижение активности дофаминовых и холинергических структур головного мозга [46, 47, 164, 175].

На уровне электрофизиологических процессов влияние ноотропов заключается в оптимизации ритма ЭЭГ, повышении уровня пространственной синхронизации биоэлектрических колебаний, что способствует облегчению иррадиации процессов возбуждения внутри каждого полушария мозга и между ними, увеличению пика доминирующего ритма спектра электроэнцефалограммы [360]. Пирацетам способствует повышению устойчивости мозговой ткани к гипоксии и интоксикациям, оказывает позитивное действие на структуру нейронов, в частности, на клеточную и ядерную мембраны, рибосомальный аппарат, митохондрии и лизосомы [169, 279].

Кроме того, было установлено облегчающее действие ноотропов в отношении эффективности синаптической передачи в структурах мозга, связанных с памятью и когнитивными функциями, и образования новых мест синаптической связи в кортикальных структурах головного мозга.

Метаболическое действие ноотропов, в свою очередь, обуславливает улучшение окислительно–восстановительных реакций, уменьшение агрессивного действия продуктов перекисного окисления липидов и активных радикалов, оптимизацию нейротрансмиссии. Многие из них, кроме того, обладают вазоактивным и мягким антиагрегантным действием [47, 176, 182, 233, 302, 348].

Сочетание положительного влияния ноотропов на высшие интегративные функции головного мозга с неспецифическим нейропротекторным действием определило широкий спектр их клинического применения в психиатрической, неврологической и нейрохирургической практике, а также в фармакологии здорового человека для защиты операторских функций и умственной работоспособности при переутомлении, депрессии и влиянии чрезвычайных факторов [21, 140, 232, 267, 302, 381, 412, 424].

Исходя из ведущего вектора ноотропной активности, препараты, относящиеся к фармакологической группе, можно разделить на:

А) Препараты, оказывающие преимущественное действие на энергетические процессы в нейронах (производные пирролидона, энергодающие субстраты, производные кислот цикла Кребса)

Б) Лекарственные средства с преимущественно нейротрофическим действием (нейропептиды и их аналоги, олигопептиды, производные витаминов и нейроаминокислот, средства с анаболической гормональной активностью)

В) Лекарственные средства с преимущественным действием в области синаптических мембран и рецепторов (ампакины, холинергические ноотропы, производные холина и его предшественников, антифеины)

Г) Препараты со вторичным ноотропным действием (цереброваскулярные средства, антиоксиданты, антигипоксанты, адаптогены, актопротекторы)

Д) Комбинированные ноотропные средства (цереброваскулярные + производные пирролидона, тиатриазолин + пирацетам).

К препаратам производных пирролидона (рацетамы) группы относят пирацетам, анирацетам, оксирацетам, прамирацетам, этирацетам, фонтурацетам. В зарубежной литературе к этой группе относят также дипирацетам, ролзирацетам, небрацетам, изацетам, нефирацетам, дестирацетам, алорацетам, тенилцетам, фасорацетам, леветирацетам [434].

Производные пирролидона влияют на энергоснабжающие метаболические процессы в нейронах и глиях, увеличивают образование АТФ в анаэробных и аэробных реакциях окисления глюкозы, ускоряют превращение АДФ в АТФ и способствуют более быстрому восстановлению концентрации АТФ. Кроме того, они облегчают протекание синаптических медиаторных механизмов, активируют синтез белка, в частности нейронспецифического белка S-100, и РНК.

Было обнаружено, что пирацетам, оксирацетам и анирацетам активируют рецепторы глутамата типа AMPA (эндогенным лигандом является аминокислота 3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионат), но не влияют на NMDA-рецепторы нейронов. В целом, препараты увеличивают выведение кальция из клетки, что способствует снижению концентрации внутриклеточного кальция. Прамирацетам увеличивает скорость натрий-зависимого поглощения холина в

гиппокампе. Его влияние на когнитивные функции проявляется за счет ускорения потока импульсов от холинергических нейронов в перегородке гиппокампа [437]. Показано, что под воздействием 1-, 7- и 14-кратного введения пирацетама (200 мг/кг/день, внутривенно) у мышей наблюдается быстрое и постоянное увеличение NMDA-рецепторов и медленное нарастание специфического ноотропного эффекта. Быстро выявляющийся неспецифический анксиолитический эффект препарата предшествует изменениям бензодиазепиновой рецепции [104].

Пирацетам по-прежнему остается не только родоначальником, но и золотым стандартом ноотропных препаратов. Производные пирролидона составляют более половины номенклатуры рынка ноотропных препаратов. Такая популярность объясняется еще и тем, что на сегодняшний день пирацетам, по сравнению с другими препаратами этой группы, обладает максимальной широтой фармакологического спектра ноотропной активности. В то же время значительное большинство фармакологических эффектов пирацетама носит неспецифический характер, что может быть связано как с недостаточной эффективностью этого препарата, так и с развитием его побочных эффектов [38, 39, 40].

В целом, побочные эффекты терапии пирацетамом возникают при употреблении его в дозах более 2,4 г/сут, а у лиц пожилого и старческого возраста, в основном, связаны со стимулирующим действием этого препарата на катехоламинергические системы головного мозга. Нежелательные эффекты пирацетама в основном проявляются повышенной возбудимостью, раздражительностью, беспокойством, агрессивностью, нарушениями сна [47, 431], усилением проявлений коронарной недостаточности, что в целом не характерно для других представителей ноотропов [431]. Существенным побочным эффектом пирацетама может стать его способность снижать порог судорожной готовности и вызывать активацию эпилептических приступов [47]. В связи с этим пирацетам необходимо применять с осторожностью у людей пожилого и старческого возраста, при наличии сопутствующей неврологической патологии, ишемической болезни сердца, тахикардий, эпилепсии и психомоторного возбуждения различного характера в анамнезе.

Пирацетам увеличивает устойчивость ткани мозга к воздействию гипоксии и различным интоксикантам [360]. Препарат повышает активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), который обеспечивает реализацию молекулярного механизма, лежащего в основе его антигипоксического и энергизирующего действия. В условиях гипоксии препарат оказывает благоприятное воздействие на структуру нейронов, в частности, на клеточную и ядерную мембраны, рибосомальный аппарат, митохондрии и лизосомы [182].

Пирацетам рекомендуется применять у пациентов с инфарктом миокарда для развития компенсаторной гипертрофии неповрежденных участков миокарда и формирования

постинфарктного рубца. Положительный клинический эффект препарата, вероятно, связан с его влиянием на метаболизм кардиомиоцитов, повышением утилизации глюкозы, усилением синтеза АТФ, РНК и фосфолипидов. В то же время восстанавливается дыхательная способность митохондрий и уменьшается выраженность аутолиза [431].

Пирацетам выпускается в различных лекарственных формах: гранулах для приготовления сиропа для детей, капсулах, растворе для внутривенного и внутримышечного введения, растворе для инфузий, растворе для приема внутрь, сиропе и таблетках, покрытых оболочкой. Показаниями к использованию пирацетама являются: нарушения умственной деятельности (ухудшение памяти, обучаемости, астенические состояния), посттравматические нарушения головного мозга, ишемическая болезнь головного мозга, последствия инсульта, трудности адаптации, профилактика негативных последствий стресса, что определяет назначение препарата в восстановительном периоде после перенесенных любых ишемических эпизодов.

В последние годы одним из самых популярных ноотропных препаратов стал другой препарат из группы производных рацематов — фонтурацетам, который сочетает в себе спектр клинко-фармакологического действия и эффективность, зачастую более выраженную, чем у пирацетама, что позволяет применять этот препарат при различных формах хронических нарушений мозгового кровообращения, когнитивных расстройствах различной природы, с астеническим синдромом и т.д. В то же время такой широкий спектр фармакологического действия неизбежно влияет на критерии его безопасности. Побочные эффекты препарата зависят от дозы и включают признаки гиперактивности центральной нервной системы (беспокойство, раздражительность, клинически выраженное беспокойство, нарушения сна), нарушения регуляции сердечно-сосудистой системы (тахикардия, повышение артериального давления, гиперемия лица), диспепсические расстройства (тошнота, рвота), патологические изменения в аппетите [115]. Все вышесказанное ограничивает возможности широкого применения фонтурацетама у пациентов пожилого возраста с сочетанием неврологической и кардиологической патологии, с психосоматическими заболеваниями, которые составляют значительную группу потребителей ноотропных и нейропротекторных средств [38].

К группе ноотропных средств пептидной природы относятся эбиратид, семакс, селанк, дельтаран, вазопрессин, пироглютамил, ноопепт (этиловый эфир фенилацетил-L-пропилглицина), а также нейротрофические пептидно-аминокислотные комплексы из мозговой ткани - церебролизин, церебрал, липоцеребрин, цереброкурин, кортексин.

Семакс – синтетический пептид, созданный на основе фрагмента АКТГ₄₋₇ с дополнительно включенным в состав трипептидом Pro-Gly-Pro, обеспечивающим защиту от гидролизующего действия пептидаз. Фрагмент АКТГ₄₋₇ и, соответственно, Семакс, является физиологическим стимулятором памяти [13]. Близким по ноотропной активности аналогом

Семакса является препарат эбиратид, также представляющий собой модифицированный фрагмент АКТГ₄₋₇ [9].

В опытах на культуре тканей было показано мощное трофическое действие семакса на нейроны холинергической группы как в полноценной среде, так и в неблагоприятных условиях, связанных с дефицитом глюкозы и кислорода. При добавлении Семакса в дозе 100 нмоль и 10 ммоль выживаемость нейронов значительно увеличивается примерно в 2 раза. Специфичность действия Семакса на популяцию холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга была подтверждена результатами экспериментов, которые показали отсутствие положительного влияния пептида на выживаемость ГАМК-эргических нейронов и гранулярных клеток мозжечка.

Направленное воздействие нейропептида на холинергические нейроны сопровождается статистически значимым повышением активности фермента ацетилхолинэстеразы специфических структур головного мозга, что обычно коррелирует с улучшением процессов обучения и формирования памяти. Было показано, что влияние препарата на активность ацетилхолинэстеразы обусловлено транскрипцией гена, кодирующего одну из изоформ фермента [9, 13, 63, 66]. Также показано влияние Семакса на обмен моноаминов в головном мозге. При однократном внутривенном введении в дозах 0,15 и 0,6 мг/кг Семакс увеличивает содержание дофамина, серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты. При курсовом приеме Семакса в дозе 0,6 мг/кг (1 раз в сутки) в течение 7 дней наблюдалась тенденция к уменьшению уровня дофамина и статистически значимое снижение содержания серотонина в гипоталамусе.

В опытах на животных было установлено, что даже в очень малых дозах (3-30 мкг/кг) Семакс оказывает выраженный ноотропный эффект, повышает адаптационные возможности головного мозга, повышая его устойчивость к стрессовым повреждениям, гипоксии и ишемии. Более высокие дозы Семакса (150-300 мкг/кг), не являясь токсичными и сохраняя ноотропные свойства малых доз, также оказывают выраженное антиоксидантное, антигипоксическое, ангиопротекторное и нейротрофическое действие [13, 66, 72].

В диапазоне терапевтических доз Семакс оказывает сильное комплексное нейропротекторное действие, основными компонентами которого являются иммуномодуляция, ингибирование глиальных воспалительных реакций, улучшение трофической поддержки головного мозга, ингибирование синтеза оксида азота и реакций окислительного стресса. Цепи метаболической трансформации, индуцируемые нейропептидом, усиливают и поддерживают друг друга, приводя к ингибированию наиболее важных механизмов замедленной клеточной гибели.

Препарат не обладает гормональной активностью, однако сохраняет значительную часть спектра нейротропных эффектов природных меланокортинов. Одним из основных механизмов

молекулярного действия нейропептида является включение внутренних биохимических каскадных процессов, приводящих к активации генов, ответственных за нормальное развитие и функционирование нервной системы. В частности, тех из них, которые ответственны за синтез белков, выполняющих нейротрофическую и нейропротекторную функции, а также участвующих в процессах формирования памяти. Регулируя активность ключевых ферментов синтеза моноаминов, Семакс контролирует активность норадреналин-, дофамин- и серотонинэргической систем ЦНС.

Многофакторное нейропротекторное действие Семакса, комбинирующее в себе свойства первичного и вторичного нейропротектора, способствует повышению выживаемости нейронов в неблагоприятных условиях. Это действие реализуется за счет снижения уровня глутаматной и эксайтотоксичности, а также антиоксидантной активности (активизация синтеза супероксиддисмутазы). Препарат также обладает прямым мембранопротекторным действием за счет изменения физико-химических свойств плазматических мембран. В механизме нейропротекторного действия Семакса определенную роль играет уменьшение интенсивности локального отека и воспаления за счет устранения цитокинового дисбаланса (повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 и снижение синтеза провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6), а также препятствия синтезу регуляторов процесса апоптоза (факторов некроза опухоли TNF α , TNF β), ингибирование активности каспаз, которые являются исполнительными ферментами апоптоза. Это предотвращает гибель выживших нейронов, предупреждает геморрагическую трансформацию зоны инфаркта и расширение зоны инсульта, что является профилактикой летальных исходов и снижает степень инвалидизации пациентов [66].

Нейрометаболическое влияние Семакса реализуется за счет ускорения проникновения глюкозы через гематоэнцефалический барьер и увеличения скорости ее усвоения клетками различных отделов головного мозга, увеличения скорости окисления и фосфорилирования в митохондриях, что в условиях кислородной недостаточности поддерживает высокий уровень образования АТФ, улучшение переносимости гипоксии нервной ткани.

Ноотропный (когнитивный) эффект Семакса проявляется у здоровых людей и в условиях патологических состояний:

- Стимулирует создание памятного следа, что увеличивает как процесс запоминания (консолидация памяти), так и вспоминания, т.е. увеличивается уровень упорядочивания, структурирования и использования информации (ввод, обработка и воспроизведение);
- Повышает концентрацию внимания, оптимизирует высшие корковые функции головного мозга (речь, мышление, координация движений).

Нейротрофический эффект Семакса основан на устранении дисфункции трофических факторов: активации синтеза нейротрофинов (регуляторы роста и дифференцировки нервной

ткани: фактор роста нервов, нейротрофический фактор мозга) и восстановлении старых и образовании новых межнейронных связей. Этот компонент действия Семакса способствует восстановлению межнейронных связей и функции глиальных клеток и, как следствие, ускоряет выздоровление пациентов (или увеличивает время ремиссии) и снижает уровень их инвалидности больных [66].

К числу других эффектов Семакса относятся антиастеническое, адаптогенное действие, стресспротективная активность, иммуностропное, вегеторегилирующее и кардиотропное действие.

В клинической практике Семакс наиболее эффективен при каротидном ишемическом инсульте, хотя положительные эффекты препарата проявляются также при вертебробазилярной локализации поражения сосудов. При интраназальном введении в суточной дозе 12-18 мг препарат снижает 30-дневную смертность, улучшает клинический исход инсульта и повышает степень функционального восстановления, особенно в случаях раннего начала терапии, в первые 6 часов заболевания. Положительный клинический эффект Семакса коррелирует с его нормализующим действием на функциональную активность головного мозга, о чем свидетельствуют данные полимодального нейрофизиологического мониторинга.

Рекомендуется применять препарат пациентам пожилого возраста (старше 60 лет) с острым супратенториальным инфарктом головного мозга, с различной степенью выраженности неврологического дефицита (NIHSS 3 - 18 баллов) и постинсультными когнитивными нарушениями, за исключением синдрома грубой и тотальной афазии, с целью улучшения восстановления когнитивные функции и снижают риск развития постинсультной деменции (ПИД) в период восстановления после ИИ. По данным РКИ, безопасность препарата удовлетворительная [247]. Лечение следует начинать в течение первых 7 дней после эпизода ОНМК с внутривенных вливаний (один раз в день). Препарат вводят в дозе 2000 мг/250 мл в виде раствора для инъекций (0,9% NaCl 200 мг/250 мл) до 20 инфузий, с последующим переходом на пероральный прием препарата в дозе 1200 мг/сут в течение шести месяцев [245].

При реабилитации пациентов с нарушениями памяти и моторики в результате мозгового инсульта, в результате травм головы Семакс способствует восстановлению навыков самообслуживания, моторики, навыков общения и речи, когнитивных способностей, способности к нормальной социальной жизни [63].

На ранней стадии болезни Паркинсона Семакс замедляет развитие болезни. Препарат помогает уменьшить мышечную неподвижность, избавиться от потери равновесия, произвольных мышечных движений, улучшить речевую активность, восстановить навыки жевания и глотания.

Семакс улучшает концентрацию памяти, усиливает избирательное внимание в процессе усвоения информации. Он снижает умственную усталость, улучшает адаптацию к последствиям ишемии головного мозга, вызванной нарушениями мозгового кровообращения, закрытыми черепно-мозговыми травмами, болезнью Паркинсона, стрессом.

Селанк – аналог регуляторного пептида тафцина. По основным свойствам и направлениям применения близок к Семаксу. Характеризуется более выраженной противострессовой, антидепрессивной и иммуномодулирующей активностью, чем семакс. Нейротропное действие Селанка определяется его нейрометаболическим (в основе которого лежит антигипоксическая активность), церебропротективным (повышение синтеза в мозговой ткани нейротрофинов и, в частности, BDNF – нейротрофического фактора мозга) и ноотропным (стимуляция образования памятного следа) эффектами. Эти эффекты определяют положительное влияние Селанка на мнестические и когнитивные функции мозга здорового и больного человека. Селанк усиливает процессы обучения, памяти (фиксацию, консолидацию), синтеза и воспроизведения информации, улучшает параметры внимания, как в норме, так и при нарушениях функций мозга органического генеза.

Анксиолитическое действие связано с воздействием на первичное звено формирования тревожных расстройств – предупреждает возрастание в эмоциогенных зонах головного мозга уровня норадреналина и серотонина и снижение концентрации энкефалинов. Антидепрессивное действие определяется нормализацией уровня энкефалинов и серотонина в эмоциогенных зонах (Селанк стимулирует синтез серотонина только на фоне его низкой концентрации). Антиабстинентное действие Селанка связано с нормализацией (снижением) уровня β -эндорфина в крови и мозге больных.

Дельтаран представляет собой комбинацию синтетического аналога дельта-сон индуцирующего пептида и аминокислоты глицина, взятой в соотношении 1:10 по массе. После интраназального введения препарат достигает ядра таламуса через 1,5 минуты (стабилизирующий эффект развивается в зависимости от уровня эндогенных пептидов, в течение от 3 минут до 1,5 часов). Компоненты препарата неспецифически транспортируются через гематоэнцефалический барьер и в течение 120 минут распределяются в организме человека приблизительно следующим образом: 80% – печень, 15% – головной мозг, 5% – периферическая кровь.

В исследовании [109] изучались особенности действия Дельтарана у лабораторных животных. Показано, что препарат оказывает преимущественное действие на импульсную активность нейронов дорсального гиппокампа, паравентрикулярных ядер гипоталамуса и вентральных передних ядер таламуса, вызывая активацию большей части нейронов в этих структурах головного мозга. При моделировании острой субтотальной ишемии мозга у всех

животных, получавших Дельтаран, показатель, характеризующий доступность притока крови к головному мозгу, был статистически значимо выше, чем у животных контрольной группы. Выживаемость животных, получавших Дельтаран, при церебральной ишемии была 100%. Животные, не получавшие препарат, погибали в 38% случаев [53, 109].

Основным механизмом действия препарата является компенсация дефицита дельта-индуцирующего сон пептида (ДСИП), возникающего при психоэмоциональном или системном стрессе, токсических воздействиях, старении организма, который защищает нейроны от разрушения. Модулирующий, улучшающий координацию всех отделов центральной нервной системы эффект ДСИП реализуется через классические нейромедиаторные системы: адренергическую, серотонино- и ГАМК-ергическую. Защищая ЦНС от повреждающих воздействий, ДСИП способен радикально изменить течение большого количества заболеваний, поскольку стрессовые реакции, сопровождающие любой патологический процесс или экстремальное внешнее воздействие, приводят к разрушению нейронов, нарушают работу ЦНС и, следовательно, способность мозга поддерживать гомеостаз. ДСИП не тонизирует нервную систему, но и не является седативным препаратом. Таким образом, Дельтаран, обеспечивая восстановление работы центральной нервной системы, оптимизирует ее функционирование и, как следствие, способствует благоприятному течению заболевания, резкому повышению эффективности действия стандартных лечебных препаратов и предупреждению развития осложнений. В неврологической практике препарат показан при снижении памяти, работоспособности и других интеллектуальных и мнестических расстройствах.

Преимущественное нейротрофическое действие характерно для ноотропных препаратов, представляющих собой тканевые экстракты (гидролизаты) тканей мозга животных. К ним относятся церебролизин, церебрал, липоцеребрин, цереброкурин, кортексин. Основные отличия между гидролизатами тканей мозга связаны с источником промышленного получения (молодые телята, свиньи, эмбрионы крупного рогатого скота), технологией гидролиза и степенью очистки.

Церебролизин – гидролизат белкового извлечения из головного мозга молодых свиней, состоящий из 85% аминокислот и 15% пептидов; 1 мл раствора церебролизина получают из 1 г вещества мозга животных [3]. Активная фракция препарата представляет собой специфичные для мозга пептиды; аминокислоты, входящие в состав церебролизина, свободны и находятся в постоянной естественной связи друг с другом. Молекулярная масса пептидов церебролизина не превышает 10000 Да, что исключает возможность анафилактических реакций, а также обуславливает легкое проникновение пептидов через гематоэнцефалический барьер и их активное включение в метаболизм нейронов головного мозга [3, 42, 43, 69, 116, 118, 255, 280].

Важнейшими механизмами действия церебролизина являются регуляция энергетического метаболизма головного мозга, его собственный нейротрофический эффект, аналогичный

эндогенным нейропептидам – фактору роста нервов (NGF), мозговому нейротрофическому фактору (BDNF) и модуляция активности эндогенных факторов роста, взаимодействие с нейропептидной и нейромедиаторной системами, повышение сродства к их рецепторам.

Экспериментально было показано, что церебролизин, с одной стороны, снижает потребность мозговой ткани в кислороде, формируя его повышенную устойчивость к факторам ишемии-гипоксии, а с другой стороны, усиливает аэробный гликолиз, значительно снижая уровень лактата в нервной ткани [43]. Стимуляция энергетического метаболизма церебролизином отличается особой гибкостью: всегда обеспечивает оптимальный уровень АТФ в нейронах, гарантирует их от гиперпродукции макроэргических связей, что позволяет клеткам адекватно реагировать на энергозависимые задачи, такие как синтез белков и нейротрансмиттеров, функционирование ионных каналов и др.

Стимуляция энергетического метаболизма церебролизином отличается особой гибкостью: он всегда обеспечивает оптимальный уровень АТФ в нейронах, защищает их от гиперпродукции макроэргических связей, что позволяет клеткам адекватно реагировать на энергозависимые задачи, такие как синтез белков и нейромедиаторов, функционирование ионных каналов и т.д.

Установлены антиоксидантные свойства препарата, обусловленные ингибированием процессов свободнорадикального и перекисного окисления липидов, а также положительным влиянием на гомеостаз микроэлементов (магний, калий, селен, марганец, ванадий), обладающих антиоксидантными свойствами. Изучение механизмов действия церебролизина показало, что каждый из пептидов препарата выполняет специфические трофические и модулирующие функции: некоторые пептиды обладают независимыми нейротрофическими свойствами, другие стимулируют синтез эндогенного фактора роста нервов в астроцитах [3]. Наряду с этим пептиды церебролизина активно взаимодействуют с нейромедиаторными системами, усиливая функциональное взаимодействие нейронов и глиальных клеток, улучшая синаптическую передачу и пластичность мозговой ткани. Нейротрофические эффекты препарата вызывают повышенную выживаемость клеток головного мозга в условиях прекращения их нейротрофической поддержки со стороны клеток-мишеней и недостатка кислорода и глюкозы. Была показана способность церебролизина увеличивать экспрессию гена переносчика глюкозы через гематоэнцефалический барьер (GLUT-1) и, таким образом, увеличивать ее транспорт в мозг в условиях экспериментальной ишемии. Было выявлено, что нейротрофические свойства церебролизина связаны с защитой цитоскелета нейронов за счет ингибирования кальций-зависимых протеаз, включая кальпаин, и увеличения экспрессии микроканальцевого кислого белка 2 (MAP2). Наряду с этим, церебролизин повышает сродство связывания BDNF с его рецепторами [118].

Установлено преимущественное влияние церебролизина на состояние холинергических нейронов, сопровождающееся значительным изменением уровня ацетилхолинэстеразы, что, по-видимому, является одним из механизмов ноотропного действия препарата. Доказано, что церебролизин стимулирует комплексное образование гормонов в аденогипофизе, оказывая модулирующее действие на молекулярные механизмы активации стресс-реализующей системы. В доклинических исследованиях показано, что препарат уменьшает размер инфаркта мозга и способствует восстановлению нарушенных неврологических функций. По данным РКИ нет абсолютной согласованности результатов о влиянии церебролизина на регресс неврологического дефицита в остром периоде ИИ. Рекомендуется применение церебролизина пациентам различных возрастных групп вне зависимости от локализации сосудистого поражения мозга с целью улучшения восстановления неврологических функций в остром периоде ишемического инсульта. Препарат следует назначать в течение первых 72 часов от эпизода ИИ по схеме: 20 - 30 мл один раз в сутки в течение 10 - 21 суток (внутривенно капельно) [433, 444].

Ноотропная эффективность церебролизина успешно применяется при лечении пациентов с хроническими формами ишемической болезни головного мозга. При дисциркуляторной энцефалопатии церебролизин повышает эффективность ассоциативных процессов в головном мозге, улучшает мыслительную деятельность, умственную активность, внимание, стабилизирует эмоциональный фон [42, 69, 282]. Для лечения больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК) церебролизин начали применять с середины 70-х годов, однако использовались в основном ноотропные эффекты небольших (1-2 мл) доз препарата. Церебролизин был назначен в конце острого периода инсульта, и на фоне лечения препаратом было отмечено только уменьшение выраженности апатии и депрессии [3, 42]. В конце 80-х годов был оправдан опыт применения высоких доз церебролизина для реализации нейропротекторных свойств, присущих препарату. Церебролизин показан в основном пациентам с ишемическим инсультом средней и тяжелой степени тяжести, он эффективен для их функционального восстановления после инсульта в сочетании с нейрореабилитацией по сравнению с нейрореабилитацией в одиночку [218, 255]. Мета-аналитические исследования церебролизина у пациентов с ишемическим инсультом позволили нам сделать вывод о том, что препарат следует назначать как можно раньше, поскольку установлена обратная зависимость его эффективности от времени, прошедшего после начала развития инсульта до первого введения [69]. При применении 30 -50 мл препарата наблюдается более полный регресс неврологических симптомов к концу острого периода заболевания и значительное улучшение функционального восстановления и навыков самообслуживания пациентов в отдаленном периоде. Показано отсутствие токсичности препарата и крайне редкое возникновение его побочных эффектов, которые возникают, в основном, при быстрой инфузии (снижение порога судорожной готовности

головного мозга). После введения больших доз церебролизина (30-50 мл) может появиться быстро проходящая головная боль и ощущение жара. Существуют ограничения по назначению препарата: судорожные припадки, печеночная недостаточность, первый триместр беременности.

Цереброкурин – это препарат, содержащий сумму активных нейропептидов, полученных из головного мозга эмбрионов крупного рогатого скота. Пептидный препарат Цереброкурин оказывает положительное влияние на высшую нервную деятельность, в основе которого лежит активация энергопродуцирующей и белоксинтезирующей функции нервных клеток, повышение активности синаптического аппарата нейронов. Цереброкурин способствует увеличению диаметра митохондрий, увеличению их площади в единице объема и восстановлению миелиновых оболочек в нейронах мозга, мозаичное разрушение которых происходит при гипоксическом поражении нейроцитов. Препарат проявляет выраженный ноотропный и вазоактивный эффекты, оказывает регулирующее действие относительно биоэлектрической активности мозга.

Новым представителем нейротрофических ноотропных препаратов является препарат Целлекса, представляющий собой органоспецифический средне- и высокомолекулярный белково-пептидный комплекс с массой от 10 до 250 кДа, полученный из эмбриональной мозговой ткани свиней. Препарат показан для пациентов с ОНМК в остром и раннем восстановительном периодах заболевания в составе комплексной терапии [21].

Кортексин - отечественный препарат пептидной структуры, полученный путем ферментативного гидролиза тканей мозга молодых (не старше 12 месяцев) телят или свиней. Содержит комплекс аминокислот, биологически активных полипептидов с молекулярной массой от 1 до 10 кДа и микроэлементов. Механизм действия кортексина связан с его метаболической активностью. Препарат, свободно преодолевая гематоэнцефалический барьер, регулирует соотношение тормозных и возбуждающих нейромедиаторов, уровень серотонина и дофамина, оказывает ГАМК-эргическое влияние, обладает антиоксидантной активностью, нормализует глутамат-кальциевые каскады, замедляет процессы апоптоза [222, 248]. Кортексин участвует в регуляции гомеостаза металлолигандов в центральной нервной системе, регулирует процессы перекисного окисления липидов в клетках головного мозга, уменьшает образование свободных радикалов и блокирует процессы свободнорадикального окисления, устраняет дисбаланс тормозящих и возбуждающих аминокислот. [168, 248]. Известно положительное влияние Кортексина у больных с нарушением когнитивных функций: применение препарата улучшает концентрацию внимания, кратковременную память, способность к обучению, что важно для комплексной реабилитации в раннем восстановительном периоде [42, 113, 116, 184, 349]. Стимулирует процессы умственной деятельности, не оказывая чрезмерного активирующего действия, восстанавливает биоэлектрическую активность головного мозга. Показаниями к

применению Кортексина в клинической практике являются: нарушения мозгового кровообращения, энцефалопатии различного генеза, острые и хронические энцефалиты и энцефаломиелит, вегетососудистая дистония, эпилепсия, черепно-мозговая травма, вирусные и бактериальные нейроинфекции, детский церебральный паралич, задержка психомоторного и речевого развития у детей, астения, нарушения памяти, мышления, снижение способности к обучению [113, 215, 222].

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) обладает ноотропными и нейропротекторными свойствами. Улучшает способность к обучению и память, воздействуя на все этапы процесса: первоначальную обработку информации, консолидацию, извлечение. Предотвращает развитие амнезии, вызванной поражением электрическим током, блокадой центральных холинергических структур, глутаматергических рецепторных систем, лишением парадоксальной фазы сна.

Нейропротекторное действие Ноопепта проявляется в повышении устойчивости ткани головного мозга к повреждающим воздействиям (травма, гипоксия, электросудорожное, токсическое) и ослаблении степени повреждения нейронов головного мозга. Препарат уменьшает объем очага некроза на модели тромботического инсульта и предотвращает гибель нейронов в культуре коры головного мозга и ткани мозжечка, подвергшихся воздействию нейротоксических концентраций глутамата, свободных радикалов кислорода. Ноопепт оказывает антиоксидантное действие, блокирует потенциалзависимые кальциевые каналы нейронов, ослабляя нейротоксическое действие избытка кальция, улучшает реологические свойства крови, оказывая антитромбоцитарное, фибринолитическое и антикоагулянтное действие [41].

Ноотропный эффект препарата связан с образованием цикло-пролилглицина, сходного по структуре с эндогенным циклическим дипептидом, обладающим антиамнестической активностью, а также с наличием холинопозитивного эффекта. Ноопепт увеличивает амплитуду транскаллозального ответа, облегчая ассоциативные связи между полушариями головного мозга на уровне кортикальных структур. Способствует восстановлению памяти и других когнитивных функций, нарушенных в результате повреждающих воздействий - черепно-мозговой травмы, локальной и глобальной ишемии, внутриутробных повреждений.

Терапевтический эффект препарата у пациентов с органическими нарушениями центральной нервной системы проявляется начиная с 5-7 дней лечения. Первоначально реализуются анксиолитические и мягкие стимулирующие эффекты, имеющиеся в спектре активности препарата Ноопепт, проявляющиеся в снижении или исчезновении тревоги, повышенной раздражительности, аффективной лабильности, нарушениях сна. После 14-20 дней

терапии выявляется положительное влияние препарата на когнитивные функции, показатели внимания и памяти.

Ноопепт оказывает вегетативно-нормализующее действие, способствует уменьшению головных болей, ортостатических расстройств, тахикардии. При прекращении приема препарата не возникает «абстинентного» синдрома. Препарат не оказывает повреждающего действия на внутренние органы; не приводит к изменениям клеточного состава крови и биохимических показателей крови и мочи; не оказывает иммунотоксического, тератогенного действия, не проявляет мутагенных свойств.

Показания к применению ноопепта: расстройства памяти, внимания, других когнитивных функций и эмоционально-лабильных расстройств (в том числе у пожилых пациентов) с последствиями черепно-мозговой травмы, посткоммоционном синдроме, сосудистая церебральная недостаточность (энцефалопатии различного генеза), астенические расстройства, другие состояния с признаками снижения интеллектуальной продуктивности.

К основным представителям группы ноотропных средств с холинэргическим действием относятся предшественники ацетилхолина (цитиколин, холина альфосцерат) и центральные холиномиметические средства непрямого действия (галантамин, донепезил, ипидакрин и др.).

Цитиколин (Рекогнан, Цераксон), также известный как цитидин-5'-дифосфохолин (СДФ-холин), представляет собой мононуклеотид, состоящий из рибозы, цитозина, пирофосфата и холина. Цитиколин служит источником холина для биосинтеза ацетилхолина и увеличивает его высвобождение в холинэргических нервных окончаниях, улучшает внимание, обучаемость и память [68, 191, 241, 274, 275, 282, 323, 403]. Цитиколин, являясь предшественником ключевых ультраструктурных компонентов клеточной мембраны (главным образом фосфолипидов), обладает широким спектром действия: способствует восстановлению поврежденных клеточных мембран, блокирует действие фосфолипаз, предотвращая избыточное образование свободных радикалов, а также предотвращает гибель клеток, воздействуя на механизмы апоптоза [289, 332, 403].

Препарат предотвращает развитие эксайтотоксичности путем блокирования высвобождения глутамата, вызванного ишемией, ингибирования глутамат-индуцированного апоптоза, увеличивает обратный захват глутамата, снижая его синаптическую концентрацию при острой ишемии, а в фазе восстановления, наоборот, увеличивает его концентрацию, способствуя улучшению когнитивных функций у пациентов [275, 354, 367].

В остром периоде инсульта он уменьшает объем поврежденных тканей, улучшает холинэргическую передачу. При черепно-мозговой травме препарат уменьшает продолжительность посттравматической комы и тяжесть неврологических симптомов. Цитиколин улучшает симптомы, возникающие при гипоксии: ухудшение памяти,

эмоциональную лабильность, безынициативность, трудности в выполнении повседневной деятельности и уходе за собой. Препарат эффективен при лечении когнитивных, сенсорных и двигательных неврологических расстройств дегенеративной и сосудистой этиологии [403].

Холина альфосцерат (Глиатилин) обеспечивает активацию всех звеньев холинергической передачи (синтез ацетилхолина, его высвобождение и связывание с рецепторами) в основных структурах ЦНС, ответственных за деятельность когнитивной сферы (кора, гиппокамп, стриатум) [12, 422], а за счет своего компонента – глицерофосфата – направленно стимулирует биосинтез фосфатидилхолина – основного структурного элемента нейрональной мембраны, оказывая тем самым прямое мембранопротекторное действие [155, 176, 192, 247].

Рекомендуется назначать препарат больным различных возрастных групп для снижения неврологического дефицита и повышения способности пациентов к самообслуживанию [155].

Холина альфосцерат в клинической практике зарекомендовал себя как высокоэффективный препарат для коррекции всех форм когнитивных нарушений на фоне хронического нарушения мозгового кровообращения (ХНМК) [243, 247, 422, 423]. Показаниями к применению препарата являются острый период черепно-мозговой травмы в основном со стволовым уровнем поражения, хроническая цереброваскулярная недостаточность (дисциркуляторная энцефалопатия); синдром деменции различного генеза, включая болезнь Альцгеймера; ишемический инсульт (ранний и поздний восстановительный период); хорея Хеттингтона; старческая псевдомеланхолия. Из побочных эффектов при его применении возможны лишь тошнота либо редкие аллергические реакции. Кроме того, холина альфосцерат не обладает какими-либо известными взаимодействиями с другими лекарственными препаратами [37].

Центральные селективные конкурентные и обратимые ингибиторы ацетилхолинэстеразы - галантамин и ипидакрин, преимущественно обеспечивают стимуляцию никотиновых холинорецепторов и повышают чувствительность постсинаптической мембраны к ацетилхолину. Ипидакрин, кроме ацетилхолинэстеразы, способен угнетать активность бутирилхолинэстеразы, что повышает его эффективность в отношении накопления ацетилхолина в синаптическом пространстве. В то же время ипидакрин непосредственно стимулирует возбуждение в нервных волокнах и синаптическую передачу в нервно-мышечных окончаниях, что связано с блокадой калиевых каналов возбудимых мембран [65, 315]. Повышая активность холинергической системы, галантамин и ипидакрин улучшают когнитивные функции у пациентов с деменцией альцгеймеровского типа, но не оказывает влияния на развитие самого заболевания [315]. Результаты экспериментальных и клинических исследований показывают, что ингибирование бутирилхолинэстеразы сопровождается улучшением способности к обучению, памяти и зрительно-пространственных функций [261]. Было показано, что по мере прогрессирования болезни Альцгеймера активность ацетилхолинэстеразы в определенных областях мозга

снижается, а активность бутирилхолинэстеразы возрастает. Учитывая этот факт, представляется предпочтительным, особенно на поздних стадиях заболевания, назначать препараты, способные ингибировать как ацетилхолинэстеразу (АХЭ), так и бутирилхолинэстеразу (БХЭ), ингибирования одной только ацетилхолинэстеразы может быть недостаточно для достижения необходимого терапевтического эффекта.

Галантамин и ипидакрин применяют при миастении, прогрессирующей мышечной дистрофии, двигательных и сенсорных расстройствах, связанных с невритами, полиневритами, радикулитами, радикулоневритами, с остаточными явлениями после нарушения мозгового кровообращения, при психогенной импотенции и другой патологии. В восстановительном остаточном периоде острого полиомиелита и при детском церебральном параличе применение галантамина, особенно в сочетании с другими мероприятиями (лечебная гимнастика и др.), приводит к улучшению и восстановлению двигательных процессов и общему улучшению состояния больных. Согласно имеющимся данным, применение галантамина в комплексной терапии спастических форм детского церебрального паралича не только улучшает нервно-мышечную проводимость и повышает сократимость мышц, но и оказывает положительное влияние на мнестические функции [140]. Их побочные эффекты проявляются в повышении тонуса гладкой мускулатуры (в том числе бронхов, сфинктеров желчного и мочевого пузыря, кишечника), усилении секреции пищеварительных и потовых желез и миозе [140]. Наличие таких побочных реакций делает применение этих препаратов, особенно галантамина, не безопасным.

Донепезил, центральный ингибитор ацетилхолинэстеразы, кроме холинэргической модулирует также дофаминовую и глутаминовую медиацию в головном мозге, в силу чего влияет не только на процессы памяти и внимания, но и способен устранять поведенческие нарушения, галлюцинации, бессмысленные повторяющиеся движения, уменьшает проявления апатии. Одобрен для применения в качестве средства для уменьшения прогрессирования потери памяти при болезни Альцгеймера, а также при нарколепсии [140, 359, 368, 372, 388, 395, 405].

К числу ноотропных препаратов – производных этаноламина, относят диметиламиноэтанол (деанол) и его производные: Нооклерил (деанола ацеглумат), актебрал (ципродеманол, 2-(диметиламино)этил-3-циклогексилпропаноат), тонибрал (янтарный эфир диметилэтанолamina), панклар (фосфорный эфир диметиламиноэтанолa), ацефен (центрофеноксин), мефексамин.

Этанолaмин является прекурсором ацетилхолина и участвует в синтезе фосфолипидов клеточных мембран [307]. Диметиламиноэтанол – естественный компонент тканей мозга человека и структурно похож на холин (холин без одной метильной группы). ДМАЭ легко проникает через гематоэнцефалический барьер и повышает уровень ацетилхолина в головном мозге за счет субстратной активации его синтеза или ингибирования его окисления до бетаина.

Диметиламиноэтанол является натуральным прекурсором ацетилхолина [206, 207, 211, 307, 378, 439], выраженно стимулирует когнитивные функции, память, внимание и повышает уровень бодрости и способствует повышению физической работоспособности в условиях её естественного снижения [93, 289]. Особенно эффективен у лиц пожилого возраста, имеющих хронические заболевания нервной системы и системы кровотока).

Введение диметиламиноэтанола мышам вызывало увеличение как концентрации, так и скорости метаболизма свободного холина в крови, за счет ингибирования его метаболизма в тканях. Центральные холинергические эффекты деанола осуществляются путем ингибирования метаболизма холина в периферических тканях, в результате чего свободный холин накапливается в крови, проникает в мозг и стимулирует холинергические рецепторы [312, 406]. Подтверждением этому являются и исследования по конверсии холина в бетаин в почках. В экспериментах на срезах ткани изолированной перфузируемой почки конверсия холина в бетаин была обнаружена в кортикальных, наружных медуллярных и внутренних медуллярных областях почки крысы. ДМАЭ при 5,0 мМ значительно ингибирует продукцию бетаина в изолированной перфузированной почке [342].

ДМАЭ стимулирует потребление мозгом глюкозы, увеличивает синтез АТФ клетками мозга, предупреждает возрастную деградацию холинергической системы и, предотвращая накопление липофусцина в нейронах коры, препятствует снижению потенциала спонтанного действия нейронов. Увеличивает плотность холинорецепторов, повышает уровень ацетилхолина в головном мозге и периферических нервных структурах, что приводит к усилению деятельности холинергических структур. При этом повышается скорость проведения нервного импульса по нервным стволам, усиливается синтез ацетилхолина и фосфолипидов мозга, мембран нервных клеток и печени, улучшает когнитивные функции, усиливает интеллект, память, обучаемость [4, 147, 211, 346, 374, 397].

Препарат оказывает положительное действие при астенических и адинамических расстройствах, повышая двигательную и умственную активность пациентов и улучшает процессы памяти и внимания, а также рекомендуется в качестве дополнительного корректора при лечении хронической нейролепсии, особенно акинетических расстройств [373, 340], устраняет невротические нарушения, вызванные органическими поражениями головного мозга или черепно-мозговыми травмами, отравлении барбитуратами и хронического алкоголизма [406, 430].

ДМАЭ обладает выраженным антиоксидантным действием, защищает клетки от воздействия повреждающих факторов, включая свободные радикалы. Показано, что ДМАЭ непосредственно реагирует с гидроксильными, аскорбиловыми и липидными радикалами. Поскольку он связывает гидроксильные и аскорбиловые радикалы более эффективно, чем

липидные радикалы, считается, что ДМАЭ работает лучше в гидрофильной среде [290, 346, 397]. В целом, перечисленные плейотропные эффекты диэтилэтанолamina, способствуют повышению концентрации внимания, улучшают процессы запоминания и воспроизведения информации, оптимизируют познавательные и поведенческие реакции, устраняют эмоциональную раздражительность и неврологическую симптоматику [161].

Компания GlaxoSmithKline вывела на рынок комплексный препарат «Энергин», содержащий битартрат диметиламиноэтанола наряду с витаминами, микроэлементами и адаптогенами [380]. Энергин показан к применению в следующих ситуациях: повышенная утомляемость, общая слабость и истощение; нарушение способности к концентрации внимания; для повышения резистентности организма к инфекциям; период реконвалесценции после тяжелых заболеваний, хирургических вмешательств и лучевой терапии; низкий уровень физической активности; для профилактики последствий стресса, вызванного нервным истощением.

Внедрен в медицинскую практику препарат Нооклерин, представляющий собой диметиламиноэтанол вместе с N-ацетил-L-глутаминовой кислотой. Показаниями к его применению являются сосудистые заболевания головного мозга (дисциркуляторная энцефалопатия и постинсультные расстройства), период реконвалесценции после перенесенных черепно-мозговых травм, астенические и астено-депрессивные расстройства, психо-органический синдром, купирование (в комплексной терапии) алкогольно-абстинентного синдрома у больных, страдающих от алкогольной зависимости, использование в качестве средства, улучшающего процессы памяти и внимания (интеллектуально-мнестические функции) и комплексное лечение умственной отсталости у детей [4, 153, 312, 439].

Нооклерин характеризуется широким спектром действия, малой токсичностью и низкой частотой развития побочных эффектов (запоры, кожный зуд, сонливость или бессонница, повышенное артериальное давление). Кроме того, нооклерин лишен отрицательных свойств психостимуляторов и обладает положительным влиянием на психофизиологические показатели когнитивной деятельности пациентов [4, 320]. Проведенное в эксперименте изучение нооклерина выявило наличие у препарата церебропротективных свойств (предупреждение или ослабление амнезии, вызванной максимальным электрошоком, скополамином, лишением парадоксальной фазы сна) [147].

Обнаружена достаточная эффективность нооклерина при лечении нейролептического синдрома, особенно в виде акинетических и, реже, гиперкинетических нарушений, что проявлялось в явном уменьшении явлений мышечной скованности, оживлении мимики и двигательной сферы [147].

Нооклерин повышает спортивную работоспособность в условиях аэробно-анаэробной и анаэробной нагрузках. В плацебо-контролируемом исследовании было продемонстрировано позитивное влияние Нооклерина на физическую работоспособность и ее восстановление у спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта, на развитие выносливости [147]. Показано, что препарат устраняет симптомы утомления, вызванные интенсивными физическими нагрузками и переутомлением, депрессивные состояния, способствует усвоению и запоминанию новых навыков в тренировочном процессе и на соревнованиях для повышения спортивных результатов. Нооклерин показан в качестве средства, корригирующего работоспособность спортсменов и способствующего повышению выносливости [147, 374].

В биомедицинских исследованиях оценивалась ноотропная активность пироглютамата диметиламиноэтанола (DMAE p-Glu). В тесте водного лабиринта Морриса у крыс он увеличивал пространственную память и внеклеточные уровни холина и ацетилхолина в медиальной префронтальной коре, а в тесте «пассивного избегания» DMAE p-Glu уменьшал симптомы амнезии, вызванные скополамином. DMAE p-Glu снижает отрицательное действие скополамина на долговременную память у здоровых добровольцев и может быть эффективным в сокращении дефицита памяти у пациентов с когнитивными нарушениями [250].

DMAЭ обладает низкой поверхностной активностью и может образовывать расширенные монослои, в которых ориентация молекул зависит от концентрации аминспирта. Концентрация DMAЭ, оцененная как 10^{-6} - 10^{-5} М, не обнаруживает значительных изменений в экто-АТФазе. Эффект такой концентрации полностью обратим. Цитотоксический эффект, проявляющийся в результате резкого снижения и блокирования активности экто-АТФазы, не является полностью обратимым и появляется при концентрациях DMAЭ выше 10^{-4} М [397].

Ацефен (центрофеноксин, меклофеноксат) представляет собой комплекс DMAE с п-хлорфеноксиуксусной кислотой. Данная кислота является соединением, родственным растительным гормонам роста (ауксинам), способствует лучшему усвоению DMAE мозгом, повышает содержание холина в головном мозге и периферических нервных структурах, что приводит к усилению деятельности холинергических структур и улучшает обменные процессы в мозге, способствует регенерации нейронов, оказывает прямое омолаживающее действие. Показано, что ацефен эффективно влияет на восстановление функций психофизиологических показателей при астенической депрессии, таких как объем, устойчивость и распределение внимания [238, 317, 430].

К специализированным ноотропным средствам последних поколений относятся ампакины. Ампакины являются новым классом ноотропных препаратов, которые стимулируют мозговую активность, повышая внимание, бдительность, ускоряя обучение и улучшая память. Представителями группы являются ампалекс, фарампатор, суниферал и родственные им

препараты (универсал, муниферал). Ампакины названы в честь ионотропного глутаматного AMPA-рецептора нейронов, с которым они сильно взаимодействуют, являясь его аллостерическими стимуляторами.

В отличие от психомоторных стимуляторов, ампакины не вызывают нарушений сна, психической зависимости, повышения артериального давления и тахикардии. Они используются для лечения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, некоторых форм шизофрении, неврологических расстройств и депрессии в пожилом возрасте.

Слабым ампакиновым действием обладают ноотропы – производные рацематов (пирацетам и родственные ему соединения).

Умеренное по выраженности ноотропное действие характерно для препарата пиритинол (энцефабол), который является структурным аналогом пиридоксина. Повышает патологически сниженный метаболизм в тканях головного мозга, что обусловлено повышением захвата и утилизации глюкозы, повышает метаболизм нуклеиновых кислот и высвобождение ацетилхолина в синапсах нервных клеток, улучшает холинергическую передачу в нервной ткани. Пиритинол способствует стабилизации структуры клеточных мембран нейронов и их функции за счет ингибирования лизосомальных ферментов, предотвращая этим образование свободных радикалов [103].

Усиливает патологически сниженный метаболизм в тканях головного мозга, за счет повышенного поглощения и утилизации глюкозы, усиливает метаболизм нуклеиновых кислот и высвобождение ацетилхолина в синапсах нервных клеток, улучшает холинергическую передачу в нервной ткани. Пиритинол помогает стабилизировать структуру клеточных мембран нейронов и их функцию путем ингибирования лизосомальных ферментов, тем самым предотвращая образование свободных радикалов [103].

Препарат улучшает реологические свойства крови, повышает пластичность эритроцитов путем увеличения содержания АТФ в их мембране, что приводит к снижению вязкости крови и улучшению кровотока. Улучшает кровообращение в ишемизированных участках мозга, увеличивает их оксигенацию, интенсифицирует обмен глюкозы в первично ишемизированных участках мозга. В результате улучшаются показатели памяти и восстанавливаются нарушенные обменные процессы в нервной ткани, что способствует полноценному функционированию ее клеток.

Слабую ноотропную активность проявляют производные: никотиновой кислоты – эуклидан, гопантотеновой кислоты – пантогам и гамма-аминомасляной кислоты – аминалон, которые в большей степени применяются в детской практике. Вторичный ноотропный эффект характерен для фолиевой кислоты и цианкобаламина (более выражен у пожилых людей), глицина.

В качестве ноотропов на этапе реабилитации после острых мозговых инцидентов могут применяться предшественники нуклеотидов (оротовая кислота, рибоксин), глицерофосфат кальция, препараты эссенциальных фосфолипидов (лецитин, эссенциале), депротеинизированный гемодериват актовегин, природные адаптогены животного и растительного происхождения.

В некоторых случаях, когда когнитивные расстройства развиваются у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, узкий мнестический (т.е. связанный с функцией памяти) эффект может быть получен при применении модуляторов рецепторов к возбуждающим аминокислотам мозга.

Для этой цели может быть использован акатинол мемантин - неконкурентный антагонист глутаматных NMDA-рецепторов (в том числе находящихся в черной субстанции), который способствует снижению чрезмерного стимулирующего действия кортикальных глутаматных нейронов на неостриатум, развивающееся на фоне недостаточного высвобождения дофамина [254]. Препарат, уменьшая поступление Ca^{2+} в нейроны, снижает вероятность их разрушения, обладает ноотропным, цереброваскулярно-расширяющим, антигипоксическим и психостимулирующим действием. Кроме того, препарат улучшает нарушенную память, повышает способность к концентрации, уменьшает усталость, симптомы депрессии и спастичность скелетных мышц, вызванную заболеваниями или повреждениями головного мозга.

Важным элементом комплексного ведения пациентов с когнитивными расстройствами является поддержание на достаточно высоком уровне мозгового кровотока. Поэтому многие авторы включают в состав фармакологического класса ноотропов и отдельных представителей цереброваскулярных средств, хотя для них способность улучшать когнитивные функции является вторичной и проявляется только тогда, когда формирование подобных нарушений возникло на фоне предшествующих острых или хронических нарушений мозгового кровообращения [215, 254].

Более отчетливо вторичное ноотропное действие встречается у таких цереброваскулярных средств, как нимодипин (блокатор медленных кальциевых каналов мозговых сосудов), винпоцетин (аналог вазоактивного алкалоида барвинка), препаратов гинкго, пикамилаона.

Нимодипин, являясь блокатором кальциевых каналов, в сосудистой стенке способен вызывать значимый гипотензивный эффект, эритему, головную боль, а также колебания частоты сердечных сокращений и симптомы перевозбуждения ЦНС (двигательная активность, агрессивность). При сочетанном применении нимодипина с антигипертензивными средствами, нитратами, бета-адреноблокаторами возможно развитие выраженной гипотензивной реакции и даже сердечной недостаточности [231, 427].

Винпоцетин обладает, в целом, меньшим спектром побочных эффектов, которые, в некоторых случаях могут быть клинически значимыми — артериальная гипотензия, головная боль, головокружение, диспепсические реакции, тахикардия (при парентеральном введении) [86]. Ключевые биологические эффекты препаратов гинкго связаны с наличием в их составе флавоновых гликозидов, терпенлактонов (гинкголидов, билобалидов), проантоцианидинов и органических кислот. Эти препараты совмещают в себе нейро-, геро- и стресспротекторное действие. Эффективность препаратов гинкго, как и других ноотропных препаратов, прямо пропорциональна величине дозы (разовой, суточной, курсовой) в пределах терапевтического диапазона доз. В отличие от всех других ноотропов, безопасность этих препаратов не коррелирует со снижением дозы, а определяется только степенью очистки лекарственного сырья. Факт высокой безопасности экстракта гинкго, которая сопоставима с таковой у плацебо и значительно превышает безопасность практически всех препаратов нейрометаболического и вазотропного типа действия [2, 10, 37, 87], касается только эталонных препаратов гинкго, содержащих стандартизированный высокоочищенный сухой экстракт листьев гинкго со строго фиксированными концентрациями его отдельных компонентов. В то же время было показано, что многочисленные генерические препараты гинкго и гинкгосодержащие биологически активные добавки с недостаточной степенью очистки лекарственного сырья могут приводить к развитию серьезных геморрагических осложнений вследствие токсического действия избыточных концентраций гинкго-кислот. При этом, в специально проведенных рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях терапевтических доз (до 240 мг/сут) стандартизированного высокоочищенного экстракта гинкго не выявлено повышения риска развития каких-либо осложнений в процессе лечения [146, 326].

Для усиления ноотропного действия у больных с хроническими сосудистыми заболеваниями мозга (дисциркуляторной энцефалопатией) применяются комбинированные препараты, содержащие ноотроп и цереброваскулярное средство. Такими препаратами являются фезам (пирацетам + циннаризин), винпотропил (пирацетам + винпоцетин), инстенол (гексабидин + этамиван + этафиллин) [47].

Для усиления нейротрофического эффекта могут применяться такие комбинированные ноотропы, как ороцетам (пирацетам + оротовая кислота), нейронал (пирацетам, янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, рибофлафин-монопнуклеотид, пиридоксин), цитофлавин (янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, рибофлафин-монопнуклеотид) [86].

В исследованиях Костинев В.А. с сотрудниками, изучавших влияние на спортсменов комбинированного препарата Цитофлавин отмечали достоверный рост адаптации к физической нагрузке, тренированности организма и его энергетического обеспечения. Также наблюдали

улучшение психоэмоционального состояния спортсменов и интегрального показателя «спортивной формы» [110].

Для усиления ноотропного действия у пациентов с синдромом хронического стресса применяется комбинированный ноотроп диапирам (пирацетам + диазепам) [45, 46].

Для усиления нейропротекторной активности может быть использован комбинированный ноотропный препарат тиоцетам (пирацетам + тиотриазолин). Тиотриазолин реагирует с активными формами кислорода и липидными радикалами за счет выраженных восстановительных свойств тиоловой группы и предупреждает возникновение активных форм кислорода путем реактивации антирадикальных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

Из комбинированных ноотропных средств как менее безопасный может быть оценен препарат фезам (пирацетам + циннаризин). Циннаризин, входящий в его состав, может вызвать развитие синдрома лекарственного паркинсонизма, встречаемость которого составляет до 43% всех случаев паркинсонизма, вызванного лекарственными препаратами [350], чаще возникает у пациентов пожилого возраста с преобладанием симптома тремора [38], а также может провоцировать развитие депрессий [355] и оказывать седативное действие.

Важно отметить, что данный комбинированный препарат назначается преимущественно лицам пожилого и старческого возраста при различных формах хронической цереброваскулярной недостаточности, сосудистой деменции и других сосудистых заболеваний, требующих длительной курсовой терапии.

На основании результатов мультицентровых рандомизированных клинических исследований, мета-аналитических обзоров и отдельных публикаций, зарегистрированные в России нейропротекторы возможно сгруппировать по степени доказанности их терапевтической эффективности (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровни доказанности терапевтической эффективности нейропротекторов - ноотропов, зарегистрированных в России (по [40, 208])

Уровни доказанности	Нейропротекторы
Уровень 1	Церебролизин, холина альфосцерат, кортексин, цитиколин, семакс, глицин, эмоксипин, эбселем, целлекса
Уровень 2	Мексидол, пикамилон, пирацетам, фонтурацетам, ноопепт
Уровень 3	Пиридитол (Энцефабол)
Уровень 4	Инстенон, актовегин

Дифференцированная оценка степени доказанности терапевтической эффективности зарегистрированных в России нейропротекторных средств, позволяет считать нейропротекторы 1-го уровня препаратами первой очереди выбора. Наиболее перспективным нейропротектором,

с позиции доказательной медицины, является цитиколин. Он упоминается в Европейских рекомендациях как единственный препарат, продемонстрировавший нейропротективный эффект в остром периоде инсульта, согласно данным мета-анализа [38, 68, 232, 362].

При отсутствии в стационаре, где лечится больной, препаратов 1-го уровня, показаны нейропротекторы 2-го уровня, обладающие определенной терапевтической активностью только при ишемическом инсульте средней тяжести (Таблица 1).

При острых нарушениях мозгового кровообращения считается бесполезным назначать нейропротекторы 3-го и 4-го уровней, которые не обладают доказанной терапевтической активностью [40].

1.2. Влияние интермедиантов цикла Кребса на функциональное состояние ЦНС

Х. Кребс вместе с Ф. Липпманном считают, что цикл трикарбоновых кислот является центральным ядром метаболизма, катаболизма белков, жиров и углеводов до CO_2 . Выделяющийся в ходе его реакций водород включается в цепь тканевого дыхания и синтеза АТФ, окисляя при этом до воды [120]. На рисунке (Рисунок 1) показана схема цикла Кребса. Субстраты цикла Кребса активно используются в практике реанимационных мероприятий для борьбы с критическими состояниями.

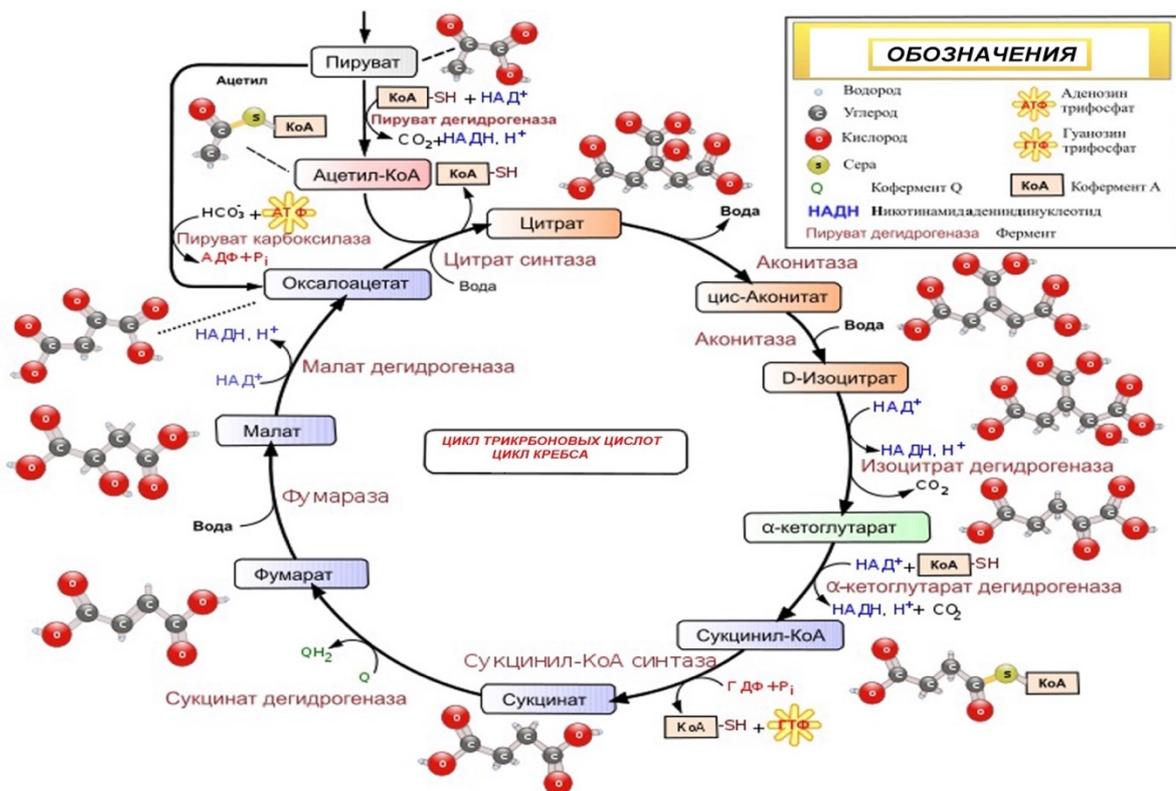


Рисунок 1. Схема цикла Кребса [120]

Наряду с малат-содержащими инфузионными растворами (Стерофундин изотонический) [57] активно разрабатываются и современные сбалансированные инфузионные растворы с другими резервными источниками щелочности, в частности – сукцинатсодержащие (ремаксол, реамберин) [11, 45, 85, 102, 119, 127, 172, 181, 188, 204] и фумаратсодержащие (мафусол, конфумин, полиоксифумарин) средства [5, 6, 162, 198].

Эффективность применения субстратов цикла Кребса была продемонстрирована на моделях ишемии миокарда и геморрагического шока [12, 36, 55, 87, 189, 214, 333].

Одним из первых в клинической практике появился Мафусол, содержащий фумаровую кислоту, одним из первых появился в клинической практике [333]. Основными показаниями к назначению Мафусола являются гиповолемия, гипоксия различного генеза, интоксикация, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу. В то же время одним из недостатков этого раствора является высокая концентрация натрия (280 ммоль/л) и гиперосмолярность (410 мОсм/л), что может сопровождаться рядом побочных эффектов и негативных воздействий, вызванных гипернатриемией.

Состав мафусола:

натрия фумарат	14 г
натрия хлорид	6 г
калия хлорид	0,3 г
магния хлорид	0,12 г
воды для инъекций	до 1 л

Полиоксифумарин - уникальный многофункциональный кровезаменитель, обладающий коллоидными и антигипоксическими свойствами. В состав препарата входят фумарат натрия и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 20 000 дальтон. В отличие от мафусола, полиоксифумарин оказывает более выраженное гемодинамическое действие. Препарат сравним с мафусолом по своему влиянию на показатели кислотно-щелочного состояния, электролитный состав крови и половые процессы. Полиоксифумарин обладает высокой терапевтической эффективностью при гастродуоденальных кровотечениях, вызывая при этом положительные изменения со стороны сердечно-сосудистой системы: увеличивается объем циркулирующей крови, минутный объем кровотока и ударный объем сердца. При диффузном перитоните препарат, наряду с эффективной коррекцией гиповолемии, проявляет антиоксидантное действие. Кроме того, полиоксифумарин оказывает положительное влияние на кардиогемодинамику при тяжелой термической травме, кардиохирургических операциях, гиповолемии, связанной с травмами, кровопотерей, интоксикацией [203].

Конфумин – это инфузионный антигипоксикант, обладающий свойствами волюмокорректора малого объема. Препарат представляет собой 15%-ный раствор натрия фумарата, который

позволяет пациентам вводить терапевтическую дозу активного вещества, при этом объем инфузии уменьшается в 10 раз. Кроме того, конфумин, наряду с антигипоксическим эффектом, свойством малообъемного корректора и ощелачивающим действием, улучшает работу сердца и функциональное состояние печени и почек, оказывает профилактическое действие против развития полиорганной недостаточности. Препарат зарекомендовал себя как высокоэффективный при лечении гиповолемии и гипоксии, связанных с кровопотерей и шоком различного генеза, злокачественными новообразованиями. Препарат также оказывает противоишемическое, антиаритмическое, положительное инотропное и кардиопротекторное действие при ишемии миокарда. Конфумин в дозах 100-300 мл в сутки не вызывает токсических эффектов, аллергических реакций у пациентов, изменений со стороны систем кроветворения и гемостаза не наблюдается [203].

В настоящее время для коррекции гиповолемии и острой гипоксии наиболее широко применяется такой инфузионный антигипоксический препарат, как Стерофундин, в состав которого в качестве антигипоксанта входит малат. В работе Горбатовых С.В. с сотрудниками [57] были отмечены положительные эффекты изотонического стерофундина при применении его в комплексной интенсивной терапии у пациентов с заболеваниями центральной нервной системы. В частности, было отмечено, что применение данного раствора способствует нормализации электролитного состава плазмы крови и сокращает время приготовления лекарственных инфузионных сред на основе различных лекарственных препаратов.

Основное применение сукцината заключается в естественной защите клетки от гипоксии [162]. В то же время восполнение фонда субстрата может происходить за счет реакций цикла Кребса, идущих как в прямом, так и в обратном направлениях. При обратном ходе реакций имеющийся запас малата, по мере необходимости, превращается в фумарат, который восстанавливается до сукцината. Восстановление фумарата сопровождается образованием АТФ, и поэтому реакции образования в системе малат-фумарат-сукцинат способны поддерживать окислительное фосфорилирование даже при аноксии. В условиях гипоксии обратные превращения фумарата действуют как пусковой механизм, который в зависимости от концентрации кислорода регулирует протекание конечных реакций цикла Кребса в прямом или обратном направлениях, и эти реакции сопровождаются синтезом АТФ.

В условиях окислительного метаболизма перенос НАДН из цитоплазмы внутрь митохондрий осуществляется, главным образом, с использованием малат-аспартатного челночного механизма. Накопление НАДН в цитоплазме ингибирует гликолиз (на уровне глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) и утилизацию лактата.

Вещества, принимающие участие в функционировании малат-аспартатного шунта, подавляют развитие ишемических нарушений биоэнергетических процессов. Таким образом,

при экспериментальной ишемии миокарда малат натрия улучшает сократительную способность сердца, уменьшает площадь ишемии [107, 196]. О положительном влиянии малата на физическую работоспособность, особенно в восстановительный период после изнурительных нагрузок, сообщил в своей работе Дунаев В.В. с соавторами [70]. Наряду с фумаратом и кетоглутаратом малат участвует в процессах образования энергии в цикле Кребса. Эффективность субстратов цикла Кребса также была продемонстрирована на моделях ишемии миокарда и геморрагического шока [197, 198, 214, 216, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 244].

Для предотвращения ранних нарушений дыхательной цепи также возможно использование средств, усиливающих компенсаторные метаболические потоки, независимые от НАДН-оксидазного пути, например, сукциноксидазного пути. При наружном применении сукцинат (сукцинат натрия, янтарный эликсир) оказывает умеренное антигипоксическое действие при курсовом применении, но его активность при воздействии экстремальных факторов недостаточна. Отсутствие выраженного защитного эффекта может быть связано с низкой проницаемостью препарата через биологические мембраны. Наиболее активный экзогенный сукцинат улавливается печенью, что сопровождается повышением его детоксицирующей активности [80, 81]. Биодоступность сукцината может быть повышена при его совместном применении с некоторыми метаболитами, которые способствуют его лучшему проникновению в клетку, в частности, с лимонной, изолимонной и яблочной кислотами [130, 132]. Более перспективным, чем введение сукцината, для коррекции экстремальных состояний может быть повышение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), активация эндогенного образования сукцината, в том числе за счет введения его предшественников, или использование различных гетероциклических сукцинат-содержащих соединений, способствующих его проникновению в клетку [111, 127, 128, 132, 172]. Использование органических производных сукцината также способствует его лучшему проникновению через биологические мембраны. В то же время показано, что после попадания вещества в клетку происходит его диссоциация или отщепление молекулы сукцината. Основная часть молекулы может быть встроена в фосфолипидную мембрану, влияя на ее физико-химические свойства, а сукцинат используется непосредственно дыхательной цепью в качестве энергетического субстрата [105].

Типичным представителем средств, разработанных на основе янтарной кислоты является препарат Мексидол - сукцинат-2-этил-3-метил-3-оксипиридин, который сочетает в себе антиоксидантные свойства основания (производного 3-оксипиридина), а с антигипоксической активностью - сукцинат [133]. Защитный эффект мексидола был выявлен в экспериментах на изолированном сердце крысы. Препарат уменьшал вызванное гипоксией повреждение механической функции сердца, предотвращая при этом снижение содержания АТФ, и ускорял восстановление кардиомиоцитов в постгипоксический период. Мексидол повышал

сопротивляемость организма к кислородзависимым патологическим состояниям (шок, нарушения мозгового кровообращения), улучшал мнестические функции, снижал токсическое действие алкоголя [200]. Применение препарата в клинической практике связано с такими показаниями, как острые нарушения мозгового кровообращения, дисциркуляторная энцефалопатия, вегетососудистая дистония, атеросклероз сосудов головного мозга, купирование абстинентного синдрома при алкоголизме и наркомании. Антигипоксическая активность мексидола при различных клинически значимых экстремальных состояниях оценивается как умеренная. Мексидол показан при острых нарушениях мозгового кровообращения, дисциркуляторной энцефалопатии, нейроциркуляторной дистонии, легких когнитивных нарушениях атеросклеротического генеза, тревожных расстройствах при невротических и неврозоподобных состояниях. Применяется препарат и для купирования абстинентного синдрома при алкоголизме с преимущественно неврозоподобными нейроциркуляторными нарушениями, при острой интоксикации антипсихотическими средствами, в схемах комплексной терапии острых гнойно-воспалительных процессов в брюшной полости (панкреонекроз, перитонит). Мексидол является антигипоксантом также благодаря своей антиоксидантной активности. В условиях гипоксии препарат вызывает компенсаторную активацию аэробного гликолиза и уменьшает торможение окислительных процессов в цикле Кребса с увеличением содержания АТФ и креатинфосфата, активацией энергосинтезирующей функции митохондрий, стабилизацией клеточных мембран. В присутствии мексидола отмечена активация сукцинатоксидазного пути окисления, что в условиях ограничения НАД-зависимого окисления на ранних стадиях гипоксии позволяет сохранить способность цитохромного участка дыхательной цепи вырабатывать энергию.

Мексидол, подобно другим производным янтарной кислоты, в условиях гипоксии оказывает антиоксидантное действие. Препарат сохраняет и восстанавливает уровень адениловых нуклеотидов, никотинамидных коферментов, креатинфосфата, стимулирует активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы и ацетилхолинэстеразы, активирует анаэробный гликолиз при гипоксии, способствует восстановлению окислительно-восстановительных процессов в митохондриях, нормализует соотношение холестерина/липопротеины высокой плотности в мембранных структурах, что очень важно для поддержания энергоснабжения и полноценного функционирования нервной системы [45].

Рекомендовано назначение этилметилгидроксипиридина сукцината пациентам среднего, пожилого и старческого (до 80 лет) возраста, перенесшим ИИ в каротидной системе, с наличием легкого, умеренного и тяжелого неврологического дефицита (NIHSS 5 - 20 баллов) с целью улучшения восстановления неврологических функций. Препарат назначают по схеме:

внутривенно капельно по 500 мг/сут в течение первых 10 суток от эпизода ИИ, а затем перорально по 1 таблетке (125 мг) 3 раза в сутки в течение 8 недель [7, 404, 425].

В настоящее время на фармацевтическом рынке России присутствует также родственный мексидолу препарат Этоксидол, представляющий собой яблочнокислую соль 2-этил-3-метил-3-оксипиридина [26, 70].

Повышение эффективности сукцинатоксидазного окисления в условиях ограничения НАД-зависимого окисления может быть достигнуто и другим путем – за счет увеличения образования эндогенного сукцината. Например, образование эндогенной янтарной кислоты в условиях гипоксии может быть активировано последовательным превращением глутамата в γ -аминомасляную кислоту, янтарный полуальдегид и янтарную кислоту. В то же время снижается ингибирование СДГ одним из метаболитов цикла Кребса – щавелевоуксусной кислотой. Антигипоксическое действие ГАМК также связано с активацией данного цикла. Однако низкая проницаемость гематоэнцефалического барьера для ГАМК является одной из причин его низкой эффективности.

Активация организма при интенсивных нагрузках приводит к избирательному увеличению вклада в митохондриальное дыхание самого мощного процесса энергоснабжения – окисления янтарной кислоты [105, 106]. Это связано с включением цикла окисления, более быстрого, чем цикл трикарбоновой кислоты, который представляет из себя шунт цикла Кребса глутамат-оксалоацетат-трансаминазой, приводящей к ускоренному образованию α -кетоглутарата и сукцината в обход ограниченных мест окисления лимонной кислоты.

При более интенсивном воздействии окисление сукцината усиливается, переходя в гиперактивацию. В то же время развивается встречный процесс - поэтапное ингибирование сукцинатдегидрогеназы и ингибирование окисления сукцината. Включение быстрого цикла влечет за собой важные последствия: митохондрии вырабатывают больше фосфоенолпирувата, который может служить не только субстратом глюконеогенеза, но и источником пирувата.

Следовательно, митохондрии переключаются на самообеспечение глюкозой. Глутаминовая кислота [89] и ее предшественники становятся внешним субстратом вместо глюкозы. Активация быстрого цикла обеспечивается аминокислотами, витаминами В6 и В2, сукцинатом. Введение сукцината предотвращает гиперактивацию и ингибирование окисления сукцината при стрессе, ускорение ресинтеза АТФ, фосфокреатина, гликогена после физических нагрузок.

Восстановление эффективности окислительного фосфорилирования представляет собой основную задачу периода восстановления после ишемических эпизодов. Это объясняется необходимостью существенных энергетических затрат на различные восстановительные синтезы: ферментов и структурных белков, фосфолипидов мембран, гормонов, гликогена и др.

Все эти синтезы угнетаются во время развития ишемии из-за возникающего энергетического дефицита [75, 76, 92, 93, 111, 113, 151, 154, 156]. Вследствии накопления гидроперекисей липидов нарушается структура митохондриальных мембран, и усиливается разъединение окислительного фосфорилирования.

При выраженной астении реакции энергетического и пластического обмена угнетаются из-за снижения активности некоторых ферментов. В частности, такие ферменты цикла Кребса, как малат- и изоцитратдегидрогеназа, рибосомные ферменты синтеза белка, очень чувствительны к астении. У лиц с астеническими нарушениями обнаружено снижение активности физиологической антиоксидантной системы, что способствует активации процессов перекисного и свободнорадикального окисления и вторичным изменениям обмена веществ, что, несомненно, приведет к снижению метаболической устойчивости организма к гипоксии, гипертермии, интенсивным физическим нагрузкам [8, 67, 165, 166].

Интермедиаты цикла Кребса являются биологически активными веществами, представляющими интерес в качестве потенциальных лекарственных средств метаболического действия. Янтарная кислота и ее производные являются наиболее изученными в этом отношении [19, 106, 263, 400].

Янтарная кислота относится к группе двухосновных насыщенных карбоновых кислот. Ее концентрация в тканях составляет 500 – 800 мкмоль/л, а в плазме крови в физиологических условиях – 2 – 20 мкмоль/л [244]. При приеме внутрь янтарная кислота поступает из желудочно-кишечного тракта в кровь и ткани, где она быстро включается в энергетический обмен организма. Янтарная кислота – малотоксичное соединение, не обладающее мутагенным и тератогенным действием [8, 67, 75, 127, 128, 130, 151]. Он обладает широким спектром действия, но в чистом виде плохо проникает через барьеры. Транспортными формами янтарной кислоты являются ее натриевые соли, метиловые эфиры, комплексы с N-(1-дезоксиде-глюцитол-1-ил)-N-метиламмонием и некоторыми другими соединениями [128].

Препараты, относящиеся к группе производных янтарной кислоты, модулируют активность ферментов клеточных мембран (Ca^{2+} -независимая фосфодиэстераза, аденилатциклаза, ацетилхолинэстераза), рецепторных комплексов (бензодиазепин, ГАМК, ацетилхолин), способствуют их связыванию с лигандами, сохранению структурной и функциональной организации биомембран, транспорту нейромедиаторов и улучшению синаптической передачи; увеличивают концентрацию дофамина в головном мозге, облегчают компенсаторную активацию аэробного гликолиза [159, 165, 400, 425, 443].

Антигипоксическое действие янтарной кислоты основано не только на способности активировать сукцинатдегидрогеназный путь ресинтеза АТФ в зоне ишемии, снижать уровень НАД-зависимых субстратов цикла Кребса и жирных кислот, но также связано со стимуляцией

активности цитохромоксидазы, которая является ключевым ферментом дыхательной цепи митохондрий клеток [103, 104, 105, 157, 158, 185, 225, 227, 263]. В дополнение к своему антигипоксическому действию по субстратному механизму янтарная кислота также действует путем активации специфических рецепторов (SUCNR1). Модуляция активности рецепторов SUCNR1 посредством изменения концентрации сукцината является одним из способов контроля секреции метаболических гормонов или регулирования метаболической активности определенных клеток [75, 159, 244]. То есть, по сути, воздействие сукцината можно назвать гормоноподобным (в дополнение к его функциям в качестве энергодающего субстрата). [160, 234].

Потенциальная буферная активность натриевых солей янтарной кислоты интересна с терапевтической точки зрения. Именно способность сукцината к внутриклеточному окислению с заменой одной молекулы водорода на натрий с образованием бикарбоната может быть уникальной с точки зрения возможностей купирования внутриклеточного метаболического ацидоза — одного из наиболее серьезных последствий гипоксии практически любой этиологии [225, 283, 439].

В условиях экспериментального шока, вызванного временной остановкой сердца, введение янтарной кислоты приводит к снижению протекания свободнорадикальных процессов в головном мозге и сыворотке крови, ослабляет разрушение мембран нейронов. В постреанимационном периоде янтарная кислота приводит к нормализации функции центральной нервной системы, уменьшению накопления продуктов свободных радикалов и способствует восстановлению морфологических изменений в крови и головном мозге [228].

В нервной ткани янтарная кислота синтезируется из ГАМК путем образования янтарного альдегида (цикл Робертса) [173], а ее антистрессовое действие обусловлено антигипоксическим эффектом и увеличением содержания ГАМК в головном мозге [105, 135, 136].

Серия исследований, в которых искусственно вызванные изменения, связанные с уменьшением количества митохондрий, снижением концентрации комплексов дыхательной цепи и энергетических субстратов, показали, что избыточное содержание сукцината проявляет стимулирующее действие на интенсивность клеточного дыхания [154].

В эксперименте применение янтарной кислоты при острой ишемии головного мозга у лабораторных крыс приводило к уменьшению деструкции нейронов, снижению концентрации продуктов ПОЛ, ионов аммония, α -аланина, нормализации коэффициента сопряженности окислительного фосфорилирования и, в итоге, к увеличению выживаемости животных [159]. Описано адаптогенное действие янтарной кислоты на модели иммобилизационного стресса.

На модели иммобилизационного стресса [216, 431] и стресса, спровоцированного ожогом, вибрацией, электрическим шоком, гипотермией описано адаптогенное действие янтарной

кислоты [172]. Окисляясь сукцинатдегидрогеназой, ЯК монополизирует дыхательную цепь [120], что приводит к ускорению ресинтеза АТФ клетками [105, 172], и более выражено, чем другие субстраты цикла Кребса, увеличивает количество восстановленных митохондриальных никотинамиддинуклеотидов (НАД⁺), стимулирует процесс восстановительного синтеза в клетке и поддерживает транспорт кальция [156]. Ее положительное влияние на функции органов связано с энергизирующим воздействием на функциональное состояние структур, оказывающих центральное регуляторное действие [216].

Реамберин (меглюмина натрия сукцинат), входящий в традиционные схемы лечения диабетической периферической невропатии, обладает выраженным потенцирующим терапевтическим эффектом и значительно укорачивает длительность лечения, проявляет выраженное седативное и снотворное действие, способствует быстрому устранению симптомов диабетической ангиопатии нижних конечностей [119, 127, 172, 181, 188, 204].

Нейропротекторное действие реамберина на головной мозг у больных с диабетическим кетоацидозом, осложненным прекомой и комой, проявляется в ускорении процессов восстановления когнитивных функций как в раннем, так и в отдаленном от перенесенного эпизода церебральной гипоксии периоде [11, 45, 85, 188].

Показано, что механизмы реализации психокорректирующего эффекта реамберина в определенной степени связаны с основными путями синтеза ГАМК [127, 181]. Было обнаружено, что реамберин способен сокращать продолжительность «поведения отчаяния» у мышей в тестах Porsolt и Steru [45]. Такой эффект препарата, по мнению авторов, обусловлен наличием антидепрессивной активности, которая не зависит от его способности проявлять стимулирующий эффект.

Введение препарата способствует резкому уменьшению нарушений транспорта кислорода в дыхательном, объемном, тканевом отделениях и показателей кислородного баланса организма, вызывает изменения электрической активности головного мозга, что проявляется в уменьшении глубины угнетения ЦНС. Включение реамберина в программу интенсивной терапии пациентов с острыми тяжелыми отравлениями нейротоксическими ядами позволило уменьшить проявления эндотоксикоза за счет уменьшения тканевой гипоксии, реабилитации естественных систем детоксикации, восстановления тканевого и системного метаболизма и выведения токсических продуктов из внутренней среды организма. [127, 228].

При применении препарата для профилактики и терапии постгипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных детей был выявлен церебропротекторный эффект. В группе детей с ранним началом терапии наблюдалось значительное сокращение продолжительности пребывания на искусственной вентиляции легких и более низкие уровни сывороточных концентраций нейроспецифических антигенов. Препарат также снижал частоту и

тяжесть гипоксически-ишемических поражений головного мозга у недоношенных новорожденных [119].

Большой интерес представляет потенцирующая активность янтарной кислоты, которая добавляется к различным традиционно используемым лекарственным средствам для усиления их антигипоксического эффекта. Таким образом, при изучении комбинированного воздействия янтарной кислоты и цитохрома С на явления энергетического дефицита в клетках при недостаточном снабжении кислородом у животных, получавших эту комбинацию, отмечено увеличение содержания гликогена и АТФ на 25%, изменений активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) не выявлено и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), снижение уровня лактата на 17,7% по сравнению с контролем. В группе, не получавшей препарат, наблюдалось увеличение активности Г6ФДГ и ЛДГ на 146 и 113% соответственно, лактата – на 216% относительно контроля, в то время как содержание АТФ снизилось на 16,8% [330].

При назначении сукцинатсодержащих препаратов (Мексидол, Реамберин) в начальные часы пребывания в отделении интенсивной терапии (ОИТ) у пациентов с ишемическим инсультом наблюдалось существенно более быстрое улучшение клинических и лабораторных показателей, восстановление нейродинамики и реактивности центральной нервной системы, уменьшение концентрации лактата и креатинфосфокиназы в крови [11, 172, 192].

Янтарная кислота участвует в обеспечении ряда энергозависимых процессов в нервной ткани: проведении нервных импульсов, поддержании пространственной ориентации и конформации структурных единиц нейронов, формировании синаптических структур и функционировании синапсов, неврологической памяти, трансмембранном переносе субстратов и нейромедиаторов [150, 165, 192]. Однако основной причиной этих эффектов является, по-видимому, антигипоксическое действие янтарной кислоты и, соответственно, уменьшение проявлений гипоксической энцефалопатии [11, 19, 159].

В условиях гипоксии, развившийся недостаток НАД-зависимых субстратов, приводит к нарушению функционирования 1-го комплекса дыхательной цепи, янтарная кислота обеспечивает перенос электронов непосредственно во 2-й комплекс, поддерживает постоянную работу дыхательной цепи и адекватность энергетического обмена в целом [314].

Однако роль янтарной кислоты в организме не ограничивается непосредственным участием в цикле Кребса и процессе окислительного фосфорилирования. Сукцинат – это мощный эндокринный стимулятор. В различных органах и тканях, в том числе в центральной нервной системе (нейроны и астроциты), экспрессируются специфические рецепторы сукцинатной мембраны, GPR91 или SUCNR1, принадлежащие к семейству рецепторов G-белка [248, 309, 314, 391] и гормоноподобное действие [108, 249].

Физиологические функции этих рецепторов заключаются в реагировании и преодолении последствий энергетического дисбаланса, связанного в первую очередь с кислородной недостаточностью [314]. Увеличение как внутриклеточной, так и внеклеточной концентрации сукцината приводит к стимуляции рецептора и последующему росту выработки и высвобождения фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). [224, 245]. Сукцинатзависимая экспрессия VEGF опосредуется высвобождением арахидоновой кислоты внутри клеток, а под влиянием циклооксигеназы-2 приводит к выработке и высвобождению простагландина E2 с последующей активацией рецепторов простагландина EP4 [309]. Реваскуляризация головного мозга может уменьшить последствия как острой, так и хронической ишемии. Кроме того, выполняет роль нейронального регулятора высвобождения провоспалительных агентов после гипоксии/ишемии мозга, ограничивает размер очага инфаркта [160, 234].

Это позволяет сделать вывод, что применение препаратов, содержащих сукцинат, способствует поддержанию оптимального уровня функционирования организма за счет увеличения компенсаторных возможностей организма и повышения адаптационных способностей при стрессе.

Устойчивость обмена субстратами между цитозолем и митохондриальным матриксом нужно для качественного митохондриального метаболизма. Доставка водорастворимых метаболитов осуществляется по потенциалзависимым анионным каналам. Повышение внутриклеточной концентрации сукцината сопровождается открытием потенциалзависимых анионных каналов и восстановлением (или интенсификацией) метаболических процессов [19, 235].

Действие янтарной кислоты на клетку, как митохондриального антиоксиданта, заключается в уменьшении интенсивности протекания перекисного окисления липидов, увеличении содержания восстановленного глутатиона, восстановлении тиолдисульфидного статуса клетки, подъёме активности антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы) [159].

Активное окисление янтарной кислоты поддерживает высокую степень восстановленной формы кофермента Q10, предупреждает накопление его частично восстановленной его формы, снижает концентрацию супероксид-анионов [19, 172]. По антиоксидантной активности сукцинат сравним с синтетическим антиоксидантом ионолом. Анализ антирадикального действия показал, что янтарная кислота, независимо от дозы, проявляет низкую антирадикальную активность [150].

Соль янтарной кислоты холина – дихолинсукцинат предотвращает развитие центральной инсулинорезистентности, значительно улучшает активацию рецепторов инсулина в нейронах в ответ на низкие субоптимальные дозы инсулина [276, 277, 415]. На экспериментальных моделях БА, сосудистой деменции, ЧМТ, ишемического инсульта, моделях тревоги и депрессии было

установлено, что препарат оказывает прямое аутофосфорилирование (активацию) рецепторов инсулина в нейронах [272, 382, 412, 416, 445].

Сукцинат аммония является субстратом, стимулирующим образование глутамата, который далее декарбоксилируется до гамма-аминомасляной кислоты и затем трансаминируется в гамма-гидроксибутират. Было установлено, что поступление сукцината аммония в организм может оказывать двоякий эффект. В большинстве случаев (около 70%) он оказывает активизирующее действие, то есть способствует бодрости и работоспособности. Но примерно 30% пациентов воспринимают сукцинат аммония как седативное средство, снимающее стресс, иногда вплоть до легкой вялости и даже сыпи. В результате клинических испытаний было установлено, что прием сукцината аммония помогает устранить чрезмерную тревожность, успокаивает и повышает активность [164]. Независимо от того, какое было первоначальное действие сукцината аммония, в обеих ситуациях он вызывает ускорение восстановления после интенсивных физических нагрузок. При пероральном введении препарат действительно полностью подвергается окислительным превращениям в углекислый газ в 6-8 раз быстрее, чем глюкоза [136]. Начиная с дозы 50 мг/кг, он оказывает дозозависимый противосудорожный эффект [52].

Определение скорости протекания нервных процессов в высших отделах центральной нервной системы у лиц, употреблявших сукцинат натрия, продемонстрировало улучшение лабильности и функциональной подвижности нервных процессов, согласованности как сенсорной, так и моторной частей центральной нервной системы, работы сенсорных единиц и четкой регуляции их активности нервной системы [223].

Основное антигипоксическое действие янтарной кислоты в составе цитофлавина (янтарная кислота + инозин + никотинамид + рибофлавин) дополняется рибофлавином, который благодаря своим коферментным свойствам повышает активность сукцинатдегидрогеназы и оказывает косвенное антиоксидантное действие (за счет восстановления окисленного глутатиона). Предполагается, что никотинамид, входящий в состав препарата, активирует НАД-зависимые ферментные системы, но этот эффект менее выражен, чем у НАД. Благодаря инозину достигается увеличение содержания общего пула пуриновых нуклеотидов, которые необходимы не только для ресинтеза макроэргов (АТФ и ГТФ), но и вторичных мессенджеров (цАМФ и цГМФ), а также нуклеиновых кислот. Определенную роль может сыграть способность инозина снижать активность ксантиноксидазы, тем самым уменьшая выработку высокоактивных форм и соединений кислорода [1, 110, 125, 186, 361, 363].

Рекомендуется применять препарат пациентам среднего, пожилого и старческого (до 85 лет) возраста вне зависимости от локализации сосудистого поражения мозга с целью более полного восстановления нарушенных неврологических функций. Лечение следует начинать в

первые 10 суток с использования парентеральной формы препарата 20 мл (в 400 мл 0,9% NaCl) дважды в сутки, а затем 11 - 35 сутки – пероральной формы (850 мг дважды в день)

Можно рекомендовать употреблять препарат пациентам среднего, пожилого и старческого (до 85 лет) возраста, независимо от локализации сосудистого поражения головного мозга, с целью более полного восстановления нарушенных неврологических функций. Лечение должно начинаться в первые 10 дней с применения парентеральной формы препарата по 20 мл (в 400 мл 0,9% NaCl) два раза в день, а затем на 11-35-й день – пероральной формы (850 мг два раза в день). [186, 361, 363].

Метаболиты цикла Кребса оказывают сосудорасширяющее действие. В экспериментах на анестезированных собаках было показано, что натриевые соли цитрата, α -кетоглутарата, сукцината, фумарата, малата и оксалоацетата в концентрациях, превышающих на 16-18% содержание метаболитов в крови, уменьшают сопротивление сосудов конечностей и почек [301]. 1%-ный раствор фумаровой кислоты, получаемый с пищей в течение 39 недель, может существенно понизить активность канцерогенов [228].

Практическое применение в качестве антигипоксантов стали находить препараты, поддерживающие активность сукцинатного звена при гипоксии. Это ФАД-зависимое звено цикла Кребса, которое позже подавляется гипоксией по сравнению с НАД-зависимыми оксидазами, может поддерживать выработку энергии в клетке в течение определенного времени при условии, что субстрат окисления в этом звене, сукцинат, присутствует в митохондриях [172]. Дисфункция митохондрий мышц является одной из основных причин мышечной слабости и снижения переносимости физической нагрузки у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Экспериментально установлено, что после удаления 5/6 почечной ткани у мышей естественным образом уменьшились мышечная масса, сила мышечных сокращений и расстояние, которое они преодолевали за единицу времени. Высокобелковая диета увеличивала объем и силу мышц, но пройденное расстояние продолжало постепенно сокращаться, в то время как введение дихлорацетата, активатора пируватдегидрогеназы, эффективно восстанавливало их первоначальную длину [418]. Применение препаратов янтарной кислоты может способствовать коррекции митохондриальной дисфункции у пациентов, находящихся на гемодиализе [201].

Есть данные о том, что янтарная кислота снижает уровень лактата в организме и способствует его более быстрому выведению, препарат повышает работоспособность спортсменов и ускоряет восстановление мышц после физических нагрузок [92].

Проведенные Chernyev O. V. [272] экспериментальные исследования в тесте «Вынужденное плавание» показали, что применение сукцината приводит к повышению эффективности внутриклеточных механизмов энергопродукции практически во всех тканях

лабораторных животных при изнурительных физических нагрузках, при этом значимо увеличивалось время плавания белых мышей до отказа.

Однократное применение сукцината натрия (5 мг/кг) повышает скорость и эффективность процессов восстановления футболистов после тренировочных занятий, об этом свидетельствуют данные динамики содержания лактата в крови после тренировки в аэробной зоне интенсивности. Анализ изменений показателей ЧСС свидетельствует, что в группах футболистов, принимавших сукцинат натрия, восстановление происходит более выражено, чем у спортсменов, которые не принимали препарат [224].

Исследование оценки эффективности фонтурацетама сукцината в условиях информационно-физического стресса (чередование двух видов нагрузок: физической — плавание с грузом 10% от массы тела, время «до предела» и информационной — формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте) продемонстрировало способность препарата устранять стрессорные нарушения, что может быть критически важным в некоторых видах спорта, например, в биатлоне.

Исследование, оценивающее эффективность фонтурацетама сукцината в условиях информационного и физического стресса (чередование двух видов нагрузок: физической - плавание с нагрузкой 10% от массы тела, время «на пределе» и информационной — формирование пищепроизводящего поведения в многоальтернативном лабиринте), представило способность препарата устранять стрессовые расстройства, что может быть критически важно в нетрадиционных видах спорта, например, в биатлоне [193].

В исследованиях, проведенных с участием высококвалифицированных гандболисток во время тренировочных сборов, было выявлено положительное влияние мексидола на восстановительные процессы. Кроме того, наблюдалось сохранение функциональной подготовленности у спортсменов старшей возрастной группы наряду с улучшением спортивных результатов во время теста зоны субмаксимальной мощности [221]. В исследованиях, в которых изучалось влияние комбинированного препарата Цитофлавин на спортсменов, было отмечено значительное повышение адаптации к физической нагрузке, тренированности организма и его энергообеспечения [1, 110]

1.3. Механизмы ноотропного действия на уровне синаптических мембран

Дендритные шипики – это постсинаптические структуры, которые обуславливают синаптический контакт с аксонной терминалью. Шипики очень тонкие, около 0,1 мкм, и короткие, около 1 мкм, ответвления дендритов, состоят из головки, соединенной с дендритом

узкой шейкой. Предполагается, что именно узкая шейка, отделяющая дендритное дерево от головки шипа, обеспечивает компартментализацию синапса [424].

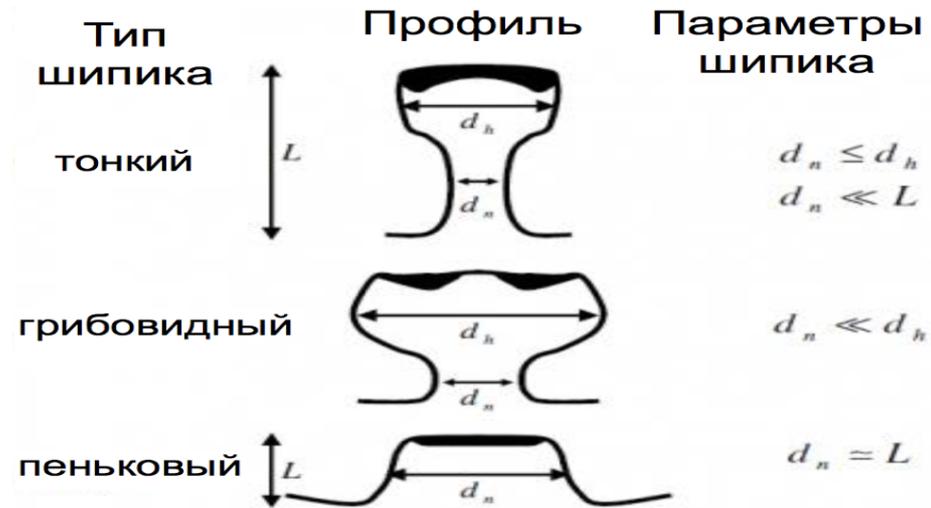


Рисунок 2. Типы дендритных шипиков в зависимости от соотношения параметров общей длины шипика (L), размера головки (d_h) и размера шейки (d_n) [177, 310].

В зависимости от размера головы и шеи дендритные шипики подразделяются на три категории: грибовидные, тонкие и пеньковые (Рисунки 2, 3). Общая длина тонкого шипика намного больше диаметра шейки, которая соединяет дендрит с маленькой головкой, диаметр которой составляет менее 0,6 микрона. Грибовидный шипик имеет большую головку, диаметр которой составляет более 0,6 мкм, и узкую короткую шейку. Для пенькового шипика характерно отсутствие шейки, большая и широкая головка, которая непосредственно соединяет его с дендритом [177, 310].

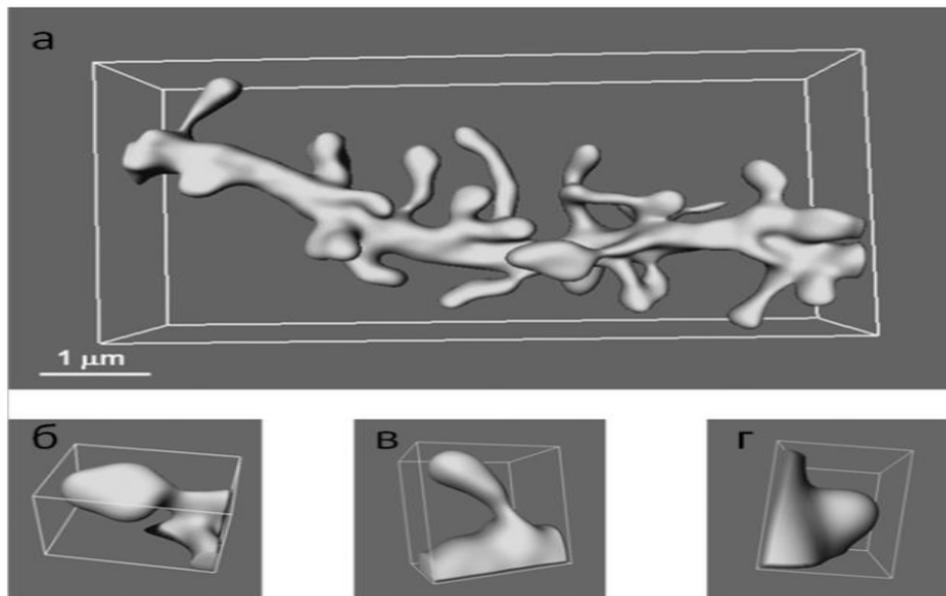


Рисунок 3. Трехмерная реконструкции дендрита (а) и дендритных шипиков, иллюстрирующая различные формы шипиков: грибовидные (б), тонкие (в) и пеньковые (г) [358].

Одной из важнейших структур головки дендритного шипика является постсинаптическая плотность (PSD). PSD представляет собой сосредоточение большого количества рецепторов, регуляторных белков и молекул, участвующих в синаптической передаче, таких как ионотропные (NMDA, AMPA) и метаботропные (mGluR) рецепторы глутамата, эффекторные белки, такие, как кальций-кальмодулин-зависимая киназа 2 типа (CAMKII), а также белки каркасного матрикса, такие, как белок постсинаптической плотности 95 (PSD-95), являющийся маркерным белком для PSD [414].

Полагается, что грибовидные шипики с большим количеством AMPA и NMDA-рецепторов, и, соответственно, большим размером PSD, более восприимчивы к глутамату и благодаря этому являются активными синапсами. Маленькие шипики значатся «молчащими» синапсами, поскольку включают только NMDA рецепторы.

Приток ионов кальция через открытые каналы NMDA-рецептора может запускать различные биохимические каскады, а шипики, расположенные на дендритах, действуют как особые функциональные компартменты постсинаптической клетки, которые предотвращают возможную диффузию кальция через другие части мембраны и, кроме того, ограничивают действие конкурирующих нейронов на постсинаптическую мембрану клетки [410].

Другим биохимическим компартментом, необходимым для нормального функционирования дендритного шипика, являются полирибосомы, которые расположены у основания дендритного шипика, однако при долговременной потенциации могут быть перемещены в область головки шипа [253, 365].

Известно, что постсинаптические дендритные отростки играют важную роль в процессах памяти и обучения [253]. Полагается, что грибовидные шипики – это «шипы памяти», и механизмы стабилизации грибовидных шипиков лежат в основе формирования и хранения воспоминаний [417].

Грибовидные шипики образуют наиболее активные синапсы, и именно их наличие является маркером высокой интеграции нейрональной сети. Они более подвержены элиминации при старении организма и нейродегенеративных заболеваниях [292], были отмечены значительные изменения в количестве и морфологии шипов у людей с неврологическими и психическими расстройствами [375].

Изучение киназных сигнальных путей – новое и быстро развивающееся направление в области нейрональной сигнальной трансдукции [83, 297, 298]. Одной из наиболее важных и представляющих интерес киназ, участвующих в регуляции процессов метаболизма, клеточной пролиферации, апоптоза, клеточного цикла, эмбриогенеза, нейротрансмиссии, нейродегенерации, синаптической пластичности, является киназа гликогенсинтазы 3 β (GSK-3 β) [389]. GSK-3 β играет важную роль в процессах нейродегенерации [60, 322, 325], участвует в

образовании амилоидного β -пептида из его предшественника и ингибирует тау-белок, что является одним из механизмов патогенеза болезни Альцгеймера.

Ростовые факторы (нейротрофины, BDNF, IGF-1, NGF, GDNF) блокируют GSK-3 β и способствуют нейрональной поляризации, росту и ветвлению аксонов [110, 328]. САМКИИ является одним из важнейших белков, связанных с синаптической пластичностью, синтезируемых на полирибосомах во время экспрессии LTP, и именно из-за увеличения его количества происходит соответствующее увеличение PSD [365]. САМКИИ – это серин-треониновая протеинкиназа, которая фосфорилирует более 30 белков в PSD [438], а после активации кальцием и кальмодулином он способен к аутофосфорилированию и в этом состоянии может регулировать активность глутаматных рецепторов как прямо, так и опосредованно в течение длительного времени после индукции LTP. Более того, САМКИИ сконцентрирован в PSD и участвует в регуляции синаптической активности, включая размер дендритного шипика.

Измененная активность ядерного фактора карраВ (NF-kappaB) в условиях мотивированного поведения, обучения и памяти была изучена у мышей, у которых отсутствовала субъединица p50 семейства транскрипционных факторов NF-kappaB/rel. Было выявлено, что p50 в нервной системе предназначается для ослабления внутриклеточной активности, опосредуемой NF-каппа В, которые физиологически проявляются повышенными стрессовыми реакциями на авersive стимулы [338].

Фосфорилирование и перемещение NMDA-рецепторов из одной области клетки в другую регулируется тирозинкиназой семейства Src Fyn посредством динамического взаимодействия с различными структурными белками комплекса NMDA-рецепторов и является точкой пересечения многих сигнальных путей, которые усиливают экспрессию GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов. В результате активации D1-дофаминовых рецепторов и рецепторов, связанных с активирующими аденилатциклазу полипептидными сигнальными путями гипофиза, отмечается увеличение экспрессии GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов. Именно NMDA-рецепторы являются главной точкой приложения этанола в головном мозге, а Fyn опосредует эффекты этанола, регулируя фосфорилирование GluN2B субъединицы NMDA рецепторов, и регулирует «синдром отмены» алкоголя и острое привыкание к нему через GluN2B-зависимые механизмы. Кроме того, Fyn изменяет порог синаптической пластичности у синапсов в CA1-области гиппокампа [426].

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и его рецептор TrkB играют существенную роль в обучении и памяти. Уменьшение уровня BDNF, циркулирующего в крови, является маркером снижения когнитивных функций в пожилом возрасте у женщин, но не у мужчин, в частности, понижения их способности к запоминанию. Стимуляция памяти связана с увеличением мРНК BDNF и активацией TrkB в структурах головного мозга. Уменьшение

нейротрофического фактора головного мозга или его рецепторов TrkB приводит к ухудшению памяти. Активация сигнальных путей митоген-ассоциированной протеинкиназы и фосфатидилинозитол-3-киназы усиливает BDNF-зависимое обучение и память. Взаимодействие передачи сигналов BDNF/TrkB с NMDA-рецепторами важно для пространственного обучения и памяти, и тирозинкиназа семейства Src может играть ключевую роль в этом взаимодействии, связывая TrkB с субъединицей глутаматного NMDA-рецептора (NR2B) [437].

Нейропротективные свойства инсулина были неоднократно продемонстрированы на модели ишемического повреждения головного мозга у экспериментальных животных [296], на культивируемых кортикальных нейронах, находящихся в состоянии окислительного стресса [294]. Важными медиаторами нейропротективного действия инсулина могут быть сиртуины (SIRT) – семейство НАД⁺-зависимых деацетилаз гистонов и негистоновых субстратов (p53, FOXO, NF-κB, Ku70, α-тубулин, ДНК-полимеразы). Сиртуинам отводится важная роль внутриклеточных сенсоров уровня НАД⁺ и регуляторов метаболизма, в том числе в контексте контроля продолжительности жизни. Активно дискутируется роль сиртуинов в регуляции синаптической пластичности, процессов запоминания, физиологического старения головного мозга, формирования поведенческих реакций при изменении метаболизма, а также в патогенезе болезни Хантингтона и болезни Альцгеймера [187, 278, 353, 420].

Сфингомиелин является ключевым модулятором дендритного цитоскелета. Накопление сфингомиелина снижает уровни метаболитов глутаматных рецепторов I типа (mGluR1/5) на синаптической мембране. В этом случае нарушается прикрепление мембраны и активность RhoA и её эффекторов ROCK и профилина IIa. Фармакологическое усиление нейтральной сфингомиелиназы улучшает двигательную функцию и дефицит памяти у мышей с дефектом метаболизма сфингомиелина [246].

Натрийуретические пептиды (NP) представляют собой семейство структурно родственных, но генетически различных пептидов. Эти пептиды вместе со своими рецепторами (GPCR) участвуют в регуляции различных физиологических функций, включая такие, как диурез, натрийурез и кровоток. Кроме того, установлено, что NP и NPR широко распространены в центральной нервной системе. Полагается, что они участвуют в моделировании физиологических функций ЦНС, в развитии нейронов, высвобождении нейромедиаторов, синаптической передаче и нейропротекции посредством активации NPR [265].

1.4. Перспективные направления развития фармакологического класса ноотропов

Анализ литературы, посвященной свойствам и особенностям применения ноотропных препаратов различных групп, показал, что некоторые группы представлены достаточным

ассортиментом лекарственных средств для нужд клинической практики. В первую очередь это относится к ноотропам – производным пирролидона (рацетамам), пептидным ноотропам, ампакинам, цереброваскулярным ноотропам, включая их комбинации с пирацетамом. Дальнейшее развитие класса ноотропных препаратов в этом направлении вряд ли позволит получить новые препараты, существенно отличающиеся по эффективности от существующих.

Перспективными, на наш взгляд, могут быть подходы, основанные на сочетании рецепторных механизмов регуляции активности нейронов и когнитивных функций с неспецифическими механизмами расширения энергетических возможностей нейронов и их пластичности.

Помимо сукцинатных рецепторов, существуют другие потенциально перспективные мишени в ЦНС, связанные с метаболитами цикла Кребса и проявляющие положительное действие на нейропротекторную и когнитивную активность. В частности, такие мишени могут включать рецепторы GPR109A (ранее известные как рецепторы никотиновой кислоты типа 1), возбуждаемые кетоновым соединением 3-гидроксибутиратом, никотиновой кислотой, монометилфумаратом. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы были обозначены как HCA2. Именно с этими рецепторами, по нашему мнению, может быть связано первое направление в разработке класса ноотропных препаратов. Предпосылками для этого являются не только информация о рецепторе, но и тот факт, что производное фумаровой кислоты диметилфумарат уже одобрено к применению в неврологии. Диметилфумарат (Текфидера) рекомендован FDA для лечения рассеянного склероза, доза препарата для длительного курсового (6 месяцев) применения составляла 120-240 мг 2 раза в день [429].

В механизме действия диметилфумарата (и монометилфумарата, до которого препарат быстро метаболизируется) важную роль представляет его способность активировать транслокацию в ядро рецептора ядерного фактора 2 (Nrf2), который регулирует, среди прочего, гены антиоксидантного ответа (гемоксигеназу-1 (HMOX1), НАДФ, хинолиноксидоредуктаза 1 (NQO1) и другие). При воздействии диметилфумарата в цитозоле глиальных клеток, олигодендроцитов и нейронов повышается концентрация Nrf2 с последующим иммуноцитопротекторным действием, уменьшением морфологических и клинических проявлений нейродегенеративного процесса у пациентов с рассеянным склерозом. В культуре активированных Т-клеток монометилфумарат (основной метаболит диметилфумарата) влияет на цитокиновый профиль (интерлейкины IL-4, IL-5) [264, 266]. На мышинных моделях рассеянного склероза показано [269], что применение диметилфумарата сопровождается снижением неврологического дефицита, инфильтрацией иммунных клеток, адгезией нейтрофилов к эндотелиальным клеткам, демиелинизацией спинномозговой хорды. Нейропротекторный

эффект диметилфумарата при рассеянном склерозе был подтвержден в клинической практике [258, 252, 262].

У диметилфумарата (ДМФ) выявлен нейропротекторный эффект на модели эпилепсии, вызванной пентилентетразолом и черепно-мозговой травмой [264, 266, 407]. В группе животных, которым вводили ДМФ (60 мг/кг) увеличивались уровень активности ферментов антиоксидантной системы (глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и содержание восстановленного глутатиона (GSH). Также отмечалось снижение процессов перекисного окисления липидов по сравнению с группой кукурузное масло + пентилентетразол [407].

Диметилфумарат, являясь регулятором генов, реализует свое действие несколькими путями, включая цитопротекторный каскад Nrf2. PARK 7/DJ-1 - многофункциональный белок, который действует как окислительно-восстановительный сенсор и эффектор нескольких цитопротекторных путей, включая Nrf2. В частности, он предотвращает ассоциацию Nrf2 с ингибитором KEAP1, что позволяет Nrf2 проникать в ядро и стимулировать цитопротекторные и антиоксидантные каскады [421, 428]. Другой автор отметил, что диметилфумарат не оказывал влияния на миелинизацию регенерированных нервов [345].

Болезнь Альцгеймера характеризуется сложной гетерогенностью патологических изменений - внеклеточными сенильными бляшками, состоящими из амилоида A β , и внутриклеточными нейрофибрилярными сплетениями, состоящими из гиперфосфорилированного тау-белка [271, 373, 384], следовательно, любой терапевтический подход требует многоцелевого применения. Было продемонстрировано, что окислительный и воспалительный стресс способствуют развитию нейрофиброза и гибели клеток [281, 266]. Диметилфумарат снижал выраженность воспаления за счет модуляции активности нейрональной синтазы оксида азота, интерлейкина 1, фактора некроза опухоли, циклооксигеназы 2 (COX2) и миелопероксидазы, уменьшал концентрацию ионизированного кальций-связанного белка, и глиального фибриллярного кислого белка, проявлял нейропротекторную и иммуномодулирующую активность. Было обнаружено, что ДМФ способен индуцировать активацию супероксиддисмутаза марганца (MnSOD) и гемоксигеназы-1 (HO-1), уменьшая выраженность окислительного стресса. Более того, ДМФ, как *in vitro*, так и *in vivo*, реализует свое действие через Nrf2/NF- κ B-зависимый механизм, регулирующий развитие воспалительного процесса, и, поэтому, может быть использован при нейродегенеративных заболеваниях [264].

Второе направление перспективного развития класса ноотропов может быть связано с поиском соединений, которые снижают гиперфосфорилирование тау-белка и блокаду агрегации тау, повышают уровень шаперонов в головном мозге и производят "очистение" амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера. В настоящее время ведется активное изучение молекулярных механизмов патогенеза этого заболевания, что, несомненно, приведет к четкому пониманию

структуры необходимой молекулярной мишени, что, в свою очередь, позволит решить проблемы молекулярного докинга и направленного синтеза молекул-мишеней. Однако при современном уровне развития науки это направление все еще недостаточно разработано с теоретической точки зрения.

Третье направление связано с поиском активаторов нейротрофиновой системы и рецепторов Trk, которые влияют на экспрессию и секрецию нейротрофинов и в то же время являются агонистами и положительными модуляторами AMPA-рецепторов [409]. Для препаратов, полученных в результате развития этого направления, можно предположить высокую нейрореабилитирующую активность, особенно у пожилых людей и у лиц с метаболическими энцефалопатиями.

Четвертое направление связано с исследованием ноотропных свойств нейростероидов (дегидроэпиандростерона и его сульфата) и их аналогов, а также разработкой новых лекарственных средств на их основе. Для этих препаратов можно предположить высокую нейротрофическую активность и способность значительно ускорять восстановление функций нейронов при их гипоксически-ишемическом повреждении [22, 336, 339].

К пятому направлению можно отнести поиск новых ноотропных препаратов среди производных антифеина. Причиной этого является тот факт, что представитель этой группы, препарат этимизол, способен улучшать обмен информацией между нейрональными центрами на уровне интерстициальных связей, способствовать формированию искусственных стабильных функциональных связей головного мозга [144, 337, 340]. Он проявляет стимулирующее действие на дыхательный центр и принадлежит к группе респираторных аналептиков. В то же время он активирует адренкортикотропную функцию гипофиза, что приводит к повышению уровня глюкокортикоидов в крови. В механизме действия этимизола значительную роль может представлять его ингибирующее действие на фосфодиэстеразу, а также увеличение образования цАМФ, что в свою очередь приводит к запуску каскада ферментативных реакций, направленных на активацию метаболических процессов и повышение функциональной активности клеток. Имеются сведения о том, что этимизол повышает действие как седативных, так и наркотических средств, а также стимуляторов головного мозга. Он проявляет стимулирующее действие на структуры активирующей системы и на диффузную таламокортикальную систему. Имеются работы [34, 35, 73, 74], которые указывают на то, что этимизол улучшает кратковременную и долговременную память, все показатели умственной работоспособности. Препарат улучшает субъективные ощущения испытуемых, усиливает внимание, оперативную память, снижает тревожность [141, 152, 392].

Шестое направление, на наш взгляд, может быть связано с преобразованием структуры аминокислоты глутамата таким образом, чтобы можно было усилить его влияние на пластичность нейронов.

Для этого необходимо повысить липотропность соединения, его способность воздействовать на синтез и вмешиваться в состояние фосфолипидов мембран нейронов. Применяемые в настоящее время препараты диметилэтанолamina в основном являются предшественниками ацетилхолина, что, бесспорно, важно для развития их ноотропного эффекта, но очевидно недостаточно для обеспечения высокого уровня синаптической пластичности. Принимая во внимание общие закономерности структурно-функциональной взаимосвязи и растворимости веществ в липидах, можно предположить, что увеличение длины заместителей с аминогруппой (замена метильных групп на этильные) может увеличить мембранные эффекты производных аминоэтанола при сохранении его основных свойств в целом в качестве типичного ноотропного средства.

Естественно, в процессе разработки новых ноотропных средств мы полагаем целесообразным использовать способность кислот цикла Кребса увеличивать антигипоксическую, актопротекторную и ноотропную активность катионных групп оснований в таких солях. Это свойство было продемонстрировано в отношении солей янтарной кислоты амтизола, глутамина, этилтиобензимидазола [25], 3-оксипиридина [133, 134, 135], ГАМК [14], фонтурацетама и других соединений.

Таким образом, в настоящем исследовании мы планируем разработать новое ноотропное средство, объединяющее три из указанных направлений – первое, шестое, и кислоты цикла Кребса. Мы предполагаем, что в химической структуре разрабатываемого перспективного ноотропа должны присутствовать следующие фармакофорные группировки:

- катионная часть – фумаровый эфир диэтиламиноэтанола
- анионная часть – кислотный остаток янтарной кислоты.

Подобные структуры (но на основе янтарного эфира диметиламиноэтанола) с отчетливым позитивным влиянием на работоспособность, устойчивость к гипоксии и стрессу, воздействию низких температур, известны. В медицинской литературе известно описание антиастенического действия диметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты [308]. Так, в качестве средства, повышающего физическую работоспособность, особенно при воздействии низких температур, применялся препарат яктон (янтарная соль янтарного эфира диметиламиноэтанола) [72, 202]. Адаптогенное и стресспротективное действие было описано для сукцината моно[(2-диметиламино) этилового эфира] янтарной кислоты [75, 127, 202]. Так, когда животных помещали в холодную камеру на 6 часов (-15/-17°C), применение препарата, содержащего сукцинат, способствовало увеличению их выживаемости. На модели двигательного стресса с использованием методики лишения экспериментальных животных сна, пищи и воды в медленно вращающемся барабане препарат продемонстрировал выраженное защитное действие как на показатели функциональной активности ЦНС, так и на развитие ряда патофизиологических проявлений стрессового синдрома [128].

Биологическая активность другого янтарного эфира диметиламиноэтанола, его соли яблочной кислоты, была прогнозирована методами информационного анализа [293]. В качестве наиболее возможных видов фармакологической активности, были обнаружены 11 эффектов, таких как: агонист гормона роста (93%), стимулятор аденилатциклазы (87,8%), радиопротектор (78,4%), агонист глицинового сайта НМДА-рецептора (76,5%), ингибитор ацетилтрансферазы аминокислот (75,2%), ингибитор НАДФН-оксидазы (74%), ингибитор креатиназы (66,1%), ингибитор 2-оксоглутаратдекарбоксилазы (66,6%), ингибитор лизин-6-трансминазы (65,4%), агонист ГАМК-С рецептора (65,3%), антигипоксанта (64%), ингибитор ГАМК-аминотрансферазы (60,9%) и др. Кроме того, адаптогенный эффект малата моно (2-диметиламино) этилового эфира янтарной кислоты, который был подтвержден у крыс на модели экстремальной ситуации, связанной со статическим напряжением мышц, и в тесте на плавание [190].

Необходимо подчеркнуть, что на фармацевтическом рынке не только Российской Федерации, но и мировом, отсутствуют препараты с ноотропной активностью широкого спектра, разработанные на основе фумаровой кислоты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая организация и схема исследования

Организация экспериментальных исследований по изучению ноотропного действия нового соединения - производного фумаровой кислоты, была проведена в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (1 часть) и, в частности, согласно её главе 17 «Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия» [145].

На предварительном этапе было выполнено сравнительное скрининговое изучение активационного действия и антигипоксической активности различных синтезированных соединений, представляющих собой разные соли фумарового и янтарного эфира диметил- и диэтилэтанолamina, что позволило осуществить выбор наиболее активного соединения для более детального экспериментального исследования. Скрининговое исследование было выполнено на лабораторных беспородных мышах.

Основная часть экспериментальной работы была проведена в виде нескольких этапов.

1. На первом этапе осуществлено моделирование у крыс **острых гипоксических состояний** (модели острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии), **ишемии головного мозга** (двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий), **черепно-мозговой травмы** (метод «Контролируемого кортикального удара»), **острого нарушения мнестических процессов** – скополаминовая амнезия (тест на выработку условной реакции пассивного избегания (УРПИ)) и осуществлена оценка эффективности изучаемого соединения в широком диапазоне доз при острых патологических состояниях.
2. На втором этапе проведена **оценка поведения животных** (тесты «открытое поле», ПКЛ), моторной дисфункции (тесты «цилиндр, «сужающаяся дорожка» и «стимулирование конечностей»), координацию движений и формирование утомления (аппаратно-программном комплексе «Ротарод+»), кратковременной и долговременной памяти (тест «Лабиринт Барнс»), **оценку когнитивных функций животных** (тесты выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), экстраполяционного избегания, прохождения Т-образного лабиринта) вне периода моделирования острого состояния.
3. Третий этап - проведены исследования по предсказанию (компьютерное предсказание) и изучению специфической активности в условиях *in vitro* (2 метода: исследование влияние ФДЭС на нДУВК и анализ морфологии дендритных шипиков в первичной культуре гиппокампа в присутствии/отсутствии бета-амилоида (Ab)).

4. Четвертый этап – оценка безопасности (острой и хронической токсичности) нового соединения ФДЭС.
5. Пятый этап – исследование фармакокинетических свойств перспективного лекарственного средства ФДЭС.
6. Шестой этап – разработка лабораторной технологии таблеток ФДЭС.

Основным объектом, по результатам скринингового исследования, является бутановая соль транс-бутендиевого эфира диэтилэтаноламина янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтаноламина (рабочий шифр соединения ФДЭС, Рисунок 4).

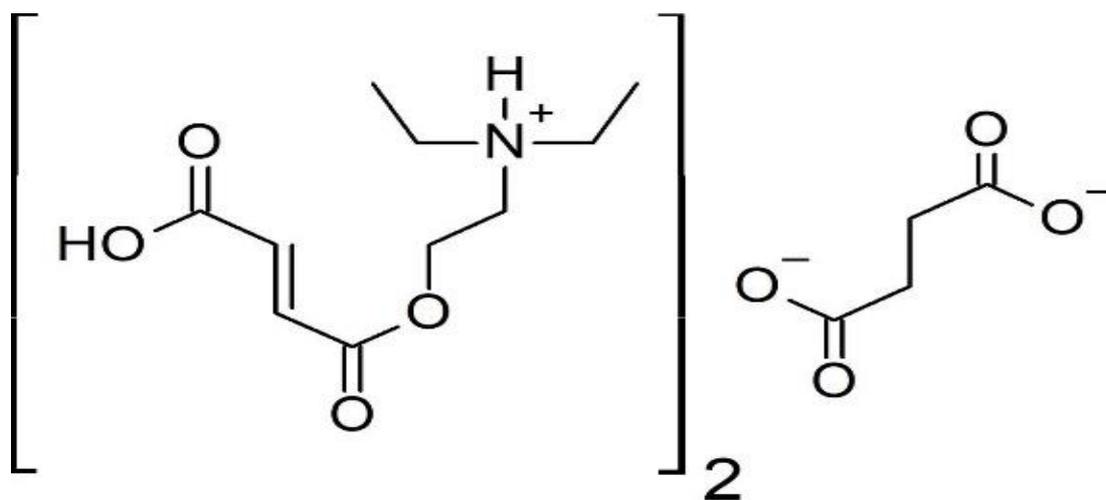


Рисунок 4. – Структурная формула бис {2-[(2E)-4- гидроксн-4-окснбут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтаномина} бутандиоат (2:1) (ФДЭС).

Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете была синтезирована фармацевтическая субстанция и изготовлены на ее основе таблетки¹.

В качестве препаратов сравнения на разных этапах исследования применялись:

Цитофлавин – комбинированный антигипоксанта промышленного производства, содержащий сукцинат, состава: янтарная кислота + рибофлавин+ рибоксин+ никотинамид в таблетках (ООО «НТФФ Полисан», Россия) [125]. Характеристики препарата представлены в разделе 1.2. Препарат вводили внутрнжелудочно в дозах 10, 25, 50, 75, 130 и 600 мг/кг (сукцинат).

- Пирацетам (ноотропил) является эталонным ноотропным препаратом промышленного производства в форме таблеток (UCB Pharma S.A., Бельгия) таблетки [49] вводили внутрнжелудочно в дозе 900 мг/кг. Свойства препарата описаны в разделе 1.1.1.

¹Выражаем нашу искреннюю благодарность В.Н. Юсковцу (руководитель д.х.н., профессор И.П. Яковлева) за синтезированные ими фармацевтическими субстанции и к.фарм.н. Терентьевой О.А. (руководитель д.фарм.н., профессор Флисюк Е.В.) за предоставленную ими готовую лекарственную форму – таблетки ФДЭС (Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет)

Выбор доз референсных препаратов был обоснован литературными данными об их эффективности на изучаемых моделях на лабораторных животных.

ФДЭС и референсные препараты вводили внутривенно за 40 минут до начала экспериментов однократно или курсом (1-3 недели). Животные контрольной группы получали 0,9% раствор NaCl в эквивалентных количествах.

Распределение объектов исследования по экспериментальным моделям и их дозы представлены в таблице (Таблица 2).

Таблица 2 – Объекты исследования и их дозы

Модель/тест	Доза препарата, мг/кг	Препарат	Лекарственная форма
Острая нормобарическая гипоксия	10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800	ФДЭС	ФС
	10, 25, 50, 75, 600	Цитофлавин	Таблетки
Острая гемическая гипоксия	10, 25, 50, 75	ФДЭС	ФС
	10, 25, 50, 75, 600	Цитофлавин	Таблетки
Острая гистотоксическая гипоксия	10, 25, 50, 75	ФДЭС	ФС
	10, 25, 50, 75, 600	Цитофлавин	Таблетки
Острая гипобарическая гипоксия	120	Пирацетам	Таблетки
	0,5	Триметазидин	Таблетки
Перманентная перевязка двух общих сонных артерий	10, 75	ФДЭС	ФС
	170	Цитофлавин	Таблетки
Окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА)	10, 75	ФДЭС	ФС
	900	Пирацетам	Таблетки
	170	Цитофлавин	Таблетки
Контролируемый кортикальный удар	10, 75	ФДЭС	ФС
	900	Пирацетам	Таблетки
	170	Цитофлавин	Таблетки
Тест «УРПИ»	10, 75	ФДЭС	ФС
	900	Пирацетам	Таблетки
Тест «Лабиринт Барнс»	10, 75	ФДЭС	ФС
	170	Цитофлавин	Таблетки
	10, 75	ФДЭС	ФС

Модель/тест	Доза препарата, мг/кг	Препарат	Лекарственная форма
Тест «Экстраполяционное избавление»	900	Пирацетам	Таблетки
Тест «Г-лабиринт»	10, 75	ФДЭС	ФС
	900	Пирацетам	Таблетки
Тест «Ротарод»	10, 75	ФДЭС	ФС
	170	Цитофлавин	Таблетки
Стимулирование конечностей	10, 75	ФДЭС	ФС
	900	Пирацетам	Таблетки
	170	Цитофлавин	Таблетки
Цилиндр	10, 75	ФДЭС	ФС
	170	Цитофлавин	Таблетки
	900	Пирацетам	Таблетки
Сужающая дорожка	10, 75	ФДЭС	ФС
	170	Цитофлавин	Таблетки
	900	Пирацетам	Таблетки

Примечание: ФС - фармацевтическая субстанция

Исследования проведены на 1292 белых беспородных лабораторных мышах самцах массой 22-30 г и мышах самцах линии СВА массой 18-22 г, 587 белых беспородных крысах-самцах и 72 крысах-самках массой 200-250 г. Все эксперименты выполняли в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в области обращения лекарственных средств» (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81), согласно утвержденному письменному протоколу.

Животные были получены от ФГУП "ПЛЖ Рапполово" (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном рационе, со свободным доступом к воде.

Животные экспериментальной и контрольной групп в рамках каждой серии исследований были одного происхождения и одного возраста, были случайным образом разделены на подгруппы по весу. Каждая экспериментальная и контрольная группы включали от 8 до 16 животных.

Распределение животных по методам исследования представлено в таблице (Таблица 3).

Таблица 3 – Распределение лабораторных животных по методам исследования

№ п/п	Методы исследования	Число животных	
		Мыши	Крысы
1.	Вынужденное плавание с грузом	860	
2.	Острая гемическая гипоксия	112	
3.	Острая гистотоксическая гипоксия	112	
4.	Острая нормобарическая гипоксия	112	
5.	Острая гипобарическая гипоксия		145
6.	Перманентная перевязка 2 общих сонных артерий		50
7.	Тест «Сужающая дорожка»		60
8.	Тест «Ротарод»		40
9.	Тест «Лабиринт Барнс»		40
10.	Стимулирование конечностей		60
11.	Тест «УРПИ»		60
12.	Тест «Цилиндр»		60
13.	Тест «Экстраполяционное избавление»		40
14.	Тест «Т-лабиринт»	32	
15.	Острая и хроническая токсичность	64	104
	ИТОГО:	1292	659

2.2. Методы моделирования патологических процессов

В рамках исследования моделировались острые гипоксические состояния, ишемия головного мозга, черепно-мозговая травма, острое нарушение мнестических процессов, физическое утомление.

2.2.1. Методы моделирования острых гипоксических состояний

Для определения антигипоксической активности нового производного этаноламина были использованы модели острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии [94,132].

Для оценки антигипоксической активности препаратов использовались два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели индивидуальной гипоксической резистентности, а также сдвиг в популяционной структуре резистентности (изменение пропорций животных с низкой, средней и высокой устойчивостью) [134]. Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового приема препаратов.

В стандартных исследованиях антигипоксическая активность анализируемого вещества может быть выражена в относительных единицах (относительно контроля, в безразмерном варианте или в процентном выражении) на основе средних групповых значений (например, порог высоты, продолжительность жизни):

$$КА = X_{пр}/X_{э}, \text{ где}$$

КА – коэффициент активности,

X_{пр} - значение анализируемого показателя резистентности при приеме препарата,

X_э - в контрольной группе.

Этот подход обычно используется при оценке антигипоксической активности на основе прямых показаний (порог высоты, критический уровень концентрации кислорода, продолжительность жизни).

При использовании косвенных или вторичных показателей для оценки антигипоксической активности использовался Индекс защиты (ИЗ), показывающий, какая часть негативных изменений показателей, вызванных внешним воздействием, компенсируется применением данного препарата [94].

$$ИЗ = \frac{X_{пр} - X_{пл}}{X_{пл}}, \text{ где}$$

X - величина изменения показателя после воздействия относительно исходного уровня, индексы «пр» и «пл» обозначают группы с применением препарата или плацебо.

При изучении антигипоксической активности препаратов в случае высокой антигипоксической активности следует отметить увеличение высотного порога и увеличение доли высокорезистентных животных при снижении доли низкорезистентных. При умеренной антигипоксической активности среднегрупповые значения высотного порога могут либо умеренно увеличиваться, либо соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии могут незначительно изменяться.

В сравнительных исследованиях с использованием эталонных препаратов (этилена) антигипоксическую активность исследуемого соединения оценивают в «эталонных» единицах [94] по следующей формуле:

$$АА = \frac{X_{пр} - X_{пл}}{X_{э} - X_{пл}}, \text{ где}$$

АА – антигипоксическая активность в «эталонных» единицах,

X - показатель переносимости гипоксического теста (например, высотный порог, продолжительность жизни, эмбриональная смертность, уровень лактата и т.д.),

Xп - при приеме тестируемого препарата,

Xпр - при приеме плацебо,

Xэ - при приеме «эталонный» препарат в стандартной дозе.

Кроме того, можно определить коэффициент сравнительной эффективности (Ксэ):

$$Ксэ = \frac{X_{пр}}{X_{э}}, \text{ где}$$

Xпр – значение анализируемого показателя в условиях гипоксии при приеме препарата,

Xэ – при приеме эталонного препарата.

Тест по оценке переносимости мышами острой нормобарической гипоксии проводили в гипоксической камере «БИО-НОВА-204» (ООО «НТО Био-Нова», Россия). Принцип работы гипоксической камеры основан на том, что очищенный фильтром окружающий воздух из окружающий среды сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. На выходе из мембранного модуля получается воздух с пониженным содержанием кислорода. Из выходного отверстия газоразделительной установки газ поступает по шлангу в камеру (объемом 75 литров). Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС составляет не менее 5 л/мин.

Процентное содержание кислорода в ГГС, даваемом животным, устанавливалось и регулировалось с помощью газоанализатора, встроенного в установку. 40 мышей как контрольной, так и экспериментальной групп помещали в гипоксическую камеру. Для каждого животного был зафиксирован критический процент кислорода в ГГС, который привел к его гибели. В ходе предварительных исследований было установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4% [210].

У животных контрольной группы гибель животных наблюдалась в диапазоне концентрации кислорода в ГГС от 5,5% у животных, неустойчивых к гипоксии, до 3,4% у животных с индивидуально повышенными уровнями устойчивости к гипоксии (Рисунок 5). Среднее значение порогового (смертельно низкого) содержания кислорода у животных контрольной группы составило $4,21 \pm 0,18\%$.

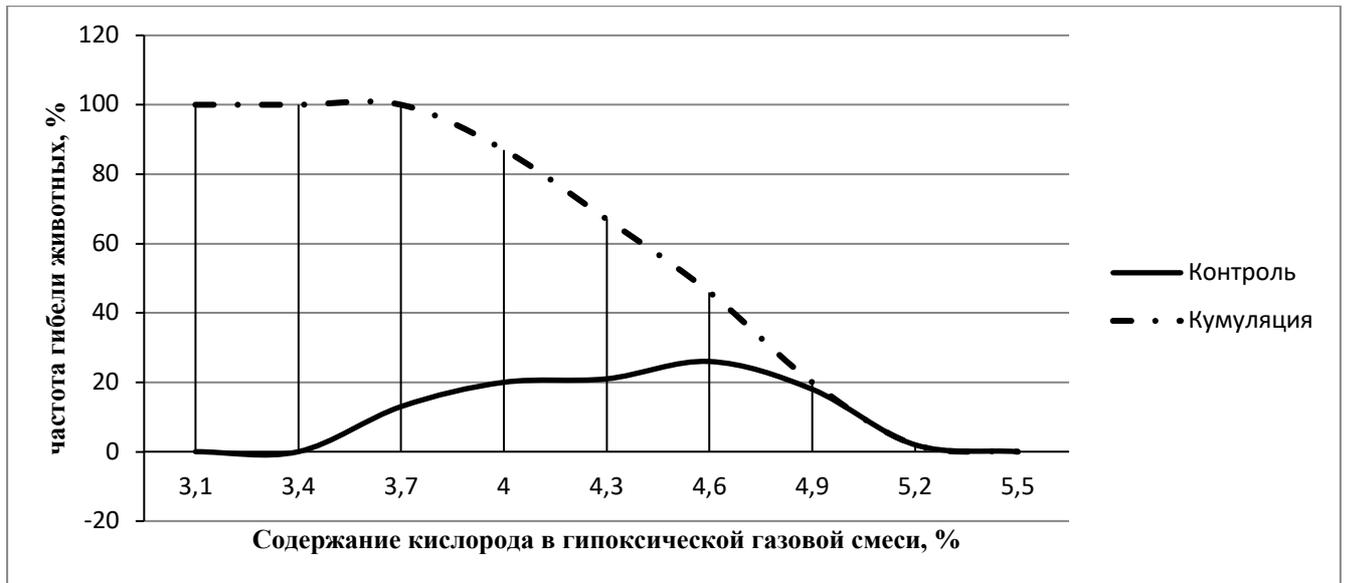


Рисунок 4 – Частотная кривая распределения смертности животных в зависимости от содержания кислорода в ГГС в контрольной группе.

Критерием переносимости воздействия является гибель животных (второй агональный вздох) при достижении пороговой для данного животного снижения процентного содержания кислорода в гипоксической газовой дыхательной смеси.

Для создания модели острой гемической гипоксии животным вводили внутрибрюшинно натрия нитрит (300 мг/кг), предварительно растворяемый в воде очищенной. Препараты вводили внутривентрикулярно однократно за 40 минут до начала экспериментов. Животные контрольной группы получали 0,9% физиологический раствор в эквивалентных количествах (Рисунок 5). Учитывали продолжительность жизни мышей в минутах.

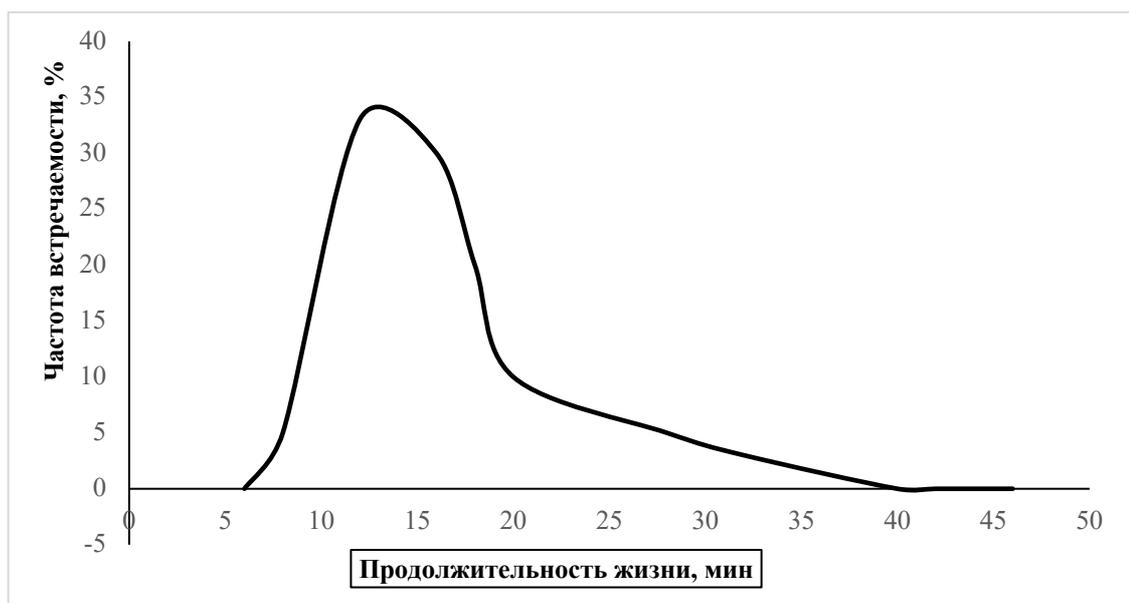


Рисунок 5 – Частотная кривая распределения продолжительности жизни животных при внутривентрикулярном введении натрия нитрита (300 мг/кг) в контрольной группе.

Острую гистотоксическую гипоксию вызывали путем внутрибрюшинного введения мышам 0,4% водного раствора нитропрусида натрия (20 мг/кг). Препараты вводили внутривенно один раз за 40 минут до начала эксперимента. Животные контрольной группы получали 0,9%-ный физиологический раствор в равных объемных количествах (Рисунок 6). Продолжительность жизни животных была зафиксирована после введения ингибитора тканевого дыхания.



Рисунок 6 – Частотная кривая распределения продолжительности жизни животных при внутрибрюшинном введении натрия нитропрусида (20 мг/кг).

Острая гипоксическая гипобарическая гипоксия выполнялась в гипоксической камере. Гипоксический эффект был создан путем подъема лабораторных животных в барокамере точного типа на «высоту» 11500 м со скоростью подъема 165 м/с. Индивидуальные показатели гипоксической устойчивости (время жизни, время сохранения и восстановления осанки) регистрировали во время пребывания животных на «высоте» с расчетом балльного комплексного показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии, характеризующегося нормальным статистическим распределением [94].

Объектами исследования были белые лабораторные крысы линии Вистар массой 200-220 г. В опытных группах животных содержалось по 5 особей обоего пола, в контрольной группе — по 15 особей обоего пола. Исследуемые препараты и препараты сравнения вводили животным после растворения их в воде для инъекций, внутривенно с помощью зонда, в объеме 0,2 мл за 1 час до начала исследования в барокамере. Контрольные животные получали равное по объему количество физиологического раствора. Исследуемые препараты вводили в дозе 25 мг/кг, препараты сравнения — в дозах, эквивалентных средним терапевтическим для человека

(пирацетам – 120 мг/кг, триметазидин – 0,5 мг/кг). Кривая частотного распределения интегрального показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии (ИУГ) показана на рисунке (Рисунок 7).

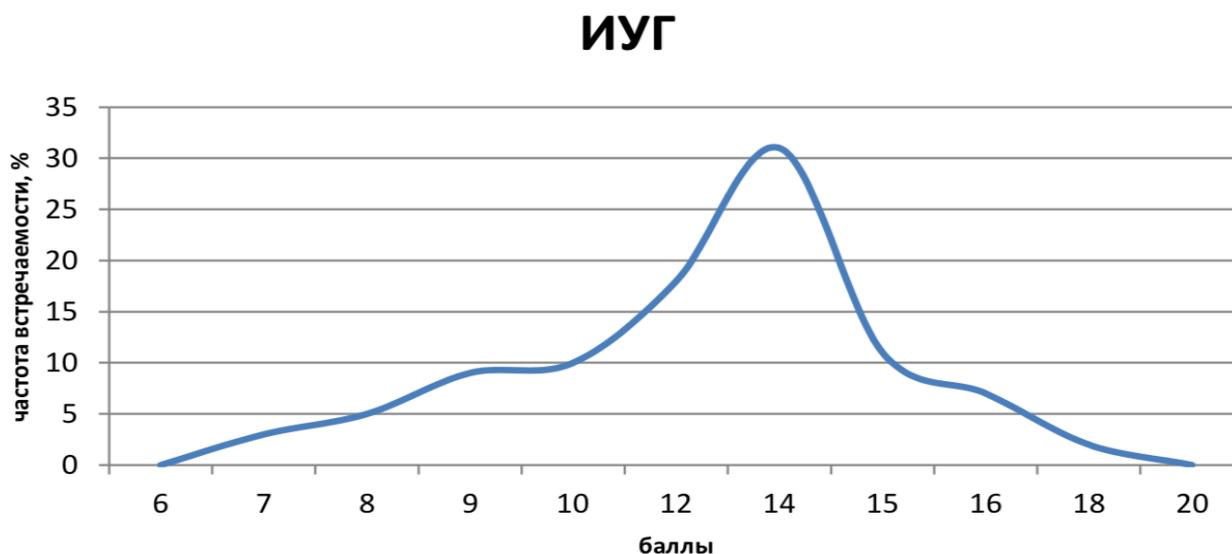


Рисунок 7. Частотное распределение значений индекса индивидуальной резистентности к гипоксии животных без применения фармакологической коррекции.

2.3. Методы моделирования ишемической патологии головного мозга

Моделирование ишемии головного мозга проводили на трех моделях: перманентной перевязки общих сонных артерий, перекрытия средней мозговой артерии (фокальная ишемия головного мозга, ОСМА) и контролируемого кортикального удара.

Моделирование глобальной ишемии мозга проводили (Модель перманентной перевязки общих сонных артерий) путем двусторонней перевязки левой и правой общих сонных артерий. Крыс анестезировали хлоралгидратом (350 мг/кг, Sigma, США). С помощью хирургического доступа были выделены общие сонные артерии, подложены под них полипропиленовые лигатуры и забинтованы. У ложно оперированных животных выполняли те же манипуляции, за исключением перевязки общих сонных артерий.

Препараты вводили внутривенно через 30 мин до после реперфузии. У ложнооперированных крыс выполняли те же манипуляции, за исключением перевязки общих сонных артерий. Животные контрольной и ложнооперированной групп получали 0,9% раствор NaCl в равных объемных количествах. Выживаемость животных оценивали в течение 21 дня.

Фокальная ишемия возникает при снижении или полном прекращении кровотока в одном из церебральных сосудистых бассейнов и ее моделирование позволяет исследовать локальные изменения мозга и пенумбру – зону вторичного повреждения вокруг ядра инфаркта с обратимой

жизнеспособностью [306, 390]. Наиболее распространенной моделью фокальной ишемии является окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА) ввиду её релевантности инсульту у человека. Как правило, этот прием ведет к ишемии внутренней капсулы, подкорковых ядер и неокортекса и воспроизводится в двух вариантах. При дистальном варианте после краниотомии проводится прямая окклюзия ОСМА или фотохимический ее тромбоз, а проксимальный вариант допускает непрямую окклюзию ОСМА через внутреннюю сонную артерию (ВСА) введением в просвет сосуда различных окклюдеров или эмболов [329].

В настоящем исследовании фокальную ишемию головного мозга моделировали с помощью интралюминальной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) по методике, описанной [343].

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (в/б, 370 мг/кг). На шее был сделан срединный разрез и выделены правая общая сонная артерия (ОСА), наружная сонная артерия (ВНСА) и внутренняя сонная артерия (ВСА). На ВСА наложили лигатуру, а на ОСА - микрососудистый зажим, после чего ВНСА была разрезана дистальнее наложения нити.

Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом, вводили через культю ВНСА в ВСА на глубину 19-20 мм (до вскрытия СМА) и фиксировали зажимом [329, 343].

Кровоток был перекрыт на 60 минут, после чего нить была удалена из сосуда, восстановив кровоснабжение в бассейне СМА.

После удаления нити культю наружной сонной артерии (ВНСА) закрывали путем коагуляции с помощью электрокаутетором до полной герметизации. На заключительном этапе операции срединный разрез шеи зашивали шелковыми нитями, обрабатывали 5%-ным раствором бриллиантовой зелени и животных помещали под инфракрасные лампы, подключенные к термореле, до тех пор, пока они не выйдут из состояния наркоза. Во время операции температуру тела животного поддерживали на уровне 37- 37,5°C с помощью коврика с подогревом. Среднее время операции составило 15 минут.

Так как в данной серии исследования моделировалась клинически значимая патология (постинсультное состояние), для оценки значимости выявленных эффектов ФДЭС в качестве препаратов сравнения были использованы стандартно применяемые в лечебной практике в постинсультной терапии ноотропный препарат цитофлавин в дозе 170 мг/кг. Животным в контрольной группе (без лечения) вводили эквивалентное количество физиологического раствора (плацебо). Исследуемое соединение ФДЭС, препараты сравнения или плацебо вводили животным внутрижелудочно зондом в первые сутки через один час после завершения операции по перевязке сонных артерий, в последующие сутки – каждый день послеоперационного периода в утренние часы на протяжении 20 дней. В день завершающего тестирования (21 сутки) для

выявления, собственно нейрореабилитационного эффекта введение препаратов не осуществлялось.

Черепно-мозговая травма была смоделирована путем нанесения удара по участку сенсомоторной коры головного мозга. Локализацию сенсомоторной зоны коры головного мозга определяли по атласу стереотаксических координат Паксиноса Г. и Уотсона С. [369, 370]. Чтобы создать травму, животных анестезировали внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над областью сенсомоторной коры головного мозга (Рисунок 8). Центр отверстия для трепанации находился на 3,0 мм роstralнее и на 2,0 мм медиальнее брегмы. После этого в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому ударяли с высоты 10 см грузом весом 50 г, скользящим по стальной трубке. Просверленную пластину вернули на место и зашили разрез кожи [343].

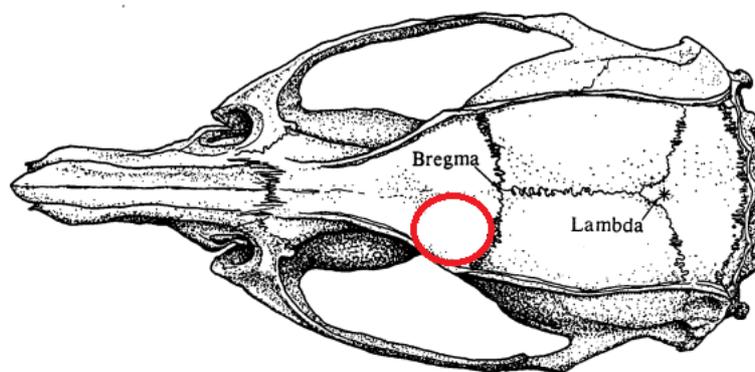


Рисунок 8. Область трепанации черепа над сенсомоторной зоной коры головного мозга [368].

Для определения объема поражения (Рисунок 9) при моделировании черепно-мозговой травмы у животных у крыс извлекали головной мозг и фиксировали в течение суток в 10%-ном забуференном формалине.



Рисунок 9. – Срезы головного мозга, окрашенного 2% раствором ТТХ. Красная область – интактная ткань, белая область – зона некроза.

Серийные срезы головного мозга с шагом 100 мкм выполняли на вибраторе (Camden Instruments Ltd, Великобритания). Каждый второй срез последовательно монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Германия) и окрашивали раствором крезилвиолета. Далее препараты обезвоживали в этиловом спирте, осветляли в ксилоле и помещали в канадский бальзам под покровные стекла. Полученные срезы были отсканированы с помощью сканера Samsung SCX-4833FD. Объем повреждения (м³) был определен с помощью программы анализа изображений ImageJ по формуле:

$V=2*0,1* \sum Sn$, где 2*0,1 - толщина двух срезов (мм); Sn, мм² - измеренная площадь повреждений в срезе; \sum - сумма площадей повреждений в срезах [324].

Все лекарства вводились через 1 час после травмы, а затем каждый день в одно и то же время в течение 21 дня. Все эксперименты проводились в соответствии с графиком (Таблица 4).

Таблица 4 – Расписание экспериментов

День травмы	1-й день	2-й день	3-й день	4-й–6-й день	7-й день	8-й-20-й день	21-й день
Утро: ЧМТ ↓ 1 час спустя травмы: введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «Цилиндр» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ «Сужающаяся дорожка» ↓ Забор биоматериалов

Примечание: «ОП» - открытое поле, «ПКЛ» - приподнятый крестообразный лабиринт

2.4. Метод моделирования амнезии, вызванной скополамином

Моделирование состояния амнезии проводили при исследовании воздействия препаратов на когнитивные функции крыс в тесте выработки условной реакции пассивного избегания (УРПИ). С этой целью, за 30 минут до тренировки животным внутрибрюшинно вводили гидробромид скополамина (Sigma, США) в дозе 1,5 мг/кг [260].

Эксперимент проводился с использованием установки PACS-30 (Columbus Instruments, США), состоящей из темного и светлого отсеков, соединенных дверью. В качестве раздражителя использовался ток в 1 мА, подаваемый один раз в течение 3 секунд.

Препараты вводили ежедневно внутривентрикулярно в течение 14 дней до введения скополамина. Животные контрольной и интактной групп получали 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентных количествах.

Выраженность антиамнестического действия исследуемых соединений оценивалась как индекс защиты (ИААД) по отношению к воздействию амнестической дозы скополамина.

Маркерным показателем был латентный период (ЛП) первого захода животного в темную камеру установки. Использовались среднегрупповые показатели.

$$\text{ИААД} = \frac{\text{ЛПп} - \text{ЛПс}}{\text{ЛПи} - \text{ЛПс}}, \text{ где}$$

ИААД - индекс антиамнестического действия исследуемого соединения,

ЛПп – латентный период в группе с введением соответствующего препарата в условиях экспериментальной амнезии,

ЛПс – латентный период в группе с экспериментальной скополаминовой амнезией,

ЛПи – значения в группе интактных животных.

В качестве препарата сравнения в этой серии исследований использовался эталонный ноотропный препарат пирацетам (доза 900 мг/кг). Исследуемые вещества (ФДЭС и пирацетам) вводились лабораторным животным внутривентрикулярно зондом через 1 после введения скополамина.

2.5. Модели *in vitro* по изучению механизма действия

Механизм действия ФДЭС был изучен на модели амилоидной токсичности. Для исследования использовали первичные культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа (с добавлением синтетических бета-амилоидов 1-42 (A β 42)) [344, 442]. Анализируется влияние препарата на морфологию дендритных шипиков и его способность защищать их от амилоидной токсичностей, оценивается способность тестируемого соединения восстанавливать внутриклеточный кальциевый сигналинг в условиях амилоидной токсичности.

Для исследования механизма действия новой фармакологически активной субстанции использовали 2 метода². Первый - анализ морфологии дендритных шипиков в первичной культуре гиппокампа в присутствии/отсутствии бета-амилоида (Ab) в программном обеспечении NeuronStudio [394].

²Выражаем искреннюю благодарность д.б.н. Попугаевой Е.А., Чернюк Д.П., (руководитель профессор Беспрозванный И.Б.) (Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого) за возможность использования данной исследовательской технологии.

Данный метод позволяет оценить нейропротекторные свойства исследуемого вещества, а именно способность препарата защищать постсинаптические дендритные шипики от амилоидной токсичности. В настоящем эксперименте первичную культуру гиппокампа на седьмой день культивирования трансфицировали плазмидой, экспрессирующей флуоресцентный белок TD-Tomato. На 12-13 день культивирования клетки обрабатывали синтетическим амилоидом Ab42 (#20276, AnaSpec (Fremont, USA) или оставляли необработанными (контроль).

На 4 сутки после этого влияние бета-амилоида на формирование грибовидных шипиков анализировали на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США) (DIV15-16). Всего было проведено 3 повторения эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано 30 ± 2 нейрона. Результаты были представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка от среднего значения. Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$. Положительным контролем служил специфический активатор каналов TRPC6 гиперфорин (HYP), который способен защищать грибовидные шипики от амилоидной токсичности, путем активации нДУВК [442].

Гиперфорин в концентрации 30 нМ и ФДЭС в концентрации 100 нМ добавляли в культуру клеток за 16 часов до фиксации (Thorlabs, США)].

С помощью второго метода было исследовано влияние ФДЭС на нДУВК, который поддерживает стабильность грибовидных шипов и снижающий закачку кальция из внеклеточного пространства внутрь клетки (I_{CRAC}) в присутствии синтетического амилоида Ab. Первичную культуру гиппокампа на седьмой день культивирования трансфицировали плазмидой, экспрессирующей генетически кодируемый кальциевый индикатор (GEC1) GCamp5.3. На 12-13-й день культивирования клетки обрабатывали синтетическим Ab42 или оставляли необработанными (контроль).

Способность исследуемых соединений активировать постсинаптический нДУВК анализировали на 15-16-й день культивирования. Влияние Ab на нДУВК оценивали по амплитуде кальциевого пика в условных единицах (у.е.). Время инкубации нейронов с исследуемыми соединениями составляло 30 минут при комнатной температуре в среде, не содержащей кальция, концентрация веществ (гиперфорина и PDE) составляла 300 нМ. Концентрация блокаторов кальциевых каналов, таких как D-AP5, Nifedipine, CNQX составляла 10, 50, 100 мкМ соответственно, ТТХ и тапсигаргина составляла 1 мкМ. По истечении времени инкубации, в бескальциевую среду добавляли 10 мМ Ca^{2+} .

Для изучения специфичности механизма действия ФДЭС при активации STIM2-nDUVK был использован метод выключения гена с помощью РНК-интерференции. Для этой цели культуру клеток гиппокампа мыши на 7-й день культивирования совместно трансфицировали

двумя плазмидами. Первая Плазмида кодировала генетически кодируемый кальциевый индикатор GCamp5.3. Вторая Плазмида несла ген, кодирующий небольшую интерферирующую РНК (siRNA), которая отключает экспрессию гена TRPC6, обеспечивающего нДУБК нейронов гиппокампа мыши. Визуализацию кальциевых ответов (кальциевый имиджинг) проводили на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США) на 15-16 день культивации клеток. Всего было проведено 3 повторения эксперимента. В каждой экспериментальной группе было изучено 30 ± 5 дендритных шипиков. Результаты были представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка от среднего значения. Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$. Положительным контролем в эксперименте был гиперфорин [396].

2.6. Методы компьютерной оценки биологической активности, включая прогноз вероятных фармакологических мишеней

В настоящее время достижения современной медицинской генетики, геномики и протеомики позволили осуществить переход от расшифровки молекулярных механизмов действия лекарственных средств к их конструированию на основе технологий компьютерной визуализации и вычислительных экспериментов по взаимодействию молекул-мишеней и молекул потенциальных лекарственных средств. Молекулярными мишенями в данном случае чаще всего являются такие макромолекулы, как белки (структурные белки, рецепторные белки, ферменты), полинуклеотидные комплексы (фрагменты ДНК, РНК), а также генные ансамбли, кодирующие синтез различных белков.

Компьютерная программа выполняет поиск в своей базе данных соединения, для которого известно аналогичное взаимодействие, и вычисляет вероятностные коэффициенты наличия или отсутствия эффектов, характерных для соединений-аналогов для исследуемого соединения. В результате формируется перечень возможных эффектов при лиганд-рецепторном взаимодействии молекулы-мишени и анализируемого вещества, на основании которого затем делается вывод о молекулярном механизме его действия. Такие вычислительные эксперименты могут быть основаны как на молекуле-мишени (тогда происходит поиск химической структуры, способной взаимодействовать с ней), так и на соединении (тогда происходит поиск молекулярной мишени, с которой может взаимодействовать исследуемое вещество) [236].

Компьютерная программа PASS [217, 382] позволяет использовать структурную формулу «лекарственно-подобного» органического соединения (молекулярная масса которого находится в диапазоне 50-1250 а.е.) для оценки вероятного профиля его биологической активности. Оценка основана на анализе взаимосвязи структуры и активности для обширного учебного отбора, который включает: субстанции лекарственных средств; «лекарственные кандидаты» на

различных стадиях клинических и доклинических исследований; фармакологические вещества и биохимические реагенты («chemical probes»); вещества, в отношении которых имеется конкретная информация о токсичности [217].

В программе PASS биологическая активность представлена качественным образом (активная/неактивная). Алгоритм построения моделей взаимосвязи структура-активность на основе субстанций обучающей выборки и прогнозирования активности для новых (не включенных в обучающую выборку) веществ основан на байесовских оценках. Средняя точность прогноза, рассчитанная методом скользящего контроля за исключением единицы для всех веществ обучающей выборки и всех видов биологической активности, представленных для этих веществ в обучающей выборке, составляет около 95%.

В качестве выходной информации пользователь получает список прогнозируемых видов деятельности с оценками вероятности наличия каждого вида деятельности P_a и вероятности отсутствия каждого вида деятельности P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы. Вероятности P_a и P_i также являются оценками вероятностей ошибок первого и второго рода соответственно. Их также можно рассматривать как показатели принадлежности прогнозируемого соединения к нечетким классам "активных" и "неактивных" веществ. Все эти интерпретации вероятностей P_a и P_i эквивалентны и полезны для анализа результатов прогноза. На их основе можно построить множество критериев для анализа результатов прогноза, соответствующих решению конкретных практических задач.

Вероятность P_a отражает, прежде всего, сходство структуры молекул этого вещества со структурами наиболее типичных молекул в соответствующем подмножестве "активных" веществ в обучающей выборке. Поэтому, как правило, прямой корреляции значений P_a с количественными характеристиками активности не наблюдается. Действительно, активное вещество, но имеющее нетипичную молекулярную структуру для обучающей выборки, может иметь низкое значение P_a в прогнозе.

Еще один важный аспект интерпретации результатов прогноза связан с новизной анализируемого соединения. Если мы ограничимся только видами активности, прогнозируемыми с наибольшими значениями P_a , то вещества, выбранные на основе прогноза, могут оказаться аналогами известных фармакологических веществ. Например, при $P_a > 0,7$ шансы обнаружить активность в эксперименте довольно высоки, но обнаруженные вещества могут оказаться близкими структурными аналогами известных лекарственных средств.

Версия программы PASS, используемая в работе (PASS 2014), предсказывает 7158 видов биологической активности, включая 480 терапевтических эффектов и 3818 механизмов действия со средней точностью около 95% (скользящий контроль за одним исключением).

Анализ взаимосвязей между эффектами, предсказанными программой PASS, и механизмами действия далее выполняется с помощью компьютерной программы Pharma Expert [117], который содержит данные о более чем о 10 тысячах установленных взаимосвязей между фармакотерапевтическими эффектами и механизмами действия. Если для анализируемого соединения одновременно прогнозируются как фармакотерапевтический эффект, так и связанные с ним механизмы действия, вероятность обнаружения этого фармакотерапевтического эффекта у данного соединения возрастает.

Была создана специальная версия программы для прогнозирования взаимодействия химических соединений с белками-мишенями человека PASS – PASS Targets, где база данных использовалась в качестве обучающей выборки ChEMBLdb 17 [335]. PASS Targets предсказывает взаимодействие с 1488 белками человека со средней точностью, рассчитанной методом скользящего к онтроля.

Докинг – это процесс «пристыковки» лиганда к лигандсвязывающему центру рецептора с целью нахождения как наиболее выгодных положений, так и ориентации лигандов, а также выявления факторов, изменение которых может привести к улучшению взаимодействия лиганд-рецептор. Поскольку для многих лигандов трудно определить пространственные структуры комплексов лиганд-рецептор различными физико-химическими методами, задача докинга состоит в том, чтобы предсказать связывание химических соединений с рецепторами, основываясь только на виртуальном эксперименте. Метод молекулярного докинга позволяет прогнозировать пространственную структуру комплекса рецептор-лиганд и свободную энергию его образования на основе данных о пространственной структуре рецептора, известных с разрешением в несколько ангстрем (например, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа) и химической структуры лиганда.

Компьютерная программа выполняет поиск в своей базе данных соединения, для которого известно аналогичное взаимодействие, и вычисляет вероятностные коэффициенты наличия или отсутствия эффектов, характерных для соединений-аналогов для исследуемого соединения. В результате формируется перечень возможных эффектов при лиганд-рецепторном взаимодействии молекулы-мишени и анализируемого вещества, на основании которого затем делается вывод о молекулярном механизме его действия.

Для целей виртуального фармакологического эксперимента используются следующие международные базы данных:

Chemical Structure Lookup Service (CSLS) [URL [<http://cactus.nci.nih.gov/cgi-bin/lookup/>]], которая содержит информацию о 74 млн структурных формул, содержащихся в более чем 100 различных информационных ресурсах (46 млн уникальных структур).

- Служба поиска химической структуры - **Chemical Structure Lookup Service (CALC)** [URL [[http://cactus.nci.nih.gov/cgi-bin/lookup /](http://cactus.nci.nih.gov/cgi-bin/lookup/)], который содержит информацию о 74 миллионах структурных формул, содержащихся в более чем 100 различных информационных ресурсах (46 миллионов уникальных структур).
- **PubChem** [URL [[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov /](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)]] при поддержке Национального центра биотехнологической информации (NCBI) это крупнейший общедоступный источник информации о структуре и свойствах химических соединений. В настоящее время PubChem содержит данные о 115 миллионах образцов химических соединений, 46 миллионах уникальных структур, 200 миллионах результатов тестирования биологической активности химических соединений. В базе данных PubChem можно осуществлять поиск не только идентичных структур органических соединений, но и структурных аналогов.
 - **Thomson Reuters Integrity** [URL [integrity.thomson-pharma.com]], содержат информацию о 380000 биологически активных соединениях и 2000 фармакологических мишенях. Возможен поиск по структурному сходству, которое оценивается на основе коэффициента Танимото. Коэффициент Танимото рассчитывается на основе «отпечатков пальцев» (fingerprints) для структуры, используемой в качестве запроса, для структур и всего, что содержится в базе данных integrity.

В работе Барановой Н.И. совместно с соавторами [16] была продемонстрирована эффективность совместного применения этих двух методов, что позволяет быстро экспериментально проверять результаты вычислительных экспериментов и корректировать проанализированные выборки из баз данных. В то же время значительно повышается эффективность информационного и молекулярного скрининга [17].

Прогноз возможных механизмов действия был произведён с использованием компьютерной программы PASS 2014 [218], при пороге $P_a > P_i$, где P_a - вероятность наличия, а P_i - вероятность отсутствия активности, указывает на возможное наличие различных видов биологической активности в анализируемом веществе. молекула.

Прогнозирование этих видов активности с высокой вероятностью осуществлялось с использованием программы PASS Targets 21 [259], обучающая выборка которой была составлена на основе информации, извлеченной из базы данных ChEMBL, версия 21 [319].

Значительное количество этих видов активности прогнозируется с низкой вероятностью и, кроме того, необходимо учитывать, что используемый в прогнозе набор структурных дескрипторов (2E) - 4-[2-(диэтиламино) этокси]-4-оксобут-2-еновая кислота не имеет высокой специфичности, что может привести к значительному количеству ложноположительных прогнозов.

2.7. Методы оценки функций

2.7.1. Методы оценки поведения животных

Оценку влияния новых ноотропов на поведение животных изучали в двух тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Тест «Открытое поле» (ОП) предназначен для оценки ориентировочно-исследовательского поведения и спонтанной активности грызунов, реализован на базе установки автоматической фиксации перемещений животного по специальной площадке (НПК Открытая Наука, Россия). Для этого каждое животное по одному помещали в центр поля и включали секундомер. Фиксировали количество пересечений, стоек, заглядываний в норки, дефекаций, уринаций и груминг в течение 3-х минут. По истечении этого времени проверяли реакцию на хлопок и захват, результат выражали в баллах. Оценивали общую двигательную активность (ОДА), которую определяли как сумму количества пересечений границ квадратов в периферической и в центральной частях площадки; поисково-исследовательская активность (PIA) определялась как сумма вертикальных перемещений и заглядываний; эмоциональную лабильность (ЭЛ) – как сумму дефекаций (Д) и уринаций (У); агрессивность (Аг) как сумму баллов за реакцию на хлопок и захват; груминг как показатель комфортности состояния животного [351].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) предназначен для исследования поведения грызунов в условиях стресса и позволяет оценить: уровень тревожности животного (в зависимости от предпочтения темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамики поведения «подглядывания»), симптомы неврологического дефицита, привыкания [432].

В тесте ПКЛ животное помещали на центральную площадку и включали секундомер. Длительность эксперимента составила 3 минуты. В течение эксперимента фиксировали время нахождения в открытом (ВНОР) и закрытом рукавах (ВНЗР), время нахождения на центральной площадке (ВНЦП), латентный период первого захода в открытый рукав (ЛППЗОР), количество заходов в открытый (КЗОР) и закрытый рукава (КЗЗР), количество стоек (КС), количество выглядываний из рукавов (КВР), дефекацию (Д) и уринацию (У). Эмоциональную лабильность рассчитывали, как сумму Д и У, ориентировочную активность как сумму КС, КВР, КЗОР, КЗЗР [432].

Время, проведенное животным в центральном и боковых отсеках лабиринта, отражает уровень двигательной активности животного, а также характеризует интенсивность их исследования новой среды и может быть использовано для оценки стимулирующего или седативного действия веществ.

О состоянии тревожности у животных судили по времени нахождения в закрытом рукаве, латентному периоду первого захода в открытый рукав, количеству заходов в открытый и закрытый рукава, а также по количеству дефекаций и уринаций, наличию конфликта мотиваций – по времени нахождения на центральной площадке.

2.7.2. Методы оценки когнитивных функций животных

Для оценки когнитивных функций у грызунов используются тесты на выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), экстрополяцию избегания и прохождение Т-образного лабиринта.

В тесте УРПИ проводили обучение животных с использованием двухкамерной установки PACS-30 (Columbus Instruments, США), состоящей из затемненного и освещенного отсеков, соединенных дверцей. Использовался ток силой 1 мА, который предъявлялся в течение 3-х секунд однократно. Эксперимент состоял из 3-х этапов:

1) Отбор животных. Крысу поместили в светлое отделение (хвостом к дверце). Для эксперимента были отобраны животные с наличием норкового рефлекса.

2) Обучение. Из-за своих биологических особенностей (врожденное предпочтение грызунами темных участков пространства) крыса предпочитала находиться в темной комнате. Во время перехода в темное отделение животное получило болезненное кожное раздражение электрическим током через дно электрода. За 30 минут до тренировки животным внутривенно вводили гидробромид скополамина (Sigma, США) в дозе 1,5 мг/кг.

3) Воспроизведение. Через 2 часа и 24 часа после тренировки крысу помещали в светлое отделение. В течение 2 минут регистрировали количество обученных крыс (которые не входили в темную камеру в течение 2 минут через 2 и 24 часа после тренировки), время нахождения животных в темной и светлой камерах через 2 и 24 часа после тренировки [47].

В тесте ««Экстрополяционное избегание»» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) крысу, взятую правой рукой полным хватом за плечевой пояс и шею, аккуратно помещали в воду, опустив ее внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Регистрировали латентный период начала движений после посадки в установку, латентный период подныривания. Время тестирования составляло не более 2-х минут [33].

Чтобы оценить влияние фармакологических средств на когнитивные функции животных, исследуемые препараты вводили внутривенно ежедневно в течение 14 дней после первой тренировки. Животные контрольной группы получали изотонический раствор хлорида натрия в равных объемных количествах. В качестве препарата сравнения в этой серии исследований использовали эталонный ноотропный препарат пирацетам в разовой дозе 900 мг/кг

внутрижелудочно. ФДЭС и пирацетам вводились по стандартной схеме с помощью зонда один раз в день в утренние часы до кормления животных на протяжении 14 дней. В сформированных в данном исследовании экспериментальных группах было по 10 животных.

Для проведения теста «Т-лабиринт» животных помещали в специализированную установку (НПК Открытая Наука, Россия), где в конце обоих рукавов находилось вознаграждение в виде корма. Животному дали время выбрать рукав и съесть корм. Выбранный рукав впоследствии был обозначен как «неправильный» и закрыт арматурой на время тренировки. В последующие 5 дней проходило обучение животных, в ходе которого каждый день, в серии из 10 попыток, животное могло пройти в «правильный» рукав, где находилась награда. Тесты на оценку памяти проводились на 1-й, 5-й и 10-й день после окончания учебы. Количество заходов в «правильные» и «неправильные» рукава было зафиксировано в серии из 10 попыток. Критерием оценки способности к обучению было выполнение более 8 посещений правильного рукава [284]. Препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 5 дней во время тренировок в Т-образном лабиринте, затем введение препаратов прекратили. Животные контрольной группы получали изотонический раствор хлорида натрия в равных объемных количествах.

Установка «Лабиринт Барнс» (НПК Открытая наука, Москва, Россия) состоит из круглой платформы с 20 одинаково удаленными от центра лунками, относительно центра все лунки выглядят идентично. В лабиринте животные приучались покидать открытую поверхность установки, прячась в лунку, под которой находится маленькая темная камера, так называемая «target box». Вокруг лабиринта были подготовлены и расставлены визуальные указатели. Они не сдвигались в течение всего эксперимента, так как служили животным ориентирами для поиска «target box». В качестве подкрепления использовался свет [364].

Для обучения крысу помещали в черную стартовую коробку в центр установки. Спустя 10 секунд коробку поднимали и позволяли крысе исследовать лабиринт в течение 3 минут. За эти 3 минуты подсчитывали количество ошибок и латентное время нахождения «target box». Животным предоставлялось 4 попытки в день, так же подсчитывался процент удачных попыток, среднее время достижения «target box», среднее количество допущенных ошибок. Тестирование заканчивалось, когда животное достигало нужной лунки или по истечению 3 минут [363].

На 5 день тестирование проводилось через фиксированных 90 минут с целью оценить кратковременную память. Подсчитывалось количество ошибок и латентное время нахождения «target box» [363].

Для оценки долгосрочной пространственной памяти тестирование осуществляется на 12 день. Между 5 и 12 днями не было никаких тренировок [363].

Схема эксперимента оценки когнитивных функций на фоне перекрытия средней мозговой артерии представлена на рисунке (Рисунок 10).



Рисунок 10. Схема эксперимента

2.7.3. Методы оценки координации животных и нарушений моторных функций

Оценку моторной дисфункции проводят с помощью тестов «цилиндр» [303], «сужающаяся дорожка» [281], «стимулирование конечностей» [286], координацию движений и формирование утомления - на аппаратно-программном комплексе «Ротарод+» [331]. Тесты позволяют оценить функцию передних и задних конечностей, а также координацию и мелкую моторику животных [194].

В тесте «Цилиндр» оценивалась асимметрия использования животным передних конечностей при исследовании стенок цилиндра. Для тестирования крысу помещали в цилиндр и проводили видеозапись движений животного в течение 8-10 минут. Видеозапись

просматривалась в покадровом режиме с подсчетом количества самостоятельного использования боковых и контралатеральных к месту повреждения конечностей во время осмотра стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременного (совместного) использования обеих лап. Данные были представлены в виде процента использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов по формуле:

$$100 * \frac{\text{контр} + 0,5\text{одновр}}{\text{инпси} + \text{контр} + \text{одновр}}, \text{ где контр – контралатеральная к месту повреждения конечность,}$$

одновр – одновременное использование передних конечностей, инпси – ипсилатеральная к месту повреждения конечность.

Тест «Сужающаяся дорожка» использовался для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей. Установка состоит из двух сужающихся дорожек длиной 165 см, расположенных друг под другом, причем нижняя имеет бортики для расположения конечностей животного при соскальзывании с верхней доски. В конце установки находится черный ящик, который является конечной целью перемещения животного. Начальная точка освещается ярким светом, побуждающим крыс добежать до конца доски в черном ящике. Перед моделированием черепно-мозговой травмы животных обучали пересекать «сужающийся дорожку» в течение 3 дней. Во время тестирования движения крыс записывались на видеокамеру. В покадровом режиме просмотра видео количество положений конечностей на нижней доске (ошибок), количество проскальзываний с верхней доски на нижнюю, а также общее количество шагов подсчитывались отдельно для каждой конечности. Данные, полученные с трех попыток, были усреднены, степень выраженности сенсомоторной недостаточности рассчитана по формуле в процентах:

$$100 * \frac{\text{ошибки} + 0,5\text{соскальзывания}}{\text{общее количество шагов}}$$

Тест «Стимуляция конечности» также известен как «Постановка конечности на опору», или в англоязычной литературе «Limb placing test» предназначен для оценки сенсомоторной недостаточности после травматического, ишемического или другого повреждения ткани головного мозга. Тест состоял в оценке реакции конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. В ходе тестирования состояние двигательной функции передних и задних лап оценивалось в 7 различных тестах, результаты были выражены в сумме баллов. Для оценки нарушений в конечностях использовалась следующая система начисления баллов: 2 балла – крыса выполнила тест полностью; 1 балл – крыса выполнила тест с задержкой более 2 секунд и/или не полностью; 0 баллов – крыса не реагировала на стимуляцию конечностей. Максимально возможное общее количество баллов составило 14. Тестирование сенсомоторной недостаточности проводили на 1-й, 3-й и 7-й дни после нанесения животному черепно-мозговой травмы.

Для определения степени неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений, крыс помещали в аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (АПК - «Ротарод», ООО «Нейроботикс», Россия) с постепенно увеличивающейся скоростью вращения стержня от 4 до 30 об/мин в течение 5 минут. Регистрировалось время удержания на вращающемся стержне.

2.7.4. Методы оценки актопротекторной активности животных

Физическую работоспособность лабораторных животных оценивали в тесте «вынужденное плавание» [95].

Исследование проводилось в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длиной 80 см, заполненный водой до половины. Внутри него находился внутренний конус из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длиной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15x15 см каждый). Установка была заполнена до половины десатурированной водой при температуре 22-24°C. Десатурацию воды осуществляли путем предварительного отстаивания воды в течение суток. Во время испытания животных попеременно помещали в соответствующее отделение бассейна и немедленно включали секундомер. Критерием окончания теста было погружение животного носом под воду с безуспешной попыткой всплыть более чем на три секунды, после чего его извлекали из бассейна, высушивали мягкой тканью и помещали в типовую клетку.

Объекты исследования – белые нелинейные лабораторные мыши массой 20-22 г. Метод оценки – вынужденное плавание животных с грузом 5% от массы тела в десатурированной воде термокомфортной температуры (24-26 °C). Оцениваемый показатель – время активного плавания (мин). Груз в виде свинцовой пластинки заданной массы крепился к специальному жилету, зафиксированному над животным, без повреждения его кожных покровов. Изучаемые препараты вводили внутривентрикулярно с помощью зонда объемом 0,2 мл за 45 минут до начала нагрузки. Контрольной группе животных вводили равное по объему количество физиологического раствора.

Поскольку диапазон рабочих доз для исследуемых соединений был неизвестен, в этой серии исследований были изучены 4 дозы препарата – 10, 25, 50 и 75 мг/кг. Рандомизация животных на группы осуществлялась случайной выборкой, в контрольную группу животных вошли 20 животных, в каждую экспериментальную группу – по 10 животных. Для каждой дозы каждого соединения формировалась отдельная экспериментальная группа. Полученные результаты сопоставлялись не только с контрольной группой животных, но и препаратом

сравнения – промышленно выпускаемым ноотропным средством аминокетанольного ряда деанола ацетилглутаматом (Нооклерил).

2.8. Методы предварительной оценки безопасности исследуемого соединения

2.8.1. Методы оценки острой токсичности

Определение острой токсичности тестируемого средства проводили при разных путях введения:

1. При пероральном приеме вещества проводятся тесты для оценки острой токсичности и определения класса токсичности в соответствии с ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний воздействия химических продуктов на организм человека. Основные требования к проведению тестов для оценки острой токсичности при внутрижелудочном приеме методом фиксированных доз» и ГОСТ 32644-2014 «Методы испытаний воздействия химических продуктов на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности»;
2. При парентеральном введении испытания по оценке острой токсичности проведено табличным методом [145], определение класса токсичности – по Hodge и Sterner [318].
3. Количество животных, использованных в исследовании, достаточно для получения статистически достоверных результатов [183]. Общее количество подопытных крыс – 12 самцов, 12 самок, мышей – 32 самца, 32 самки.

Исследуемое вещество вводили однократно внутривенно/внутрижелудочно/подкожно. Количество групп определяется как достаточное для расчета токсической дозы и/или значения LD50. Общая продолжительность наблюдения за животными составила 14 дней. В ходе исследования было зафиксировано следующее:

- 1) Гибель животных – ежедневно с начала и до конца периода наблюдения (14 дней).
- 2) Общее состояние и поведение, тип токсических проявлений, их появление, развитие и/или прекращение их проявлений - ежедневно в течение 14-дневного периода наблюдения.
- 3) Степень выраженности токсических проявлений (при их наличии) - ежедневно на протяжении 14 дневного периода наблюдения.
- 4) Вес животных – в период проведения карантина и в ходе наблюдения не менее 1 раз в неделю.
- 5) Потребление пищи и воды - в период проведения карантина и в ходе наблюдения не менее 1 раз в неделю.

б) Влияние максимально вводимых доз на параметры периферической крови, биохимические показатели и параметры гемостаза.

7) Макроскопическое исследование внутренних органов и тканей – проводилось у каждого погибшего в ходе наблюдения или эвтаназированного животного по окончании периода наблюдения.

В случае невозможности вычислить полулетальные дозы (LD_{50}) вещества использован метод пробит-анализа Литчфильда-Уилкоксона [18]. В качестве тест-системы для исследования использовали лабораторных беспородных мышей, самцов и самок. Согласно экспресс-методу Прозоровского, ФС вводили внутривенно и подкожно при тестировании 4 смежных доз облучения в течение 4 наблюдений. Определение дозы и ее погрешностей осуществлялось в соответствии с таблицами и не требовало расчетов. Было сформировано 16 групп животных, по 4 особи в каждой группе. Всего 64 животных – 32 самки и 32 самца (Таблицы 5, 6). Исследуемое вещество вводили в широком диапазоне доз с логарифмическим шагом 0,1.

Таблица 5 – Схема эксперимента по определению LD_{50} у лабораторных мышей при внутривенном введении экспресс-методом Прозоровского с использованием 4 смежных доз по 4 наблюдения в каждой группе

Номер группы	Количество животных	Доза мг/кг	Пол	Концентрация, мг/мл	Объем введения вещества на животное массой 20 г
1	4	1260	самцы	25,2	0,5 мл
2	4	1580	самцы	31,6	
3	4	2000	самцы	40,0	
4	4	2500	самцы	50,0	
5	4	1260	самки	25,2	
6	4	1580	самки	31,6	
7	4	2000	самки	40,0	
8	4	2500	самки	50,0	

Таблица 6 – Схема эксперимента по определению LD_{50} на лабораторных мышах при подкожном введении экспресс методом Прозоровского при использовании 4 соседних доз по 4 наблюдения в каждой группе

№ группы	Количество животных	Доза мг/кг	Пол	Концентрация, мг/мл	Объем введения вещества на животное массой 20 г
1	4	1580	самцы	31,6	0,5 мл
2	4	2000	самцы	40,0	
3	4	2500	самцы	50,0	
4	4	3160	самцы	63,2	
5	4	1580	самки	31,6	
6	4	2000	самки	40,0	
7	4	2500	самки	50,0	
8	4	3160	самки	63,2	

б) исследование острой токсичности на крысах

Лабораторные беспородные самцы и самки крыс использовались в качестве тест-системы для определения класса токсичности. Согласно методологии ОЭСР, Тест № 423 «Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности» (Тест № 423 «Острая пероральная токсичность - Метод класса острой токсичности»), вещество вводили внутрижелудочно каждой группе экспериментальных животных в одной из указанных доз. Вещество тестировали с использованием пошаговой процедуры, используя на каждом этапе трех животных одного пола. В качестве начальной дозы использовали дозу 300 мг/кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляет 14 дней. В течение этого периода еженедельно регистрировали массу тела и признаки острой интоксикации у животных. В течение первых суток животные находились под непрерывным наблюдением. На 15-й день после введения ФДЭС подопытных животных подвергали эвтаназии с целью регистрации признаков интоксикации внутренних органов.

Тестируемый ФДЭС вводили в организм экспериментальных животных однократно, внутрижелудочно с помощью шприца с питающей иглой (22 г, диаметр шарика 1,25 мм - крысы, Braintree scientific, INC). Объем внутрижелудочного введения на одно животное рассчитывали исходя из соотношения 1 мл на 100 г массы животного.

Перед введением дозы, животные оставались голодными в течение 12 часов. В день введения утром их взвесили.

При исследовании острой токсичности использовался широкий диапазон доз вещества до 2000 мг/кг. Максимальная испытанная доза была предельной для других способов введения в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств.

Согласно методике ОЭСР, тест № 423 проводился на трех животных на каждом этапе (таблица 7). Доза, использованная в качестве начальной, составляла 300 мг/кг массы тела. Первым трем животным вводили тестовую дозу 300 мг/кг. В течение 24 часов после введения все животные выжили, поэтому ту же дозу повторно ввели еще трем животным. На данном этапе никто не умер. Дозу увеличили до 2000 мг/кг и ввели трем животным, ни одно из которых не умерло. При повторном введении этой дозы трем крысам смерти животных не произошло. Это наблюдалось у крыс обоих полов. Ход исследования и методы исследования общетоксических свойств ФДЭС в хроническом эксперименте проводились в объеме, регламентированном Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [145] и ГОСТ Р 56697-2015 «Методы исследования воздействия химических продуктов на организм человека». Схема эксперимента по изучению острой токсичности у лабораторных крыс представлена в таблице 7.

В качестве тест-системы для исследования использовались лабораторные беспородные самцы и самки крыс.

Таблица 7 – Схема эксперимента по изучению острой токсичности у лабораторных крыс по методике ОЭСР Тест № 423 "Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности"

№ группы	Пол	n	Вещество	Доза (мг/кг)	Объем введения (мл/100 г веса животного)	День некропсии
1	m*	3	Испытуемая ФС	300	1,0 мл	На 15 день после введения ФС
2	f**	3				
3	m	3		300	1,0 мл	
4	f	3				
5	m	3		2000	1,0 мл	
6	f	3				
7	m	3		2000	1,0 мл	
8	f	3				

* m – самцы; ** f – самки.

Вещество тестировалось с помощью поэтапной процедуры, с использованием на каждом этапе трех животных одного пола. В качестве начальной дозы использовали дозу 300 мг/кг массы тела.

Исследуемая фармацевтическая субстанция вводилась в организм подопытных животных однократно, внутривентрикулярно при помощи шприца с иглой для кормления (22G, диаметр шара 1,25 мм – крысы). Объем внутривентрикулярного введения на одно животное был рассчитан исходя из соотношения 1 мл на 100 г веса животного. До введения дозы животные оставались голодными в течение 12 часов. В день введения утром они были взвешены.

При исследовании острой токсичности использовался широкий диапазон доз вещества до 2000 мг/кг (Таблица 8). Максимально тестируемая доза являлась предельной при других путях введения, согласно руководству по доклиническому изучению лекарственных средств.

Таблица 8 – Схема эксперимента изучения острой токсичности на лабораторных крысах по методу ОЭСР Тест № 423 «Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности»

Группа №	Пол	n	Доза (мг/кг)
1	самцы	3	300
2	самки	3	
3	самцы	3	300
4	самки	3	
5	самцы	3	2000
6	самки	3	
7	самцы	3	2000
8	самки	3	

Продолжительность эксперимента – 14 дней. На протяжении этого периода регистрировались еженедельно масса тела и признаки острой интоксикации у животных. Первые сутки животные находились под непрерывным наблюдением. На 15 день после введения соединения была осуществлена эвтаназия опытных животных с целью регистрации признаков интоксикации внутренних органов. На лабораторных весах BM24001 взвешивали внутренние органы (тимус, сердце, поджелудочную железу, печень, селезенку, лёгкие, почки, надпочечники, семенники и простату (яичники)) и рассчитывали их среднюю абсолютную ($M \pm m$) и относительную массы (O_m) органов.

2.8.2. Методы оценки хронической токсичности на крысах

ФДЭС вводили животным ежедневно (1 раз в день в течение 180 дней) в первой половине дня внутривентрикулярно в виде растворов. Выбранный путь введения аналогичен пути введения человеку. Продолжительность курса введения таблеток испытуемого объекта в организм экспериментальных животных, в рамках планируемого эксперимента, была рассчитана на основании рекомендаций «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств», в части, касающейся изучения оригинальных лекарственных средств [145]. Контрольным группам животных аналогичным образом вводили контрольное вещество – очищенную воду.

Внутрижелудочное введение экспериментальным животным осуществляли с помощью шприца с питающей иглой (22 г, диаметр шарика 1,25 мм; Braintree scientific, INC.). Объем внутрижелудочного введения на животное составлял 1 мл на 100 г массы животного, согласно общепринятым рекомендациям [145].

В исследовании использовались три дозы тестируемого ФС: терапевтическая доза для данного типа экспериментальных животных (5 мг/кг); превышение терапевтической дозы в 5 раз (25 мг/кг); и превышение терапевтической дозы в 10 раз (50 мг/кг). Приготовление доз для внутрижелудочного введения осуществляли в день введения.

Было сформировано 8 групп животных, по 10 особей в каждой группе. Всего здесь 80 животных – 40 самок и 40 самцов. Первые 4 группы составляли самцы, из которых 2,3,4 группы получали раствор тестируемых таблеток в изученных дозах, 1-я группа была контрольной группой, в которой животные получали контрольное вещество - очищенную воду.

Следующие 4 группы были сформированы из особей женского пола и распределены аналогичным образом – 6,7 и 8-я группы получали раствор тестируемых таблеток в изученных

дозах, 5-я группа – контрольная группа, в которой животные получали контрольное вещество (Таблица 9).

На протяжении всего исследования масса тела регистрировалась еженедельно в течение первого месяца и один раз в 2 недели после этого, а клиническое обследование животных проводилось на открытой местности. На 31-й, 91-й, 181-й день после первого введения препарата брали кровь для гематологического, биохимического анализа; первоначально, на 29-й, 89-й и 179-й день введения препарата, проводилась оценка состояния центральной нервной системы, а на 30-й, 90-й и 180-й день введения препарата - сбор и анализ мочи и регистрация ЭКГ.

Таблица 9 – Экспериментальная схема изучения хронической токсичности таблеток на основе ФДЭС при ежедневном (1 раз в сутки в течение 180 дней) внутрижелудочном введении лабораторным крысам, самцам и самкам

№ группы	Пол	Кол-во в группе, n	Вещество	Доза по ДВ (мг/кг)	КДВ (мг/мл)	ОВ (мл/200 г)	Некропсия	
							181-й день	195-й день
1	самцы	10	КВ	-	-	2,0	5	5
2	самцы	10	ИФС	50	5,0	2,0	5	5
3	самцы	10		25	2,5	2,0	5	5
4	самцы	10		5	0,5	2,0	5	5
5	самки	10	КВ	-	-	2,0	5	5
6	самки	10	ИФС	50	5,0	2,0	5	5
7	самки	10		25	2,5	2,0	5	5
8	самки	10		5	0,5	2,0	5	5

Примечание: ДВ – действующее вещество, КВ – контрольное вещество, ИФС – испытуемая фармацевтическая субстанция, КДВ – концентрация ДВ, ОВ – объем введения

На 181 день после первого введения препарата половина животных из каждой группы была подвергнута эвтаназии с последующим вскрытием. Органы были взвешены и зафиксированы в формалине для гистологического исследования.

Оставшиеся животные в группах были сохранены на период восстановления (14 дней) для выявления отсроченных эффектов лекарственного препарата и выяснения обратимости токсических эффектов.

После окончания восстановительного периода (на 193-й, 194-й и 195-й день после первого введения препарата) у них забрали кровь для гематологического, биохимического анализа и исследования параметров гемостаза, а также провели сбор и анализ мочи, снятие ЭКГ и исследование ЦНС. После этого выполнили процедуру эвтаназии животных и некропсию с целью регистрации признаков интоксикации внутренних органов.

2.9. Методы оценки фармакокинетики

Изучение параметров фармакокинетики (ФК) – кинетики всасывания, распределения и элиминации фармакологических средств в организме является важной составной частью доклинических исследований лекарственных средств. Определение фармакокинетических параметров субстанции ФДЭС проводили в два этапа в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [145].

Изучение фармакокинетических параметров в крови крыс осуществляли при двух путях введения (внутривенно и при пути введения, предполагающегося для клинического применения, т. е. перорально). Исследование проводили на трех уровнях доз при внутрижелудочном (пероральном) пути введения как основном пути введения, предполагающемся для клинического использования и одном уровне дозы для внутривенного введения. Исследование трех уровней доз при внутрижелудочном (пероральном) введении необходимо для проверки гипотезы линейности фармакокинетики у данного вида животных. Конкретные дозы для фармакокинетического исследования были определены на основании результатов изучения специфической активности.

Изучение экскреции крысами проводили для каждого пути введения на одном уровне дозы, эквивалентном полученной терапевтической дозе в пересчете на крыс либо в наиболее удобной для введения дозе, пропорционально превышающей терапевтическую. Схема эксперимента по изучению параметров фармакокинетики представлена в таблице (Таблица 10).

Таблица 10 – Схема эксперимента по изучению параметров фармакокинетики на крысах

Путь введения	Внутривенный	Внутрижелудочный (пероральный)		
Доза*, мг/кг	5 мг/кг	мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг
Количество животных	6	6	6	6
Пол животных	самцы	самцы	самцы	самцы
Тип исследуемого биологического материала	кровь, моча	кровь, моча	кровь	кровь
Количество временных точек отбора крови	не менее 9	не менее 9	не менее 9	не менее 9
Количество временных точек отбора проб мочи	не менее 5	не менее 5	-	-

Примечания: * - уровни доз будут определяться на основании результатов исследования специфической активности

Отбор образцов биосред

Каждое животное использовалось для получения проб крови на двух временных точках. Отбор проб крови у крыс осуществлялся из подъязычной вены после прокола стерильной иглой в объеме 1 мл в соответствии с графиком пробоотбора. Для сбора образцов крови использовались пробирки MiniCollect с лития гепарином (GBO, Австрия). Сразу после взятия проб образцы крови центрифугировали. Для увеличения объема плазмы и более полного удаления форменных элементов крови центрифугирование проводили в два этапа. Режим центрифугирования на

первой стадии: скорость – 1000 об/мин, время – 5 минут, T – +15 С. Режим центрифугирования на второй стадии: 3000 об/мин, время – 10 минут, T – +15 С. После центрифугирования плазма отбиралась механическим дозатором в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл и замораживают при T -40 С. Срок годности образцов плазмы в замороженном состоянии составлял не более 14 дней.

Сбор образцов мочи крыс проводился с использованием индивидуальных метаболических клеток в соответствии с графиком пробоотбора. Замерялся объем экскрета. Количество мочи, достаточное для дальнейшего анализа содержания вещества (не менее 1 мл) переносили в пробирку типа эппендорф объемом 2 мл и немедленно замораживали. Срок хранения образцов мочи в замороженном состоянии составлял не более 14 суток.

Подготовка образцов для хроматографического анализа

Образцы плазмы крови размораживали в термостате при температуре +37 С. После размораживания каждый образец плазмы крови объемом 0,5 мл переносили в пробирку из боросиликатного стекла, к плазме порциями добавляли ацетонитрил (по 100-200 мл каждый) для осаждения белков до конечного объема 3 мл при постоянном встряхивании. Затем пробирки центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 8000 об/мин при температуре +15 С. Жидкость под давлением из каждого образца количественно переносили в мерную колбу объемом 5 мл и доводили до метки ацетонитрилом, после чего экстракт переливали в пластиковую пробирку с плотно завинчивающейся крышкой. Полученные экстракты фильтровали, отфильтрованную фракцию помещали в хроматографический флакон и анализировали на жидкостном хроматографе. Разведение ацетонитрильного экстракта учитывали при окончательном расчете концентрации вещества в плазме.

Образцы мочи размораживали в термостате при температуре +37 С. После размораживания каждую пробу в объеме 0,5 мл переносили в пробирку из боросиликатного стекла, порциями добавляли ацетонитрил (по 100-200 мл каждая) для осаждения белков до конечного объема 3 мл при постоянном встряхивании. Затем пробирки центрифугировали в течение 15 минут при скорости 8000 об/мин при температуре +1 С. Жидкость-наполнитель из каждого образца количественно переносили в мерную колбу объемом 5 мл и наносили на этикетку ацетонитрилом, после чего экстракт переливали в пластиковую этикетку с плотно завинчивающейся крышкой. Полученные экстракты фильтровали, отфильтрованную фракцию помещали в хроматографический флакон и анализировали на жидкостном хроматографе.

Разведение ацетонитрильного экстракта учитывали при окончательном расчете концентрации вещества в моче.

Количественное определение вещества в биологических жидкостях

Для количественного определения препарата ФДЭС в биологических жидкостях (плазме крови и моче) использована система высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на основе жидкостного хроматографа модели Agilent 1200 «Agilent Technologies», с насосом, встроенным дегазатором, оборудованным системой автоматического ввода пробы с масс-селективным детектором (МС) Agilent 6410B Triple Quadrupole LC/MS с электрораспылительной ионизацией, хроматографической колонкой: ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 50 mm (Agilent Technologies) с программным обеспечением для сбора и обработки данных MassHunter Agilent Technologies.

*Подготовка к аналитическим исследованиям*Реагенты и материалы:

- • Ацетонитрил для ВЭЖХ производства Lab-Scan, кат. Номер C02C11X, Польша.
- • Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.
- • *Азот газообразный, о.с.ч, класс А, ТУ 51-940-80.
- • Гидрокарбонат калия, ч, ГОСТ 4220-75.
- • Концентрированная серная кислота ($\rho = 1,84$ кг/л), Н.Н., ГОСТ 4204. Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, производства компании «Pangeac», кат. № 221881.1611, США.
- Муравьиная кислота, производства компании «Sigma», кат. № 251364, США.
- Субстанция препарата ФДЭС, стандартный образец предприятия с массовой долей основного вещества не менее 95,0%.

Приготовление подвижной фазы

Для хроматографического анализа используется двухкомпонентная подвижная жидкая фаза:

- – компонент А - 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде;
- - компонент В – 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ».

Для приготовления 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты в деионизированной воде 600 мл деионизированной воды наливают в мерную колбу емкостью 1000 мл. С помощью механического дозатора с переменным объемом дозирования (0,1-1,0) мл добавляют 1,0 мл муравьиной кислоты.

Мерную колбу помещают в ультразвуковую ванну и дегазируют раствор в течение 5 минут. Затем добавьте неионизированную воду, указанную на этикетке. Приготовленный раствор переливают во флакон хроматографической системы объемом 1000 мл, плотно закрывают крышкой и тщательно перемешивают.

Срок годности приготовленного раствора при температуре (25 ± 2) °С составляет не более семи дней.

Для приготовления 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле: 600 мл ацетонитрила наливают в мерную колбу емкостью 1000 мл. С помощью механического дозатора с переменным объемом дозирования (0,1-1,0) мл добавляют 1,0 мл муравьиной кислоты. Мерную колбу помещают в ультразвуковую ванну и дегазируют раствор в течение 5 минут. Затем добавьте ацетонитрил на этикетку.

Приготовленный раствор переливают во флакон объемом 1000 мл, плотно закрывают крышкой и тщательно перемешивают. Срок годности приготовленного раствора при температуре (20 ± 2) °С составляет не более семи дней.

Приготовление аттестованного раствора (АР) и градуировочных растворов (ГР) препарата ФДЭС в растворителе вода-ацетонитрил (1:1).

В виале вместимостью 15 мл на аналитических весах взвешивают $10,0\pm 0,2$ мг образца препарата ФДЭС. Количество ацетонитрила V , мл, которое необходимо добавить для приготовления АР, вычисляется по формуле:

$$V = \frac{m \times \mu}{c \times 100}, \text{ где} \quad (1)$$

μ - массовая доля вещества в стандартном образце, %, указанная в паспорте на образец;

m - масса стандартного образца, мг;

c - концентрация препарата в АР ($c = 1,0$ мг/мл).

Расчетное количество ацетонитрила отбирают с помощью дозатора переменного объема вместимостью 1,0-5,0 мл. Необходимое количество ацетонитрила добавляют во флаконы с насадками, закрывают крышками и тщательно перемешивают в орбитальном шейкере в течение 1 минуты.

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл дозатором переменного объема вместимостью 0,1-1,0 мл вносят 1,0 мл аттестованного раствора препарата ФДЭС в растворителе вода-ацетонитрил (1:1) с концентрацией 1 мг/мл, дозатором переменного объема вместимостью 1,0-5,0 мл приливают 9,0 мл ацетонитрила, закрывают крышкой и тщательно перемешивают на орбитальном шейкере в течение 1 минуты и обрабатывают в ультразвуковой ванне в течение 5 мин.

Срок хранения АР в растворителе вода-ацетонитрил (1:1) при температуре $5,0\pm 1,0$ °С – не более 72 часов. Из АР препарата ФДЭС путем смешивания и кратного разбавления ацетонитрилом готовят три ГР (Таблица 11).

Таблица 11 – Концентрации градуировочных растворов препарата ФДЭС в растворителе вода-ацетонитрил (1:1)

Приготавливаемый раствор		Раствор АР или ГР, используемый для разведения		Ацетонитрил
№ ГР	Концентрация компонента, мг/мл	Концентрация компонента, мг/мл	Объём, мл	Объём, мл
1	0,100	1,0	1,00	9,00
2	0,075	1,0	0,75	9,25
3	0,050	1,0	0,50	9,50
4	0,025	1,0	0,25	9,75
5	0,010	1,0	0,10	9,90

Чтобы установить калибровочные характеристики, образцы ГР1-ГР5 препарата ФДЭС помещают в автосамплер хроматографа и анализируют по 1 мкл каждого ГР, начиная с ГР5 (с более низкой концентрацией). Измерения для каждого из ГР выполняются по меньшей мере дважды, и с помощью программного обеспечения MassHunter получается зависимость площади хроматографического пика препарата ФДЭС от его концентрации в ГР. Калибровочная характеристика должна быть линейной во всем диапазоне измеряемых концентраций лекарственного средства с коэффициентом корреляции не менее 0,99, который определяется автоматически без вмешательства оператора.

Перед выполнением анализа исследуемого образца необходимо проанализировать чистый образец (ацетонитрил, используемый для приготовления раствора вещества и ГР), чтобы убедиться в отсутствии помех, вызванных загрязнением аналитической системы, посуды и реагентов.

Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическую колонку устанавливают в термостат хроматографа, подключают к системе и промывают подвижной фазой в соответствии с приведенной ниже программой. Объемная скорость потока подвижной фазы установлена равной 0,6 мл/мин. Температура термостата установлена на 30 °С. Соотношение компонентов подвижной фазы изменяют поэтапно: 90% компонента В - промывают систему в течение 30 минут, 50% компонента В – промывают систему в течение 30 минут и 20% компонента В - промывают систему в течение 1 часа. После окончания промывки системы устанавливаются условия эксплуатации (Таблицы 12-14).

Таблица 12 – Условия хроматографического разделения

Показатели	Количества
Компоненты подвижной фазы	- компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси неионизированная вода/ ацетонитрил марки «для ВЭЖХ» (95% об/5% об); - компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в

Показатели	Количества
	ацетонитриле марки «для ВЭЖХ»
Режим хроматографического элюирования	градиент: 5 % Б (0 – 3 мин), от 5% до 70 % Б (3 – 7 мин), 70 % Б (7 – 7.5 мин), 5 % Б (7.5 – 9.0 мин).
Температура термостата колонки	30°C
Объем ввода пробы	0,01 мл
Время анализа	10 мин (с уравниванием)

Таблица 13 – Условия эксплуатации масс-спектрометрического детектора

Масс-спектрометрический детектор	Agilent 6410B Triple Quadrupole LC/MS с электрораспылительной ионизацией (ESI)
Режим источника ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении
Режим детектирования	1. Детектирование в режиме полного ионного тока при положительной ионизации от 100 до 1500 Да 2. Детектирование положительных и отрицательных ионов в режиме МС/МС (родительский ионы от катионной и анионной частей в положительной и отрицательной полярностях в соответствии с табл. 59) от 50 до 300 Да
Скорость потока газа-осушителя	5 ед.
Скорость потока вспомогательного газа	20 ед.
Скорость потока газа на распылителе	40 ед.
Напряжение на капилляре	3,5 кВ
Температура на распылителе	320°C
Температура капилляра	350°C
Режим источника ионизации	Ионизация электростатическим распылением

Выполнение измерений

Контроль аналитической системы

В соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора, в начале каждого рабочего дня масс-спектрометрическая система проверяется с помощью автоматического теста. Суть теста заключается в том, что в результате настройки необходимо получить масс-спектр калибровочного вещества. Система обработки данных автоматически выполняет тест до тех пор, пока не будут выполнены все критерии конфигурации, заложенные в программном обеспечении.

Хроматографическая система считается подходящей, если выполняются следующие условия: относительное стандартное отклонение времени удерживания препарата составляет не более 5,0% ($n = 6$); асимметрия пиков составляет не более 1,9.

Таблица 14 – Условия детектирования положительных и отрицательных ионов препарата ФДЭС в режиме МС/МС (исходные ионы из катионной и анионной частей в положительной и отрицательной полярностях)

Родительский ион	Полярность	Прекурсор	Дочерний продукт-ион	Фрагментор	Энергия соударения, СЕ
189.2	Положительная	190.2	72.1	106	8
189.2	Положительная	190.2	145.1	106	8
189.2	Положительная	190.2	99	106	20
189.2	Положительная	190.2	55.1	106	28
188	Отрицательная	188	99	105	5
115	Отрицательная	115	71.1	105	5
269	Отрицательная	269	89	105	5

Аналитическая система контролируется перед началом работы, а также при замене хроматографической колонки, очистке детектора и т.д.

Перед измерением хроматографических параметров исследуемого образца необходимо проанализировать чистый образец (измерить хроматографические параметры используемого растворителя – вода-ацетонитрил), чтобы убедиться в отсутствии помех, вызванных загрязнением аналитической системы, посуды и реагентов.

На рисунке 11 показан типичный вид масс-хроматограммы стандартного образца водного раствора ацетонитрила препарата ФДЭС 0,1 мг/мл.

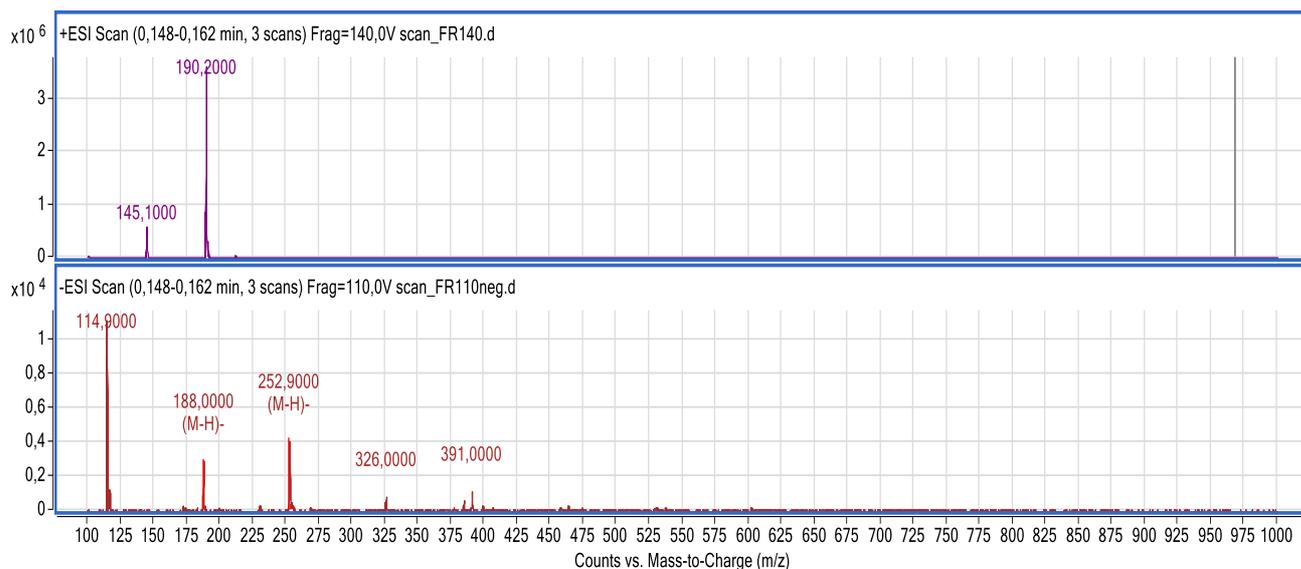


Рисунок 11 – Типичный вид масс-хроматограмм стандартного образца раствора препарата ФДЭС 0,1 мг/мл в положительной и отрицательной полярности

Выбор процедур пробоподготовки

Для разработки методики извлечения исследуемого соединения из биологических сред выбраны два направления: извлечение препарата после осаждения ацетонитрилом в соотношении 3:1 и применение мембранных фильтров с отсечением по молекулярной массе (3 кДа, 10 кДа). Отработку методик проводили с использованием образцов мочи и крови с созданными концентрациями ФДЭС на трёх различных уровнях: 10, 100 и 500 нг/мл.

Осаждение белковой фракции проводят добавлением трехкратного избытка ацетонитрила, содержащего 0,1 % муравьиной кислоты. Выпадающий осадок белковой фракции

центрифугируют при 14000 об/мин на охлаждаемой центрифуге 10 мин. Верхний прозрачный ацетонитрильный раствор используют для анализа.

В случае применения мембранных фильтров с отсечением по молекулярной массе (3 кДа или 10 кДа) образец биосреды (300-400 мкл) наносят на фильтр и центрифугируют 10 мин при 14000 об/мин в охлаждаемой центрифуге. Прозрачный раствор на дне виалы используют для анализа.

Расчеты фармакокинетических параметров

Расчет фармакокинетических параметров проводили с использованием пользовательского макроприложения к программе Microsoft Excel - PKSolver [440]. Были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры:

– Кажущаяся начальная концентрация препарата C_0 , - концентрация вещества, которая была достигнута в плазме крови при его внутривенном введении и мгновенном распределении по органам и тканям;

– Период полувыведения препарата $T_{1/2}$, отражающий время, в течение которого концентрация соединения в крови снижается вдвое:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}} \text{ (час)}$$

– Почечный клиренс (Cl , л/ч/кг), отражающий скорость высвобождения препарата из единицы объема биожидкости, как отношение дозы (D) к AUC:

$$cl = \frac{D}{AUC} \text{ (мл/час)}.$$

– Общий (кажущийся) объем распределения (V_d , л/кг), который понимается как объем, в котором лекарственное средство имело бы ту же концентрацию, что и в плазме крови, как отношение клиренса (cl) к константе элиминации. (K_{el}): $V_d = \frac{cl}{K_{el}}$ (мл).

– Объем распределения лекарственного средства (V_d) характеризует степень его захвата тканями из плазмы крови (сыворотки).

– Площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) представляет собой площадь рисунка, ограниченную фармакокинетической кривой и осями координат ($AUC = C_0/K_{el}$). Величина (AUC) связана с другими фармакокинетическими параметрами – объемом распределения, общим клиренсом. При линейности кинетики действия препарата в организме значение AUC пропорционально общему количеству (дозе) препарата, попавшего в системный кровоток. Часто определяется площадь под частью кривой (от нуля до некоторого времени t); этот параметр обозначается $auction$.

AUC является основным фармакокинетическим параметром и характеризует биодоступность лекарственного средства. Этот параметр был рассчитан независимым методом статистических моментов [Пиотровский В. 1986] в программе Microsoft Excel.

$$AUC = \frac{C_1}{2} \Delta t_1 + \frac{C_1 + C_2}{2} \Delta t_2 + \frac{C_2 + C_3}{2} \Delta t_3 \dots + AUC_{OCl},$$

где $AUC_{OCl} = \frac{C_{посл}}{K_{el}}$

– Абсолютная биодоступность (F, %) – это часть дозы препарата (в %), которая достигла системного кровотока после внесосудистого введения и равна отношению AUC после введения тестируемым методом (внутрь, в мышцу и т.д.) к AUC после внутривенного введения.

– Относительную биодоступность лекарственной формы – это отношение AUC вещества к AUC лекарственной формы при соответствующем введении препарата крысам.

– Константа элиминации прямо пропорциональна зазору и обратно пропорциональна объему распределения (исходя из определения клиренса):

$$K_{el} = C_L/V_d; [K_{el}] = \text{час}^{-1}/\text{мин}^{-1} = \text{доля в час.}$$

– Среднее время удерживания, характеризующее среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT):

$$MRT = AUMC_{inf}/AUC_{inf} \text{ (час), где}$$

$AUMC_{inf}$ – площадь под кривой «произведение концентрации на время–время» от нулевого момента до бесконечности – вычисляли по формуле:

$$AUMC_{inf} = AUMC_{96ч} + C_{96ч} \times T_{96ч} / K_{el} + C_{96ч} / K_{el}^2$$

$AUMC$ – площадь под кривой – произведение времени на концентрацию лекарственного вещества – время.

Испытуемый препарат ФДЭС является новым, оригинальным фармакологическим средством, особенности всасывания, распределения и элиминации ранее не изучались.

Схема эксперимента по изучению параметров фармакокинетики на крысах представлена в таблицах (Таблицы 15, 16, 17).

Таблица 15 – Схема эксперимента по изучению параметров фармакокинетики на крысах.

Путь введения	Внутривенный	Пероральный		
		5 мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг
Доза ФС	5 мг/кг	5 мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг
Количество животных	15 (кровь) + 6 (моча)	15 (кровь) + 6 (моча)	15	15
Пол животных	самцы	самцы	самцы	самцы
Объем введения	1 мл/кг	2,5 мл/кг	2,5 мл/кг	2,5 мл/кг
Растворитель	0,9% р-р NaCl	вода очищенная	вода очищенная	вода очищенная
Тип исследуемого биологического материала	кровь, моча	кровь, моча	кровь	кровь

График отбора проб крови крыс представлен в таблице (Таблица 16), проб мочи – в таблице (Таблица 17).

Таблица 16 – График отбора проб крови у крыс

Временная точка, ч	Путь введения			
	Внутривенный	Пероральный		
		5 мг/кг	5 мг/кг	25 мг/кг
0,25	●	●	●	●
0,5	●	●	●	●
1	●	●	●	●
2	●	●	●	●
3	●	●	●	●
4	●	●	●	●
6	●	●	●	●
8	●	●	●	●
24	●	●	●	●

Таблица 17. График отбора проб мочи у крыс

Временная точка, ч	В/в путь введения	П/о путь введения
	5 мг/кг	5 мг/кг
1	●	●
2	●	●
3	●	●
4	●	●
6	●	●
24	●	●

Для проведения фармакокинетического исследования лабораторным животным (белым беспородным крысам) препарат ФДЭС вводился внутривенно или с помощью зонда внутрижелудочно в дозе 5,0 мг/кг.

Были изучены следующие биоматериалы: кровь и моча.

- кровь

Точки забора	№ пробирок	Примечание
контроль	1	
15 минут	2	
30 минут	3	
60 минут	4	
90 минут	5	
2 часа	6	
4 часа	7	
8 часов	8	
12 часов	9	
16 часов	10	
24 часов	11	
48 часов	12	
72 часа	13	

Точки забора	№ пробирок	Примечание
ИТОГО	13 пробирок	

- моча

Точки забора	№ пробирок	Примечание
0	контроль	
1-2 часа	1	
4-5 часов	4	
12-13 часов	12	
24	24	
48	48	
ИТОГО	6 пробирок	

В качестве бланка используется моча (кровь) интактных животных, которым не вводили никаких соединений или медикаментов.

По значению площади хроматографических пиков с использованием калибровочных характеристик и программ обработки данных определяют концентрацию препарата ФДЭС в анализируемом образце. Расчет массовой концентрации анализируемых веществ в образце проводится для каждого из двух параллельных определений. В качестве результата измерения берется среднее арифметическое результатов двух параллельных определений одного экстракта (Рисунок 12).

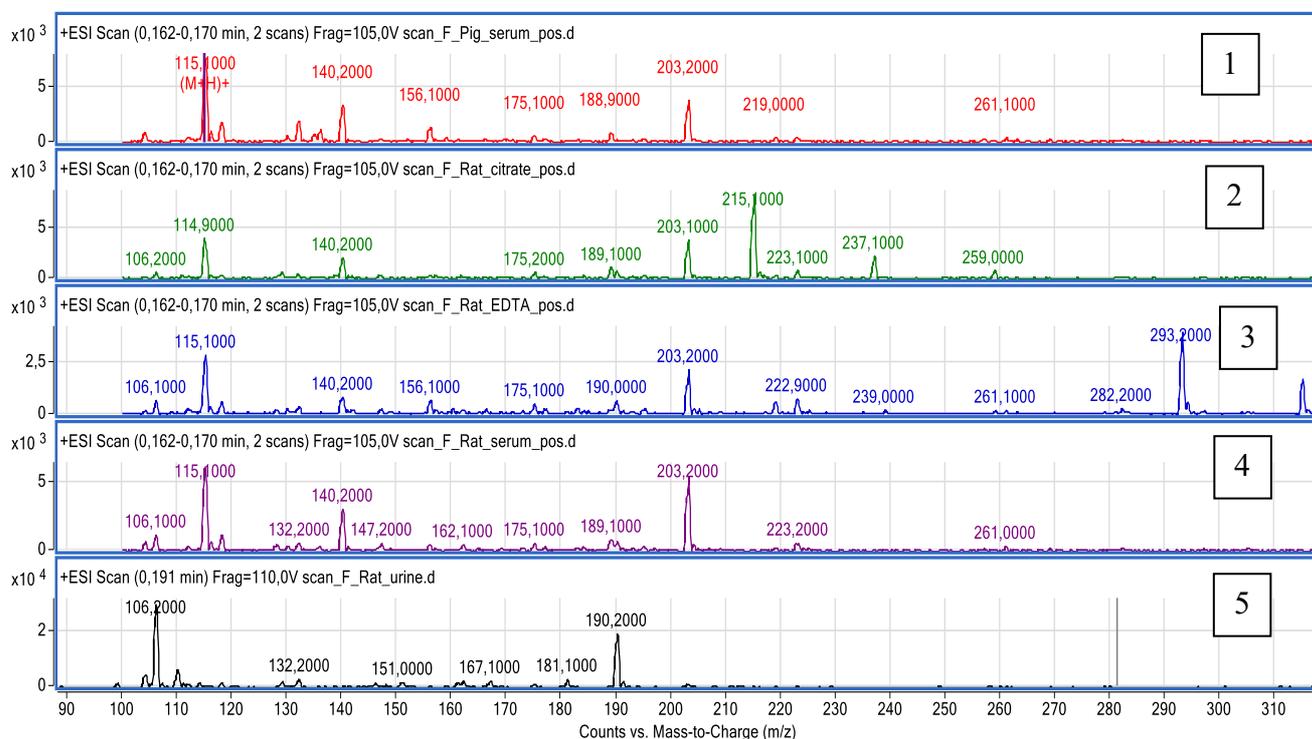


Рисунок 12. Определение соединения ФДЭС и его метаболитов в плазме и моче лабораторных животных через 1,5 часа после введения препарата. Обозначения: 1 – хроматограмма по полному ионному току, сыворотка; 2 – хроматограмма по полному ионному току, плазма цитрат; 3 – хроматограмма по полному ионному току, плазма ЭДТА; 4 – хроматограмма по полному ионному току, сыворотка; 5 – хроматограмма по полному ионному току, моча.

2.9.1. Компьютерный прогноз метаболизма ФДЭС

Прогноз метаболизма новых веществ может быть осуществлён с помощью программ SMP и MetaTox. Программа SMP (Prediction of Substrate/Metabolite Specificity) [SMP URL [http://www.way2drug.com/SMP/], предназначена для предсказания принадлежности химических соединений к субстратам и метаболитам конкретных ферментов метаболизма. Программа обеспечивает предсказание списка ферментов, для которых соединение может являться субстратом и/или метаболитом на основе взаимосвязей «структура-фермент». Программа MetaTox [MetaTox URL [http://www.way2drug.com/MG/, 397], предназначена для предсказания структурных формул метаболитов, образующихся в ходе биотрансформации в организме человека. Прогноз метаболизма изучаемого вещества выполнен с помощью компьютерной программы MetaPred (свидетельство Роспатента № 2004610666 от 12.03.2004 г.).

2.10. Материалы и методы технологии производства таблеток

В экспериментальной части диссертационной работы для разработки таблеток ФДЭС нами были использованы следующие приборы и оборудование:

- Весы (Pioneer PA 512) (США);
- Весы лабораторные (Sartorius LA 16001S) (Германия);
- Вакуум водоструйного насоса;
- Воронки М-2, М-8;
- Двугорлая круглодонная колба Р-7;
- Детектор ионизационно-пламенный;
- Диодно-матричный детектор;
- Дистиллятор (ДЭ-4М) (Россия);
- Колонка Phenomenex Luna 5u Phenyl-Hexyl 250 мм * 4,6 мм, 5 мкм;
- Климатическая камера Memmert HPP 110 (Германия);
- Магнитная мешалка;
- Мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм;
- Мерную колбу емкостью 25 мл, 50 мл, 100 мл 1000 мл;
- Мешалка магнитная (MR Hei-Standard) с датчиком температуры (Германия);
- Обратный холодильник Т-3 и Т-9;
- Парофазный дозатор;
- Пресс лабораторный гидравлический ПГР-10 (Россия);

- Полочная сушилка Сш-13;
- Прямой холодильник;
- Прибор Erweka SVM 221 для определения объёмной плотности порошков до и после утрамбовки;
- Сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM – 6490LV при 20kV;
- Таблетный пресс однопуансонный (C&C 600 Series модель А);
- Тестер распадаемости «Erweka» ZT 322m;
- Тестер истираемости (Erweka TAR 220) (Германия);
- Тестер насыпной плотности Erweka SVM 221 (Германия);
- Тестер контроля распадаемости (LABINDIA DS 1000) (Индия);
- Тестер на растворение модель PNWS120S с шестью независимыми приводами;
- Тестер прочности таблеток на раздавливание Erweka TBH 125 TD-P (Германия);
- Тестер на определение прочности на сжатие Erweka TBH 125 TD-P;
- Тестер для определения сыпучести Erweka GT D-63150;
- рН-метр РВ-11 с электродом №А123806011;
- Хроматограф жидкостной Flexar;
- Хроматограф газовый Clarus 680;
- Шкаф термический (СШ-80-01 СПУ) (Россия);
- Флакон для парофазного анализа;
- Фильтр Ф-5, Ф-11;
- Электропечь лабораторная SNOL 8,2/1100;
- Электропечь лабораторная низкотемпературная SNOL 58/350.

Методы исследования

Исследования вещества проводились с использованием следующих методов анализа, описанных в ГФ XIV, том 1 [58].

ОФС.1.1.0006.15.Фармацевтические субстанции.

ОФС.1.1.0006.15.Описание.

ОФС.1.2.1.0005.15.Определение растворимости вещества ФДЭС

ОФС.1.2.1.0011.18.Температура плавления

ОФС.1.2.1.0004.15.Ионометрия. рН раствора

ОФС.1.2.1.0010.15.Потеря массы при сушке (воды)

ОФС.1.2.2.2.0014.15.Сульфатная зола

ОФС.1.2.2.2.0012.15.тяжелые металлы

ОФС.1.2.2.2.0009.15.Хлориды

ОФС.1.4.2.0004.15.Прочность на истирание

ОФС.1.4.2.0014.15.Насыпная плотность

ОФС.1.4.2.0016.15.Текучесть

ОФС.1.1. 0010.15.Условия хранения лекарственных средств

Исследования лекарственной формы проводили с использованием следующих методов анализа, описанных в ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.1.0015.15 Таблетки [59]:

ОФС.1.4.1.0015.15.Внешний вид таблеток

ОФС.1.4.2.0009.15.Однородность массы дозированных лекарственных форм

ОФС.1.4.2.0013.15.Дезинтеграцию таблеток ФДЭС

ОФС.1.4.2.0008.18.Равномерность дозирования

ОФС.1.4.2.0014.15.Растворение таблеток ФДЭС

ОФС.1.1.0009.18.Сроки годности лекарственного средства

К физико-химическим и технологическим свойствам субстанций относят: сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная масса, форма и размер частиц, влагосодержание, прессуемость, фракционный состав и др.

Метод влажной грануляции

Метод используется для порошков с плохой сыпучестью и низкой способностью к сцеплению между частицами. Для улучшения сцепления частиц в массу добавляют растворы связывающих веществ.

Приготовление крахмального клейстера

Крахмал картофельный суспендировали в холодной воде очищенной в соотношении 1:1. Затем к оставшемуся количеству воды очищенной, нагретой на водяной бане до 90-96 °С при перемешивании приливали полученную суспензию крахмала картофельного, охлаждали при перемешивании до комнатной температуры.

Приготовление раствора МЦ

К расчётному количеству воды очищенной при температуре 60-70 °С при перемешивании добавляли МЦ, перемешивали при нагревании в течение 20 мин. Затем охлаждали при перемешивании до комнатной температуры до получения прозрачного вязкого однородного раствора.

Получение гранулята.

Отвешенные количества ВВ просеивали. Небольшими порциями постепенно добавляли раствор увлажнителя в количестве, необходимом для получения влажной массы, не прилипающей, но уминающейся в комок. Полученную массу вымешивали в течение 5 мин, гранулировали. Влажные грануляты сушили при температуре 65-75°С, до остаточной влажности не более 3,5%.

2.11. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного пакета "Statistica 6.0". Нормальность распределения количественных признаков проверялась для небольшого числа наблюдений с помощью W-критерия Шапиро-Уилка, значимость различий в нормальном распределении количественных признаков оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а в случае аномального распределения - с помощью в случае множественных сравнений использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных вариационных рядов), а также однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Статистическую значимость изменений в динамике показателей у животных одной и той же группы оценивали с использованием критерия Уилкоксона для родственных выборок. Числовые данные, приведенные в таблицах, представлены в виде: среднее арифметическое (M) ± ошибка среднего (m). Уровень достоверности был установлен на уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. СКРИНИНГ НОВЫХ ЭФИРОВ АМИНОЭТАНОЛА С ЯНТАРНОЙ И ФУМАРОВОЙ КИСЛОТОЙ И ИХ СОЛЕЙ С КИСЛОТАМИ ЦИКЛА КРЕБСА НА НАЛИЧИЕ ПСИХОАКТИВИРУЮЩЕГО И АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТОВ

Несмотря на многолетнее изучение ноотропных препаратов, до настоящего времени в биомедицинских исследованиях не сформировался стандартный методический подход для скрининга новых соединений на наличие ноотропной активности. Во многом это связано с тем, что методики оценки влияния биологически активных веществ на когнитивные функции лабораторных животных являются трудозатратными, требуют формирования памятного следа и последующую оценку скорости и условий его угасания, а сами когнитивные эффекты характеризуются высокой вариативностью и нестабильностью. В связи с этим в различных исследованиях часто встречается подход, основанный на скрининге выраженности действия новых соединений в отношении отдельных проявлений ноотропного действия: психоактивирующего и нейропротекторного. Тогда при одновременном выявлении активности по этим эффектам можно предположить и, возможное, наличие ноотропной активности у данного потенциально перспективного средства.

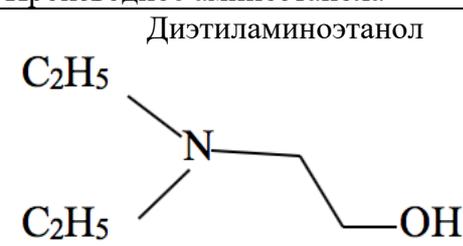
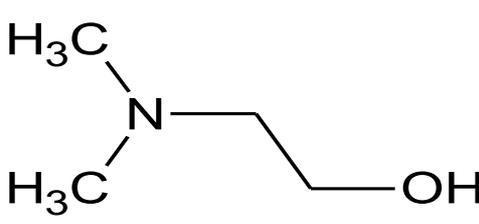
Так как для ноотропных препаратов типичным является умеренное по выраженности психоактивирующее действие (в отличие от психостимуляторов и общетонизирующих средств), то оно может быть выявлено в тестах оценки физической работоспособности животных при однократном поступлении препарата в организм, находящийся в комфортных для него условиях. При этом специфическая актопротекторная активность лекарственных препаратов требует или курсового применения на фоне тренирующих нагрузок, или выполнения физических нагрузок в неблагоприятных условиях (например, на фоне дополнительного воздействия гипоксического или температурного факторов. В качестве скрининговой методики выявления умеренного психоактивирующего действия и его позитивного действия на физическую работоспособность может быть использована методика вынужденного плавания животных с грузом в термокомфортных условиях [95, 161].

Закономерным компонентом нейропротекторного действия является антигипоксическая активность биологически активных соединений. Для скрининга антигипоксической активности известно применение широкого круга различных методик, связанных с различными типами и формами гипоксических состояний. Наиболее универсальными (и в минимальной степени связанными с другими негативными воздействиями на организм) из них могут считаться тесты на переносимость гипоксической гипоксии (гипобарической или нормобарической). Методика их выполнения описана ранее в разделе 2.7.2. диссертации. Объектами исследования были выбраны различные эфирные производные этаноламина в качестве основания, и их сукцинатная,

фумаратная, малатная и кетоглутаровая соли, синтезированные на кафедре органической химии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.). Сведения о исследуемых соединениях представлены в таблице (Таблица 18).

Скрининговое исследование было выполнено в 2 серии. Первая серия была посвящена выявлению психоактивирующего действия (повышение физической работоспособности), вторая – оценке антигипоксической активности соединений, у которых была выявлена способность повышать физическую работоспособность лабораторных животных. Пирацетам (производства ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА») и Триметазидин (Предуктал МВ, производства ООО «Сердикс» – аффилированной компании Servier) – препараты сравнения.

Таблица 18 – Включенные в скрининговое исследование новые производные эфиров этаноламина

№ п/п	Соединение		
	Катион		Анион
	Эфир	Производное аминоэтанола	Кислотный остаток
1.	-	Диэтиламиноэтанол	-
2.	Янтарный		DL- малат
3.	Янтарный		L- малат
4.	Янтарный		Фумарат
5.	Янтарный		Сукцинат
6.	Янтарный		Кетоглутарат
7.	Фумаровый		-
8.	Фумаровый		Кетоглутамат
9.	Фумаровый		Фумарат
10.	Фумаровый		Сукцинат
11.	Янтарный		Диметиламиноэтанол
12.	Янтарный		DL- малат
13.	Янтарный		L- малат
14.	Янтарный		Фумарат
15.	Янтарный		Сукцинат
16.	Янтарный		Кетоглутарат
17.	Фумаровый		-
18.	Фумаровый		Кетоглутарат
19.	Фумаровый		Фумарат
20.	Фумаровый		Сукцинат

Таким образом, для скрининга были использованы 20 новых соединений, из них 10 – производных диметиламиноэтанола, и 10 – производных диэтиламиноэтанола. В каждой группе были представлены янтарные и фумаровые эфиры, а также собственно основания и их янтарные, фумаровые, кетоглутаровые и яблочнокислые соли.

3.1.Скрининг психоактивирующей активности

Результаты скрининга новых соединений на наличие психоактивирующей активности представлены в таблице (Таблица 19). Профилактическое введение (за 1 час до гипербарического воздействия) исследуемых препаратов и препаратов сравнения обеспечивало выраженную защиту мозга животных от гипоксических воздействий.

Таблица 19 – Влияние исследуемых соединений на время активного плавания мышей

№ п/п	Соединение	Доза, мг/кг	Продолжительность плавания	
			М±m, мин	% к контролю
1	Контроль		5,41±0,21	100
2	ДМАЭ - ацетилглутамат	10	5,23±0,45	97
3	ДМАЭ - ацетилглутамат	25	4,03±0,34	75
4	ДМАЭ - ацетилглутамат	50	9,41±1,21	174**
5	ДМАЭ - ацетилглутамат	75	8,56±1,39	158*
6	Сукцинат - ДЭАЭ - DL-малат	10	5,08±0,35	94
7	Сукцинат - ДЭАЭ - DL-малат	25	7,50±0,73	139
8	Сукцинат - ДЭАЭ - DL-малат	50	5,73±0,45	106
9	Сукцинат - ДЭАЭ - DL-малат	75	5,23±0,55	97
10	Сукцинат - ДЭАЭ - L-малат	10	4,73±0,64	87
11	Сукцинат - ДЭАЭ - L-малат	25	6,10±0,55	113
12	Сукцинат - ДЭАЭ - L-малат	50	5,90±0,26	109
13	Сукцинат - ДЭАЭ - L-малат	75	4,72±0,28	87
14	Сукцинат - ДЭАЭ - Фумарат	10	4,80±0,36	89
15	Сукцинат - ДЭАЭ - Фумарат	25	5,62±0,50	104
16	Сукцинат - ДЭАЭ - Фумарат	50	6,56±0,73	121
17	Сукцинат - ДЭАЭ - Фумарат	75	10,04±1,51	186**
18	Сукцинат - ДЭАЭ - Сукцинат	10	4,22±0,24	78
19	Сукцинат - ДЭАЭ - Сукцинат	25	5,91±0,53	109
20	Сукцинат - ДЭАЭ - Сукцинат	50	5,88±0,60	109
21	Сукцинат - ДЭАЭ - Сукцинат	75	6,10±0,55	113
22	Сукцинат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	10	4,01±0,23	74
23	Сукцинат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	25	7,08±0,87	131
24	Сукцинат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	50	6,29±0,57	116
25	Сукцинат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	75	4,80±0,36	89
26	Сукцинат - ДМАЭ основание	10	4,72±0,28	87
27	Сукцинат - ДМАЭ основание	25	4,63±1,38	86
28	Сукцинат - ДМАЭ основание	50	6,45±0,54	119
29	Сукцинат - ДМАЭ основание	75	4,24±0,52	78
30	Сукцинат - ДМАЭ - Сукцинат	10	6,56±0,73	121
31	Сукцинат - ДМАЭ - Сукцинат	25	9,88±1,20	182**
32	Сукцинат - ДМАЭ - Сукцинат	50	8,54±1,26	158*
33	Сукцинат - ДМАЭ - Сукцинат	75	7,35±0,71	136
34	Сукцинат - ДМАЭ - Фумарат	10	9,41±1,11	174**
35	Сукцинат - ДМАЭ - Фумарат	25	10,88±1,17	201**
36	Сукцинат - ДМАЭ - Фумарат	50	7,82±0,73	145
37	Сукцинат - ДМАЭ - Фумарат	75	7,51±0,79	139
38	Сукцинат - ДМАЭ - DL-малат	10	7,92±0,95	146

№ п/п	Соединение	Доза, мг/кг	Продолжительность плавания	
			M±m, мин	% к контролю
39	Сукцинат - ДМАЭ - DL-малат	25	8,57±1,61	158*
40	Сукцинат - ДМАЭ - DL- малат	50	5,06±1,30	94
41	Сукцинат - ДМАЭ - DL-малат	75	7,92±0,95	146
42	Сукцинат - ДМАЭ - L- малат	10	4,80±0,46	89
43	Сукцинат - ДМАЭ - L- малат	25	5,24±0,67	97
44	Сукцинат - ДМАЭ - L-малат	50	6,02±0,74	111
45	Сукцинат - ДМАЭ - L-малат	75	6,02±0,75	111
46	Сукцинат - ДМАЭ - Кетоглутарат	10	5,06±1,24	94
47	Сукцинат - ДМАЭ - Кетоглутарат	25	7,47±0,87	138
48	Сукцинат - ДМАЭ - Кетоглутарат	50	7,21±0,52	133
49	Сукцинат - ДМАЭ - Кетоглутарат	75	7,33±0,98	136
50	ДЭАЭ основание	10	6,45±0,54	119
51	ДЭАЭ основание	25	7,95±1.08	147
52	ДЭАЭ основание	50	11,95±1,66	221**
53	ДЭАЭ основание	75	7,77±0,82	144
54	Фумарат - ДЭАЭ - основание	10	5,24±0,67	97
55	Фумарат - ДЭАЭ - основание	25	6,33±0,84	117
56	Фумарат - ДЭАЭ - основание	50	4,10±0,48	76
57	Фумарат - ДЭАЭ - основание	75	7,17±0,81	133
58	Фумарат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	10	6,02±0,74	111
59	Фумарат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	25	8,39±0,72	155*
60	Фумарат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	50	7,92±0,55	146*
61	Фумарат - ДЭАЭ - Кетоглутарат	75	8,61±1,20	159*
62	Фумарат - ДЭАЭ - Фумарат	10	7,76±1,06	143
63	Фумарат - ДЭАЭ - Фумарат	25	5,83±0,42	108
64	Фумарат - ДЭАЭ - Фумарат	50	4,62±0,39	85
65	Фумарат - ДЭАЭ - Фумарат	75	4,50±0,42	83
66	Фумарат - ДЭАЭ - Сукцинат	10	14,17±4,26	262***
67	Фумарат - ДЭАЭ - Сукцинат	25	6,06±0,89	112
68	Фумарат - ДЭАЭ - Сукцинат	50	5,19±0,97	96
69	Фумарат - ДЭАЭ - Сукцинат	75	4,91±0,93	91
70	Фумарат - ДМАЭ - основание	10	7,76±0,85	143
71	Фумарат - ДМАЭ - основание	25	9,23±1,16	171*
72	Фумарат - ДМАЭ - основание	50	5,08±0,41	94
73	Фумарат - ДМАЭ - основание	75	4,72±0,28	87
74	Фумарат - ДМАЭ - Фумарат	10	5,24±0,67	97
75	Фумарат - ДМАЭ - Фумарат	25	5,50±0,49	102
76	Фумарат - ДМАЭ - Фумарат	50	7,33±0,80	135
77	Фумарат - ДМАЭ - Фумарат	75	14,85±3,60	275***
78	Фумарат - ДМАЭ - Сукцинат	10	4,50±0,42	83
79	Фумарат - ДМАЭ - Сукцинат	25	6,73±1,78	124
80	Фумарат - ДМАЭ - Сукцинат	50	6,14±0,58	114
80	Фумарат - ДМАЭ - Сукцинат	75	7,32±1,35	135
82	Фумарат - ДМАЭ - Кетоглутарат	10	5,50±0,49	102
83	Фумарат - ДМАЭ - Кетоглутарат	25	8,02±1,18	148
84	Фумарат - ДМАЭ - Кетоглутарат	50	7,25±0,93	134
85	Фумарат - ДМАЭ - Кетоглутарат	75	7,69±0,48	142

Примечание: отличия от контроля статистически значимы по F-критерию дисперсионного анализа (ANOVA)

Проведенное исследование показало, что среди изучаемых производных эфиров аминокислот к дальнейшему изучению антигипоксической активности могут быть допущены следующие соединения:

- из группы сукцинатных эфиров диметиламиноэтанола – янтарная, фумаровая и DL-яблочная соль
- из группы фумаровых эфиров диметиламиноэтанола – фумаровая соль и основание
- из группы сукцинатных эфиров диэтиламиноэтанола – фумаровая соль
- из группы фумаровых эфиров диэтиламиноэтанола – янтарная и кетоглутаровая соли.

Для указанных соединений в оптимальных дозах выявлено умеренное психоактивирующее действие, сопоставимое или превышающее активность эталонного ноотропного препарата аминокислотного ряда – нооклерила [27].

3.2.Скрининг антигипоксической активности

Анализ таблицы (Таблица 20) показывает, что соли основного производного предшественника холина и дающих энергию кислот цикла Кребса проявляют антигипоксическую активность, сравнимую с антигипоксической активностью препаратов сравнения пирацетама и триметазидина. Однако обращает на себя внимание высокая степень индивидуальной вариабельности эффекта (высокие значения коэффициента вариации).

Таблица 20 – Антигипоксическая активность исследуемых препаратов

Препарат	Время жизни, сек	% от контроля	Коэффициент вариации (КВ)	Степень влияния (D)	Достоверность различий (p)
	M ± m				
Контроль	231,0±34,0	100	0,81	-	-
Предуктал	1039,0±142,0	450	0,43	0,64	8*10 ⁻¹⁰
Пирацетам	1416,0±256,0	612	0,57	0,60	4*10 ⁻⁹
ФДМ-основание	432,0±101,0	187	0,74	0,135	0,02
ФДМ-фумарат	637,0 ± 218,0	276	0,34	0,47	8*10 ⁻⁷
СДМ-сукцинат	1475,±249,0	638	0,53	0,64	7*10 ⁻¹⁰
ФДЭ-сукцинат	1126,0 ± 218,0	487	0,38	0,53	6*10 ⁻⁸
СДМ-фумарат	1044,0 ± 162,0	452	0,32	0,48	5*10 ⁻⁷
ФДЭ-фумарат	814,0±215,0	352	0,84	0,33	0,0001
ФДЭ-кетоглутарат	681,0±49,0	295	0,23	0,55	5*10 ⁻⁸
СДМ-DL-малат	629,0±201,0	272	1,01	0,20	0,004
СДЭ-фумарат	926,0±182,0	401	0,62	0,48	9*10 ⁻⁷

Примечание: СДМ – янтарный эфир диметиламиноэтанола; ФДМ – фумаровый эфир диметиламиноэтанола; СДЭ – янтарный эфир диэтиламиноэтанола; ФДЭ – фумаровый эфир

диэтиламиноэтанола. Отличия от контроля статистически значимы по F-критерию дисперсионного анализа (ANOVA).

Следовательно, у некоторых животных антигипоксическая активность может быть недостаточной, несмотря на высокий, в целом, уровень влияния препарата на показатель продолжительности жизни. Наиболее активной из изученных солей производного диметилэтанолламинного эфира в модели острой гипоксической гипоксии была янтарная соль.

Наличие достаточно высокого разброса между средними значениями антигипоксической активности отдельных лекарственных средств по времени жизни на критической высоте позволило нам провести факторный анализ значимости основного и анионного компонента солей в антигипоксической активности солей. Результаты проведенного двухфакторного анализа представлены в таблице (Таблице 21).

Таблица 21 – Влияние химической структуры новых молекул на устойчивость животных к гипоксической гипоксии

Контролируемый фактор	Влияние фактора, (D)	Достоверность модели, (p)
Фактор А – основание	0,135	0,02
Фактор В – кислотный остаток	0,270	0,004
Взаимодействие факторов А*В	0,025	0,78
Итого контролируемые факторы	0,43	$6 \cdot 10^{-8}$
Неконтролируемые факторы	0,53	-

Таким образом, химическое строение исследуемых соединений является значимым фактором, достоверно объясняющим 43% общей изменчивости отдельных показателей продолжительности жизни животных на критической высоте. Значимость кислотного остатка в антигипоксической активности исследуемых солей в 2 раза превышает значимость основания (0,270 и 0,135 соответственно). Однако превалирующее значение имеют неконтролируемые факторы (53% от общей изменчивости индивидуальных значений продолжительности жизни животных в критической гипоксии). К таким неконтролируемым факторам могут относиться различные исходные уровни индивидуальной резистентности животных к гипоксии. Фактор изомерии анионов также можно отнести к категории факторов, не учтенных в данном эксперименте. Таким образом, в работе были изучены две соли яблочной кислоты – рацемический DL-малат и изомерный L-малат. Было обнаружено, что антигипоксическая активность L-малата в 1,5 раза выше, чем у рацемической соли. Дисперсионный факторный анализ, проведенный для этих двух подгрупп, показал, что фактор анионной изомерии определяет 6% от общего изменения показателя продолжительности жизни животных на критической высоте. Этот эффект не был статистически значимым ($p=0,29$). Однако, когда в исследование включаются возможные изомерные анионы других солей, из-за увеличения числа

наблюдений уровень достоверности может достичь, как мы предполагаем, статистически значимого уровня [235].

Обобщенные результаты скрининговых серий новых фармакологически активных веществ на предмет возможного обнаружения у них ноотропной активности представлены в таблице (Таблице 22).

Таблица 22 – Оценка вероятности обнаружения ноотропной активности у новых соединений с выявленным психоактивирующим и нейропротекторным (антигипоксическим) действием

Соединение	Выраженность активности		Вероятность ноотропного действия
	Психоактивирующей	Нейропротекторной (антигипоксической)	
ФДМ-основание	+	+	низкая
ФДМ-фумарат	+++	+	высокая
СДМ-сукцинат	+	+++	высокая
СДМ-фумарат	+	++	умеренная
ФДЭ-кетоглутарат	+	+	Низкая
ФДЭ-сукцинат	+++	+++	Очень высокая
СДЭ-фумарат	++	+	умеренная

Примечание: СДМ – янтарный эфир диметилэтанолamina; ФДМ – фумаровый эфир диметилэтанолamina; СДЭ – янтарный эфир диэтилэтанолamina; ФДЭ – фумаровый эфир диэтилэтанолamina. Выраженность эффекта в сравнении с контролем: + слабая, ++ - умеренная, +++ - высокая.

Таким образом, по результатам проведенного скрининга фармакологической активности, для дальнейшего экспериментального исследования потенциального ноотропного действия был выбрано соединение - янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтанолamina (рабочее обозначение ФДЭС).

ГЛАВА 4. НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФДЭС

Наличие нейропротекторного действия (наряду с влиянием на когнитивные функции) является ключевым для отнесения того или иного соединения к фармакологическому классу ноотропных препаратов. Оно заключается в снижении степени поражения нервной системы при общем или локальном повреждающем воздействии (собственно нейропротекторный эффект), а также в ускорении процессов восстановления нарушенных функций после прекращения воздействия поражающего фактора (нейрореабилитационный компонент нейропротекторного действия).

4.1. Общая характеристика нейропротекторного действия лекарственных средств

Н.Н. Брагиной [36] было сформулировано целостное представление о взаимосвязанном патологическом процессе, включающее неврологические проявления очагового и общемозгового поражения и критическое состояние. Согласно концепции критических состояний, шок и гипоксия вне зависимости от причины его развития могут вызывать первичное поражение головного мозга (Рисунок 13).

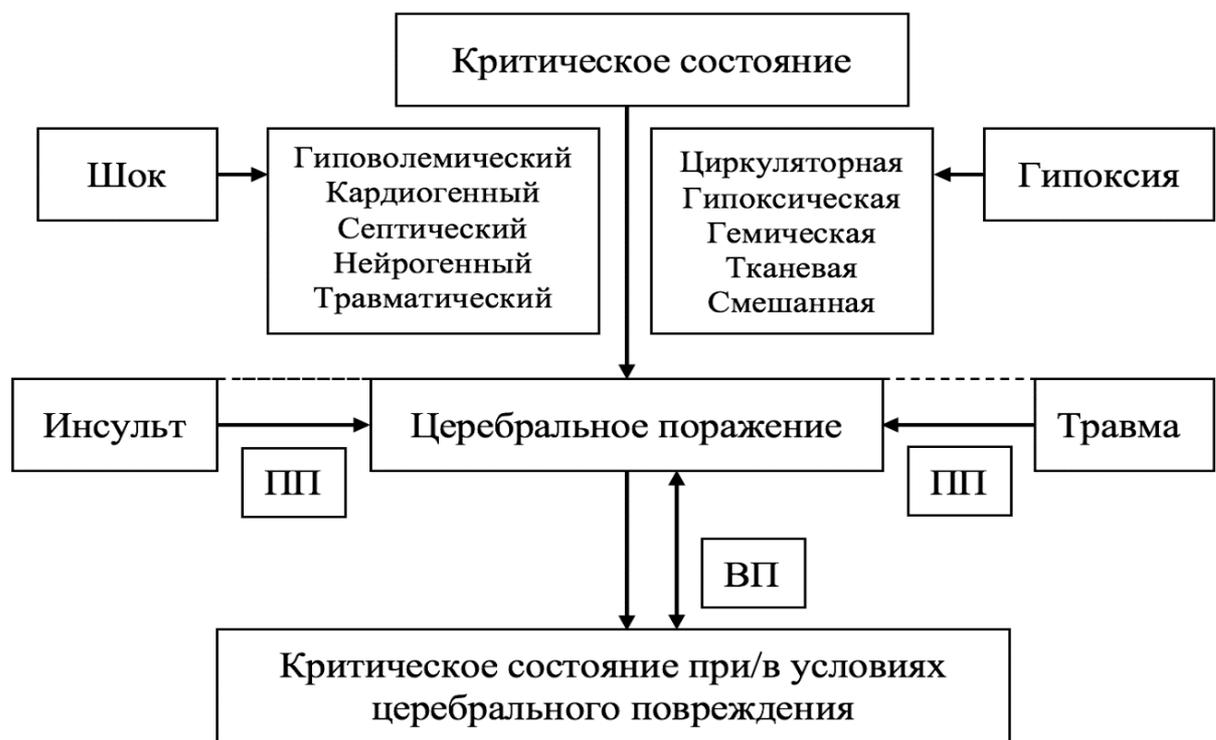


Рисунок 13 – Схематическое представление о взаимосвязности критического состояния и церебрального повреждения. Обозначения: ПП – первичное повреждение мозга (травма, инсульт, гипоксия, шок); ВП – вторичное повреждение мозга (ишемическое/гипоксическое, под действием факторов вторичного повреждения мозга) [6].

Первичное повреждение головного мозга также может возникнуть в результате ишемии, вызванной острым нарушением церебрального кровообращения, или вследствие повреждающего воздействия механической энергии при черепно-мозговой травме (ЧМТ) при исходно нормальном состоянии организма.

Развившись, первичное повреждение мозга вызывает нарушение его центральных регулирующих влияний на системные функции и гомеостаз. Эти повреждения препятствуют процессам саногенеза, стабилизации и восстановления системных функций и гомеостаза, преодолению критического состояния, как при инсульте, так и ЧМТ. Как следствие такого первичного повреждения головного мозга происходит трансформация критического состояния в его особую форму, то есть, в формировании факторов вторичного повреждения мозга. Те же нарушения системных функций и гомеостаза (нарушение системной гемодинамики, газообмена, метаболизма) в условиях нарушенной центральной регуляции ими, воздействуют на уже поврежденный мозг, усугубляя клеточную гипоксию и ишемизацию мозговой ткани, тем самым усиливают тяжесть первичного церебрального поражения.

Ишемия – это типовой патологический процесс, и в различных органах она протекает по универсальным механизмам, финалом которых будет гибель клеток от апоптоза, некроза или аутофагии. Следует отметить, что повреждения на клеточном уровне характеризуются энергетической недостаточностью, вызванной митохондриальным оксидом азота и митохондриальной синтазой оксида азота (mtNOS) [172], свободнорадикальным повреждением, повышением уровня внутриклеточного кальция, внутриклеточными отеками и ацидозом, потерей калия, повышением проницаемости мембран, разрушением четвертичной структуры белков, патологическим апоптозом и др. [79, 120].

Возникающая в ответ на повреждение мозга нейропластическая компенсаторная реакция (ангио-, нейро-, синаптогенез) является недостаточной для восстановления утраченных функций [88]. На тканевом уровне отмечаются эксайтотоксичность, распространяющаяся корковая депрессия, воспаление, эндотелиальная дисфункция и феномен невосстановления кровотока, а несоответствие производства энергии по сравнению с расходами приводят к аксональной дегенерации и нейронной дисфункции или дегенерации (327, 404). На органном уровне – вазоспазм, патологическое тромбообразование, феномен обкрадывания, отек мозга и вклинение (Рисунок 14).



Рисунок 14 – Условная схема ишемического каскада.

Снижение объема мозгового кровотока влечет за собой значительное ограничение поступления кислорода и глюкозы в мозговую ткань. Метаболизм кислорода и глюкозы наиболее нарушен в центральной зоне ишемизированной области, в меньшей степени в демаркационной зоне (Рисунок 15) [300].

Область мозга с наиболее выраженным снижением кровотока (менее 10 мл/100 г/1 мин) очень быстро, в течение 6-8 минут после развития острого нарушения мозгового кровотока, становится необратимо поврежденной («ядро», или «ядерная зона», ишемия). В течение нескольких часов центральная «точка» инфаркта окружена ишемизированной, но живой тканью (с уровнем кровотока выше 20 мл/100 г за 1 мин) - так называемой зоной «ишемической полутени», или penumbra.

В зоне полутени (Рисунок 15, Таблица 23) энергетический обмен сохранен и функционирует, структурных изменений нет, функция нейронов снижена, так как метаболические потребности ткани не обеспечиваются, а клетки мозга остаются жизнеспособными с сохраненным ионным гомеостазом. Поскольку резерв локальной реперфузии исчерпан, нейроны в области полутени становятся чувствительными к любому дальнейшему падению перфузионного давления. Из-за зоны полутени происходит постепенное увеличение размеров инфаркта.

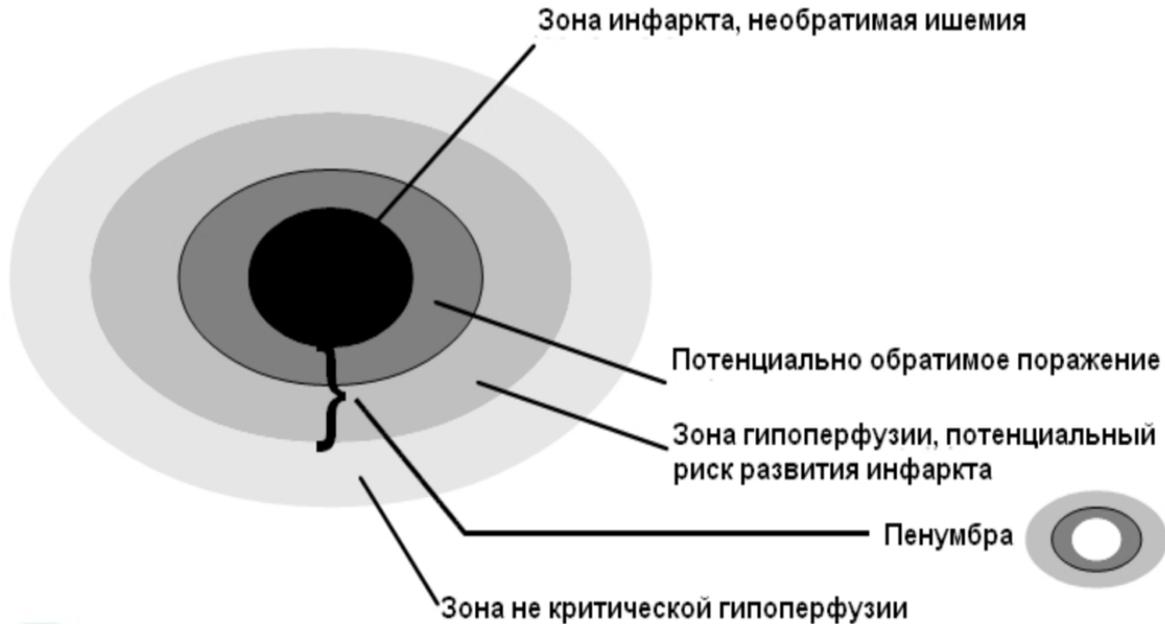


Рисунок 15 – Зоны поражения при инфаркте мозга [300].

Зону «ишемической полутени» можно сохранить путем восстановления адекватного состояния перфузии мозговой ткани и применения нейропротекторных средств. Процессы, происходящие в зоне пенумбры в разных временных точках представлены в таблице (Таблице 23) [6].

Таблица 23 – Нарастающая последовательность процессов клеточно-тканевого повреждения в зоне пенумбры

Длительность ишемии	Патогенез ишемии	
0-3 часа	нарастающий энергетический дефицит	
3-6 часов	глутаматная эксайтотоксичность	
	нарушение Ca^{2+} гомеостаза	нарастающий лактат-ацидоз
12-36 часов	оксидативный стресс, воспаление	
48-72 часа	преобладание процессов апоптоза	
более 72 часов	необратимые морфофункциональные изменения в веществе мозга.	

Собственно, зона ишемической полутени является основной мишенью терапии в первые часы и сутки после развития повреждения головного мозга. Продолжительность существования зоны «полутени» индивидуальна для каждого пациента и определяет границы периода времени, в течение которого терапевтические мероприятия могут быть проведены с наибольшей эффективностью (терапевтическое окно) [61, 62, 300].

Патогенетическая терапия ишемического инсульта имеет два основных направления: реперфузию и нейропротекцию. Реперфузия при острой очаговой ишемии головного мозга дает наибольший эффект в первые минуты развития ОНМК и может быть использована в первые 3-6

часов от начала развития заболевания после обязательной визуализации характера инсульта [195]. Нейропротекция может применяться как в стационаре, так и на догоспитальном этапах лечения без использования нейровизуализации и, несомненно, является одним из наиболее перспективных направлений терапии ОНМК [63, 195].

Среди методов метаболической терапии наиболее перспективными являются: воздействие на нейромедиаторную, рецепторную системы головного мозга с целью нормализации соотношения возбуждающих и тормозных процессов; применение препаратов с нейромодулирующим и нейротрофическим эффектами.

Цитопротекторная терапия является одним из наиболее значимых методов лечения пациентов в остром периоде церебрального инсульта [401]. Основными мишенями цитопротекции являются нейроны, глиальные и эндотелиальные клетки. Целью цитопротекторной терапии является защита клеток в условиях острого ишемического повреждения и повышение репаративных возможностей ткани головного мозга.

На сегодняшний день разработано несколько групп лекарственных средств, обладающих нейропротекторными эффектами. Такими свойствами обладают регуляторы нейромедиаторных систем (глицин), антиоксиданты (мексидол, цитофлавин, винпоцетин), препараты с мембраностабилизирующим действием (цитиколин, глиатилин), препараты с нейромодулирующими свойствами - нейропептиды (церебролизин, семакс и кортексин) [98].

Для устранения патологических процессов, протекающих в ЦНС, основные виды нейропротекции могут быть направлены на:

- нормализацию функциональности регуляторов нейрогенеза — ростовых факторов и нейротрофинов;
- поддержание антиоксидантной системы;
- обеспечение функциональности митохондрий;
- поддержание нейромедиаторного баланса мозга;
- обеспечение кровоснабжения мозга (стимуляция ангиогенеза, увеличение экспрессии сигнального белка - фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF));
- нормализация трансформации стволовых клеток вблизи сосудов;
- предотвращение развития центральной инсулинорезистентности;
- поддержание интенсивности всех фаз нейрогенеза;
- устранение отека мозга, ацидоза, надперекисей и свободных радикалов, воспаления, избыточного инфлюкса Ca^{2+} в нейрон;
- предупреждение демиелинизации нейрона, нарушение синаптической передачи и апоптоза.

4.2. Влияние ФДЭС на устойчивость мозга к критической гипоксии

Антигипоксическая активность ФДЭС исследовалась на беспородных белых мышах на моделях острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии при однократном профилактическом внутрижелудочном введении (раздел 2.2.1.). В качестве препарата сравнения в данной серии исследований использовался сукцинат-содержащий антигипоксикант цитофлавин.

Для сравнения влияния ФДЭС на продолжительность жизни мышей рассчитывали взвешенную среднюю по формуле:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |R_i - T_i|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad [2]$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i \cdot f_i}{\sum f_i}, \quad [3]$$

где: X_i — продолжительность жизни;

X — средняя величина, показывающая, во сколько раз продолжительность жизни превышает контроль,

f_i — повторяемость индивидуальных значений

Антигипоксическую активность ФДЭС³ изучали на трёх моделях: острой нормобарической, острой гемической и острой гистотоксической гипоксии (раздел 2.2.1.).

На модели нормобарической гипоксии³ было проведено исследование антигипоксической активности ФДЭС при однократном пероральном введении нового соединения в широком диапазоне доз от 10 мг/кг до 800 мг/кг и препарата сравнения цитофлавина в дозах 10, 25, 50, 75 и 600 мг/кг (Таблица 24).

Установлено, что ФДЭС во всех исследованных дозах (кроме дозы 500 мг/кг) оказывает антигипоксический эффект, который для доз 10, 75, 300 и 800 мг/кг достигает уровня статистической достоверности.

Различия между уровнем устойчивости животных к гипоксии для этих доз не являлись достоверными, при этом максимальный эффект наблюдали в дозе 75 мг/кг (Таблица 24). Поскольку на модели ОНГ наблюдали лучшую переносимость животными гипоксии для 2 доз исследуемого вещества, то для исследования антигипоксической активности соединений на других гипоксических моделях были выбраны дозы 10 и 75 мг/кг. Как видно из приведенных

³Выражаем глубокую, искреннюю благодарность к.б.н. Титович И.А. за помощь в выполнении исследований (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

данных, антигипоксический эффект препарата проявляется в широком диапазоне доз и практически не зависит от величины дозы.

Таблица 24 – Влияние исследуемых препаратов на переносимость мышами острой нормобарической гипоксии

Группа животных	Доза, мг/кг	Содержание кислорода во вдыхаемом воздухе при наступлении гибели животных, (%)
Контроль	-	4,21±0,18
Цитофлавин	10	4,60±0,08 *
	25	4,54±0,14 *
	50	4,14±0,13
	75	4,76±0,08 *
	100	4,80±0,23*
	200	4,81±0,36
	300	4,78±0,25
	400	4,80±0,49
	500	4,87±0,27*
	600	4,05±0,18
ФДЭС	10	3,72±0,08 *
	25	3,86±0,14 *
	50	4,02±0,07
	75	3,62±0,07 *
	100	3,92±0,32
	200	3,92±0,55
	300	3,66±0,57 *
	400	4,06±0,65
	500	4,35±0,55
	600	3,72±0,52 *
	700	3,90±0,74
	800	3,70±0,62

Примечание: * - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

Антигипоксическая активность исследуемых соединений оценивалась как отношение среднегрупповых концентраций кислорода, вызывающих гибель животных, в контрольной группе к соответствующему значению при приеме анализируемой дозы препарата. Изучены

кривые зависимости «Доза-Эффект» для ФДЭС и препарата сравнения цитофлавина (Рисунок 16).

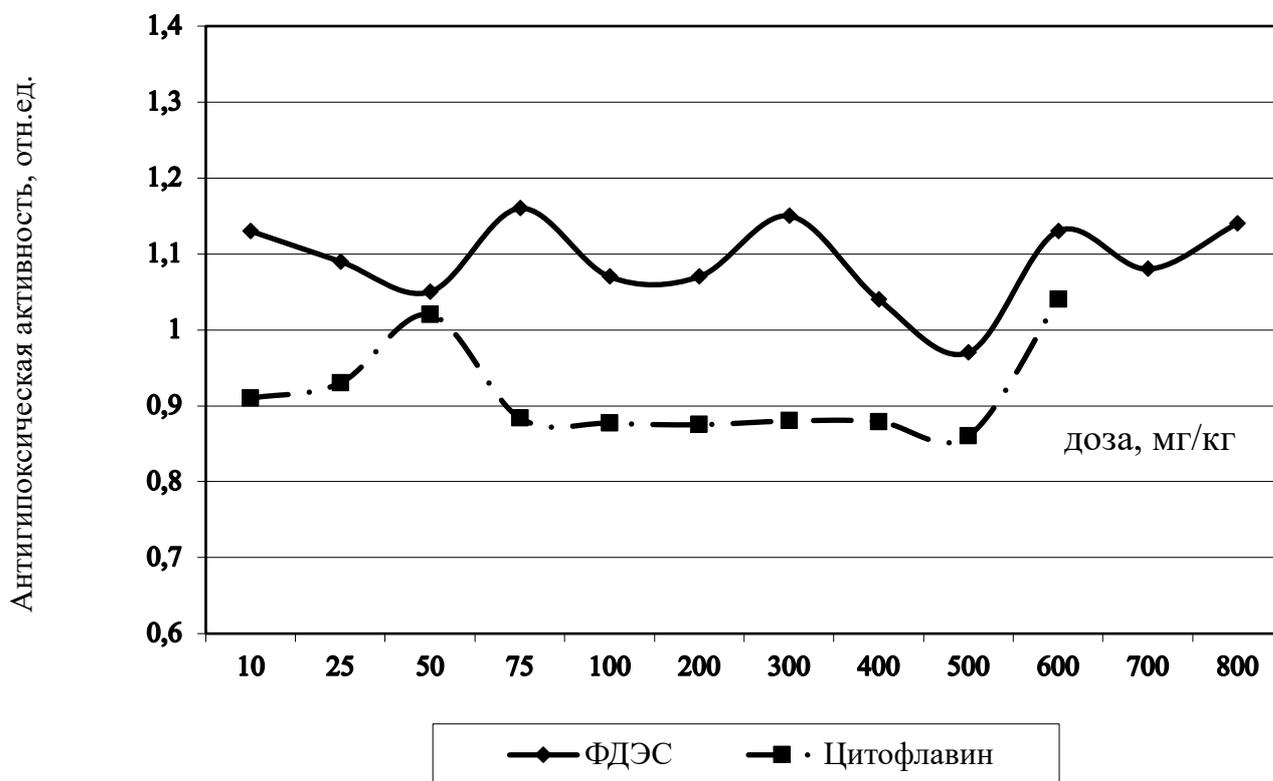


Рисунок 16 – Кривые зависимости «Доза-Эффект» для антигипоксической активности ФДЭС и цитофлавина. Примечание: антигипоксическая активность плацебо в контрольной группе равна 1,0.

Кривая зависимости «Доза-Эффект» для ФДЭС на модели нормобарической гипоксии (рис.16) отражает «плоский» характер зависимости, т.е. увеличение дозы не сопровождается повышением антигипоксической активности. Такая зависимость не соответствует субстратному механизму действия, для которого, типичным является, существенно более высокая активность высоких доз препарата по сравнению с низкими. Вероятно, антигипоксическая активность ФДЭС в основном связана с катионной частью его молекулы.

Препарат сравнения цитофлавин на модели критической нормобарической гипоксии не оказывал антигипоксического действия. При этом тренд направлен на повышение антигипоксической активности в высоких дозах цитофлавина, что является отражением субстратного механизма действия входящего в его состав сукцината.

На модели гемической гипоксии установлено, что антигипоксический эффект ФДЭС носит дозозависимый характер - начинает проявляться в дозе 25 мг/кг и достигает максимума в дозе 75 мг/кг (Таблица 25). ФДЭС в данной дозе увеличивал продолжительность жизни и

выживаемость мышей на 77% и 63% соответственно по сравнению с группой контрольных животных.

По своей антигипоксической активности ФДЭС превосходил препарат сравнения цитофлавин.

Таблица 25 – Влияние ФДЭС на переносимость острой гемической гипоксии

Группа животных, доза	Количество животных	Продолжительность жизни		Выживаемость, %
		М ± m, мин	Δ к контролю, %	
Контроль	16	16,5±1,9	0	0
Цитофлавин, 10 мг/кг	8	13,7±0,6	-17,2	0
Цитофлавин, 25 мг/кг	8	14,6±0,6	-11,5	0
Цитофлавин, 50 мг/кг	8	14,3±1,2	-13,7	0
Цитофлавин, 75 мг/кг	8	17,5±1,2	+5,9	20
Цитофлавин, 600 мг/кг	8	15,6±4,2	-5,6	20
ФДЭС, 10 мг/кг	8	15,1±1,7	-8,5	25
ФДЭС, 25 мг/кг	8	16,9±2,2 *	+2,1	25
ФДЭС, 50 мг/кг	8	20,0±3,0 *	+21,1	38
ФДЭС, 75 мг/кг	8	27,3±3,3 **	+65,0	75

Примечание: * - статистически значимое отличие от контрольной группы (p<0,05),
** - статистически значимое отличие от контрольной группы (p<0,005).

Результаты данной серии исследований на модели острой гистотоксической гипоксии представлены в таблице (Таблица 26).

На модели острой гистотоксической гипоксии было установлено, что ФДЭС в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг увеличивал продолжительность жизни в 1,22 раза и 1,16 раза соответственно и выживаемости мышей на 50 и 38% соответственно по сравнению с контрольной группой мышей.

Таблица 26 – Влияние ФДЭС на переносимость гистотоксической гипоксии

Группа животных	Кол-во животных	Длительность жизни		Выживаемость, %
		М±m, мин	Δ к контролю, %	
Контроль	16	14,7±1,6	0	0
Цитофлавин, 10 мг/кг	8	8,4±0,2	-42,9	0
Цитофлавин, 25 мг/кг	8	10,3±0,8	-29,9	0
Цитофлавин, 50 мг/кг	8	7,3±0,7	-50,0	0
Цитофлавин, 75 мг/кг	8	10,4±1,0	-29,2	0
Цитофлавин, 600 мг/кг	8	20,7±6,4 *	+41,3	60
ФДЭС, 10 мг/кг	8	14,6±1,2	-0,3	0
ФДЭС, 25 мг/кг	8	14,1±2,1	-3,6	25
ФДЭС, 50 мг/кг	8	17,8±1,9 *	+21,8	50
ФДЭС, 75 мг/кг	8	17,0±3,1 *	+15,8	38

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы (p<0,05).

По эффективности ФДЭС (50 мг/кг) превосходил по активности цитофлавин в среднем

дозовом диапазоне (10-75 мг/кг), но уступал в 1,16 раза цитофлаvinу в максимальной субстратной дозе 600 мг/кг.

Для оценки антигипоксической активности препаратов, используя методы статистических обработок, определяли усредненную интегральную активность (УИА) по формуле:

$$\text{УИА} = \sqrt{\frac{a^2 + b^2 + c^2}{3}}$$

где a , b и c – антигипоксическая активность (в относительных единицах) в тестах «нормобарическая гипоксия», «гемическая гипоксия» «гистотоксическая гипоксия» соответственно.

Результаты оценки усредненной интегральной активности представлены в таблице (Таблица 27).

Таблица 27 – Оценка антигипоксической активности ФДЭС и цитофлавина

Соединение	Доза мг/кг	Антигипоксическая активность, отн. ед.			УИА
		ОНГ	ОГГ	ОГтГ	
ФДЭС	10	1,13	0,92	1,0	1,02
	25	1,09	1,02	0,96	1,02
	50	1,05	1,21	1,22	1,16
	75	1,16	1,65*	1,16	1,34*
Цитофлавин	10	0,91	0,83	0,57	0,78
	25	0,93	0,89	0,70	0,85
	50	1,02	0,86	0,50	0,82
	75	0,88	1,06	0,71	0,89

Примечание: антигипоксическая активность плацебо (контрольная группа) равна 1,0.

Интегральная оценка антигипоксической активности нового соединения в трех моделях острой (критической) гипоксии – нормобарической, гемической и гистотоксической, показывает, что новое соединение ФДЭС в дозе 50 мг/кг оказывает умеренный, а в дозе 75 мг/кг - выраженный антигипоксический эффект.

4.3. Оценка нейропротекторного действия

Оценку нейропротекторной активности исследовали при различных ишемических поражениях головного мозга⁴, а именно, «глобальной»⁴ и «фокальной ишемии головного мозга и направленного кортикального удара»⁴

⁴Выражаем глубокую, искреннюю благодарность к.б.н. Титович И.А., к.б.н. Сысоеву Ю.И., заведующему кафедрой фармакологии и клинической фармакологии д.м.н., профессору С.В. Оковитому за помощь и поддержку в выполнении исследований (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

4.3.1. Изучение влияния ФДЭС на выживаемость животных после перевязки общих сонных артерий

На модели глобальной ишемии головного мозга введение исследуемого вещества и препаратов сравнения осуществлялись внутривенно за 30 минут и через 30 минут после операции и далее ежедневно в течение 21 дня.

В настоящем исследовании было установлено, что в условиях перманентной перевязки общих сонных артерий наблюдается гибель животных, наиболее выражена в первые сутки после операции и длящуюся в течение 72 часов. К 7 суткам в живых осталось 33,3%, а к 21-м суткам в живых осталось 25% контрольных крыс (Таблица 28).

Таблица 28 – Влияние исследуемых препаратов на выживаемость крыс после двусторонней необратимой перевязки обеих общих сонных артерий

Группа	Количество животных	Выживаемость, %				
		1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Ложнооперированные	12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Не леченные (контроль)	12	50,0	41,7	33,3	25,0	25,0
ФДЭС 10 мг/кг	12	66,7	58,3	58,3	58,3	58,3
ФДЭС 75 мг/кг	12	66,7	66,7	66,7	66,7 *	66,7 *
Цитофлавин 170 мг/кг	12	50,0	41,7	25,0	25,0	25,0

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы животных ($p < 0,05$).

Введение ФДЭС перед операцией позволило снизить смертность животных в послеоперационном периоде. ФДЭС в дозе 10 мг/кг продемонстрировал статистически незначимую тенденцию к увеличению доли выживших животных на 42% ($p=0,09$), в то время как в дозе 75 мг/кг статистически значимо обеспечил увеличение этого показателя на 33,3% ($p=0,05$). То есть препарат ФДЭС характеризуется нейропротекторным эффектом, определяемым выживаемостью на модели тотальной ишемии головного мозга. Необходимо отметить, что препарат сравнения цитофлавин не оказывал влияния на выживаемость животных при развитии тотальной ишемии мозга.

4.3.2. . Изучение влияния ФДЭС на координаторные функции животных при фокальной ишемии головного мозга

Очаговую ишемию головного мозга моделировали с использованием внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) в соответствии с методом, описанным Longa.

В контрольной группе крыс время удержания на вращающемся стержне (Ротарод) на 21-й день восстановительного послеоперационного периода значительно снизилось в 4,2 раза по сравнению с исходными значениями.

Таблица 29 – Влияние исследуемых препаратов на координацию движений у животных после фокальной ишемии головного мозга (тест Ротарод)

Группа животных	Время удержания на вращающемся стержне, сек	
	Исходный уровень	21 сутки
Ложнооперированные	218,0±17,0	197,0±20,0
Контрольная	202,0±6,0	48,0±9,0 *
ФДЭС, 10 мг/кг	207,0±23,0	138,0±34,0 * **
ФДЭС, 75 мг/кг	219,0±16,0	144,0±24,0 * **
Цитофлавин, 170 мг/кг	196,0±13,0	59,0±17,0 *

Примечание: * - статистически значимое отличие от соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$); ** - статистически значимое отличие от показателя контрольной группы ($p < 0,05$).

В группах животных, получавших ФДЭС в обеих дозах этот показатель снизился в среднем всего в 1,5 раза, существенно отличаясь от значения контрольной группы (Таблица 29).

В условиях патологии (ОСМА) в тесте «Ротарод» препарат сравнения Цитофлавин (доза 170 мг/кг) не оказывал влияния на координацию движений животных.

4.3.3. Изучение влияния ФДЭС на пространственную ориентацию и память животных после фокальной ишемии головного мозга

При проведении теста пространственной ориентации и памяти у ишемизированных лабораторных животных в тесте «Лабиринт Барнс» в контрольной группе животных выявлено как увеличение количества ошибок с 0,8 до 4,6 усл. ед., так и времени выполнения теста с 32 до 79 с, что свидетельствует о чувствительности данной методики к посттравматическим нарушениям ЦНС у животных в остром периоде (Таблица 30).

Таблица 30 – Оценка влияния ФДЭС и препарата сравнения цитофлавина у животных после фокальной ишемии головного мозга на способность к обучению их и пространственную память (тест «Лабиринт Барнс»)

Группа, доза	5-й день		12-й день	
	Ошибки, у.е.	Время, сек	Ошибки, у.е.	Время, сек
Ложнооперированные	0,8±0,3	32,2±5,4	0,9±0,2	28,4±4,7
Контрольная	4,6±1,1 *	79,7±5,0 *	3,6±0,6 *	64,8±6,0 *
ФДЭС, 10 мг/кг	2,1±0,5 **	47,3±8,6 **	0,9±0,4 **	42,3±7,5 **
ФДЭС, 75 мг/кг	2,3±0,4 **	50,5±8,0 **	2,1±0,3 **	45,9±7,7 **
Цитофлавин 170 мг/кг	4,5±0,5 *	66,8±7,7 *	3,4±0,4 *	60,8±7,4 *

Примечание: * - статистически значимое отличие от соответствующего показателя ложнооперированных животных ($p < 0,05$); ** - статистически значимое отличие от показателя контрольной группы ($p < 0,05$).

В группах животных, принимавших ФДЭС (дозы 10 или 75 мг/кг), на 5-й день после ишемии наблюдали значительное сокращение времени, необходимого для поиска норки («target

вох»), на 35-40% (при $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Индексы защиты для ФДЭС был равен 0,68 (доза 10 мг) и 0,61 (доза 75 мг/кг). Кроме того, животные из этих групп допускали меньше ошибок при выполнении данного теста.

Для цитофлавина в дозе 170 мг/кг защитное действие на 5 и 12 сутки после ОСМА в тесте «Лабиринт Барнс» не определялось (Таблица 30).

На 12 день после ишемии во всех группах были отмечены достоверные позитивные изменения времени, требуемого для нахождения норки в группах животных, а также снижение ошибок, по сравнению с 5 сутками после перевязки сонных артерий.

Наилучший результат по влиянию на когнитивные функции на 12 сутки продемонстрировало исследуемое вещество в дозе 10 мг/кг, которое способствовало полной нормализации показателя ошибочных действий. Необходимо отметить, что темп этих изменений не имел статистических отличий от результатов, характерных для группы контроля.

Таким образом, в тесте «Лабиринт Барнес» установлено, что ФДЭС (доза 10 мг/кг) способствует сокращению времени нахождения «безопасной» норки крысами, что свидетельствует на активацию у таких животных когнитивных процессов в условиях обучения. Для дозы 75 мг/кг степень позитивного действия была выражена несколько слабее.

4.3.4. Изучение влияния ФДЭС на модели фокальной черепно-мозговой травмы

В фоновом периоде и по окончании восстановительного периода (21 день) у животных с фокальной черепно-мозговой травмой¹ проводили тесты «Сужающаяся дорожка» и «Цилиндр».

Оценка неврологического дефицита проводилась с помощью теста «Стимулирование конечностей» через 24 часа после операции и далее на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки (Таблица 31). Также оценивали объем травматического поражения головного мозга.

Тест «Стимулирование конечностей» выявил уменьшение неврологического дефицита после ЧМТ у животных, получавших ФДЭС. Исследуемый препарат в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг в первые сутки после травмы головного мозга снижал неврологический дефицит у крыс в 3 раза и 3,1 раза соответственно по сравнению с контрольной группой крыс.

Тенденция к снижению неврологического дефицита сохранялась у данных групп животных до конца эксперимента в равной степени для обеих доз препарата: на 3-й день - в 1,6 раза и 1,5 раза соответственно, на 7-й день - в 1,9 раза и 1,86, и на 14-й день в 1,6 раза и 1,56 раза соответственно по сравнению с группой контроля (Таблица 31).

К 21-му дню ФДЭС практически полностью устранял неврологический дефицит у крыс, развивающийся после фокальной ЧМТ. По эффективности исследуемое вещество было сопоставимо с препаратами сравнения пирацетамом и цитофлавином.

Таблица 31 – Влияние ФДЭС на сенсомоторные функции животных, выживших после очаговой черепно-мозговой травмы, в тесте «Стимуляция конечностей»

Группа	Продолжительность лечения				
	1-й день	3-й день	7-й день	14-й день	21-й день
Ложнооперированные	14,0±0,0**	14,0±0,0**	14,0±0,0**	14,0±0,0**	14,0±0,0**
Контроль	2,8±0,4*	6,2±0,7*	6,4±0,5*	8,3±0,5*	10,5±0,5*
ФДЭС 10 мг/кг	6,3±0,4*.*	9,8±0,5*.*	11,9±0,5*.* *	13,5±0,3 *.*	13,7±0,2**
ФДЭС 75 мг/кг	6,4±0,4*.*	9,2±0,5*.*	11,8±0,5*.* *	12,9±0,4*.* *	13,0±0,3*.*
Пирацетам 900 мг/кг	5,4±0,5*.*	8,5±1,2*.*	10,9±0,3*.* *	13,0±0,3*.* *	13,1±0,3*.*
Цитофлавин 170 мг/кг	5,2±0,5*.*	9,2±0,5*.*	11,8±0,4*.* *	13,3±0,3*.* *	13,5±0,2*.*

Примечание: * - статистически значимое отличие от группы ложнооперированных животных ($p < 0,05$), ** - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$).

Снижение неврологического дефицита отражает процесс реабилитации после травмы мозга, скорость которого может быть охарактеризована как тангенс угла наклона регрессионной кривой восстановления сенсомоторных функций животных.

Уровень неврологического дефицита на конкретный момент восстановительного периода определяется как отношение разницы между фактическим значением показателя сенсомоторных функций в тесте «Стимулирование конечностей» и максимально возможным значением этого показателя (равным 14), к этому значению и выражается в процентах.

Динамика неврологического дефицита на фоне введения животным исследуемого соединения и препаратов сравнения представлена на рисунке (Рисунок 17).

Анализ рисунка (Рисунок 17) показывает, что наиболее выраженное различие исследуемого соединения и препаратов сравнения от контрольной (не леченной) группы животных определяется в первые сутки после травмы, что связано с нейропротекторным действием препаратов при их введении за 30 минут до нанесения дозированной ЧМТ.

Расчеты показывают, что примерно треть (35-36%) возникающего после ЧМТ неврологического дефицита может быть компенсировано профилактическим однократным введением ФДЭС вне зависимости от дозы препарата. Последующее введение исследуемых препаратов, как следует из рисунка 17, поддерживало достигнутое нейропротекторное действие (меньшая степень повреждения мозга при дозированной травме), но не оказывало стимулирующего влияния на процессы восстановления сенсомоторных функций конечностей животных. Это заключение подтверждается расчетом регрессионных функций, значения углового коэффициента которых находится в диапазоне от 0,29 до 0,36 балл/сутки и не

отличается от такового для группы контроля (0,35 балл/сутки). Нейропротекторная активность препаратов сравнения была несколько ниже (26-28%).

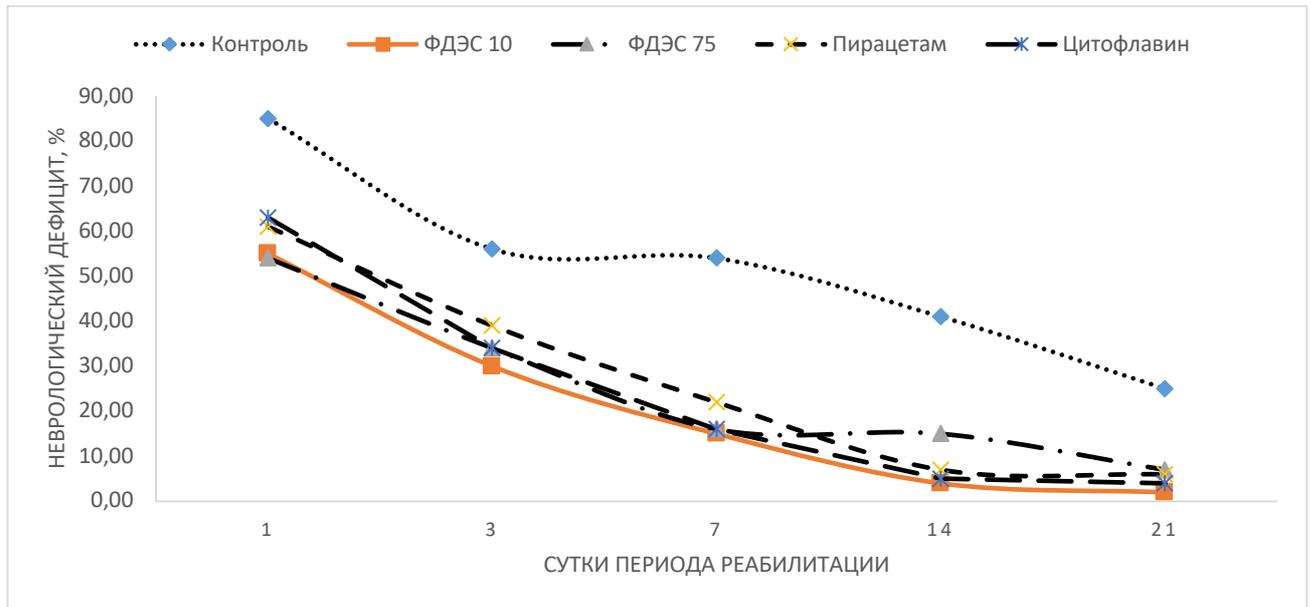


Рисунок 17 – Динамика неврологического дефицита в периоде реабилитации после дозированной фокальной черепно-мозговой травмы

Количественную оценку этого нейропротекторного эффекта можно выполнить путем расчета индекса защиты (ИЗ), который показывает, в какой степени изменения, возникающие в результате побочных эффектов в контрольной группе, компенсируются приемом исследуемого препарата. Значения этого показателя, определенные по показателю сенсомоторной функции конечностей животных на 1-й день реабилитационного периода для исследуемых соединений (Рисунок 18).

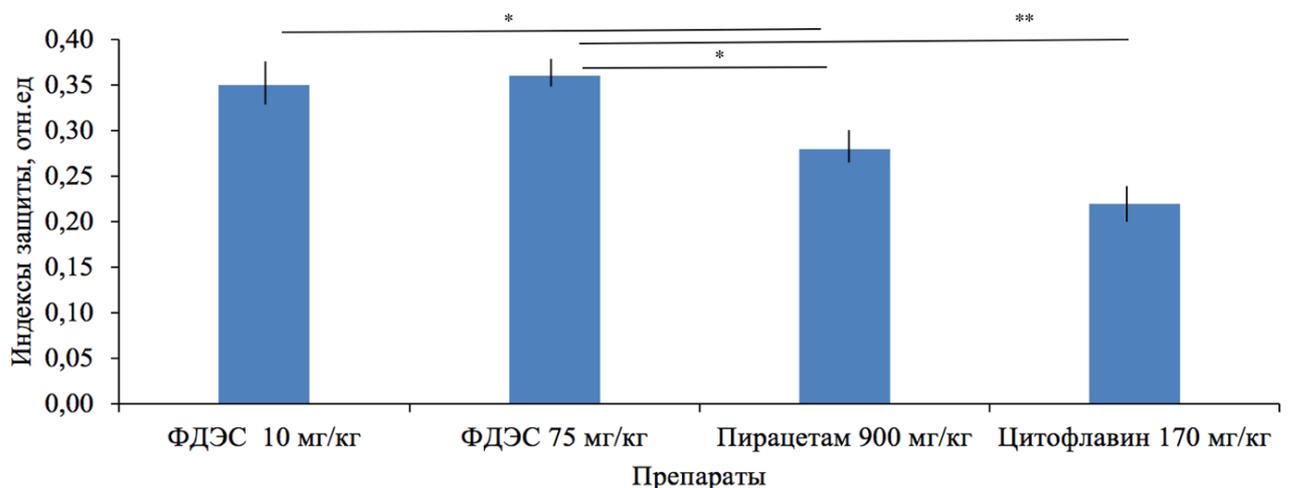


Рисунок 18 – Индексы защиты исследуемых соединений при профилактическом введении за 30 мин до нанесения дозированной черепно-мозговой травмы лабораторным животным.

Установлено, что ИЗ был ниже у пираретама и цитофлавина в 0,8 раза и 1,4 раза соответственно по сравнению с ИЗ ФДЭС.

В тесте «Цилиндр» на 21-й день после ЧМТ у крыс всех групп уменьшилось использование левой лапы (которая находится контрольной стороной к поврежденному полушарию головного мозга) (Таблица 32).

У животных контрольной группы оно снижалось на 30%, что является статистически достоверным признаком фокального повреждения мозга при ЧМТ.

Таблица 32 – Влияние курсового введения ФДЭС и препаратов сравнения на частоту использования передней контролатеральной участку травмы конечности животными в тесте «Цилиндр»

№ п/п	Группа, доза	Использование контролатеральной конечности, % попыток		
		до ЧМТ	на 21 сутки после ЧМТ	
		М±m	М±m	Δ к исходному
1.	Ложнооперированные	45,2±0,7	43,3±0,8	-1,9
2.	Контроль	46,6±1,1	17,2±1,2	-29,4 *
3.	ФДЭС 10 мг/кг	46,8±1,5	32,0±2,5	-15,2 **
4.	ФДЭС 75 мг/кг	44,4±1,4	21,0±2,2	-23,4 *
5.	Пираретам 900 мг/кг	45,6±2,1	25,0±2,6	-20,6 *
6.	Цитофлавин 170 мг/кг	45,2±2,1	29,4±2,2	-15,8 **

Примечание: * - статистически значимое отличие от ложнооперированной группы ($p < 0,05$); ** - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$).

У животных с ишемическим повреждением головного мозга, которым вводили ФДЭС в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг, использование левой лапы было возможным в 31,5% попыток, что на 15% выше, чем в группе контрольных (не леченных) животных. При этом степень снижения по сравнению с исходным уровнем теряет статистическую достоверность, что свидетельствует о более полном восстановлении моторной функции.

При расчете индекса защиты (ИЗ) по показателю использования контролатеральной зоне фокальной ЧМТ конечности было установлено, что для ФДЭС (доза 10 мг/кг) он был равен 0,50 (т.е. препарат при курсовом приеме через 21 день восстановительного периода в 2 раза снижал негативное влияние травмы на этот показатель).

Для ФДЭС в дозе 75 мг/кг и препаратов сравнения пираретама и цитофлавина этот эффект был выражен слабее. Так, для ФДЭС (доза 75 мг/кг) ИЗ=0,13, для пираретама в дозе 900 мг/кг ИЗ=0,27, для цитофлавина в дозе 130 мг/кг ИЗ=0,40. Для ФДЭС (доза 10 мг/кг) и цитофлавина (доза 170 мг/кг) защитное действие было статистически значимым.

Признаком посттравматического сенсомоторного дефицита, проявляющегося дискоординацией постановки лап животных при ходьбе в тесте «Сужающаяся дорожка», является увеличение доли соскальзывания контролатеральных по отношению к очагу поражения

мозга лап крысы с опоры. При этом при малых размерах очага поражения или их легкой степени может выявляться продольная асимметрия (разница между координаторной функцией передних и задних лап).

В нашем исследовании, выполненном на 21 сутки восстановительного периода, такая асимметрия не выявлялась, что позволило объединить данные, полученные для передних и задних лап в единый показатель сенсомоторного дефицита, который выражался в процентах от общего количества выполненных животных движений лапами (Таблица 33).

Таблица 33 – Влияние ФДЭС и препаратов сравнения на степень выраженности сенсомоторного дефицита контролатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 21-е сутки

Группа, доза	% ошибок постановки лап		ИЗ
	М±m	М±m	
Ложнооперированные	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,3	-
Контроль (не леченные)	3,2 ± 0,2	34,2 ± 0,6 *	0
ФДЭС 10 мг/кг	2,9 ± 0,2	19,0 ± 0,6 * **	0,49
ФДЭС 75 мг/кг	3,5 ± 0,2	23,4 ± 0,8 *	0,35
Пирацетам 900 мг/кг	4,5 ± 0,7	21,2 ± 0,9 *	0,42
Цитофлавин 170 мг/кг	3,6 ± 0,2	21,0 ± 0,6 * **	0,43

Примечание: * - статистически значимое отличие от ложнооперированной группы ($p < 0,05$);

** - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$).

Проведенное исследование показало, что в тесте «Сужающаяся дорожка» спустя 21 день после фокального травматического поражения головного мозга у крыс выявляется отчетливый сенсомоторный дефицит, проявляющийся увеличением на 30% доли ошибок в постановке лап травмированных животных.

Анализ индексов защиты показывает, что все исследуемые соединения при курсовом применении обладают близкими защитными свойствами относительно этого показателя, причем защитное действие ФДЭС в дозе 10 мг/кг и цитофлавина в дозе 170 мг/кг было статистически достоверным.

Нами полученные данные по влиянию ФДЭС на неврологические показатели крыс, вызванные дозированным кортикальным ударом, были сопоставимы с ранее полученными результатами Сысоева Ю.И. и соавторов [205].

Далее была проведена оценка объема очага поражения головного мозга, вызванного с помощью фокальной дозированной черепно-мозговой травмы (Таблица 34).

У крыс после ЧМТ, которым за 30 минут до операции вводили новое исследуемое соединение в дозе 10 и 75 мг/кг, наблюдали статистически значимое уменьшение очага повреждения головного мозга в 1,54 раза ($p < 0,05$) и 1,38 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с животными контрольной группы.

Цитофлавин и пирацетам снижали этот показатель в 1,3 раза ($p<0,05$) и 1,2 раза ($p<0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

Таблица 34. – Влияние курсового применения ФДЭС и препаратов сравнения на развитие травматического очага поражения головного мозга крыс

Группа. доза	Размер поражения мозга		
	$M \pm m, \text{мм}^3$	Δ к контролю, мм^3	к контролю, %
Ложнооперированная	0,00±0,00	-	-
Контрольная	310,27±8,06 *	0	100,00
ФДЭС, 10 мг/кг	201,46±9,54 * **	- 108,81	64,90
ФДЭС, 75 мг/кг	225,86±11,34 * **	- 84,60	82,46
Цитофлавин 170 мг/кг	245,85±11,54 * **	- 64,42	79,24
Пирацетам 900 мг/кг	255,08±10,91 * **	- 55,19	82,21

Примечание: * - статистически значимое отличие от ложнооперированной группы ($p<0,05$); ** - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p<0,05$).

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ФДЭС НА ПОВЕДЕНИЕ И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В настоящем исследовании методики «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) были применены для изучения влияния препарата на поведение животных. В условиях автоматической регистрации в тесте ОП регистрируются 8 первичных показателей, в тесте ПКЛ – 12. При этом даже для совпадающих показателей, определяемых в двух этих тестах на одних и тех же этапах исследования, отсутствует корреляционная связь (коэффициенты корреляции находятся в диапазоне 0,10-0,15), что не позволяет исключить их из анализа. Анализировать их по отдельности во многом представляется не рациональным, но в то же время какой-либо методики интегральной оценки поведенческой активности животных не существует.

В связи с этим нами была предпринята попытка формирования обобщающих (комплексных) показателей для оценки спонтанного поведения животных в тестах ОП и ПКЛ. Для этого первичные результаты, полученные у интактных животных на этапе рандомизации, были подвергнуты мультифакторному анализу, позволяющему конструировать обобщающие показатели (факторы) по принципу общности закономерных взаимосвязей.

Последовательное наращивание факторов позволило выявить 3 комплексных фактора для теста ОП и 4 фактора для теста ПКЛ (Таблицы 35, 36).

Таблица 35 – Комплексные факторы поведения животных в тесте ОП (достоверные весовые коэффициенты для нормированных первичных показателей)

Показатель	2-хфакторная модель		3-хфакторная модель		
	F1	F2	F1	F2	F3
Горизонтальная активность	+0,80		+0,81		
Вертикальная активность	+0,88		+0,87		
Заглядывания за край	+0,60		+0,60		
Дефекация		+0,54			+0,59
Уринация		+0,75		+0,77	
Реакция на захват					+0,72
Реакция на хлопок		-0,53			-0,54
Грумминг		-0,71		-0,79	
Значимость фактора	0,26	0,22	0,26	0,21	0,16
Значимость модели	0,48		0,73		

Следовательно, для интерпретации теста ОП может быть использована трехфакторная модель. При этом 1-й фактор (F1) объединяет с одним знаком показатели локомоторной активности (горизонтальную, вертикальную активность и количество заглядываний), что позволяет интерпретировать его как фактор поведенческой активности.

2-й фактор (F2) объединяет показатели груминга и уринаций с противоположным знаком, что позволяет его интерпретировать как фактор психоэмоционального комфорта.

3-й фактор (F3) объединяет с положительным знаком показатели эмоциональной лабильности (дефекации, и реакции на захват) и с отрицательным знаком – реакцию на хлопок, что позволяет интерпретировать его как фактор эмоционального реагирования.

Следовательно, комплексная оценка поведения животных в тесте ПКЛ возможна с использованием 4-факторной модели.

При этом 1-й фактор, определяющий 34% дисперсии поведения животных, объединяет со знаком плюс время пребывания в открытом и закрытом рукавах лабиринта, количество заходов в закрытый рукав, выглядываний и стоек, и с отрицательным знаком – количества свисаний. Этот фактор может быть определен как фактор поведенческой активности для теста ПКЛ.

2-й фактор объединяет со знаком плюс латентный период первого захода в открытый рукав, и со знаком минус – количество заходов в открытый рукав. Этот фактор может быть интерпретирован как фактор стрессового угнетения ЦНС.

Таблица 36 – Комплексные факторы поведения животных в тесте ПКЛ (достоверные весовые коэффициенты для нормированных первичных показателей)

Показатель	2-факторная модель		3-факторная модель			4-факторная модель			
	F1	F2	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F4
Вр ЦП		+0,60		+0,51					-0,84
Вр ЗР	+0,91		+0,89			+0,89			
Вр ОР	+0,94		+0,93			+0,92			
ЛП ПЗ ОР		-0,58		-0,67			+0,92		
Выглядываний за край	+0,86		+0,88			+0,82			
Стойки			+0,50			+0,51			
Свисания	-0,71		-0,66			-0,65			
Уринации					-0,70			+0,85	
Дефекация					-0,72			+0,78	
Груминг									+0,68
КЗ ОР		+0,77		+0,88			-0,91		
КЗ ЗР	+0,75		+0,77			+0,77			
Значимость фактора	0,35	0,15	0,34	0,16	0,14	0,34	0,16	0,13	0,12
Значимость модели	0,50		0,64			0,75			

3-й фактор объединяет с одним знаком показатели эмоциональной вегетативной лабильности (уринации и дефекации). 4-й фактор объединяет со знаком плюс показатель зоосоциального комфорта (груминг) и со знаком минус показатель мотивационного конфликта

(Вр ЦП). Это позволяет интерпретировать этот фактор как фактор комфортности состояния животных.

Комплексные факторы рассчитываются с использованием Z-оценок конкретных показателей, нормирование которых проводится по группе интактных животных:

$$Z_{xi}=(X_i-M_x)/\sigma_x, \text{ где}$$

X_i – первичное значение показателя X для i-наблюдения,

M_x – среднегрупповое значение показателя X для интактной группы,

σ_x – среднеквадратичное отклонение для показателя X.

Полученные значения Z-баллов показателей имеют распределение со средним значением, равным 0, и дисперсией, равной 1.

Для комплексных факторов, рассчитанных для интактной группы, среднее значение будет равно нулю, а дисперсия будет характеризовать их популяционную вариативность. При совместном комплексном анализе рассчитываются 7 обобщающих факторов (Таблица 37).

Таблица 37 – Комплексные факторы оценки поведения животных по тестам ОП и ПКЛ

Фактор	Название	Уравнение расчета
Тест ОП		
F1	Поведенческой активности в тесте ОП	$F1=0,81*GA+0,87*BA+0,60*Загл$
F2	Психоэмоциональная комфортность	$F2=0,79*Гр-0,77*Урин$
F3	Эмоциональное реагирование	$F3=0,59*Деф+0,72*Захв-0,54*Хл$
Тест ПКЛ		
F4	Поведенческой активности в тесте ПКЛ	$F4=0,89*ВрЗР+0,92*ВрОР + 0,82*Выгл+0,51*Стойки + 0,77*КЗЗР - 0,65*Свис$
F5	Стрессовое угнетение ЦНС	$F5=0,65*ЛП-0,91*КЗОР$
F6	Вегетативная лабильность	$F6=0,85*Урин+0,78*Деф$
F7	Комфортность	$F7=0,68*Гр-0,84*ВрЦП$

Обозначения показателей: GA – горизонтальная активность, BA – вертикальная активность, Загл – число заглядываний, Деф – дефекации, Урин – уринации, Захв – реакция на захват, Хл – реакция на хлопок, Гр – груминг, ВрЦП – время пребывания на центральной площадке, ВрЗР – время пребывания в закрытом рукаве, ВрОР – время пребывания в открытом рукаве, ЛП – латентный период первого захода в открытый рукав, Выгл – количество выглядываний, Стойки – количество стоек, Свис – количество свисаний.

Оценка стабильности показателей комплексных поведенческих факторов показала, что при повторном тестировании с недельным интервалом (Таблица 38) значения факторов F1 (Поведенческой активности в тесте ОП), F2 (Психоэмоциональная комфортность в тесте ОП) и F6 (Вегетативная лабильность) понижались, а по факторам F3 (Эмоциональное реагирование), F4 (Поведенческой активности в тесте ПКЛ), F5 (Стрессовое угнетение ЦНС) и F7 (Комфортность) повышались.

Таблица 38 – Динамика значений комплексных поведенческих факторов в группе контрольных животных при повторном тестировании с недельным интервалом (число наблюдений 19)

Фактор	Стабильность значений	Повышение	Понижение
F1	1	2	16 ***
F2	3	2	14 ***
F3	8	9 **	2
F4	4	11 **	4
F5	3	13 **	3
F6	0	6	13 *
F7	2	13 **	4

Примечание: Динамика показателей статистически достоверна по критерию знаков. * - $p < 0,1$; ** - $p < 0,05$; *** - $p < 0,01$

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показателей комплексных поведенческих факторов в группе животных по фактору «кратность повторного приема» представлены в таблице (Таблица 39).

Таблица 39 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа динамики комплексных поведенческих факторов в группе контрольных животных по контролируемому фактору «кратность тестирования»

Поведенческий фактор	Центроиды групп в зависимости от кратности тестирования				Коэффициент детерминации, D	Достоверность, $p =$
	1	2	3	4		
F1	0	-1,2	-2,4	0,04	0,24	0,006
F2	0	0,05	-0,9	-1,1	0,12	0,12
F3	0	0,39	0,70	0,55	0,07	0,38
F4	0	1,06	0,64	0,21	0,04	0,58
F5	0	0,73	2,0	1,77	0,25	0,005
F6	0	0,20	-0,31	-0,26	0,02	0,86
F7	0	1,8	0,9	-0,42	0,17	0,04

Примечание: выделены шрифтом комплексные факторы, максимально чувствительные с кратности тестирования.

Динамика значений центроидов подгрупп в зависимости от кратности тестирования подтверждает, что комплексный фактор F1 (поведенческая активность в тесте ОП) отражает реакцию животных на новизну обстановки тестирования, и закономерно снижается при повторном выполнении этого теста. Однако сам факт длительного участия животных в исследовании оказывает в целом слабое негативное влияние на состояние животных (снижение фактора комфортности к концу исследования (факторы F2 и F7) ниже уровня группы интактных животных, повышение значений фактора F5 (стрессовое угнетение ЦНС).

Динамика факторов F4 (поведенческая активность в тесте ПКЛ) и F6 (вегетативная лабильность), характеризующаяся как повышение значений при втором тестировании и с

постепенным приближением к уровню интактных животных свидетельствует о достаточно быстрой адаптации поведения животных в условиях повторного тестирования.

5.1. Влияние ФДЭС на поведение

5.1.1. Влияние ФДЭС на спонтанное поведение здоровых лабораторных животных

Результаты действия однократного внутрижелудочного введения исследуемого соединения (ФДЭС) в дозах 10 и 75 мг/кг на комплексные показатели спонтанного поведения животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в таблице (Таблица 40), а обозначения показателей и формулы их расчета представлены в Таблице 38.

Анализ данных таблицы 40 показывает, что поведение животных контрольной группы по ряду показателей отличается от интактных животных, что объясняется как фактом повторного тестирования с потерей новизны обстановки для животных (снижение комплексного показателя поведенческой активности как для теста ОП, так и для теста ПКЛ), так и следовыми изменениями после стрессового для животных зондового внутрижелудочного введения плацебо (появление стрессового угнетения ЦНС, снижение комфортности состояния, повышение эмоционального реагирования и вегетативной лабильности). Эти влияния не только являются статистически достоверными, но и существенными по своему воздействию на поведение животных, так как расчет коэффициентов детерминации показал, что от 15 до 55 % всей вариативности комплексных показателей связаны с эффектом тестирования.

Применение ФДЭС (доза 10 мг/кг) проявлялось в сравнении с плацебо-контролем повышением поведенческой активности в тесте ОП (коэффициент детерминации $D=0,20$, $p=0,03$) или меньшим ее угнетением в тесте ПКЛ, менее выраженным ростом показателя эмоционального реагирования в тесте ОП (коэффициент детерминации $D=0,14$, $p=0,09$).

Необходимо отметить, что показатель психологического комфорта в тесте ОП при этом снижались (в тесте ПКЛ – менее интенсивно, чем в контрольной группе).

Введение препарата ФДЭС в более высокой дозе (75 мг/кг) проявлялось только снижением стрессовой реактивности организма животных (УРПИ) снижение эмоциональной реакции (ОП), вегетативной лабильности (УРПИ), менее выраженное стрессовое угнетение центральной нервной системы (УРПИ) по сравнению с контрольной группой.

Результаты влияния короткого курсового (14 дней) перорального введения исследуемого соединения (ФДЭС) в дозах 10 и 75 мг/кг на комплексные показатели спонтанного поведения животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены

в таблице (Таблица 40), а обозначения показателей и формулы их расчета представлены в ранее (Таблица 34).

Таблица 40 – Комплексные показатели спонтанного поведения животных в тестах «Открытое поле» и Приподнятый крестообразный лабиринт» через 1 час после однократного введения ФДЭС (у.е., $M \pm m$)

Комплексный показатель	Интактная группа	Контрольная группа	ФДЭС 10 мг/кг	ФДЭС 75 мг/кг
Тест «Открытое поле»				
Поведенческая активность	$0,01 \pm 0,32$	$-0,49 \pm 0,74$	$+1,66 \pm 0,60$ (** p=0,03)	$+0,22 \pm 0,87$
Психологический комфорт	$0,01 \pm 0,19$	$-0,56 \pm 0,26$	$-1,32 \pm 0,41$ (** p=0,02)	$-0,48 \pm 0,22$
Эмоциональное реагирование	$0,00 \pm 0,17$	$+2,59 \pm 0,37$ (* p=10 ⁻¹¹)	$+1,57 \pm 0,43$ (** p=0,09)	$+0,48 \pm 0,30$ (** p=0,0004)
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»				
Поведенческая активность	$0,00 \pm 0,32$	$-2,80 \pm 0,51$ (* p=10 ⁻⁴)	$-1,44 \pm 0,60$	$-1,41 \pm 0,71$
Стрессовое угнетение ЦНС	$0,00 \pm 0,26$	$+2,03 \pm 0,55$ (* p=0,03)	$+2,00 \pm 0,70$	$+1,41 \pm 0,65$
Вегетативная лабильность	$0,00 \pm 0,21$	$+2,63 \pm 0,59$ (* p=10 ⁻⁵)	$+2,20 \pm 1,12$	$+0,29 \pm 0,62$ (** p=0,02)
Комфортность состояния	$0,00 \pm 0,19$	$-2,24 \pm 1,33$ (* p=0,01)	$-1,63 \pm 1,05$	$-1,67 \pm 0,63$

Примечания: Отличия между группами статистически значимы (метод дисперсионного анализа ANOVA) * - по отношению к интактной группе, ** - по отношению к контрольной группе.

Анализ полученных данных (Таблица 41) показывает, что поведение животных контрольной группы при курсовом введении в меньшей степени, чем при однократном, отличается от интактных животных, что отражает процесс частичной адаптации их к условиям двухнедельного исследования.

Тем не менее, для контрольной группы было характерно снижение поведенческой активности в тестах ОП и ПКЛ, формирование стрессового угнетения ЦНС в тесте ПКЛ, повышение уровня эмоционального реагирования в тесте ОП.

Значения показателя вегетативной лабильности и комфортности состояния, в отличие от условий однократного исследования, почти не отличались от группы интактных животных.

Короткое курсовое применение препарата ФДЭС (доза 10 мг/кг) не оказывало существенного влияния на поведение животных в тестах ОП и ПКЛ. Единственный комплексный показатель, в отношении которого было выявлено статистически значимое различие с контрольной группой – это показатель комфортности состояния животных в тесте ОП.

Таблица 41 – Комплексные показатели спонтанного поведения животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» через 2 недели короткого курсового введения ФДЭС (у.е., $M \pm m$)

Комплексный показатель	Интактная группа	Контрольная группа	ФДЭС 10 мг/кг	ФДЭС 75 мг/кг
Тест «Открытое поле»				
Поведенческая активность	$0,01 \pm 0,32$	$-1,29 \pm 0,46$ (* $p=0,06$)	$-1,20 \pm 0,56$	$-1,79 \pm 0,39$
Психологический комфорт	$0,01 \pm 0,19$	$-0,06 \pm 0,26$	$+0,09 \pm 0,23$	$+0,56 \pm 0,15$ (** $p=0,05$)
Эмоциональное реагирование	$0,00 \pm 0,17$	$+0,67 \pm 0,40$ (* $p=0,08$)	$+0,44 \pm 0,21$	$+0,55 \pm 0,25$
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»				
Поведенческая активность	$0,00 \pm 0,32$	$-0,80 \pm 0,55$	$-1,06 \pm 0,66$	$-0,79 \pm 0,36$
Стрессовое угнетение ЦНС	$0,00 \pm 0,26$	$+1,90 \pm 0,72$ (* $p=0,03$)	$+1,49 \pm 0,61$	$+0,84 \pm 0,46$
Вегетативная лабильность	$0,00 \pm 0,21$	$+0,15 \pm 0,67$	$+0,25 \pm 0,38$	$-0,64 \pm 0,20$
Комфортность состояния	$0,00 \pm 0,19$	$+0,59 \pm 0,41$	$+1,09 \pm 0,26$	$+0,80 \pm 0,20$

Примечания: Отличия между группами статистически значимы (метод дисперсионного анализа ANOVA) * - по отношению к интактной группе, ** - по отношению к контрольной группе.

Введение ФДЭС (доза 75 мг/кг) показывает умеренное статистически значимое повышение показатель комфортности состояния животных в тесте ОП ($p=0,05$, коэффициент детерминации $D=0,18$). Отмечалось также тенденция к снижению вегетативной лабильности, но выраженность этого эффекта была незначительной.

5.1.2. Влияние курсового введения ФДЭС на спонтанное поведение животных при создании ишемии головного мозга

Нарушения мозгового кровообращения, приводящие к развитию нарушений поведения и когнитивных функций, являются одним из самых частых показаний к применению ноотропных средств. Поэтому для оценки возможного ноотропного действия новых соединений необходимо выполнить оценку поведения и когнитивных функций⁵ не только в обычных условиях, но и при моделировании нарушений мозгового кровообращения.

⁵Выражаем глубокую, искреннюю благодарность за помощь и поддержку в проведении исследования к.б.н. Титович И.А. (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

Типичной моделью ишемии головного мозга является окклюзия средней мозговой артерии у лабораторных животных (раздел 2.3.1.).

У животных контрольной группы, сформированной в результате операции по перевязке сонных артерий, развилась стойкая ишемия головного мозга с отчетливыми нарушениями поведенческой активности (тест «открытое поле»), которая была устранена в послеоперационном периоде (21 день) (Таблица 42).

При этом общая двигательная активность снижалась в 6 раз, поисково-исследовательская активность – в 5 раз, агрессивность животных увеличивалась в 2,6 раза, а эмоциональная лабильность – в 3,7 раза. Эти данные свидетельствуют о высокой чувствительности поведенческих методик к ишемическим поражениям головного мозга.

Данные, представленные в таблице (Таблица 42), показывают, что цитофлавин не оказывал защитного действия на эмоциональную лабильность. Установлено, что ФДЭС (доза 10 мг/кг) была более активной в отношении показателей эмоциональной сферы, оказывала защитное действие в отношении самой поведенческой активности. Его влияние, вероятно, проявляется в увеличении энергетических возможностей корковых нейронов.

Таблица 42 – Влияние ФДЭС и цитофлавина на поведение крыс с фокальной ишемией головного мозга в тесте «Открытое поле»

Группа	ОДА, у. е.	ПИА, у. е.	Аг, у. е.	ЭЛ, у. е.
	Исходный уровень			
Ложнооперированные	48,1±7,6	11,1±0,7	1,9±0,3	2,0±0,3
Контрольная	52,0±7,3	12,0±0,8	2,0±0,1	1,5±0,3
ФДЭС 10 мг/кг	50,3±4,3	12,8±0,7	1,7±0,4	1,3±0,5
ФДЭС 75 мг/кг	51,1±4,4	11,1±1,5	1,4±0,3	1,0±0,3
Цитофлавин 170 мг/кг	50,6±6,8	12,0±0,8	2,0±0,3	1,2±0,5
Через 21 день				
Ложнооперированные	41,6±7,3	9,9±0,4*	1,6±0,5	2,0±0,3
Контрольная	9,3±1,3*	2,3±0,5*	5,3±0,9*	5,5±0,9*
ФДЭС, 10 мг/кг	28,5±6,9*,**	6,3±0,7*,**	2,0±0,5**	3,0±0,5*,**
ФДЭС, 75 мг/кг	18,6±5,8*,**	3,6±0,4*,**	2,4±0,7*,**	3,7±0,7*,**
Цитофлавин 170 мг/кг	20,3±2,0*,**	3,7±0,9*	4,3±0,9*	3,6±0,7*,**

Примечание: *- отличия от соответствующего исходного показателя статистически значимы, $p < 0,05$; ** - отличия от соответствующего показателя контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$; Обозначения: ОДА - общая двигательная активность; ПИА - поисково-исследовательская активность; Аг - агрессивность, ЭЛ - эмоциональная лабильность.

5.2. Влияние введения ФДЭС на когнитивные функции

Модели обучения животных в лабиринтах являются наиболее адекватными для исследования процессов памяти, потому что создаваемые условия соответствуют естественным

условиям обитания. Хорошо развитая пространственная память мелких грызунов позволяет исследовать их поведение в лабиринтах различной степени сложности. Модель обучения мышей в Т-образном лабиринте с пищевым подкреплением является одной из распространенных тестов лабиринтного обучения (раздел 2.7.2).

Влияние ноотропных препаратов на оперативную память является типичным свойством препаратов этой группы. Поэтому для выявления ноотропной активности новых соединений тестирование процессов обучения является обязательным.

В качестве препарата сравнения в данной серии исследований использовался препарат пирацетам в стандартной разовой дозе 900 мг/кг, вводимой лабораторным животным однократно внутрижелудочно с помощью зонда за 1 час до начала процедуры обучения.

Контрольной группе животных вводился физиологический раствор в эквивалентном количестве.

5.2.1. Обучение в Т-образном лабиринте

Итоги изучения влияния ФДЭС на обучение животных в тесте Т-образного лабиринта представлены в таблице (Таблица 43). Обнаружено, что при отложенном тестировании 100% животных контрольной группы не сохранили навык предпочтения «правильного рукава», то есть тест «Т-лабиринт»¹ может быть рассмотрен как тест оперативной памяти, при проведении которого у животных не регистрируется длительный памятный след.

Таблица 43. – Влияние ФДЭС и пирацетама на когнитивные функции в тесте «Т-лабиринт»

Группа	Количество животных, сохранившие навык выбора «правильного» рукава после окончания обучения, %		
	1 –й день	5-й день	10-й день
Контроль	0,0	0,0	0,0
Пирацетам 900 мг/кг	28,5 *	28,5 *	0,0
ФДЭС, 10 мг/кг	50,0 *	62,5 *	50,0 *
ФДЭС, 75 мг/кг	87,5 *	87,5 *	50,0 *

Примечание: * - отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$

Установлено, что пирацетам в условиях однократного приема оказывал слабое стимулирующее действие на процессы обучения животных и фиксацию в памяти результатов обучения. Эффективность ФДЭС в обеих исследованных дозах значительно повысила эффективность обучения, запоминания и воспроизведения информации у животных.

В этом случае выявленный эффект чувствителен к дозе (прием более высокой дозы сопровождается более высоким эффектом), но не пропорционален, так как увеличение дозы ФДЭ в 7,5 раз приводит к усилению эффекта на 25-35% с выравниванием разницы к концу 10 дня.

5.2.2. Влияние ФДЭС на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте «Экстраполяционное избавление»

В тесте экстраполяционное избавление (ЭПИ) (раздел 2.7.2.) была исследована способность исследуемых препаратов курсами (14 дней) сохранять памятный след о способе избегания водной среды.

В экспериментальном исследовании было установлено, что в контрольной группе животных, получавшей физиологический раствор, задержка в решении задачи экстраполяции (погружения) увеличилась в 1,7 раза, а число крыс, решивших эту задачу, уменьшилось на 10% по сравнению с исходным уровнем (Таблица 44).

В группе животных, получавших эталонный ноотропный препарат пирацетам, после завершения обучения наблюдалось значительное улучшение когнитивных функций - сокращение времени погружения в воду в 2,3 раза, а через 2 недели приема препарата - и увеличение на 20% крыс, которые смогли выполнить экстраполяционную задачу, что свидетельствует о закреплении алгоритма решения задачи и его сохранения во времени.

Таблица 44 – Влияние 14-дневного перорального введения ФДЭС на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте ЭПИ (n=10)

Группа	Латентный период подныривания, М ± m, мин		Доля животных, решивших экстраполяционную задачу, %	
	После обучения	Через 14 дней	Исходно	Через 14 дней
Контроль	1,28 ± 0,17	1,82 ± 0,20	70	60
Пирацетам 900 мг/кг	0,61 ± 0,18 *	0,28 ± 0,03 *	70	90
ФДЭС 10 мг/кг	0,57 ± 0,18 *	0,34 ± 0,08 *	70	90
ФДЭС 75 мг/кг	0,53 ± 0,15 *	0,19 ± 0,05 *	70	80

Примечание: * статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы (критерий Вилкоксона-Мана-Уитни, $p < 0,05$).

Введение ФДЭС в обоих исследуемых дозах (10 и 75 мг/кг) способствует повышению когнитивных функций сравнимо с действием пирацетама, но осуществляется в существенно более низкой дозе, т.е. соединение ФДЭС обладает более высокой активностью.

5.2.3. Антиамнестическое действие на модели скополаминовой амнезии

Метод оценки когнитивных функций в тесте УРПИ (раздел 2.7.2) основан на выработке условной реакции пассивного избегания в челночной камере у крыс в ответ на безусловный электрокожный болевой раздражитель, предъявляемый в предпочитаемом грызунами тёмном отсеке камеры.

Было установлено, что исследуемые препараты влияют на когнитивные функции (Таблица 45). В тесте УРПИ⁶ для группы интактных животных через 2 часа после тренировки 83% крыс сохранили памятный след. Скополамин значительно ухудшил этот показатель, снизив количество обученных крыс до 16%.

Под воздействием пираретама наблюдалось нивелирование отрицательного холиноблокаторного эффекта, и количество обученных животных через 2 часа составило 83%. ФДЭС в обеих дозах продемонстрировал эффект, сопоставимый с эффектом препарата сравнения, увеличив количество крыс, сохранивших навык через 2 часа, до 75% (10 мг / кг и 75 мг/кг). В тесте УРПИ через 24 часа (Таблица 46) среди интактных крыс 75% животных сохранили памятный след после тренировки. Скополамин значительно ухудшил этот показатель, снизив количество обученных крыс до 41%. Под воздействием пираретама количество животных, обученных через 24 часа, составило 100%.

Таблица 45 – Исследование антиамнестического эффекта ФДЭС на модели амнезии, вызванной скополамином, при внутрижелудочном введении (воспроизведение УРПИ через 2 часа после тренировки)

Группа	Число наблюдений, n	Латентный период, М ± m, мин	Доля животных, воспроизводящих памятный след, %	ИААД, ед
Интактные	12	1,80 ± 0,13	83,0	-
Скополамин	12	0,67 ± 0,20	16,0	0
Пираретам 900мг/кг+скополамин	12	1,70 ± 0,18 *	83,0 *	0,92*
ФДЭС 10 мг/кг + скополамин	12	1,58 ± 0,22 *	75,0 *	0,81 *
ФДЭС 75 мг/кг + скополамин	12	1,57 ± 0,22 *	75,0 *	0,80 *

Примечание: ИААД – индекс антиамнестического действия, * - статистически значимых отличий от контрольных животных со скополамином, критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$

ФДЭС в обеих дозах показал эффект, сопоставимый с препаратом сравнения, увеличив

⁶Выражаем искреннюю благодарность за помощь в проведении исследовании к.б.н. Титович И.А., к.б.н. Лисицкому Д. С., Бельской А. В., Михайловой М. В., к.б.н. Сысоеву Ю. И. (Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства г. Санкт-Петербурга)

количество крыс, которые сохранили навык через 24 часа, до 91% (10 мг/кг) и 83% (75 мг/кг) соответственно (Таблица 46).

В серии проведенных исследований установлено, что исследуемое вещество способствует сохранению и закреплению информации, полученной в период обучения как к здоровых животных, так и в условиях амнезии, вызванной введением скополамина.

Таблица 46 – Изучение антиамнестического эффекта ФДЭС на модели амнезии УРПИ, вызванной скополамином, при внутрижелудочном введении (воспроизведение УРПИ через 24 ч после обучения)

Группа	Число наблюдений, n	Латентный период, М ± m, мин	Доля животных, воспроизводящих памятный след, %	ИААД, ед
Интактные	12	1,75 ± 0,15	75,0	-
Скополамин	12	0,95 ± 0,22	41,0	0
Пирацетам + скополамин	12	1,85 ± 0,17 *	100,0 *	1,12*
ФДЭС 10 мг/кг + скополамин	12	1,90 ± 0,12 *	91,0 *	1,18*
ФДЭС 75 мг/кг + скополамин	12	1,75 ± 0,17 *	83,0 *	1,00*

Примечание: ИААД – индекс антиамнестического действия, * - статистически значимых отличий от контрольных животных со скополамином, критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$

ГЛАВА 6. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Механизм действия ФДЭС был изучен *in vivo*⁷ на модели амилоидной токсичности [386] и составлен компьютерный прогноз для его дополнительных механизмов действия [207].

Исследование проводили в первичных культурах нейронов гиппокампа мышей дикого типа (с добавлением синтетических бета-амилоидов 1-42 (Аб42)) по методике, описанной в разделе 3.3.2). Анализировали способность тестируемого соединения восстанавливать внутриклеточный кальциевый сигналинг в условиях амилоидной токсичности, оценивали влияние ФДЭС на морфологию дендритных шипиков и его способность защищать их от амилоидной токсичности.

6.1. Механизм действия

В первичной гиппокампальной культуре, полученной из новорожденных мышей дикого типа, *in vitro* исследовали действие ФДЭС на кальциевый вход в дендритные шипики и в сому нейронов [170, 385]. Регистрируемые кальциевые токи могли быть отнесены к депо-управляемым.

Установлено, что синтетический амилоид Абета вызывал в 2,2 раза снижение амплитуды нДУВК по сравнению с группой контроля (Рисунок 19, Таблица 44). Результаты исследования свидетельствуют о том, что ФДЭС является положительным регулятором нДУВК и статистически значимо повышает в 2 раза ($p < 0,0005$) амплитуду нДУВК в группе нейронов с Абета по сравнению с группой синтетического амилоида Абета (Рисунок 19 А, Г, Е; Таблица 47).

Таблица 47 – Влияние ФДЭС и НУР на амплитуды нДУВК нейронов, обработанных Абета

Группа	Амплитуда нДУВК (пик), F/F0	
	M±m, у.е.	% к контролю
Контроль	6,18±0,37	100,0
Гиперфорин 30 нМ	7,83±0,68*	127,0
ФДЭС 100 нМ	5,41±0,67	87,5
Синтетический амилоид Абета	2,84±0,51**	46,0
Синтетический амилоид Абета + Гиперфорин 30 нМ	7,97±0,65***	129,0
Синтетический амилоид Абета + ФДЭС 100 нМ	5,75±0,48***	93,0

Примечание: Ab – синтетический амилоид Абета, НУР - гиперфорин, * - статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$), ** - статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,005$), *** - статистически значимое отличие от соответствующего показателя группы Абета ($p < 0,0005$).

⁷Выражаем глубокую, искреннюю благодарность д.б.н. Попугаевой Е.А. (заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации д.б.н., профессор Беспрозванный И.Б.) за помощь и поддержку в проведении данного исследования ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет имени Петра Великого»

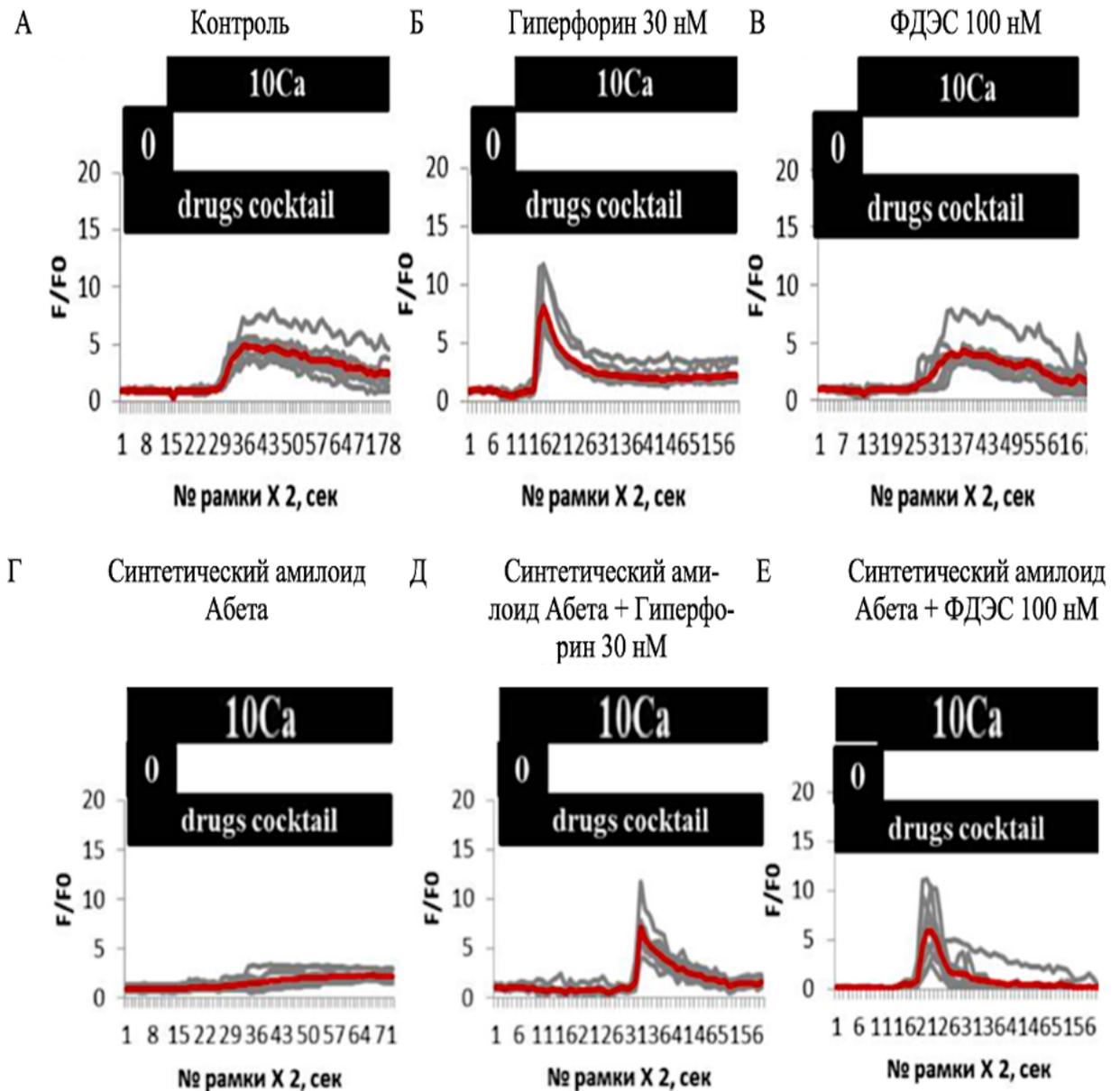


Рисунок 19 – Исследование влияния ФДЭС на контролируемый постсинаптический нДУВК в условиях синаптоксичности амилоида Аβ. А, В, С, D, D, Е – микрофотографии записей нДУВК (пик F/F0) в исследуемых группах, Аβ – синтетический амилоид, НУР – гиперфорин, drugs cocktail – комплекс блокаторов кальциевых каналов; 0,10 Ca – концентрация кальция в растворе в мМ.

Важно отметить, что ФДЭС запускает нДУВК в первую очередь в постсинаптических дендритных шипиках, поскольку интенсивность флуоресценции GCaMP5.3 повышается сначала в дендритных шипиках, а затем в дендритах (Рисунок 20). Эффект от запуска нДУВК ФДЭС максимально заметен между 40, 44 и 46 секундами записи (Рисунок 20 панели Б, В, Г).

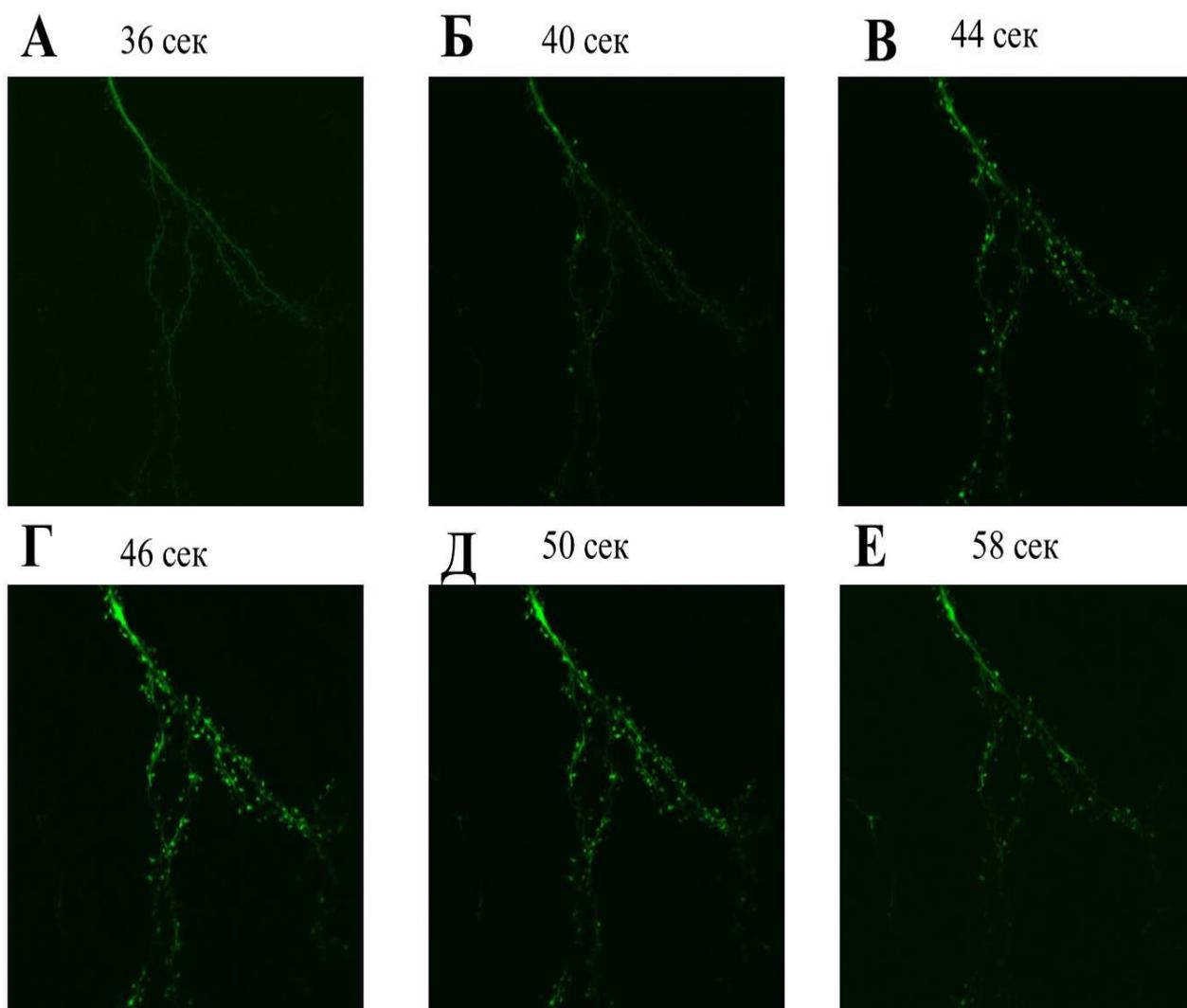


Рисунок 20 – Микрофотографии записи нДУВК в культуре нейронов гиппокампа при выдержке в присутствии 300 нМ ФДЭС в течение 30 мин.

В серии экспериментов было показано, что выключение экспрессии гена TRPC6 в культуре гиппокампа мыши приводило к значительному, в 2,3 раза ($p < 0,0005$), снижению амплитуды нДУВК с $6,22 \pm 0,51$ у.е. (Рисунок 21 А, Таблица 48) до $2,7 \pm 0,30$ у.е. (Рисунок 21 Г, Таблица 48) для контрольной группы.

Гиперфорин (доза 30 нМ) не смог восстановить амплитуду нДУВК в отсутствие гена TRPC6 до контрольного уровня, хотя и вызвал статистически значимое повышение в 1,54 раза ($p < 0,005$) амплитуды нДУВК (Рисунок 21 D, E, Таблица 48). Последнее наблюдение объясняется тем фактом, что РНК-интерференция не отключает ген полностью, всегда присутствуют следовые количества целевого белка, которых, вероятно, достаточно для того, чтобы гиперфорин активировал нДУВК.

Субстанция ФДЭС не способна активировать TRPC6 в отсутствие TRPC6 (Рисунок 21 А, В, Е), являясь специфическим активатором TRPC6-зависимого TRPC.

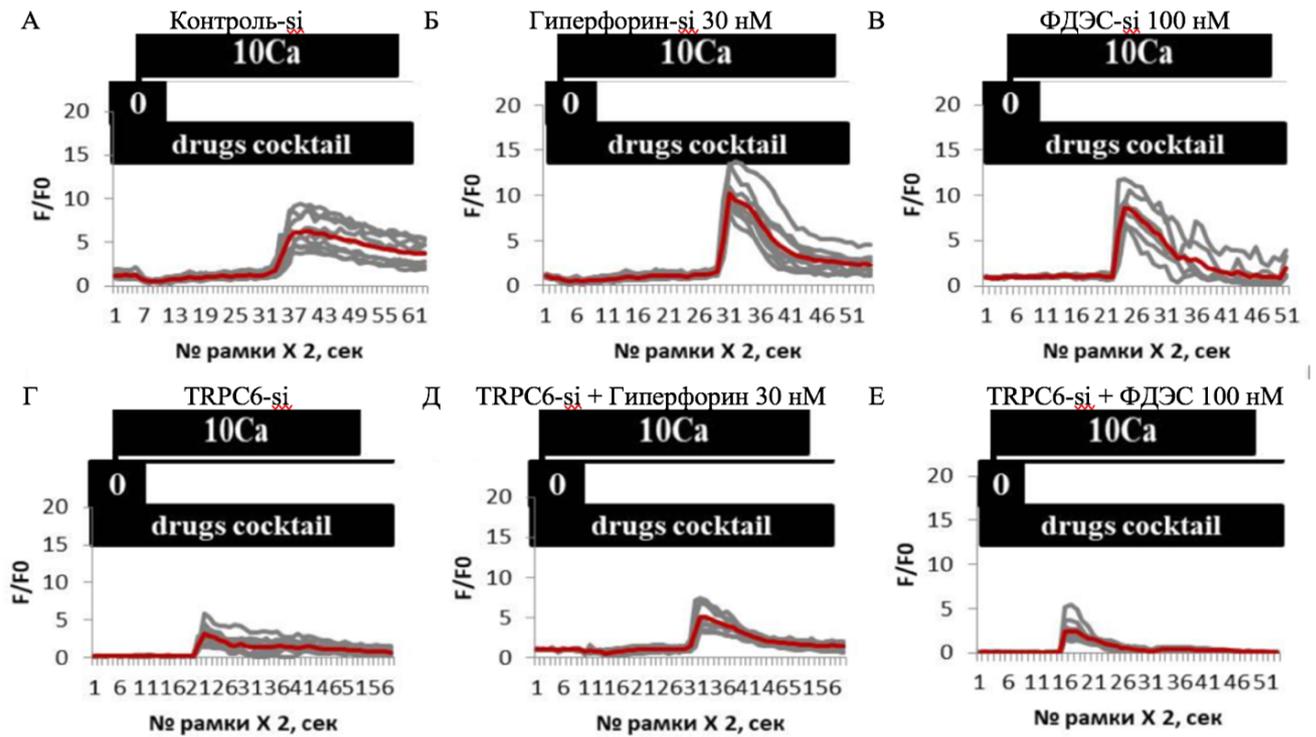


Рисунок 21 – Влияние ФДЭС на постсинаптический нейрональный депо-управляемый вход кальция в условиях нокаута гена TRPC6. А, Б, В, Г, Д, Е – микрофотографии записи нДУВК в исследуемых группах. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Сокращения: Контр-si – контрольная группа нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, TRPC6-si – группа нейронов, трансфицированная siРНК комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, 10 Ca – концентрация кальция в растворе в мМ.

Таблица 48 – Абсолютные значения средней амплитуды нДУВК у.е. ± стандартная ошибка среднего значения в контрольных группах и группах нейронов с выключенным геном TRPC6 при наличии/отсутствии гиперфорина или ФДЭС

Группа	Амплитуда нДУВК (пик), F/F0, у.е.	
	M±m, у.е.	% к контролю
Контр-si	6,22±0,51	100,0
Гиперфорин-si 30 нМ	9,29±0,84*	149,0
ФДЭС-si 100 нМ	8,37±0,57	134,5
TRPC6-si	2,7±0,30***	43,4
TRPC6-si + Гиперфорин 30 нМ	4,15±0,39**	66,7
TRPC6-si + ФДЭС 100 нМ	2,62±0,34	42,1

Примечание: Контр-si – контрольная группа нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, TRPC6-si – группа нейронов, трансфицированная siРНК комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, НУР – гиперфорин, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$; *** – $p < 0,0005$ статистически значимые результаты по сравнению с контрольной группой.

Далее исследовали влияние ФДЭС на функцию синаптических мембран в культуре клеток гиппокампа. Исследование проводили в первичных культурах нейронов гиппокампа мышей дикого типа (с добавлением синтетических бета-амилоидов 1-42 (А642)) по методике, описанной

в разделе 3.3.2). Анализировали влияние препарата на морфологию дендритных шипиков и его способность защищать их от амилоидной токсичности, оценивали способность тестируемого соединения восстанавливать внутриклеточный кальциевый сигналинг в условиях амилоидной токсичности.

В результате проведённых исследований на модели амилоидной нейротоксичности было установлено, что синтетический аналог амилоида (Абета) вызывает резкое в 2,5 раза ($p < 0,001$) сокращение доли активных грибовидных шипиков, достоверно в 1,6 раза ($p < 0,001$) увеличивает количество тонких шипиков. Кроме того, была обнаружена тенденция Абета увеличивать в 1,4 раза процент пеньковых шипиков, по сравнению с контрольной группой, однако она не достигала статистически значимой разницы (Рисунок 22, Таблица 49).

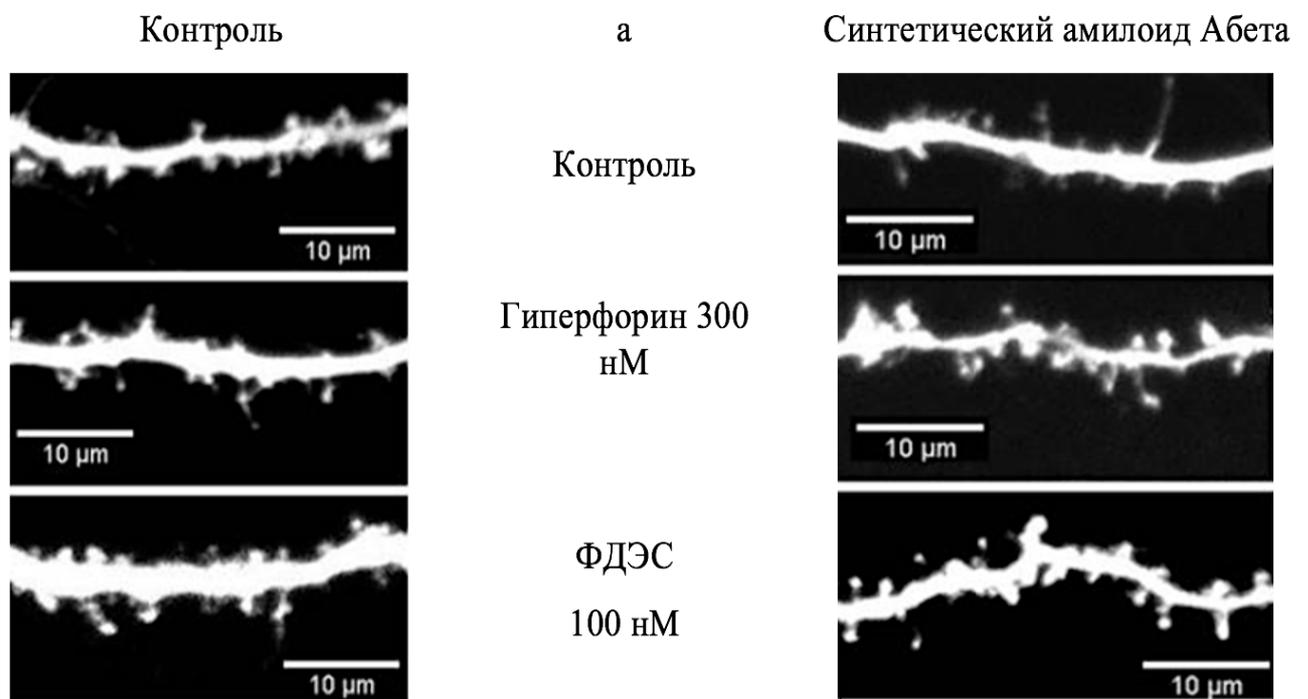


Рисунок 22 – Влияние ФДЭС на дендритные шипы нейронов в условиях токсичности амилоида в концентрации 100 нМ. а - микрофотографии каждой исследуемой группы нейронов гиппокампа, трансфицированных плазмидой TD-Tomato.

Гиперфорин в концентрации 300 нМ способствует восстановлению в 2,8 раза ($p < 0,0005$) процента грибовидных шипиков, (Рисунок 22, Таблица 49), снижал в 1,8 раза ($p < 0,0005$) процент тонких шипиков и в 1,5 раза ($p < 0,05$) пеньковых шипиков, по сравнению с группой нейронов, выдержанных в присутствии Абета.

ФДЭС (100 нМ) обладает нейропротекторными свойствами, защищая грибовидные шипики от амилоидной токсичности. Установлено, что ФДЭС восстанавливает в 2,2 раза ($p < 0,0005$) процент грибовидных шипиков по сравнению с группой Абета. Аналогично гиперфорину,

изучаемое вещество достоверно снижает процент тонких и пеньковых шипиков в 1,3 раза ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой Абета.

Таблица 49 – Влияние ФДЭС на количество грибовидных, тонких и пеньковых шипиков в условиях амилоидной токсичности

Группа	Тип шипиков		
	грибовидные	тонкие	пеньковые
	M \pm m, %	M \pm m, %	M \pm m, %
Контроль	46,0 \pm 1,6	33,8 \pm 2,2	20,2 \pm 2,1
Синтетический амилоид Абета	18,0 \pm 2,4**	54,3 \pm 1,4**	27,7 \pm 2,8
Гиперфорин 300 нМ	53,3 \pm 1,7*	30,9 \pm 1,4	15,8 \pm 1,4
ФДЭС 100 нМ	48,3 \pm 1,8	29,3 \pm 2,2	22,4 \pm 1,3
Синтетический амилоид Абета + Гиперфорин 300 нМ	50,3 \pm 1,9****	30,9 \pm 1,5****	18,8 \pm 0,9***
Синтетический амилоид Абета + ФДЭС 100 нМ	39,9 \pm 2,2****	42,5 \pm 3,2***	17,6 \pm 1,9***

Примечание: Аб - синтетический амилоид Абета, НУР - гиперфорин, * - статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$), ** - статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,001$), *** - статистически значимое отличие от соответствующего показателя группы Абета ($p < 0,05$), **** - статистически значимое отличия от соответствующего показателя группы Абета ($p < 0,0005$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ФДЭС способен защитить грибовидные шипики от амилоидной токсичности, а его рабочая концентрация лежит в наномолярном диапазоне. Кроме того, ФДЭС является активатором нейронального депо-зависимого поступления кальция в нейроны и не способен восстановить нДУВК при отсутствии ионных каналов TRPC6 в условиях амилоидной синаптотоксичности до уровня контрольной группы.

В ходе проведенного исследования было установлено, что механизм нейропротекторного действия нового ноотропного вещества связан как со способностью ФДЭС активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики, являясь специфическим активатором нДУВК, так и защищать грибовидные шипики в условиях амилоидной синаптотоксичности.

6.2. Компьютерное моделирование взаимодействия ФДЭС с молекулярными мишенями

Методом компьютерного моделирования⁸ предсказана нейротропная активность ФДЭС.

⁸Выражаем глубокую, искреннюю благодарность за помощь в проведении исследования к.м.н. А.В. Дмитриеву и заведующему отделом биоинформатики профессору В.В. Поройкову «Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии наук»

Ранее в литературе были высказана гипотеза, а затем описана, предсказанная методами информационного анализа, биологическая активность родственного изучаемому соединению препарата - янтарного эфира диметиламиноэтанола - его яблочнокислой соли (Антилактат) [295].

В этом исследовании в качестве наиболее вероятных видов активности были представлены (в скобках - вероятность наличия соответствующей активности): агонист гормона роста (93%), стимулятор аденилатциклазы (87,8%), радиопротектор (78,4%), агонист глицинового сайта NMDA-рецептора (76,5%), ингибитор ацетилтрансферазы аминокислот (75,2%), ингибитор НАДФН-оксидазы (74%), ингибитор креатиназы (66,1%), ингибитор 2-оксоглутаратдекарбоксилазы (66,6%), ингибитор лизин-6-трансаминазы (65,4%), агонист ГАМК-С рецептора (65,3%), антигипоксикант (64%), ГАМК-аминотрансферазы ингибитор (60,9%) и др. [295].

Прогноз молекулярных механизмов действия ФДЭС осуществлен при использовании программы PASS 2014. Основной показатель расчетов - IAP (Invariant Accuracy of Prediction)/неизменная точность прогнозирования (НТП) является характеристикой средней точности прогноза, полученной при скользящем контроле с исключением по одному для соединений обучающей выборки).

Результаты вычислительного эксперимента по влиянию ФДЭС на антигипоксическую/антиишемическую и нейропротекторную активность, на выраженность неврологического дефицита (после ЧМТ, ОСМА) и ноотропное действие (обучаемость, память) представлены в таблице (Таблице 50).

Таблица 50 – Компьютерный прогноз видов биологической активности соединения ФДЭС с помощью программы PASS 2014

Pa	Pi	Молекулярный механизм действия	Ген	Потенциальные эффекты	IAP
0.755	0.015	Ингибитор транскрипционного фактора NF kappa B1	NFKB1	ИШ ↓, КГ ↑	83.5
0.725	0.02	Ингибитор мембранной проницаемости	-	ИШ ↓, ЧМТ ↓	85.4
0.722	0.022	Агонист предсердного натрийуретического пептида	NPPA	ИШ ↓, КГ ↑	87.7
0.621	0.008	Антагонист фибриногеновых рецепторов тромбоцитов	ITGA2B, ITGB3	ИШ ↓	90.9
0.562	0.023	Переносчик кислорода	-	ИШ ↓, КГ ↑	86.2
0.539	0.046	Агонист инсулиновых рецепторов	INSR	ИШ ↓, КГ ↑	81.9

Примечание: ИШ – это уменьшение или увеличение негативных последствий ишемии головного мозга, КГ – это снижение или увеличение когнитивных способностей, ЧМТ – это уменьшение или увеличение негативных последствий черепно-мозговой травмы.

С помощью программы PASS 214 для исследуемого соединения – ФДЭС, нами были предсказаны следующие виды фармакологической активности: ингибирование транскрипционного фактора NF kappa B (83,5%), уменьшение мембранной проницаемости (85,4%), агонизм к рецепторам предсердного натрийуретического пептида (87,7%), антагонизм к фибриногеновым рецепторам тромбоцитов (90,9%), антигипоксант (86,2%) и агонист инсулиновых рецепторов (81,9%).

ГЛАВА 7. ФАРМАКОКИНЕТИКА

Изучение фармакокинетических параметров является важной частью изучения фармакологических свойств новых фармакологически активных соединений. Скорость фармакокинетических процессов во многом определяет эффект лекарственного вещества. Все эти процессы взаимосвязаны и взаимозависимы [81, 91].

Знание фармакокинетических показателей исследуемого вещества дает возможность обосновать выбор пути и методов его введения, определить ткани, в которые оно проникает наиболее интенсивно, установить его основные пути выведения.

По результатам экспериментального изучения фармакокинетики возможно предсказать концентрацию препарата в крови и таким образом, выбрать ориентировочную схему дозирования, которая может быть затем уточнена в ходе клинических исследований [219].

7.1. Разработка методики количественного определения ФДЭС в биосредах

Для количественного определения субстанции ФДЭС использована система высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)⁹ на основе жидкостного хроматографа модели Agilent 1200 «Agilent Technologies», с насосом, встроенным дегазатором, оборудованным системой автоматического ввода пробы с масс-селективным детектором (МС) Agilent 6410B Triple Quadrupole LC/MS с электрораспылительной ионизацией, хроматографической колонкой: ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 50 мм (Agilent Technologies) с программным обеспечением для сбора и обработки данных MassHunter Agilent Technologies.

Измерение содержания препарата ФДЭС в средах проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии путем:

- предварительной подготовки образца, состоящая в осаждении белковой фракции биосреды ацетонитрилом (3:1);
- разделение ацетонитрильного экстракта на хроматографической колонке с последующим масс-спектрометрическим определением характеристик целевых компонентов в режиме полного ионного тока (ТIC);
- фиксация сигнала детектора в цифровой форме с помощью ЭВМ.

Для определения содержания препарата в ацетонитриловом экстракте применяют метод нормализации внутренней площади. Аналит идентифицируется по совпадению времени

⁹Выражаем глубокую, искреннюю благодарность за помощь в проведении фармакокинетических исследований к.фарм.н. Сипкиной Н.Ю. и к.б.н. Ивкину Д. Ю. (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

удерживания веществ, из данных калибровочного и анализируемого растворов, и масс-спектральным характеристикам, полученным в режимах МС и МС/МС при напряжении в ячейке ударной ионизации.

Используя разработанный метод количественного определения (раздел 7.1), были получены хроматограммы растворителя проб, растворов бланков, модельных растворов и калибровочного раствора вещества с концентрацией 50 мкг/мл (Рисунки 23, 24, 25).

R: 1 PER(0.0:6.0)PSIM(216.0),0.8,75,60000 : 1

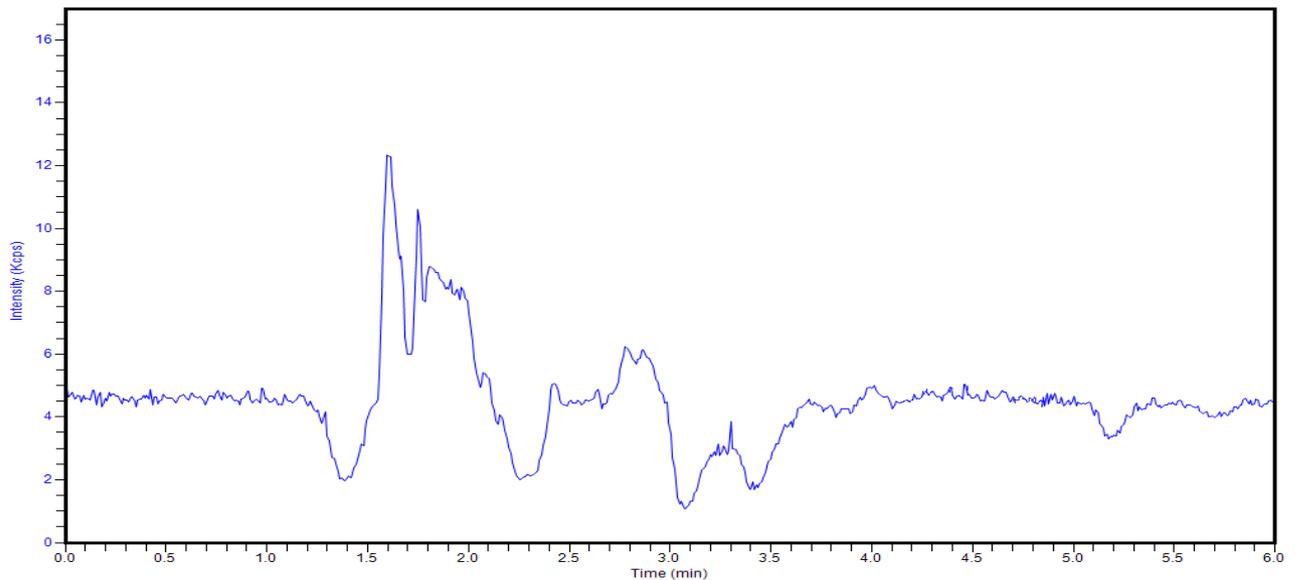


Рисунок 23 –Хроматограмма раствора бланка плазмы крови крысы

R: 1 PER(0.0:6.0)PSIM(216.0),0.8,75,60000 : 1

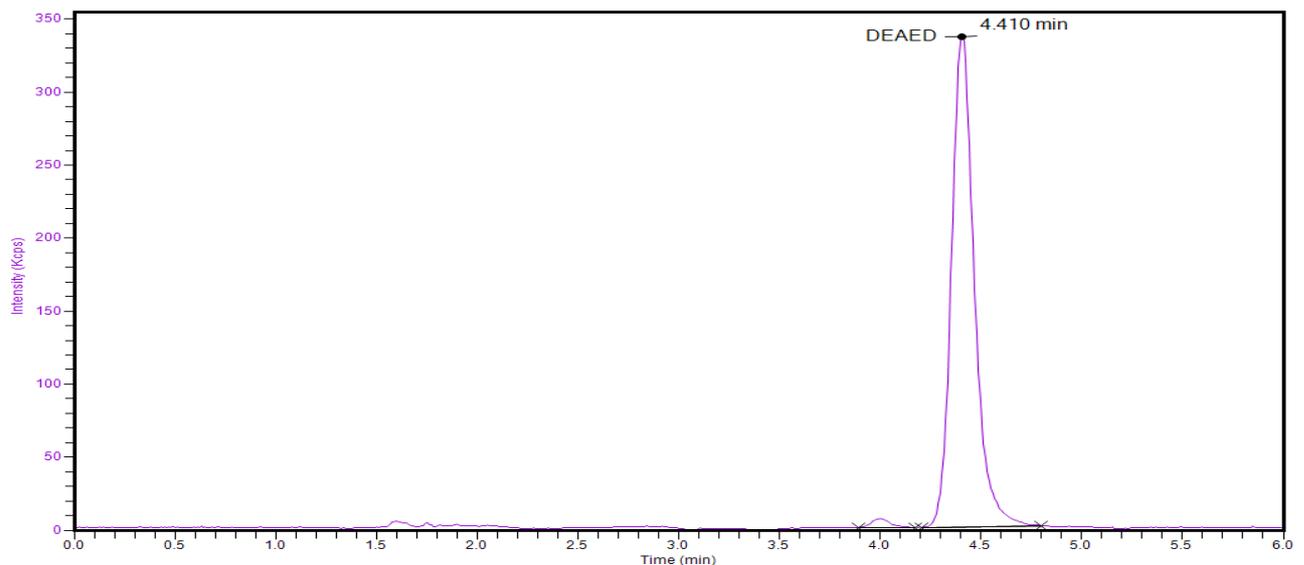


Рисунок 24 – Хроматограмма модельного раствора плазмы крови крысы

Валидация метода проводилась согласно «Guideline on bioanalytical method validation» (ЕМЕА, 2012). По полученным результатам измерений были рассчитаны точность и прецизионность (средняя ошибка измерения). Зависимость площадей пиков от концентрации

соединения ФДЭС анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 1–100 мкг/мл. По каждому значению концентрации проводилось 5 параллельных измерений (Рисунок 25).

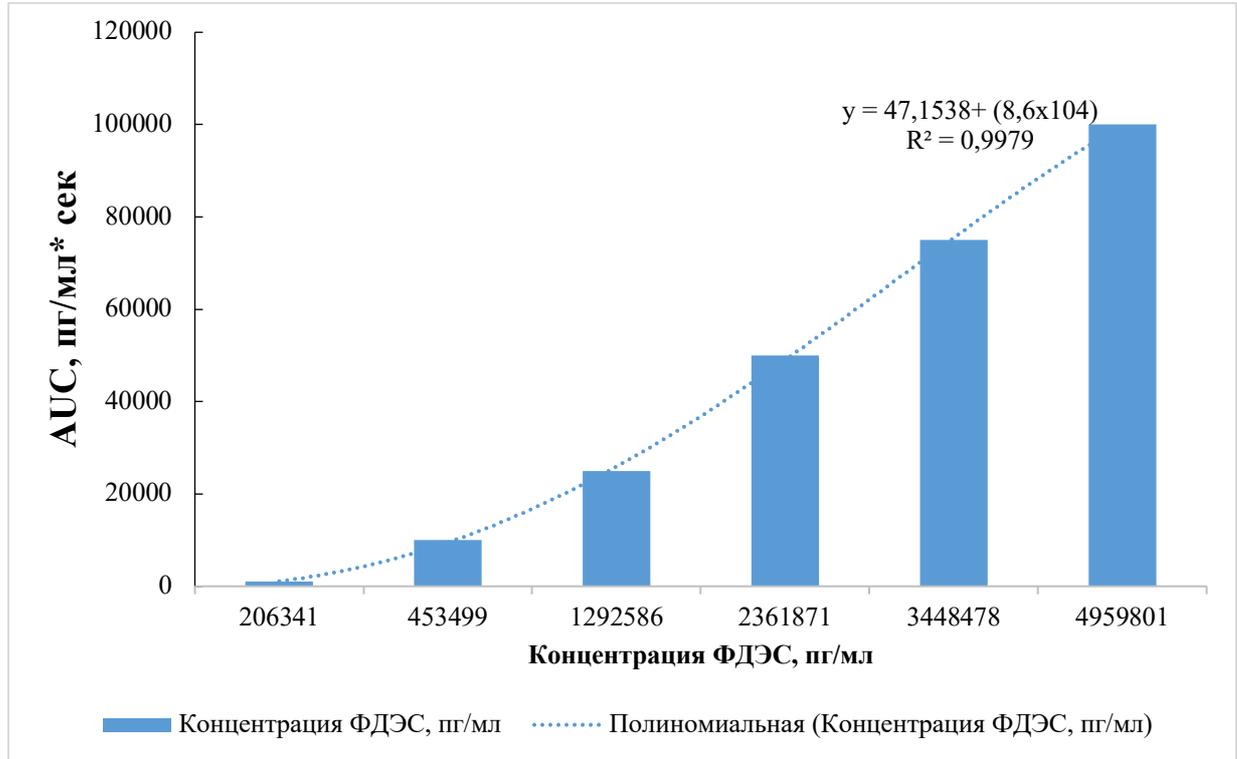


Рисунок 25 – Зависимость величины площади под фармакокинетической кривой соединения ФДЭС от величины дозы при внутривенном введении крысам. Обозначения: по оси абсцисс – доза соединения ФДЭС, мкг/кг; по оси ординат – площадь под фармакокинетической кривой, АUC, нг/мл*сек.

В итоге было обнаружено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2), равным 0,9979 (Рисунок 25, Таблица 51).

Таблица 51 – Валидационные характеристики метода ВЭЖХ количественного определения соединения ФДЭС

Раствор	Номинальная концентрация, нг/мл	Расчетная концентрация, нг/мл	Точность, $\Delta\%$	Прецизионность, %
Плазма крови	10000	9785,0 \pm 267,7	-2,1	11,5
	50000	49151,7 \pm 1287,8	-1,7	11,0
	100000	100077 \pm 2334,9	0,1	10,0
Моча	10000	10386,7 \pm 242,6	3,9	10,4
	50000	52864,4 \pm 1021,1	5,7	8,8
	100000	97860,4 \pm 1282,6	-2,1	5,5

Были изучены повторяемость метода и его воспроизводимость. Внутриведенные процентные колебания не превышали 20% в изученных диапазонах концентраций. Суточные процентные колебания для исследуемого соединения в основном не превышали 15% (Таблица 52). При исследовании стандартных растворов соединения после 72 часов хранения при

комнатной температуре, а также при изучении влияния процессов замораживания и таяния средние абсолютные процентные колебания находились в одних и тех же пределах, что свидетельствует о стабильности исследуемого вещества.

Таблица 52 – Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения ФДЭС

Параметр/Единицы измерения	Значение
Внутридневные колебания (повторяемость), %	≤ 20
Междневные колебания (воспроизводимость), %	≤ 15
Точность (ср. по концентрациям), %	98,78
Порог количественного определения, нг/мл	1000
Предел обнаружения, нг/мл	10
Средняя ошибка измерения, %	2,18

Внутрилабораторная сходимость результатов оценивалась по различию значений результатов измерения содержания активного фармацевтического вещества ФДЭС в контрольных образцах лекарственного средства, выполненного разными исследователями (Таблица 53).

Таблица 53 – Оценка внутрилабораторной сходимости результатов выполнения методики определения ФДЭС

Образец	Нормативное содержание, мг	Результаты измерения (мг) по исследователям			Среднее по образцу, мг
		1	2	3	
ОК-1	500	495	495	497	495,7
ОК-2	500	507	503	501	503,7
ОК-3	500	502	505	498	501,7
ОК-4	500	498	500	503	500,3
ОК-5	500	491	498	496	495,0
Средние значения	500	498,6	500,2	499,0	499,3

Статистическая обработка полученных результатов показала, что при среднем значении измерений 499,3 стандартное отклонение составило 2,8, что соответствует коэффициенту вариации 0,055 (высокая сходимость измерений). При проверке однофакторным дисперсионным анализом гипотезы о значимости фактора «исследователь», данная гипотеза отвергнута (коэффициент детерминации модели $D=0,027$, критерий $F=0.166$ при степени свободы $df=14$, критическое значение критерия $F_c=3.89$, уровень значимости $p=0,85$).

Ретестная валидность оценивалась по дисперсии значений результатов повторного измерения содержания активной фармацевтической субстанции ФДЭС в одних и тех же контрольных образцах препарата, выполненных одним и тем же исследователем с 10-минутным интервалом (Таблица 54).

При проверке однофакторным дисперсионным анализом гипотезы о значимости фактора «повторное определение», данная гипотеза отвергнута (коэффициент детерминации модели $D=0,004$, критерий $F=0.025$ при степени свободы $df=14$, критическое значение критерия $F_c=3.89$, уровень значимости $p=0,97$).

Таблица 54 – Оценка ретестной валидности результатов выполнения методики определения ФДЭС

Образец	Нормативное содержание, мг	Результаты измерения (мг) по сериям			Среднее по образцу мг
		1	2	3	
ОК-10	500	494	494	496	494,7
ОК-11	500	503	503	503	503
ОК-12	500	505	505	502	504
ОК-13	500	496	498	501	498,3
ОК-14	500	497	498	495	496,7
Средние значения	500	499	499,6	499,4	499,3

Концентрационная валидность оценивалась по отклонениям значений результатов измерения концентрации активной фармацевтической субстанции ФДЭС в градуировочных растворах ГР1-ГР5, полученных в соответствии с алгоритмом раздела 3.1.1, от фактической концентрации (Таблица 55).

Таблица 55 – Оценка концентрационной валидности результатов выполнения методики определения ФДЭС

Концентрация,	ГР1	ГР2	ГР3	ГР4	ГР5
Заданная, мг/мл	0,100	0,075	0,050	0,025	0,010
Измеренная, мг/мл	0,098	0,076	0,049	0,026	0,011

Коэффициент корреляции между рядами заданных и измеренных значений $r=0.9996$. При проверке однофакторным дисперсионным анализом гипотезы о достоверности различий между рядами, данная гипотеза отвергнута (коэффициент детерминации модели $D=0,000$, критерий $F=0.000$ при степени свободы $df=9$, критическое значение критерия $F_c=5.32$, уровень значимости $p=1,00$). Следовательно, согласно результатам, полученным в ходе валидационных испытаний, предлагаемая методика, удовлетворяет установленным требованиям и является пригодной для использования в аналитической лаборатории.

7.2. Определение фармакокинетических показателей в крови и моче при внутривенном введении субстанции ФДЭС

По результатам исследования было выявлено (Рисунок 26), что при внутривенном введении соединение циркулирует в плазме крови более 24 часов. Фармакокинетическая кривая

имеет моноэкспоненциальный характер. Через 4 часа после введения наблюдается максимальное снижение ФДЭС до 5,4 нг*ч/мл, а затем постепенно исследуемое вещество вновь появляется в крови, и к 24 часам его концентрация составляет 53,2 нг*ч/мл.

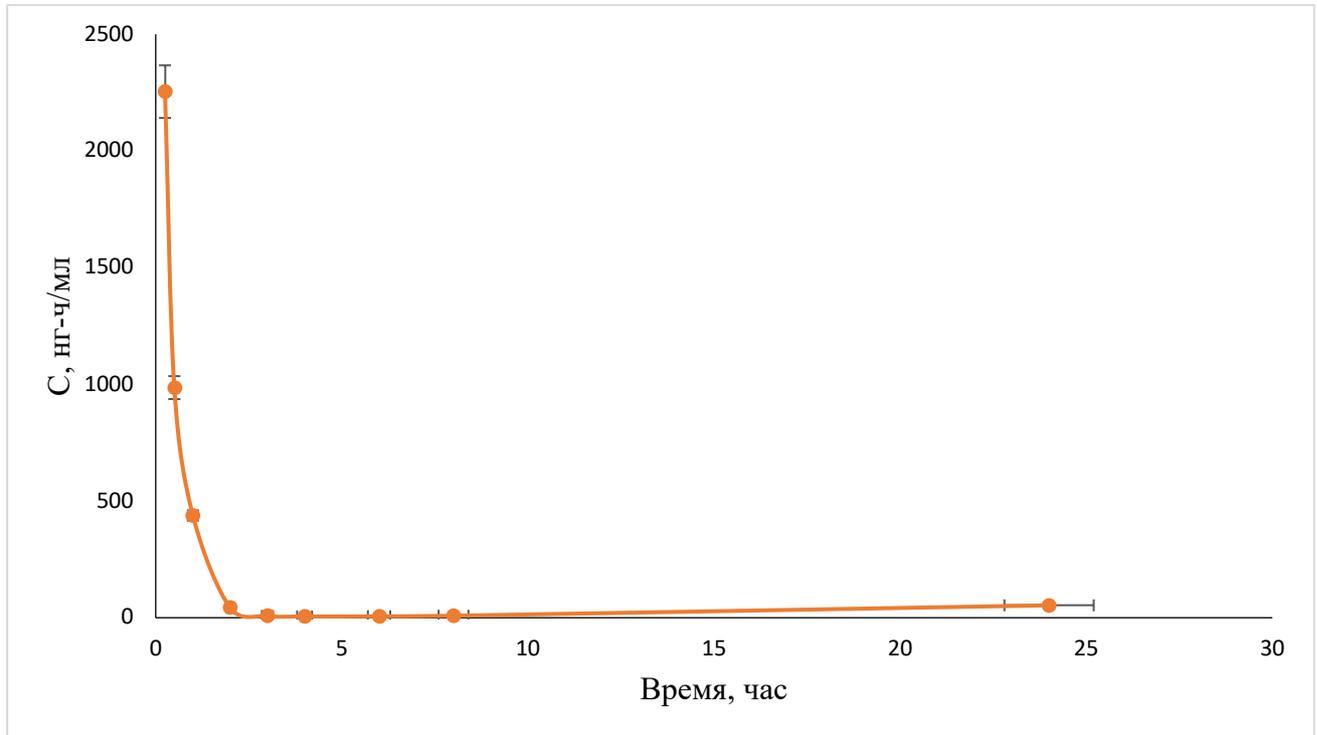


Рисунок 26 – Фармакокинетическая кривая зависимости «время-концентрация» при однократном внутривенном введении крысам ФДЭС в дозе 5 мг/кг

Определены фармакокинетические параметры после однократного внутривенного введения 5 мг/кг (Таблица 56). Ключевые фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения в плазме крови крыс от времени, показывают низкие значения периода полувыведения и среднего времени удерживания в организме одной молекулы изучаемого вещества. Кажущийся объем распределения превышает реальный объем тела крысы более чем в 1,9 раза, что можно рассмотреть, как неравномерное распределение соединения в тканях. Из полученных результатов исследования видно, что исследуемое вещество подвергается длительному процессу выведения, о чем свидетельствует значение периода полураспада, а также среднее время удерживания (Таблица 56).

Таблица 56 – Фармакокинетические параметры ФДЭС при внутривенном введении крысам в дозе 5 мг/кг.

Параметры	Значение
AUC_{last} (нг*ч/мл)	2479,43
AUC_{inf} (нг*ч/мл)	3063,21
$AUMC_{inf}$ (нг*ч ² /мл)	32112,67
MRT, ч	10,48

Параметры	Значение
$T_{1/2}$, ч	0,5
T_{max} , ч	0,25
C_{max} , нг/мл	2254,38
C_0 нг/мл (для в/в)	5153,73
Cl (л/час/кг)	1,63
Vd (л/кг)	2,22
K_{el} , ч	0,09

Экспериментальные исследования по изучению экскреции выявили, что исследуемое соединение обнаруживается в моче уже в первый час исследования, экскреция ФДЭС достигает максимального уровня к 3 часам и снова может обнаруживаться в моче более 24 часов (Рисунок 27, Таблица 57).

Таблица 57 – Экскреция вещества ФДЭС с мочой у крыс при внутривенном введении ФДЭС 5 мг/кг

Время, час	Экскреция, нг
1	919.11
2	416.83
4	119,66
6	55,77
8	9,91
24	1.70

В то же время более 90 процентов выведенного соединения выводится в течение первых 24 часов после введения.

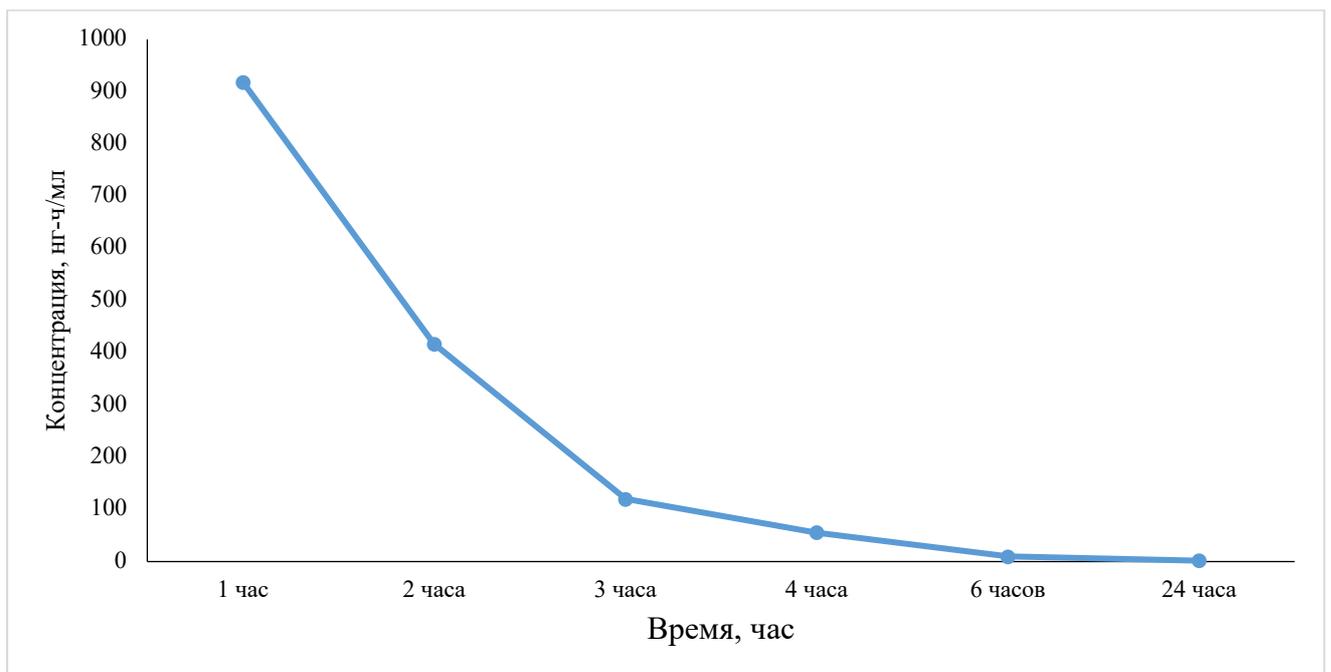


Рисунок 27 – График экскреция почками соединения ФДЭС при внутривенном введении крысам в дозе 5 мг/кг

7.3. Определение фармакокинетических показателей в крови и моче при пероральном введении таблеток ФДЭС

По результатам экспериментальных исследований перорального введения ФДЭС, были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации исследуемого вещества в плазме крови крыс от времени (Рисунок 28).

В серии экспериментов было установлено, что фармакокинетическая кривая зависимости «время-концентрация» при однократном пероральном введении крысам таблеток ФДЭС в дозе 5 мг/кг имеет фазу увеличения концентрации (фазу абсорбции), во время которой достигается максимальная концентрация в плазме крови.

Вторая часть фармакокинетической кривой характеризует выведение таблеток и показывает, что распределение в организме неравномерно. К концу дня концентрация ФДЭС в моче составляет 82,3 нг/мл.

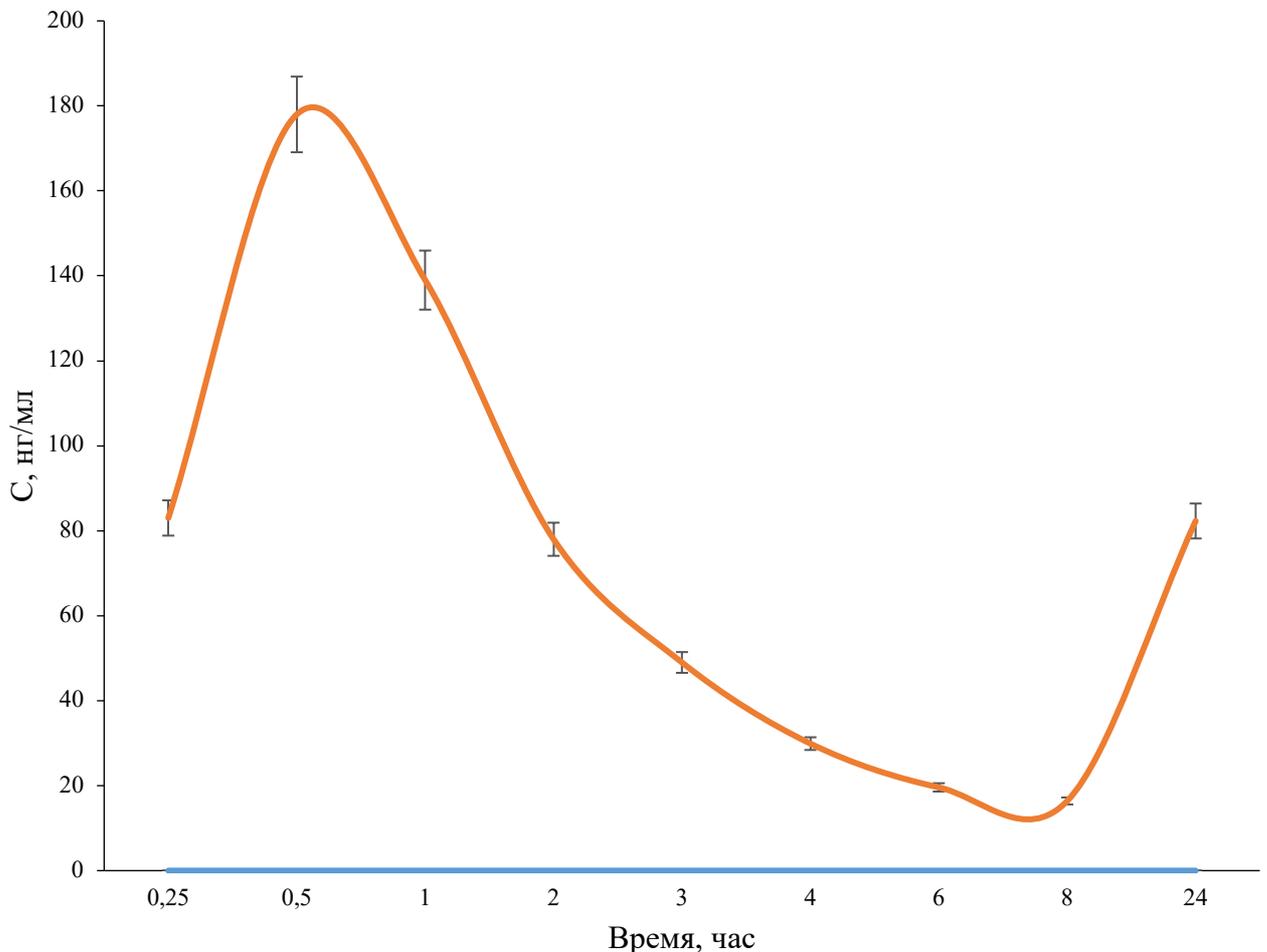


Рисунок 28 — Фармакокинетическая кривая зависимости «время-концентрация» при однократном пероральном введении крысам таблеток ФДЭС в дозе 5 мг/кг

Соединение ФДЭС обнаруживается в плазме крови в течение 24 часов. Выведение занимает много времени, о чем свидетельствует величина периода полураспада и среднее время удерживания одной молекулы (Таблица 58).

Кажущийся объем распределения превышает реальный объем тела крысы в 24,1 раза, что указывает на деронирование и неравномерное распределение в органах и тканях. Биодоступность при пероральном приеме составила 25,0%

Таблица 58 – Фармакокинетические параметры при однократном пероральном введении ФДЭС крысам в дозе 5 мг/кг

Параметры	Величины
AUC_{last} (нг*ч/мл)	616,11
AUC_{inf} (нг*ч/мл)	794,22
$AUMC_{inf}$ (нг*ч ² /мл)	11747,16
MRT, ч	14,79
$T_{1/2}$, ч	0,37
T_{max} , ч	0,5
C_{max} , нг/мл	178,03
Cl (л/час/кг)	6,29
Vd (л/кг)	28,09
K_{el} , ч	1,87
F, %	25

В Таблице 59 и на Рисунке 30 представлены данные об экскреции вещества с мочой при пероральном введении в тестовой дозе 5 мг/кг.

Исследование показало, что ФДЭС было определено в моче крыс в первый час исследования, экскреция достигает максимального уровня к 2 часам и постепенно снижается, но продолжает определяться в моче до 24 часов (Рисунок 29). Однако, более 90 % соединения выводится в течение первых 24 часов после его введения.

Следует отметить, что в хроматографических условиях, разработанных для соединения ФДЭС, на хроматограммах не было обнаружено никаких дополнительных пиков.

Таблица 59 – Выведение вещества ФДЭС с мочой крыс при пероральном введении в дозе 5 мг/кг

Время, час	Экскреция, нг
1	33,21
2	54,72
4	23,57
6	19,61
8	11,44
24	4,96

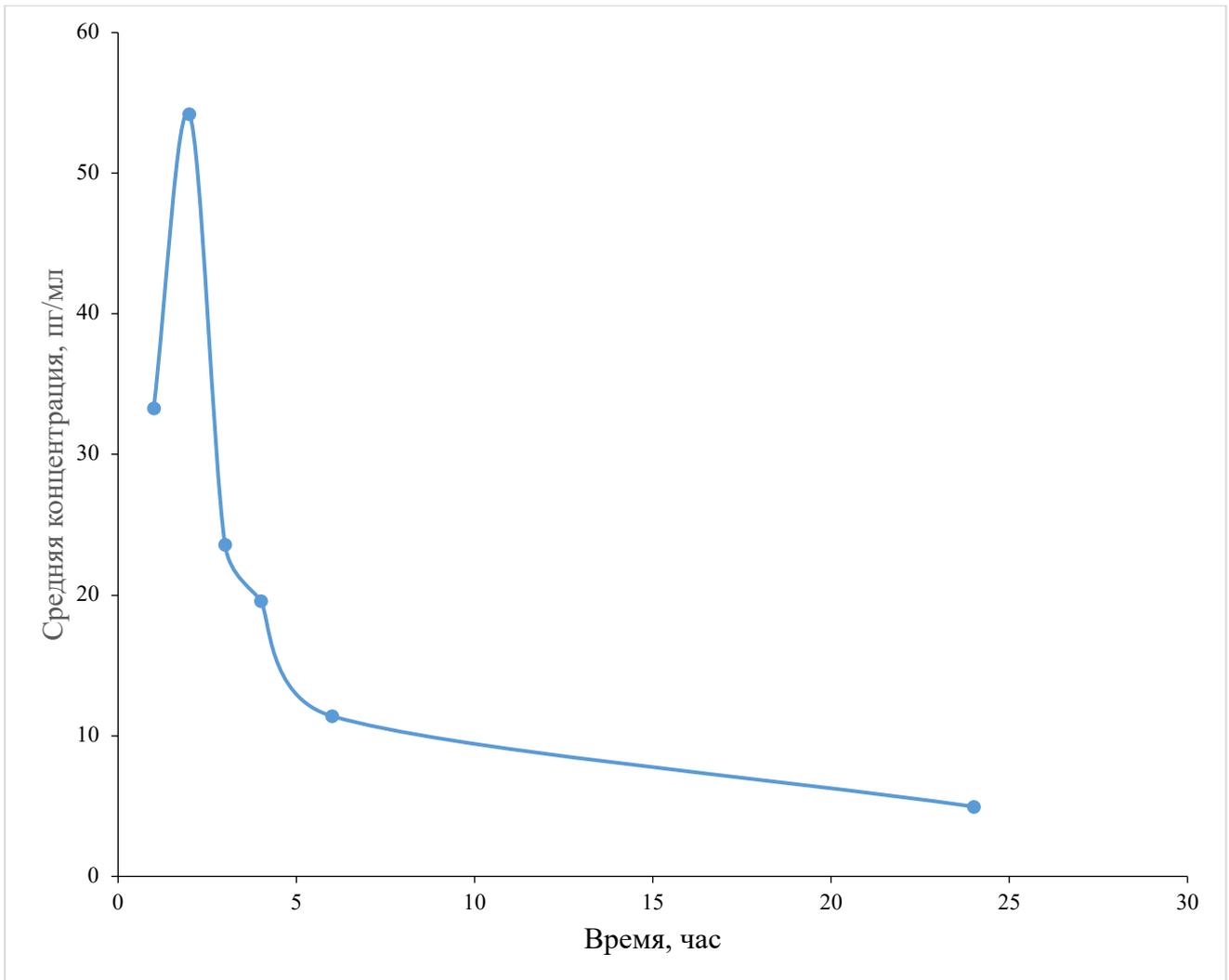


Рисунок 29 – Почечная экскреция соединения ФДЭС при пероральном введении крысам в дозе 5 мг/кг

В ходе исследования было выявлено, что основной параметр, характеризующий степень биодоступности препарата, площадь под фармакокинетической кривой, увеличивается экспоненциально с увеличением дозы. Значения максимальной концентрации также имеют статистически значимые различия в зависимости от дозы.

При пероральном введении крысам исследуемого соединения в дозах 5, 25 и 50 мг/кг коэффициент аппроксимации r^2 составляет 0,8052, свободный член линейного уравнения, описывающего зависимость, составляет 4969,8 (Рисунок 30).

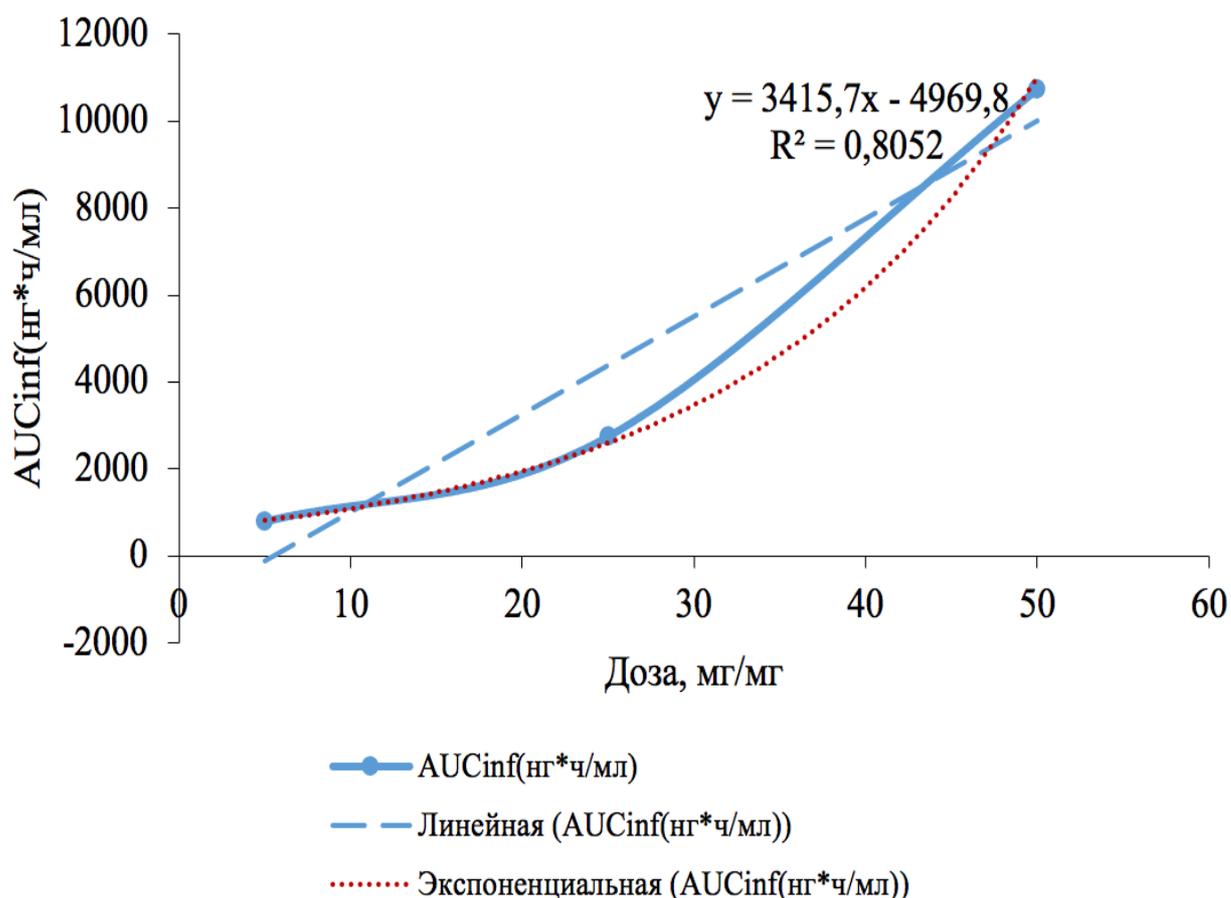


Рисунок 30 – График зависимости AUC от дозы при пероральном введении крысам

7.4. Метаболизм соединения ФДЭС

Поиск метаболитов любого экзогенного соединения подразделяется на два этапа. Первый этап заключается в теоретических исследованиях с использованием пакетов прикладных программ по возможным путям биотрансформации целевых компонентов и образованию их метаболитов (*in silico*).

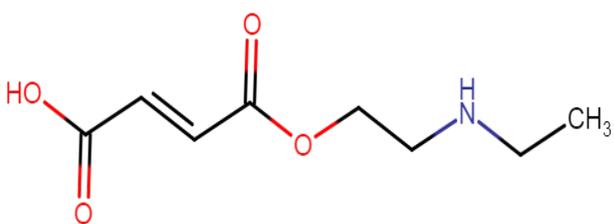
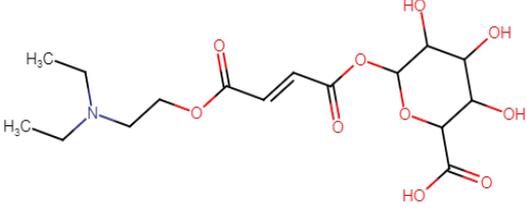
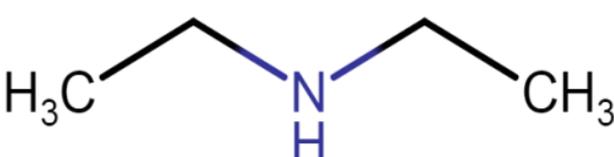
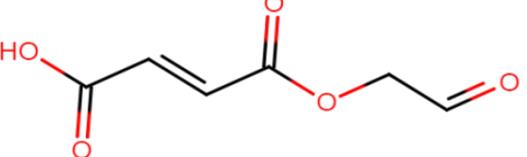
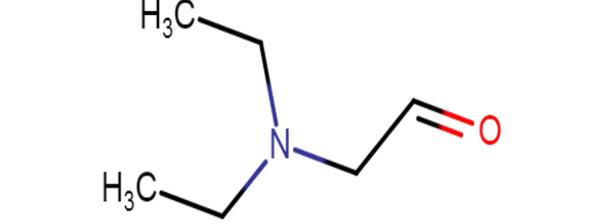
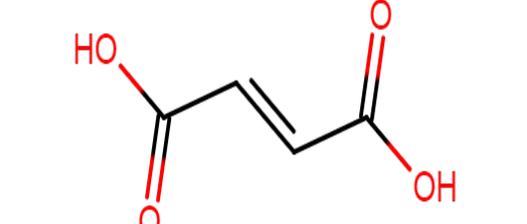
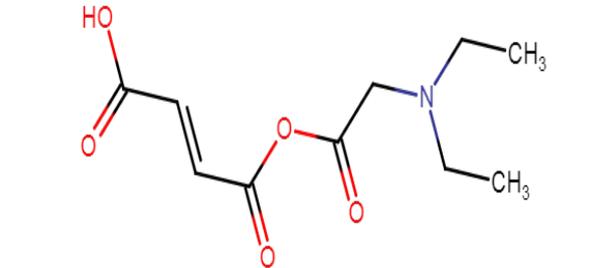
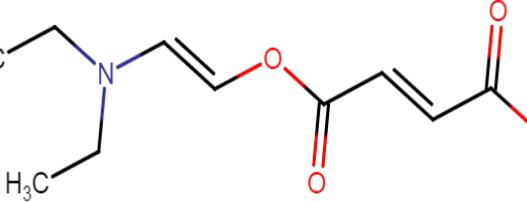
Второй этап заключается в экспериментальных исследованиях при экспонировании лабораторных животных действующими веществами, сбору проб биологических жидкостей и их анализа с целью определения содержания целевых компонентов и их метаболитов.

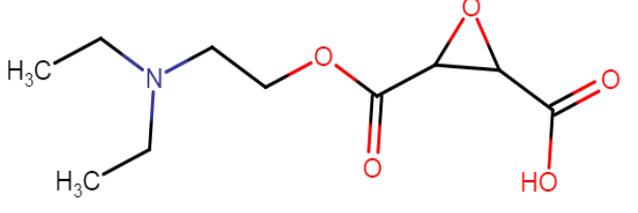
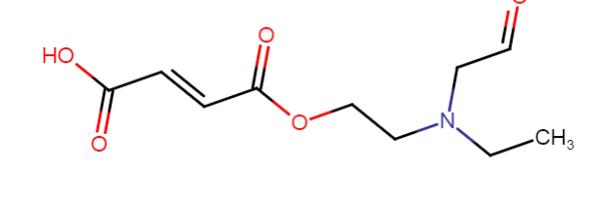
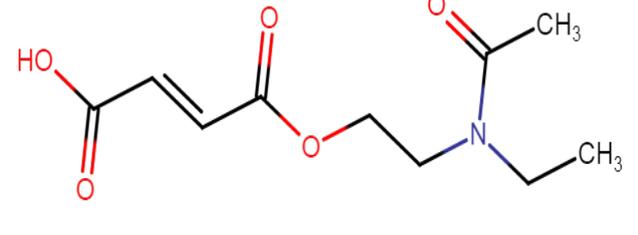
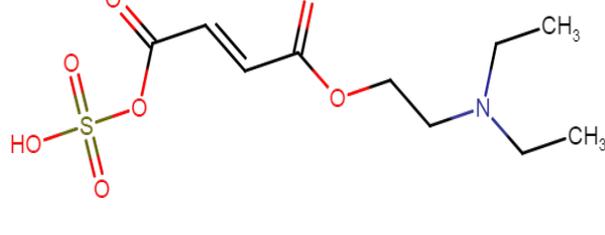
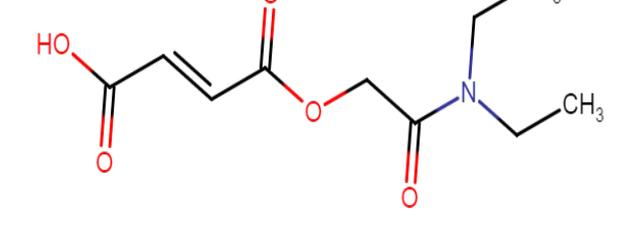
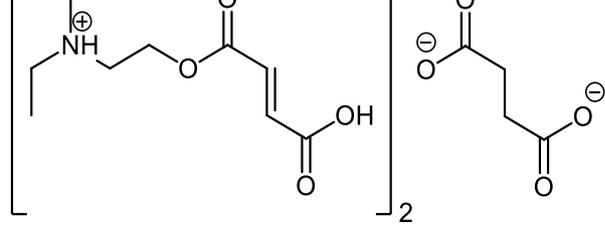
Для теоретического моделирования возможных метаболических реакций с участием широкого круга семейств ферментов (CYP 450, глюкуронирования) использовали программу Metabolizer ChemAxon Ver 14.12.15. Следует отметить, что метаболизм ФДЭС может осуществляться, как в процессах окисления, так конъюгации в печени.

В 1 фазу метаболизма могут осуществляться реакции: N-деалкилирования, O-деалкилирования, C-окисления, дегидрогенирования, эпоксидирования, а во 2 фазе O-сульфатирования, O-глюкуронирования.

При проведении компьютерного прогноза с помощью программы «PALLAS 3.00» возможных метаболитов соединения ФДЭС, было определено 13 структур метаболитов (Таблица 60).

Таблица 60 – Возможные метаболиты соединения ФДЭС, полученные по результатам прогноза в программе «PALLAS 3.00»

Номер метаболита	Номер метаболита
Метаболит №1	Метаболит №2
	
Метаболит №3	Метаболит №4
	
Метаболит №5	Метаболит №6
	
Метаболит №7	Метаболит №8
	
Метаболит №9	Метаболит №10

Номер метаболита	Номер метаболита
	
Метаболит №11	Метаболит №12
	
Метаболит №13	Базовая структура ФДЭС
	

Таким образом, в результате прогноза метаболизма можно предполагать, что ФДЭС может быть субстратом целого ряда ферментов цитохрома Р450, а также сульфотрансферазы. При этом реакция, в результате которой может быть получен продукт 12 (О-сульфатирование) потенциально может быть катализована сульфотрансферазой, реакция глюкуронирования (метаболит 2) может быть катализована УДФ-глюкуронилтрансферазой.

Остальные 11 метаболитов могут образовываться под воздействием цитохрома Р450.

Для исследования метаболитов лабораторным животным внутрижелудочно зондом было введено исследуемое соединение в дозе 50 мг/кг. Биологические среды для анализа забирались через 2 часа.

Результаты качественного определения вероятных метаболитов ФДЭС представлены на рисунке 31.

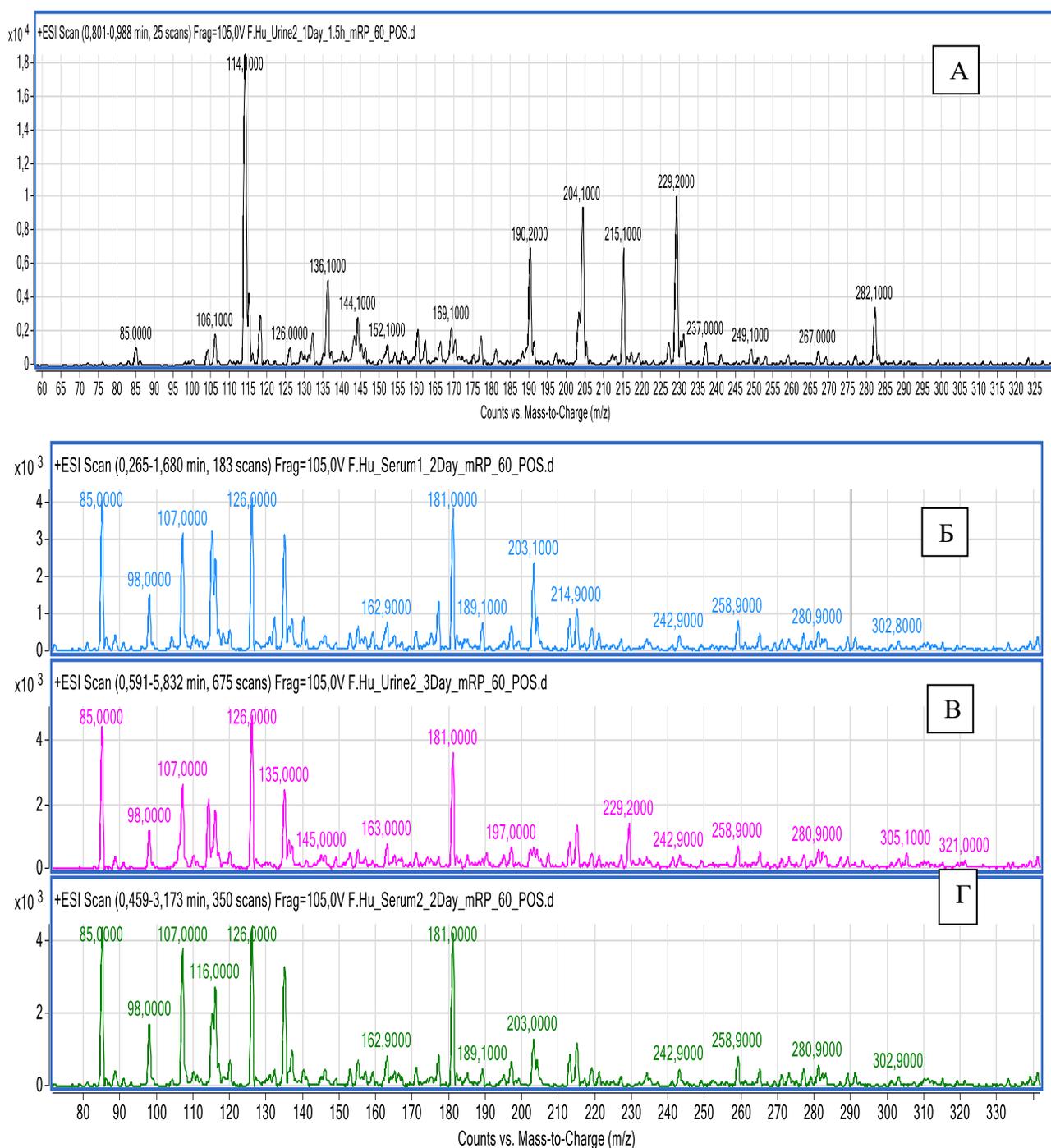


Рисунок 31 – Масс-хроматография проб биологических жидкостей лабораторных животных (крысы) через 2 часа после внутрижелудочного введения препарата ФДЭС в дозе 50 мг/кг. Обозначения: А – сыворотка крови, Б – плазма крови с цитратом, В – плазма крови с ЭДТА, Г – моча.

При анализе этих масс-хроматограмм обращает на себя внимание присутствие как катионной (непротонированной или протонированной, массы 189,1 и 190,2 соответственно, на масс-хроматограммах (Рисунок 31 А, Б, Г) и анионной части препарата (пик 115,1, на масс-хроматограммах А, В, Г), так и предсказанных метаболитов (низкоамплитудных пиков метаболита-1 (118,2) на масс-хроматограммах А и Б, метаболита-3 (пик 205,09) на хроматограмме А, метаболита-4 (пик 203,08) на хроматограммах (Рисунок 31 А, Б, В и Г).

Необходимо отметить, что продукт гидролиза соединения ФДЭС по эфирной связи присутствует в виде низкоамплитудного пика только на масс-хроматограмме А (сыворотка крови), что свидетельствует о низкой скорости такого пути метаболизма и возможной потере его при центрифугировании плазмы крови. Вероятно, биологическое действие определяется именно целой эфирной структурой действующего вещества препарата ФДЭС.

Основным метаболитом ФДЭС можно считать продукт окисления и гидроксилирования катионной части молекулы (метаболит-4), который присутствует на всех масс-хроматограммах, отраженных на Рисунке 31 Г. Поскольку одновременно окисление и гидроксилирование субстратов может идти в печени при участии цитохромов семейства P450, можно предположить участие этих ферментов в фактической биотрансформации этого соединения.

ГЛАВА 8. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ТАБЛЕТОК

Лабораторная технология производства таблеток¹⁰ осуществлена согласно требованиям ГФ XIV [58, 59].

8.1. Физико-химическая и технологическая характеристика субстанции ФДЭС

Активное фармацевтическое вещество (АФС) под рабочим названием ФДЭС, синтезированное на кафедре органической химии СПХФУ, представляет собой белый аморфный порошок с температурой плавления от 97 до 100°C, очень хорошо растворимый в воде и этиловом спирте, практически нерастворимый в этилацетате. рН 1%-ного водного раствора исследуемого вещества находится в диапазоне от 3,0 до 4,0 [237].

АФС ФДЭС является полидисперсный аморфный порошок с преимущественно равносторонними частицами и их более крупными агломератами. Поверхность частиц шероховатая, неоднородная, а форма краев сглажена (Рисунок 32).

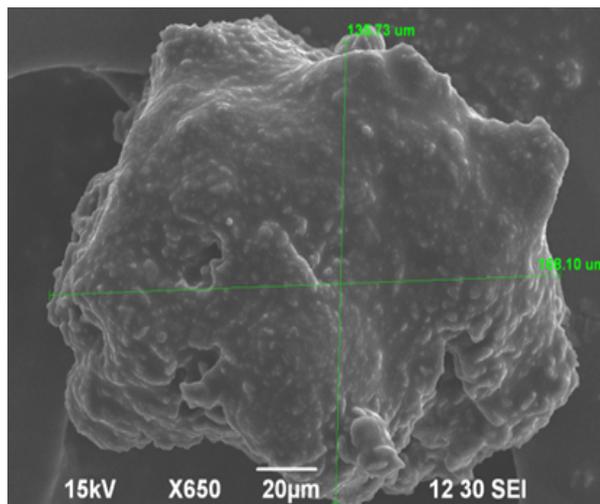


Рисунок 32 – Микрофотография частиц порошка ФДЭС

Размер частиц основной фракции порошка ФДЭС составляет 1,0-0,5 мм, что является приемлемым для смешения с порошкообразными материалами со сходным гранулометрическим составом и последующего прессования. При этом порошок ФДЭС, соответствующий проекту нормативной документации (НД) [209], достаточно хорошо отвешивается, равномерно распределяется в таблетной массе и прессуется.

¹⁰Выражаем глубокую, искреннюю благодарность за помощь в проведении исследований к.фарм.н. Терентьевой О.А. (руководитель д.фарм.н., профессор Флисюк Е.В.) (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

ФДЭС очень легко растворяется в воде, имеет удовлетворительную вибросыпучесть и насыпную массу, однако плохо высыпается из канала диаметром 10 мм, увеличивается её слёживаемость и комкование.

Определение технологических показателей субстанции ФДЭС проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV [59], были определены ее технологические свойства (Таблица 61).

Таблица 61 – Технологические свойства субстанции ФДЭС

Показатель	Единицы измерения	Значение показателя	
Фракционный состав	%	<0,5 мм 2-1,0 мм – >2,0 мм -	33,3
		1,0-0,5 мм	66,7
Форма и цвет частиц		Аморфный порошок белого цвета	
Сыпучесть	г/с	0	
Насыпная плотность до уплотнения (m/V_0)	г/см ³	0,493±0,012	
Насыпная плотность после уплотнения (m/V_{1250})	г/см ³	0,632±0,008	
Коэффициент прессуемости	%	21,8±0,2	
Способность порошка к уплотнению $V_{10} - V_{500}$	мл	5,2±0,2	

На основании анализа результатов о технологических свойствах субстанции ФДЭС (Таблица 61), можно сделать заключение о необходимости предварительного гранулирования смеси АФС со вспомогательными веществами для обеспечения свободной сыпучести и постоянной насыпной плотности массы для таблетирования.

8.2. Получение таблеток производного ДЭАЭ с использованием метода влажного гранулирования

Субстанция ФДЭС представляет собой гигроскопичный порошок [149, 209], поэтому её не удалось ввести в массу таблетную непосредственно при влажном гранулировании. Возникла необходимость разработать технологический режим получения прочного, сыпучего гранулята ВВ, а затем смешать его с действующим веществом.

С этой целью для влажного гранулирования исследовали возможность применения метода продавливания (протирания) влажных масс и псевдооживленного слоя (ПОС) [24, 31, 356].

При разработке технологии гранулирования, было проведено сравнение трёх гранулирующих агентов: ПВП, МЦ, 5% раствор крахмала картофельного (Таблица 62).

Для трёх образцов гранулята были выбраны из списка вспомогательных веществ, рекомендованных ГФ XIV (ОФС.1.4.1.0015.15), вспомогательные вещества. Рассмотрены технологические методы и изучены их параметры, необходимые для получения гранулята.

Таблица 62 – Экспериментальные составы для выбора технологии гранулирования и параметры ведения процессов

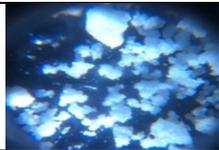
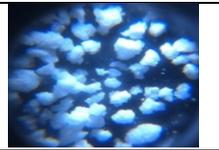
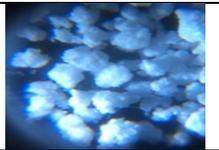
Ингредиенты	Вариант №					
	Г-1		Г-2		Г-3	
	В, %	Загрузка, г	В, %	Загрузка, г	В, %	Загрузка, г
Кальция гидрофосфата дигидрат	-	-	-	-	4,5	200,0
ПВП К-29/32	6,7	24,14	-	-	-	-
МЦ-16	-	-	0,7	2,4	-	-
Крахмал картофельный (общее количество)	-	-	-	-	9,4	60,0
МКЦ	3,9	50,0	3,1	100,0	-	-
Лактозы моногидрат	69,4	250,0	6,2	200,0	16,1	50,0
Итого:	00,0	360,0	00,0	302,4	00,0	310,0
Увлажнитель	Раствор ПВП 20%		Раствор МЦ 2%		Крахмальный клейстер 5%	
Масса раствора увлажнителя, г; в его составе:	120,68		119		124	
Связующее вещество, г	24,14		2,4		6,2	
Вода очищенная, г	96,54		116,6		117,8	
Краткая характеристика технологии	Смешение, увлажнение, гранулирование и сушка в псевдоожиженном слое; калибровка гранулята через сито 2 мм		Смешение, увлажнение в ступке; гранулирование через сито 2 мм; подсушивание в шкафу сушильном; протирание через 2 мм; сушка до 2-3% влаги, калибровка гранулята через сито 2 мм			
Описание и параметры технологического процесса	$t_{\text{колорифера}} - 80 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$; $t_{\text{сушка}} - 50 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $t_{\text{вых}} - 48 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$. расход увлажнителя – 11 ед.; сопротивление днища – 40 ± 6 мм водн. ст; сопротивление фильтра – 300 мм водн. ст. давление сжатого воздуха на распыление = $7,0 \pm 0,1$ бар		Сушка гранулята: температура – $70 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ Продолжительность сушки – 55-60 мин		Сушка гранулята: температура – $72 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ Продолжительность сушки – 55-60 мин	

Примечание: Г-1-Г-3– опытные образцы гранулята от 1 до 3.

Для выбора технологии гранулирования оценивали влияние исследованных приёмов на технологические свойства получаемых гранулятов (сыпучесть, насыпную массу, фракционный состав, выход) (Таблица 63).

Установлено, что при использовании ПОС в выбранных технологических режимах выход целевой фракции гранулята (0,5-2,0 мм) составил около 40%. Однако, в ходе проведённого технологического процесса было много потерь, частицы гранулята получались малопрочными. При влажном гранулировании методом протирания частицы гранулята оказались достаточно прочными, выход целевой фракции - 60-65%.

Таблица 63 – Основные свойства полученных гранулятов

Ингредиенты	Вариант №		
	ОГ-1	ОГ-2	ОГ-3
Получено гранулята (<2 мм), г	275,4±13,8	286,7±14,2	295,7±14,7
Выход гранулята (<2 мм), %	76,4±6,1	94,8±4,5	95,4±4,8
Внешний вид частиц гранулята			
Потеря в массе при высушивании, %	2,27±0,1	1,91±0,1	2,04±0,1
Гранулометрический состав			
<0,5 мм	160,3±8,1	110,4±5,3	102,5±5,0
0,5-1,0 мм	113,3±5,7	120,6±6,0	164,8±8,3
1,0-2,0 мм	1,8±0,1	55,7±2,8	28,4±1,4
Выход целевой фракции гранулята (0,5-2,0), %	41,8±2,5	61,5±3,1	65,3±3,2
Сыпучесть, г/с			
<0,5 мм	22,1±1,2	18,3±0,9	24,2±1,3
0,5-1,0 мм	12,6±0,6	12,1±0,6	15,1±0,8
1,0-2,0 мм	-	8,3±0,4	6,4±0,3
Насыпная плотность до уплотнения, г/см ³			
<0,5 мм	0,58±0,3	0,54±0,2	0,54±0,2
0,5-1,0	0,47±0,2	0,45±0,2	0,47±0,2
1,0-2,0	-	0,43±0,1	0,45±0,1

Примечание: ОГ-1-ОГ-3– опытные образцы гранулята от 1 до 3.

Сушку гранулятов проводили в шкафу сушильном до достижения постоянного значения влажности 2%-3,5%. При меньших значениях гранулят оказывался хрупким, характеризовался высоким содержанием пылевидной фракции, при хранении таблетки расслаивались, а при больших значениях - ухудшалась его сыпучесть, модельные таблетки оказывались непрочными, со временем крошились.

ПВП использовали в концентрации 20%, МЦ – 2%, для крахмала картофельного потребовалось изучить влияние концентрации на свойства получаемых гранулятов и таблеток

(Таблица 64).

Клейстер крахмальный 10% обуславливает получение таблеток с избыточным временем распадаемости (более 20 мин), а клейстера крахмального 2% - с прочностью на раздавливание менее 60 Н, что может оказаться недостаточно для обеспечения механических и потребительских свойств таблеток в течение всего срока годности (Таблица 64).

При изучении влияния концентрации клейстера крахмального на характеристики получаемых таблеток ФДЭС, установлено, что наилучшей механической прочностью и наименьшим временем распадаемости обладали таблетки, полученные при использовании клейстера крахмального 5% (Таблица 64).

Установлено, что 5% клейстер крахмальный обеспечивает получение целевой фракции гранулята с достаточным выходом и хорошей сыпучестью (Таблица 64). В таблице 65 представлены краткие описания и параметры ведения технологических процессов гранулирования.

Таблица 64 – Влияние концентрации клейстера крахмального на показатели качества, получаемых таблеток ФДЭС

Ингредиент	Единица измерения	Вариант №		
		ВО-5	ВО-6	ВО-7
ФДЭС	%	13,3	13,3	13,3
Лактоза моногидрат	%	11,5	11,2	10,8
Кальция гидрофосфата дигидрат	%	56,8	55,6	53,5
Крахмал картофельный	%	17,4	18,9	21,4
Магния стеарат	%	1,0	1,0	1,0
Увлажнитель	%	крахмальный клейстер 2%	крахмальный клейстер 5%	крахмальный клейстер 10%
Распадаемость	мин	7,9	13,2	21,1
Прочность на раздавливание	Н	52,6	92,3	140,4
Показатели качества				
Прочность на истираемость	%	99,55±0,01	99,97±0,03	99,99±0,03
Выход фракции гранулята 2,0÷0,5 мм	%	60,5±0,2	64,2±0,2	66,4±0,4
Сыпучесть гранулята (с мешалкой)	г/с	12,2±0,4	13,4±0,4	14,9±0,3

Примечание: ВО-5 –ВО-7 – опытные образцы таблеток от 5 до 7.

ФДЭС вводили в массу для таблетирования на операции опудривания гранулята магния стеаратом. При получении таблетной массы однородность смешения компонентов оценивали визуально при помощи лупы (x20). ФДЭС смешивали с сухим гранулятом ВВ в специальной емкости для опудривания с имитацией движения 3-хнаправленного смесителя в течение 4 мин.

При разработке режима таблетирования подбирали величину усилия прессования, обеспечивающую получение прочных таблеток с гладкой поверхностью, с отклонением средней

массы не более 5% от номинального значения.

При усилии прессования менее 1,5 кН получались непрочные таблетки, с неоднородной поверхностью. Увеличение величины усилия прессования более 6 кН приводило к прилипанию таблеток к пресс-инструменту и частичному подплавлению компонентов, при этом увеличивалось время распадаемости таблеток и ухудшался внешний вид (неоднородность окраски).

Поэтому для получения качественных таблеток ФДЭС в выбранных условиях усилие прессования должно составлять от 3,5 до 5,5 кН.

Таким образом, при разработке технологии получения таблеток ФДЭС было показано, что для гранулирования ингредиентов, выбранных при фармацевтической разработке таблеток ФДЭС (лактозы моногидрат, крахмал картофельный, кальция гидрофосфата дигидрат) наиболее рационально применение метода влажного гранулирования ВВ с использованием высокоэффективных связующих – клейстера крахмального 5%. Результаты определения фракционного состава массы для таблетирования, получаемой по данной технологии, представлены в таблице (Таблица 65).

Таблица 65 – Фракционный состав массы для таблеток ФДЭС

Виды размеров частиц, мм	Массовая доля, %
	Масса для таблетирования
<0,5	2,4±0,1
> 0,5 - <1,0	8,8±0,4
1,0-2,0	38,0±1,9
>2,0	50,8±2,5

Масса для таблеток содержат приемлемое сочетание крупной и мелкой фракций, что обеспечивает прочность на сжатие получаемых из них таблеток и отсутствие избыточного пылеобразования в ходе технологического процесса.

Масса и прочность таблеток из полученного гранулята остаются постоянными, таблетки не расслаиваются. Использование указанного технологического приёма позволяет улучшить технологические свойства ФС: обеспечить достаточную сыпучесть, насыпную массу, избежать негативного воздействия на неё температуры и излишней влаги в ходе технологического процесса (Таблица 66).

Таблица 66 – Технологические свойства массы для таблетирования

Наименование показателя	Единицы измерения	Результат
Насыпная плотность	г/см ³	0,53±0,1
Насыпная плотность после уплотнения	г/см ³	0,67±0,3
Угол естественного откоса	°	28,0±2,0
Сыпучесть (d=10 мм, с мешалкой)	г/с	13,7±0,3
Коэффициент прессуемости	у.е.	0,22±0,2

Небольшое отличие насыпной плотности после усадки от свободной насыпной плотности обеспечивает точность загрузки при автоматическом дозировании по объёму.

Далее изучали гигроскопичность таблетной массы и таблеток. Результаты исследования влагопоглощения полупродуктов и готового продукта при различных значениях относительной влажности представлены на рисунках (Рисунок 33–35).

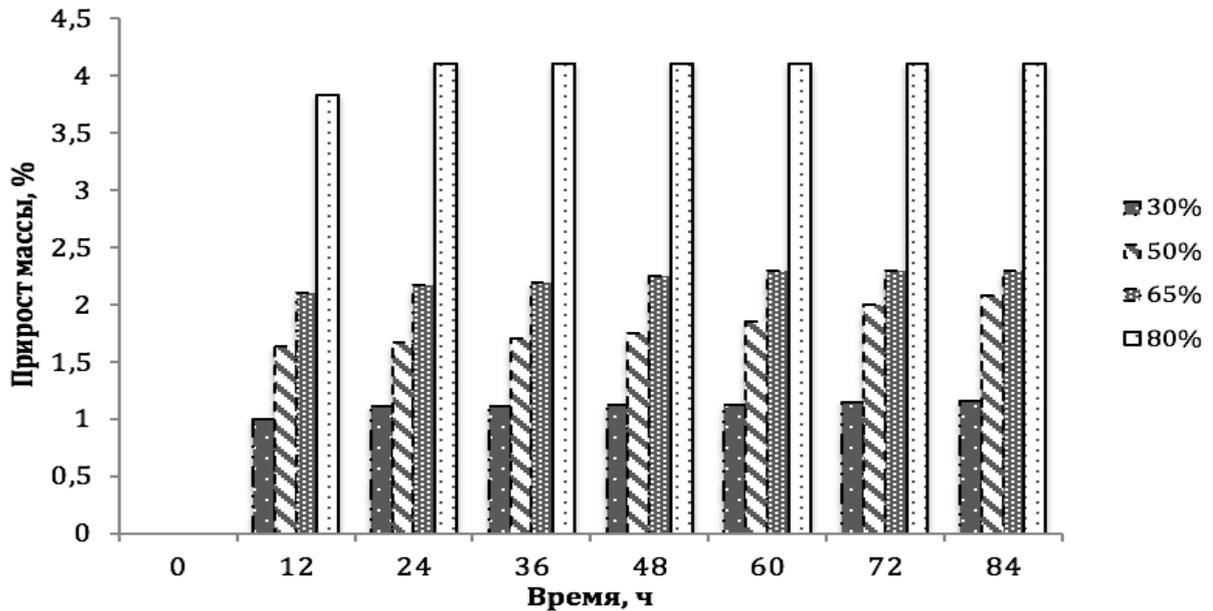


Рисунок 33 – Кривые влагопоглощения таблетной массы (25°C, $\varphi = 30, 50, 65, 80\%$)

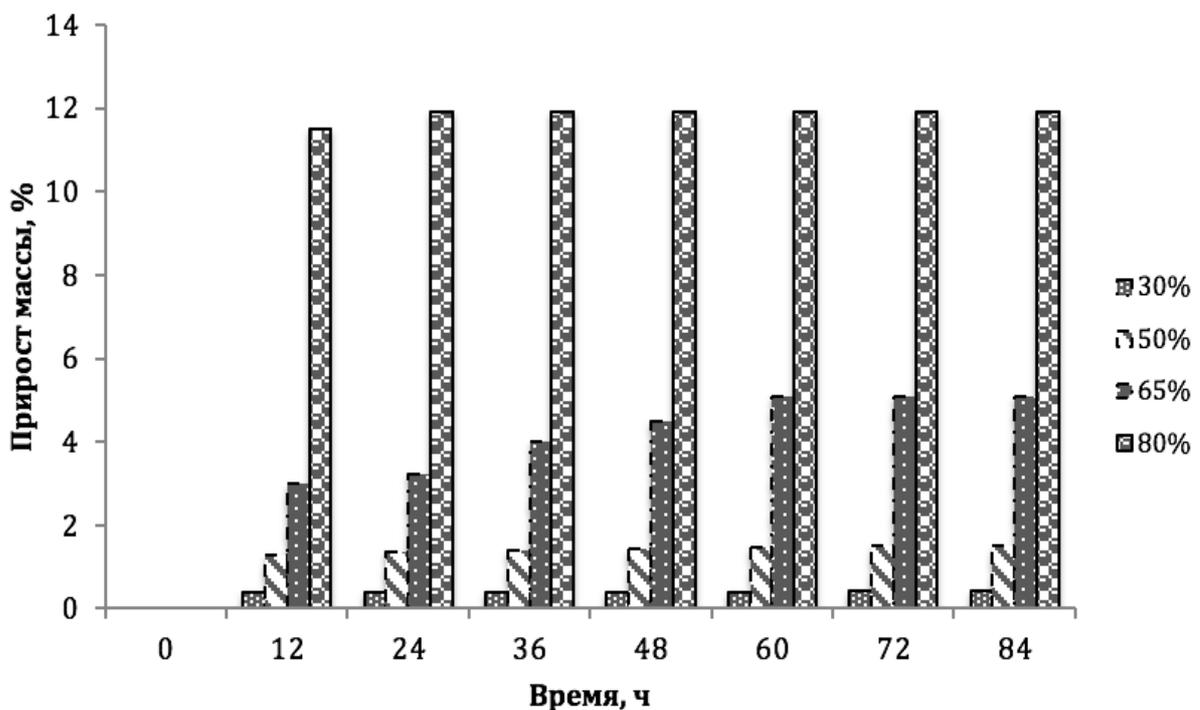


Рисунок 34 – Кривые влагопоглощения таблеток ФДЭС (25°C, $\varphi = 30, 50, 65, 80\%$)

При производстве и хранении может быть рекомендовано поддержание условий с относительной влажностью около 50% и хранение в первичной упаковке, обеспечивающей изоляцию от атмосферного воздуха, например, в банках из стекломассы или полимеров с плотной крышкой и вложенным влагопоглотителем.

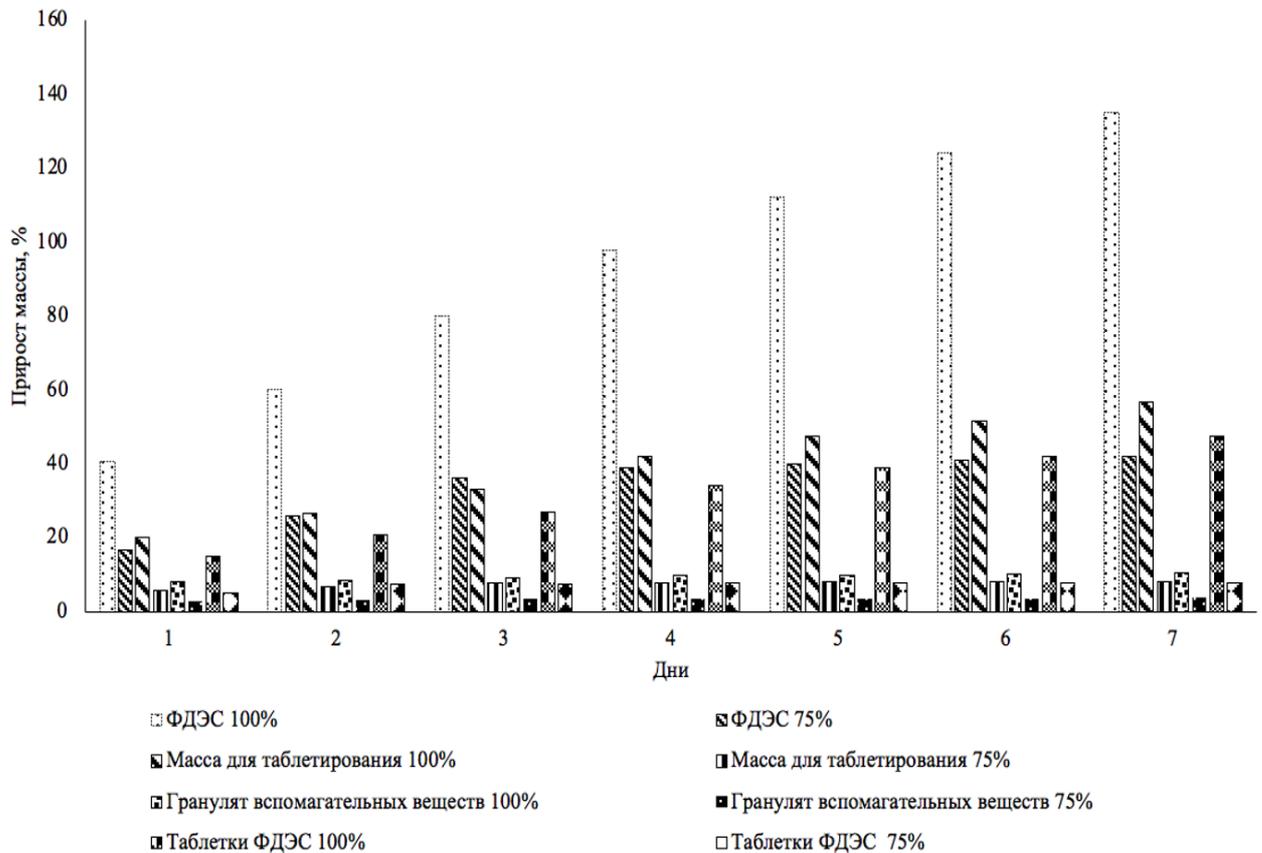


Рисунок 35 – Кривые влагопоглощения образцов ФС, таблетной массы и таблеток ФДЭС (25°C, $\varphi = 75, 100\%$)

Наибольшей гигроскопичностью обладает АФС ФДЭС, а полученные на её основе, таблетки характеризуются в 2,5-3 раза меньшим влагопоглощением.

Таким образом, нами были выбран оптимальный технологический подход и состав таблеток (Рисунки 34,35), который обеспечивает существенное повышение устойчивости к поглощению влаги готовой лекарственной формы.

8.3. Обоснование состава таблеток ДЭАЭ и изучение их свойств

Доза действующего вещества ФДЭС в таблетке составляет 60 мг, которая была определена путём преобразования эффективной дозы, установленной в исследованиях на животных, в эквивалентную дозу для человека [229].

Для получения необходимой массы таблетки (450 мг) и придания ей необходимых технологических свойств в качестве наполнителей в состав таблетки введены кальция гидрофосфата дигидрат, лактозы моногидрат и крахмал картофельный.

При этом крахмал картофельный, введённый в состав таблетки в сухом виде, одновременно выполняет также и функцию дезинтегранта, а в составе увлажнителя – связующего вещества.

Введение в состав таблеток комплекса таких гидрофильных компонентов, как крахмал картофельный, лактозы моногидрат в целом способствует улучшению смачиваемости таблетки. При этом введение нерастворимого в воде кальция гидрофосфата дигидрата позволяет уменьшить влагопоглощение таблеток.

В качестве лубриканта использован магния стеарат в количестве 1,0%, который не только снижает трение на контактных участках при прессовании таблеток, но также значительно облегчает деформацию частиц вследствие адсорбционного понижения их прочности (проникновение в микрощели).

На основании проведённых фармацевтических и технологических исследований был определён состав экспериментальных таблеток ФДЭС, обеспечивающий их надлежащие показатели качества (Таблица 67).

Таблица 67 – Состав таблеток ФДЭС и выбор вспомогательных веществ

Ингредиент	Содержание в 1 таблетке	Функциональное назначение ВВ
ФДЭС	60 мг	Действующее вещество
Лактозы моногидрат	50,5 мг	Наполнитель
Кальция гидрофосфата дигидрат	250 мг	Наполнитель
Крахмал картофельный	85 мг	Дезинтегрант, связующее, наполнитель
Магния стеарат	4,5 мг	Лубрикант
ИТОГО:	450 мг	

Таблетки экспериментальных составов получали методом прямого прессования, диаметр таблетки составлял 10 мм, форма таблеток - двояковыпуклая. Во всех случаях доза действующего вещества была постоянной и составляла 60 мг, а масса таблетки равна 450 мг.

У экспериментальных таблетки изучали их внешний вид, механическую прочность (истираемость, прочность на раздавливание), распадаемость, влагопоглощение через 24 ч ($\phi=80\%$; 25°C) и через 48 ч ($t=25^{\circ}\text{C}$, $\phi=50\%$).

Изучено влияние различные вспомогательных вещества на качество таблеток. Так, Полипласдон[®] XL-10, МКЦ, тальк и аэросил ухудшали качество таблеток. При относительной влажности 80% в выбранных условиях эксперимента таблетки крошатся через 1 ч 8 ч или расслаиваются после их прессования, некоторые имеют неоднородную поверхность и окраску.

Полипластон® XL-10 способствовал увеличению влагопоглощающей способности таблеток, введение МКЦ в таблетную массу затрудняло процесс прямого прессования. Некоторые образцы таблеток, в составе которых был Полипластон® XL-10 немного увеличились в размерах и становились рыхлыми. Введение в состав таблеток талька и аэросила приводило к увеличению времени распадаемости, а крахмала картофельного - улучшало их распадаемость.

Таким образом, по набору свойств наиболее приемлемым оказался экспериментальный состав таблеток, содержащий крахмал картофельный, лактозы моногидрат и кальция гидрофосфата дигидрат (Таблица 68).

Описание. Круглые плоскоцилиндрические таблетки белого или почти белого цвета с риской на одной из сторон и фаской. По внешнему виду должны соответствовать требованиям ГФ XIV (ОФС.1.4.1.0015.15).

Распадаемость. Не более 15 мин с использованием дисков. ГФ XIV (ОФС.1.2.1.0010.15). В ходе проведения испытаний по показателю «Распадаемость» было установлено, что таблетки «ФДЭС» полностью распадаются в течение 9 мин.

Вода. Не более 5,0%.

Стеарат магния. содержание кальция магния 1%.

Микробиологическая чистота. категория 3А (для препаратов для приёма внутрь или введения ректально).

Таблица 68 – Свойства экспериментального образца таблеток ФДЭС

Параметры		Характеристика таблеток
Внешний вид		Таблетки белого цвета, гладкие, без вкраплений
Диаметр таблетки, мм		10,0±0,1
Прочность на истираемость, %		99,99±0,03
Прочность на раздавливание, Н		156,9±7,9
Распадаемость, мин		6,0±0,3
Прирост массы через 24 ч, % (φ=80%; t=25°C)		9,23±0,71
Прирост массы через 48 ч, % (t=25°C, φ=50%)		1,73±0,11

На основании проведенных технологических исследований составлена схема производства таблеток ФДЭС (Рисунок 37).

Выделяют несколько основных технологических этапов, получения экспериментальных таблеток ФДЭС: подготовка оборудования и сырья, получение массы таблетной, получение таблеток, фасовка, упаковка и маркировка, готовая продукция.

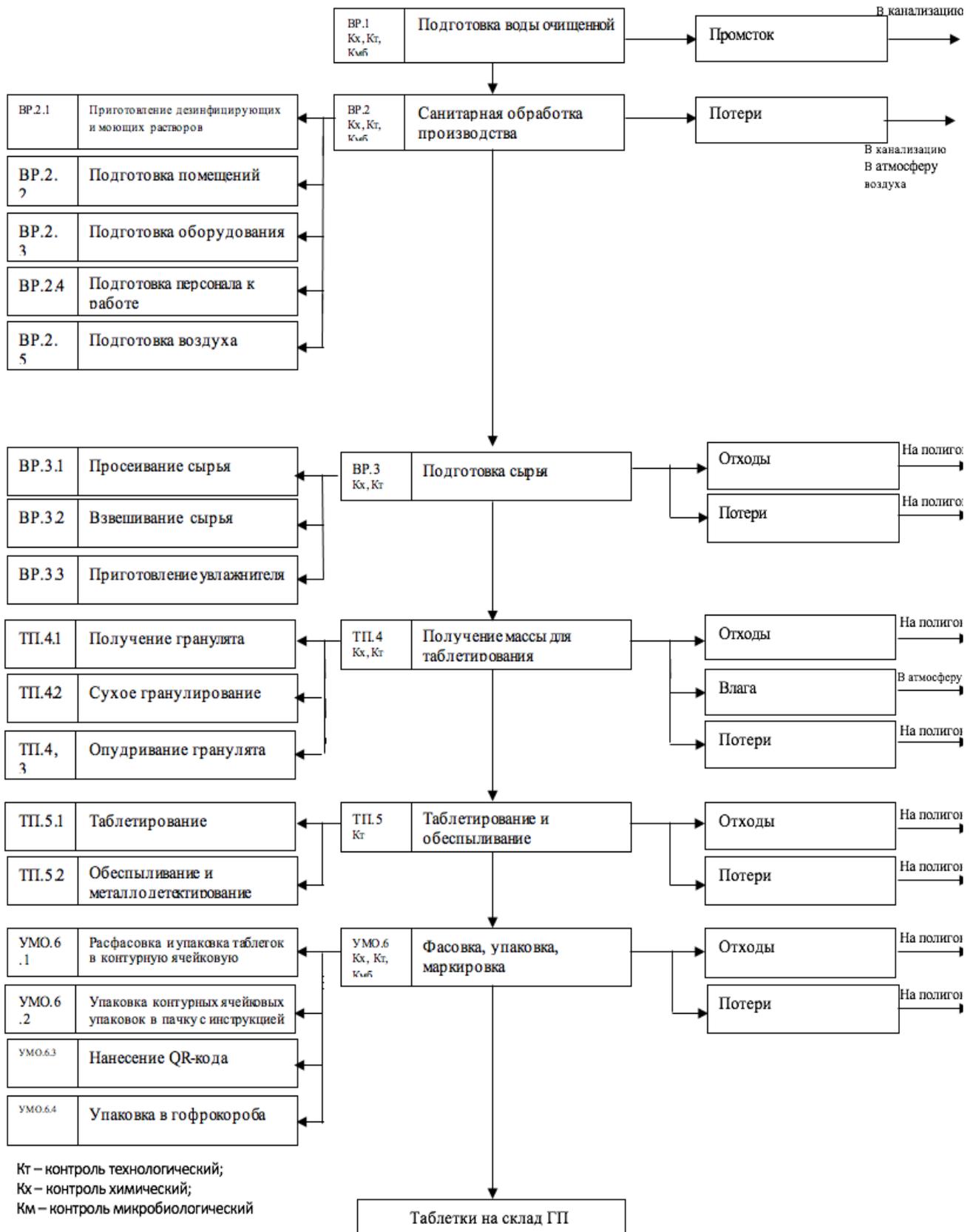


Рисунок 37. Технологическая схема производства таблеток ФДЭС

ГЛАВА 9. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ФДЭС

Исследования по оценке безопасности лекарственного средства¹¹ включали изучение острой токсичности субстанции и хроническую токсичность таблеток.

9.1. Изучение острой токсичности субстанции ФДЭС

Исследование проводилось с целью определения класса токсичности нового соединения и предварительной оценки его потенциальной пригодности к применению в качестве лекарственного средства. С этой целью оценивалась общая токсичность ФДЭС при однократном внутривенном и подкожном введении лабораторным мышам обоего пола с расчетом LD₅₀, а также при однократном пероральном введении самцам и самкам аутбредных крыс для определения класса токсичности испытуемой фармацевтической субстанции.

Критериями оценки острой токсичности являлись количество погибших животных и время их смерти; клиническая картина интоксикации; изменения в поведенческих реакциях и патологические изменения во внутренних органах и тканях, выявленные при вскрытии павших и выживших животных, убитых в конце эксперимента (макроскопическая оценка).

Были зафиксированы все патологические изменения в поведении и клиническом состоянии животных. Определение летальных доз ФДЭС при различных путях введения проводили по экспресс-методу Прозоровского. В качестве тест-системы были использованы аутбредные мыши самцы и самки. Испытуемое вещество вводилось в широком диапазоне доз с логарифмическим шагом 0,1 (Таблица 69).

Таблица 69 – Алгоритм проведения эксперимента по определению LD₅₀ на лабораторных мышах при внутривенном введении экспресс методом Прозоровского

Номер группы	Пол животного	Количество животных в группе	Доза внутривенно, мг/кг	Доза подкожно, мг/кг	Доза перорально, мг/кг
1	самцы	4	1260	1580	2000
2	самцы	4	1580	2000	2500
3	самцы	4	2000	2500	3160
4	самцы	4	2500	3160	3994
5	самки	4	1260	1580	2000
6	самки	4	1580	2000	2500
7	самки	4	2000	2500	3160
8	самки	4	2500	3160	3994

¹¹Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам центра экспериментальной фармакологии и к.б.н. доценту Ивкину Д.Ю. за помощь в выполнении настоящего исследования (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет)

Процедуру введения растворов исследуемой субстанции все животные перенесли хорошо, без каких-либо признаков изменения поведения или болезненности.

При внутривенном и подкожном введении ФДЭС в диапазоне доз от 2000 мг/кг до 3000 мг/кг отмечали гибель мышей, которая наступала в течение первых суток после введения вещества (Таблицы 70, 71).

В течение первых 6 часов наблюдения были отмечены индивидуальные признаки острого отравления - угнетение дыхания, бледность конечностей и ретропульсия (заторможенная походка). Наблюдалось снижение реакции на взятие трубку. Все перечисленные признаки проходили и зафиксированные показатели пришли в норму у выживших животных, животные чувствовали себя нормально, охотно употребляли корм, равномерно набирали вес.

При внутрижелудочном введении ФДЭС в диапазоне доз от 2000 мг/кг до 3000 мг/кг в течение 14 дней не наблюдалось гибели мышей обоих полов.

Таблица 70 – Смертность мышей и значения LD₅₀ при внутривенном введении раствора исследуемой субстанции ФДЭС

Пол животного	Доза вещества, мг/кг	Количество павших животных /количество в группе	Последовательность по Прозоровскому	LD ₅₀ , мг/кг
самцы	1260	0/4	0042	2070±220
	1580	0/4		
	2000	4/4		
	2500	2/4		
самки	1260	0/4	0142	1990±250
	1580	1/4		
	2000	4/4		
	2500	2/4		

Таблица 71 – Смертность мышей и значения LD₅₀ при подкожном введении раствора исследуемой субстанции ФДЭС

Пол животного	Доза вещества, мг/кг	Количество павших животных /количество в группе	Последовательность по Прозоровскому	LD ₅₀ , мг/кг
самцы	1580	0/4	0232	2550±430
	2000	2/4		
	2500	3/4		
	3160	2/4		
самки	1580	1/4	1014	2550±240
	2000	0/4		
	2500	1/4		
	3160	4/4		

В качестве тест-системы для проведения исследования использовались лабораторные аутобредные крысы самцы и самки.

По методике ОЭСР Тест № 423 «Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности» (Test № 423 «Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method») вещество вводилось внутривентриально каждой группе подопытных животных в одной из заданных доз.

Так же были определены средней летальной дозы на крысах. Согласно методике ОЭСР Тест № 423 на каждом этапе использовалось три животных. Первым трем животным вводилась тестируемая доза 300 мг/кг.

В течение 24 часов после введения все животные выжили, поэтому эта же доза была введена повторно еще трем животным. На данном этапе ни одно животное не погибло.

Дозу увеличили до 2000 мг/кг и ввели трем животным, из которых ни одно не погибло. При повторном введении данной дозы трем крысам гибели животных не было. Такие результаты получены у крыс самцов и самок.

У животных величина зрачка и ширина глазной щели не менялись в течение всего периода наблюдения. Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось. Нос был умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены.

Дыхание в целом было нормальным у всех экспериментальных животных. Слезотечения и нарушений слюноотделения не наблюдали. Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. Тонус мускулатуры у всех животных был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Молочные железы самок без уплотнений на ощупь. Половые органы самцов правильно выражены.

Все животные нормального телосложения, удовлетворительного питания. Двигательная активность была в норме. В целом, поведение животных было стандартным.

Кровотечений у животных не наблюдали, все выделения были в норме. Было установлено, что при внутривентриальном введении ФДЭС в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг гибели в течение 14 дней и изменения внешнего вида крыс не отмечено.

При определении острой токсичности по методике ОЭСР Тест № 423 «Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности» доза 2000 мг/кг не вызывала летального исхода при применении у животных двух видов (мыши и крысы) и обоих полов, что позволяет отнести исследуемое вещество к классу токсичности «5 класс токсичности или не классифицируется».

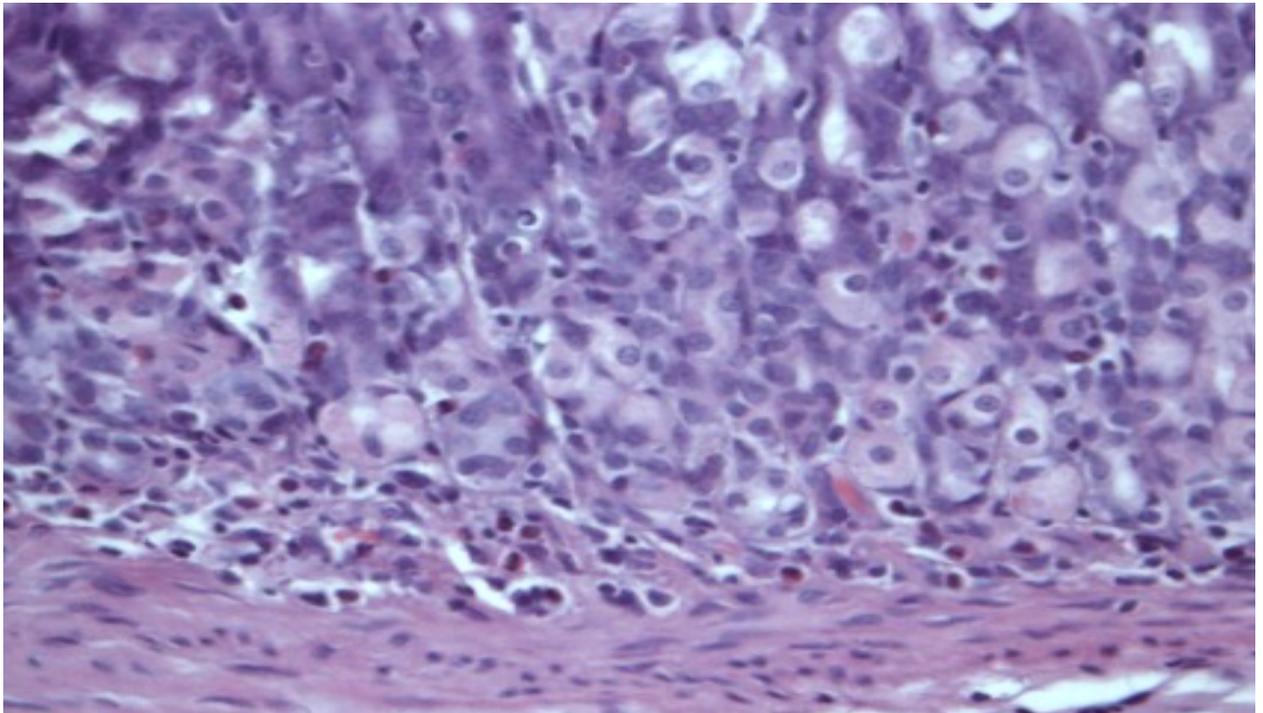
Далее была проведена оценка динамики массы тела и состояния внутренних органов белых беспородных крыс после однократного введения препарата ФДЭС в высокой дозе.

Установлено, что однократное введение животным растворов испытуемой ФС внутрижелудочно не вызывает изменения в массе тела крыс самцов и самок. Данный показатель у крыс самцов и самок равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения, животные охотно потребляли корм и воду. Статистически значимых различий между группами не наблюдали (Таблица 72).

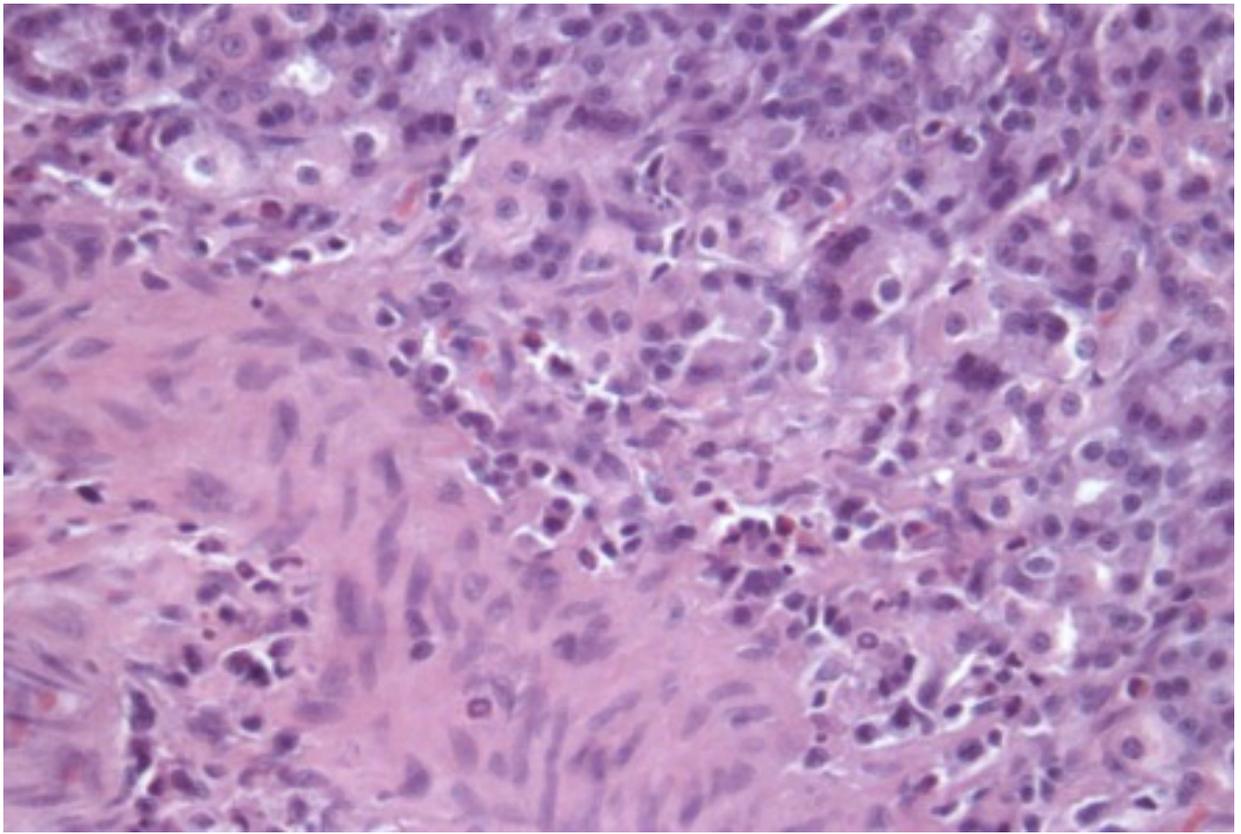
Таблица 72 – Влияние однократного внутрижелудочного введения ФДЭС на массу тела крыс самцов и самок ($M \pm m$)

Пол	Доза, мг/кг	Масса тела животных, г		
		1 день	7 день	14 день
		$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
самцы	300	177,9 \pm 3,4	193,3 \pm 5,5	202,5 \pm 2,8
	2000	190,2 \pm 3,8	198,4 \pm 3,9	206,2 \pm 4,5
самки	300	170,2 \pm 4,1	177,4 \pm 4,2	185,2 \pm 2,1
	2000	172,7 \pm 3,1	182,2 \pm 5,4	190,4 \pm 3,9

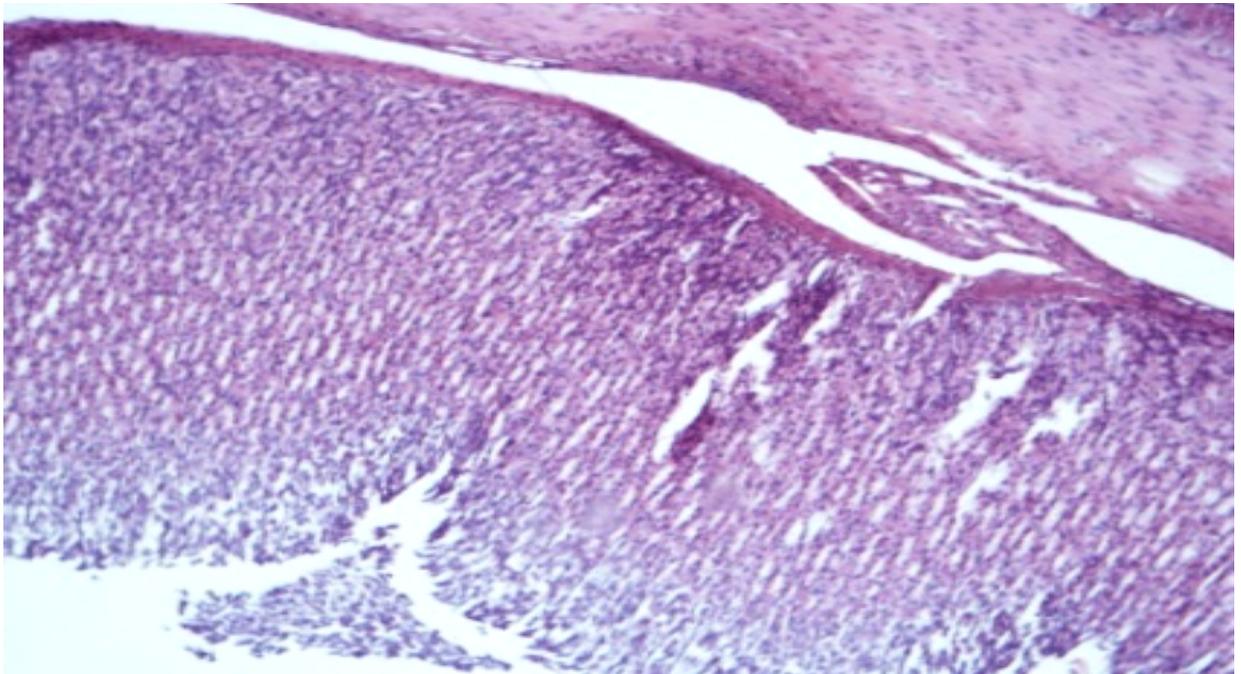
Макроскопические исследования полостей тела с находящимися в них внутренними органами и результаты вскрытия не выявили у крыс, получавших раствор ФДЭС внутрижелудочно, патологических изменений. Гистологические исследования слизистой желудка и 12-перстной кишки в сравнении с контролем (Рисунки 37, 38) не выявили изменений в тканях при однократном введении субстанции в обеих тестируемых дозах (300 мг/кг и 2000 мг/кг).



Контроль



ФДЭС 300 мг/кг

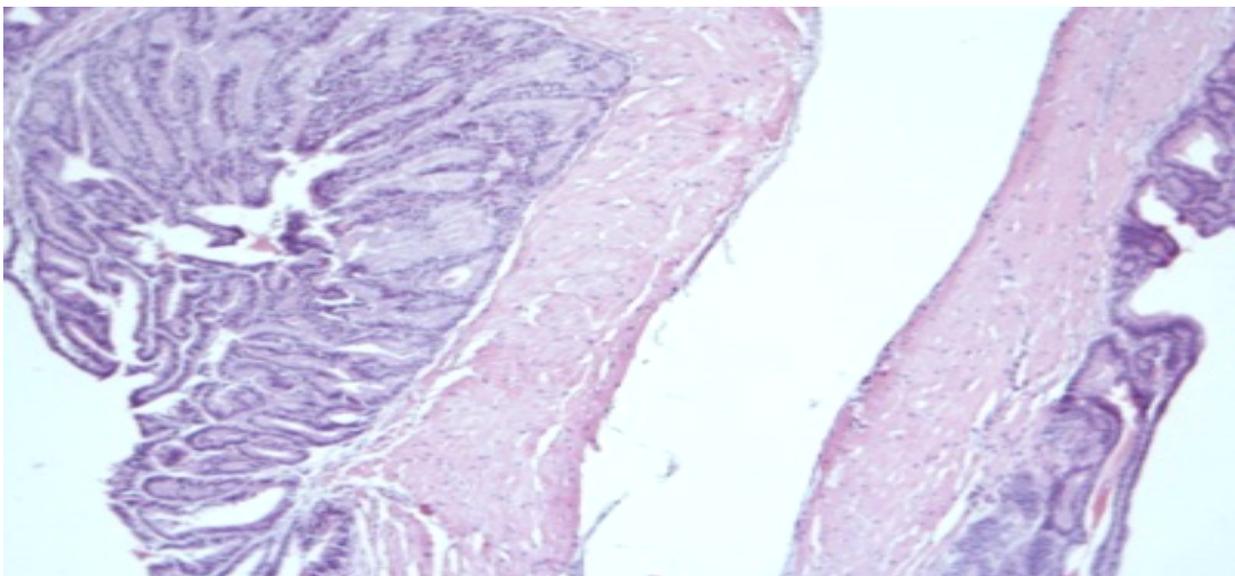


ФДЭС 2000 мг/кг

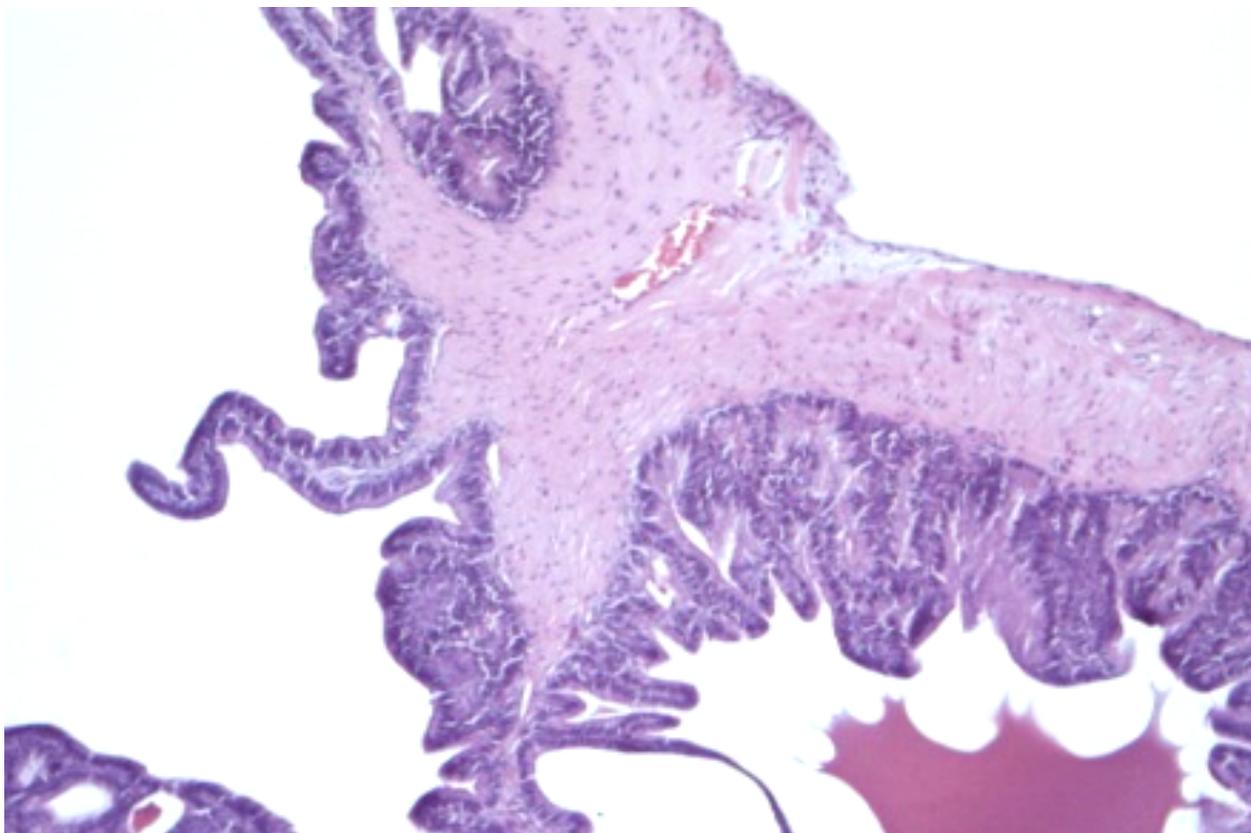
Рисунок 37 – Гистологическая картина слизистой желудка при исследовании местнораздражающего действия препарата при внутрижелудочном введении. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

Слизистая оболочка безжелезистой части желудка выстлана не измененным многослойным плоским эпителием. Покровный эпителий слизистой тела желудка образован слизистыми цилиндрическими клетками, дефектов эпителиальной выстилки нет. Главные и обкладочные клетки желез тела желудка не изменены.

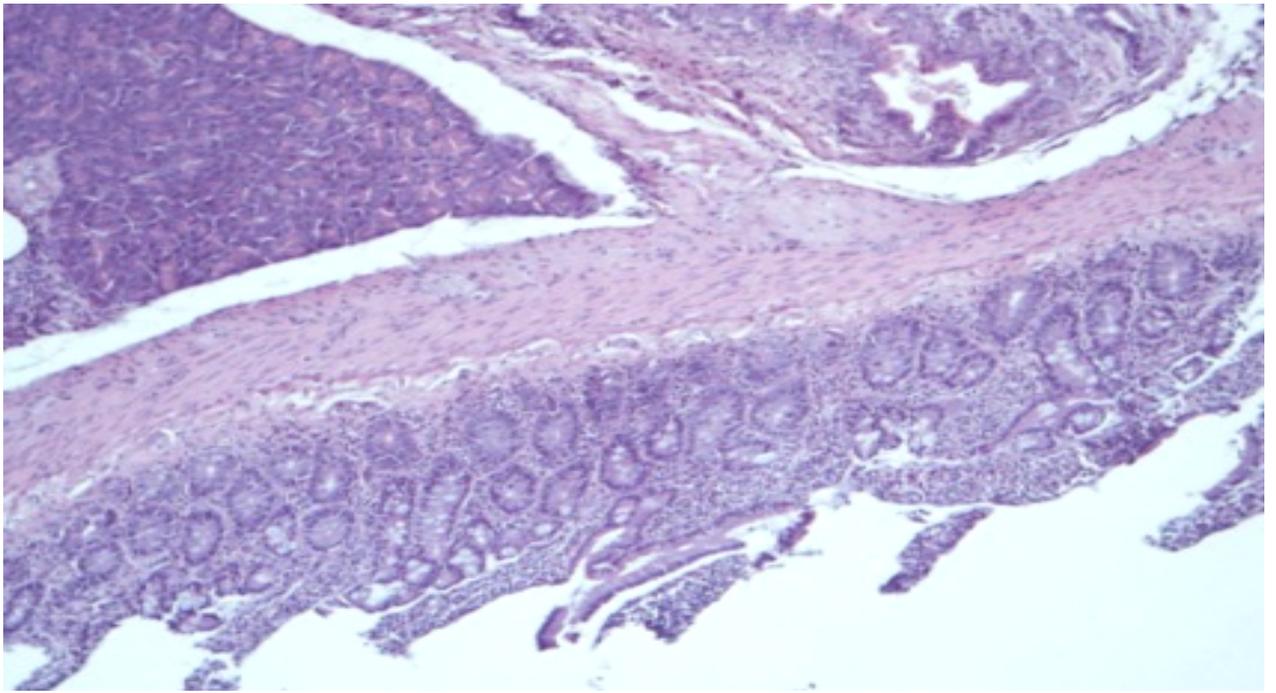
Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки представлена ворсинами различной длины без воспалительных изменений.



Контроль



ФДЭС 300 мг/кг



ФДЭС 2000 мг/кг

Рисунок 38 – Гистологическая картина слизистой двенадцатиперстной кишки при исследовании местнораздражающего действия препарата при внутрижелудочном введении. Окраска гематоксилином и эозином, x200

Форма и величина печени без изменений. Поверхность печени гладкая, однородная темно-красной окраски. Ткань печени на разрезе была темно-красной. Капсула печени была тонкой, прозрачной. Консистенция печени имела обычную плотность. Форма поджелудочной железы без изменений. Железа имела дольчатое строение, бледно-розовую окраску и умеренно плотную консистенцию. Изменений размера и формы селезенки не выявлено. Поверхность селезенки имела однородную темно-вишневую окраску, была гладкой. Консистенция селезенки умеренно плотная. На разрезе органа выделялись сероватые мелкоклеточные фолликулы. Величина и форма почек также без изменений. Капсула почек легко снималась. Поверхность была гладкой, однородно коричневато-сероватого цвета. На разрезе органа хорошо различимы корковое и мозговое вещество. Консистенция почек умеренно плотная. Надпочечники имели округлую форму, беловато-желтую окраску и умеренно плотную консистенцию. На разрезе отчетливо выделялось темно-коричневое мозговое вещество. Мочевой пузырь был заполнен прозрачной, светлой мочой. Слизистая оболочка мочевого пузыря была гладкой, блестящей, бледной окраски. Яичники самок имели неровную зернистую поверхность, темно-красный цвет и округлую форму. Тело матки было умеренно плотным, имело обычные размеры, темно-красный цвет. Яички самцов были умеренно плотными, беловатого цвета, обычных размеров. Предстательная железа имела четкое дольчатое строение.

Средние показатели относительной массы внутренних органов всех экспериментальных животных представлены в таблице (Таблица 73).

Таблица 73 – Влияние однократного внутрижелудочного введения ФДЭС на показатели относительной массы (%) внутренних органов крыс

Орган	Группы			
	ФДЭС 300 мг/кг		ФДЭС 2000 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Тимус	0,21±0,01	0,23±0,01	0,20±0,04	0,21±0,02
Сердце	0,45±0,02	0,41±0,03	0,41±0,04	0,41±0,03
Поджелудочная железа	0,33±0,02	0,28±0,04	0,35±0,04	0,33±0,06
Селезенка	0,51±0,05	0,43±0,05	0,50±0,04	0,53±0,03
Печень	4,21±0,11	4,35±0,18	4,03±0,12	4,03±0,37
Легкие	0,75±0,07	0,81±0,02	0,78±0,06	0,79±0,03
Почки	0,76±0,04	0,81±0,05	0,74±0,03	0,78±0,01
Надпочечники	0,04±0,00	0,04±0,01	0,04±0,01	0,05±0,00
Семенники	1,18±0,07		1,03±0,05	
Простата	0,46±0,03		0,32±0,03	
Яичники		0,08±0,01		0,07±0,01

Анализ показателей относительной и абсолютной массы внутренних органов крыс самцов и самок статистически значимых различий между группами не выявил (критерий Стьюдента, $p > 0,05$). При анализе возможного влияния высокой дозы препарата ФДЭС на уровне статистических тенденций отмечается незначительное повышение относительной массы селезенки и снижение относительной массы печени, что может свидетельствовать о возможных особенностях его действия (снижение запасов гликогена в печени вследствие интенсификации его расходования, пролиферативное лимфотропное действие в отношении селезенки). Таким образом, признаков токсического влияния испытуемой ФС на организм животных, сопровождавшихся изменением показателей относительной и абсолютной массы внутренних органов, выявлено не было.

9.2. Изучение хронической токсичности таблеток ФДЭС

Исследования проводили на 80 аутбредных крысах обоего пола, в каждой группе по 10 животных. Исследуемое вещество в готовой лекарственной форме – таблетки ФДЭС, вводили в течение 180 дней в дозах 5, 25 и 50 мг/кг. В конце периода исследования проводили эвтаназию животных и оценивали состояние внутренних органов. Гистологическому исследованию

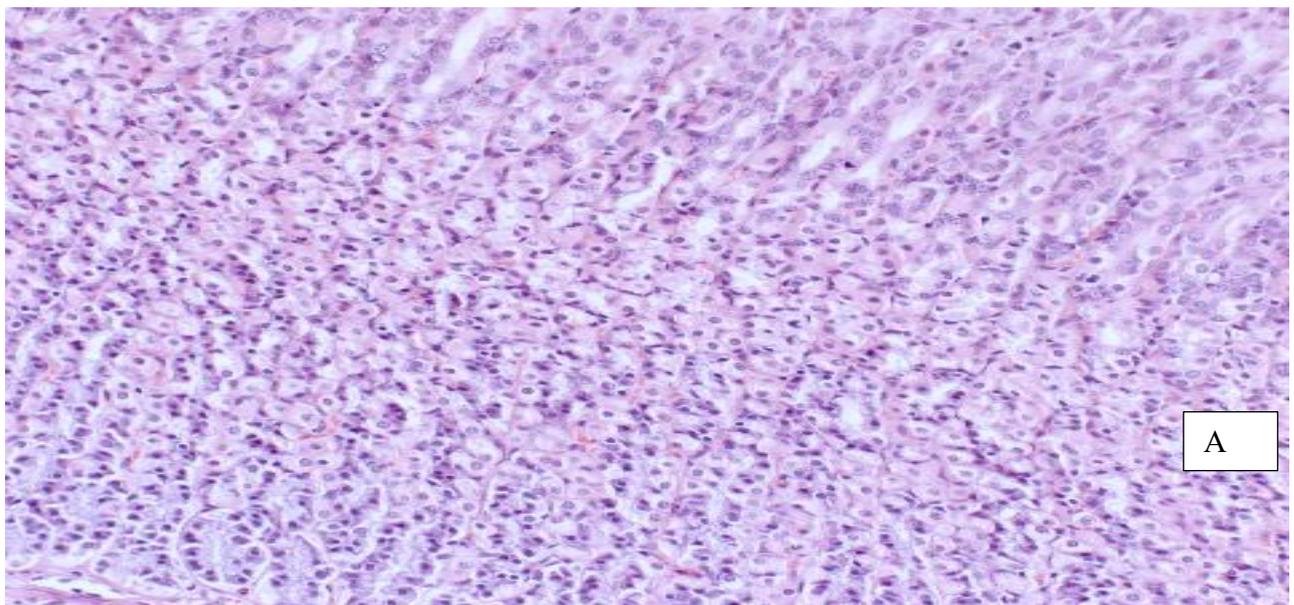
подвергались лёгкие, миокард, желудок и двенадцатиперстная кишка, поджелудочная железа, печень, селезёнка, тимус, почки, надпочечники, половые органы в зависимости от пола животного (яичники, семенники, простата). В большинстве случаев при применении ФДЭС значимой патологии выявлено не было (Таблица 74).

Таблица 74 – Встречаемость отдельных признаков отклонений морфологической картины органов и тканей животных от нормы (%)

Признак патологического отклонения от нормы	Контроль	ФДЭС 5 мг/кг	ФДЭС 25 мг/кг	ФДЭС 50 мг/кг
Диффузно-очаговый или гранулематозный гепатит	2	0	2	1
Вакуольная дистрофия гепатоцитов	0	0	0	1
Признаки панкреатита	0	0	1	0
Очаговая дистрофия эпителия канальцев почек	1	0	0	0
Эксудативный бронхит, интерстициальная пневмония	1	1	1	2
Резко сниженный сперматогенез в части канальцев яичек	1	0	0	2

Дыхательная система. Бронхи со слабо выраженной реактивной пролиферацией респираторного цилиндрического эпителия, в просвете – небольшое количество слизи. Альвеолы с тонкими стенками, с крайне скудной лимфоцитарной инфильтрацией, в просвете – немногочисленные альвеолярные макрофаги. Лимфоидный аппарат с признаками слабо выраженной гиперплазии. Плевра без особенностей. Сердечно-сосудистая система. Миокард левого и правого желудочков с явлениями слабо выраженного отека, значимой воспалительной инфильтрации нет. Эндокард с явлениями слабо выраженного отека. Сосуды без патологии.

Пищеварительная система. Слизистая желудка и ДПК с рассеянной слабо выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией (Рисунок 39).



A

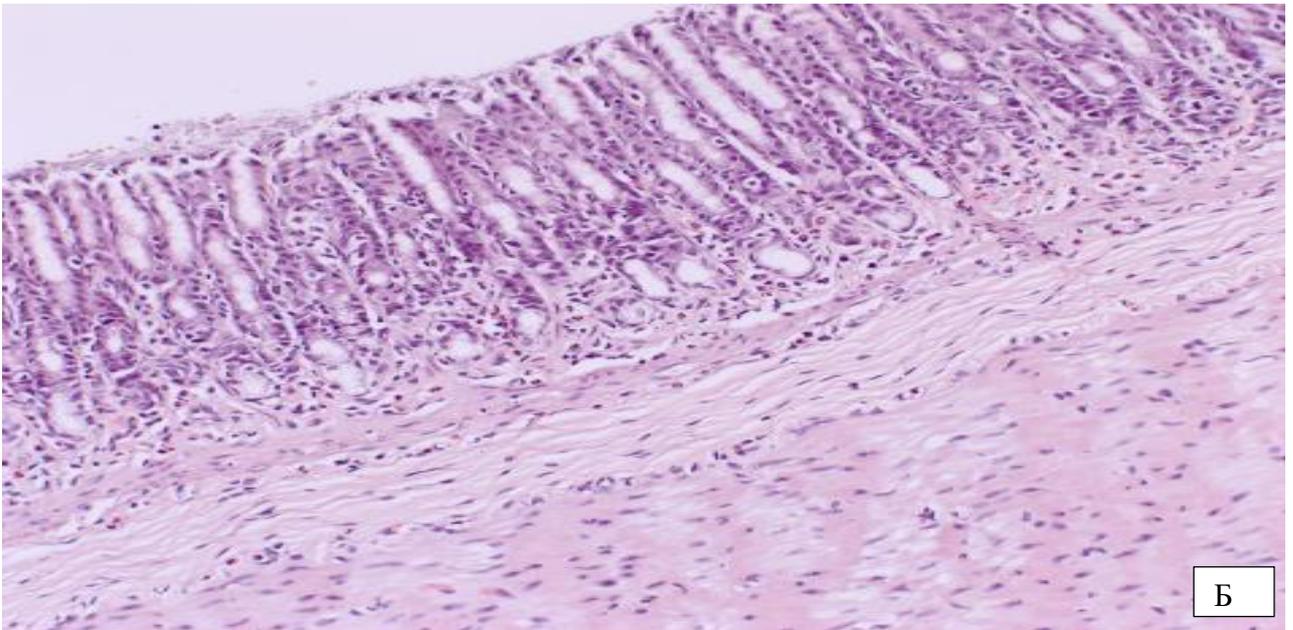


Рисунок 39 – Слизистая оболочка фундального (А) и антрального (Б) отделов желудка со слабо выраженной полиморфноклеточной инфильтрацией стромы. Окраска гематоксилином и эозином, x200

Лимфоидные фолликулы в части случаев с признаками слабо выраженной гиперплазии. Подслизистый, мышечный слой и адвентиция без особенностей.

Печень с сохраненным дольковым и балочным строением, портальные тракты со скудной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, гепатоциты с очаговой слабо выраженной вакуольной дистрофией. Поджелудочная железа с нормальным строением ацинусов и протоков, островки Лангерганса без патологии. Селезенки не увеличена. Красная пульпа умеренно полнокровна. Лимфоидный аппарат белой пульпы обычного строения. Тимус с дольчатым строением. Коровое и мозговое вещество нормального строения. Определяются немногочисленные мелкие тельца Гассала.

Почки обычного строения. Клубочки с умеренно полнокровными капиллярами, без патологии. Эпителий канальцев коркового и мозгового вещества с мелкоочаговой вакуольной дистрофией. Интерстиций с крайне скудной инфильтрацией лимфоцитами. Слизистая чашечек и лоханок без патологии.

Надпочечники с разделением на корковое и мозговое вещество. Строение всех слоев сохранено, патологической инфильтрации нет. В исследованных семенниках и придатках семенников самцов крыс, получавших контрольное вещество, макроскопически видимых изменений обнаружено не было. Гистологическое строение семенников и придатков семенников животных в данной группе соответствовало норме.

По результатам патоморфологического и гистологического исследования органов репродуктивной системы самцов аутбредных крыс можно заключить, что внутрижелудочное

введение животным в течение 60 дней тестируемого препарата не оказало токсического действия на ткань семенника и придатка семенника. Никаких дистрофических и деструктивных изменений в указанных органах у животных на фоне многократного введения тестируемого препарата в двух дозах не обнаружено.

У всех исследованных самок крыс наблюдали состояние беременности. Макроскопически видимых изменений у животных не обнаружено. Гистологическое строение яичников, матки и маточных труб беременных самок крыс соответствовало сроку беременности.

По результатам гистологического исследования, было установлено, что у самок, более подверженных токсическим воздействиям, патологических изменений внутренних органов, связанных с применением таблеток, не наблюдалось. У самцов редко наблюдались слабо выраженные изменения, как в группах, получавших препарат в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг, так и в контроле. При применении таблеток в терапевтической дозе (5 мг/кг) изменений не выявлено.

Анализ данных гематологического исследования образцов периферической крови крыс самцов и самок, получивших внутрижелудочно испытуемый препарат, с контрольной группой статистически значимых различий не выявил (критерий Стьюдента, $p < 0,05$) за исключением повышения на 180-й день после начала введения таблеток у самцов опытных групп количества тромбоцитов, уровня гемоглобина и связанного с ним уровня гематокрита, относительно контроля. Изученные показатели находились в пределах физиологической нормы для самцов и самок крыс.

Отличий между группами крыс самцов и самок, свидетельствующих о негативном влиянии испытуемого препарата на биохимические показатели сыворотки крови и систему свертывания подопытных животных выявлено не было. У контрольных и опытных групп животных показатели ЭКГ были без патологий. Под действием испытуемых таблеток в опытных группах крыс относительно контроля по таким показателям как относительная плотность, объем мочи и pH статистически достоверных изменений не наблюдалось.

В контрольной группе животных наблюдали достоверное снижение числа пресечённых секторов, числа обследованных секторов, числа стоек и числа обследованных отверстий. На фоне введения таблеток во всех дозах так же наблюдали уменьшение данных показателей, однако у животных обоего пола, получавшие ФДЭС в дозе 50 мг/кг, достоверное увеличивались показатели - число обследованных секторов и число пресечённых секторов по сравнению с контрольной группой животных на 180 день. Уровень эмоциональной лабильности оставался одинаковым на протяжении всего периода. Таким образом, длительное применение таблеток ФДЭС не приводило к значительным изменениям со стороны высшей нервной деятельности. Исследуемая субстанция ФДЭС и таблетки являются безопасными как при однократном, так и курсовом (180 дней) введении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения когнитивных функций является одним из наиболее распространённых неврологических расстройств. Для лечения когнитивных нарушений в медицинской практике широко используются ноотропные препараты, которые устраняют нарушения речи, когнитивные расстройства, сниженную психическую и двигательную активности [97], оказывающие нейропротекторное действие.

Литературный обзор современных ноотропных средств и их роли в лечении различных заболеваний головного мозга позволил сформулировать перспективные направления разработки новых препаратов, основанных на сочетании рецепторных механизмов регуляции нейрональной активности и когнитивных функций с неспецифическими механизмами расширения энергетических возможностей нейронов и их пластичности. В частности, перспективными направлениями создания новых ноотропных препаратов могут быть: производные цикла Кребса с нейропротекторной и когнитивной активностью; соединения, уменьшающие гиперфосфорилирование белка тау и блокаду тау-агрегации или влияющих на экспрессию и секрецию нейротрофинов; производные нейростероидов и их аналогов; производные антифеина; модификация структуры аминокэтанола, позволяющая усилить его влияние на нейрональную пластичность [27, 260, 384, 419].

Для скрининга были использованы 20 новых соединений, из них 10 – производных диметилэтаноламина, и 10 – производных диэтилэтаноламина. В каждой группе были представлены янтарные и фумаровые эфиры, а также собственно основания и их янтарные, фумаровые, кетоглутаровые и яблочнокислые соли.

Проведенное исследование показало, что среди изучаемых производных эфиров этаноламинов к дальнейшему изучению антигипоксической активности могут быть допущены следующие соединения: из группы сукцинатных эфиров диметилэтаноламина – янтарная, фумаровая и DL-яблочная соль; из группы фумаровых эфиров диметилэтаноламина – фумаровая соль и основание; из группы сукцинатных эфиров диэтилэтаноламина – фумаровая соль; из группы фумаровых эфиров диэтилэтаноламина – янтарная и кетоглутаровая соли. Для указанных соединений в оптимальных дозах выявлено умеренное психоактивирующее действие, сопоставимое или превышающее активность референсного ноотропного препарата аминокэтанола ряда – нооклерила [27, 28, 29].

Профилактическое введение (за 1 ч до барокамерного воздействия) исследуемых препаратов и препаратов сравнения обеспечивало выраженную защиту мозга животных от гипоксического воздействия. Химическое строение изучаемых соединений является значимым фактором. Значимость кислотного остатка в антигипоксической активности изученных солей в 2 раза превышает значимость основания (0,270 и 0,135 соответственно).

В ходе проведенных скрининговых исследований была изучена ноотропная активность новых биологически активных веществ. Установлено, что высокая психоактивирующая активность была обнаружена у 2 соединений производного диметилэаноламина: ФДМ-фумарат и СДМ-сукцинат, а очень высокая психоактивирующая и нейропротекторная (антигипоксическая) активность обнаружена у производного диэтилэаноламина: ФДЭ-сукцинат. По результатам скрининга фармакологической активности соединение янтарнокислая соль фумарового эфира диэтиламиноэанола (ФДЭС) подлежало дальнейшему исследованию.

Интегральная оценка антигипоксической активности (УИА) в трех моделях острой гипоксии – нормобарической гипоксической, гемической и гистотоксической, показывает, что новое соединение ФДЭС в дозе 50 мг/кг оказывает умеренное (УИА=1,16), а в дозе 75 мг/кг - выраженное антигипоксическое действие (УИА=1,34) [30, 313].

Известно, что диметилэаноламин (ДМАЭ), являясь преимущественно прекурсором ацетилхолина [378, 439], выражено стимулирует умственную и физическую работоспособности в условиях её естественного снижения [92, 290], рекомендуется в качестве дополнительного корректора лечения хронической нейролепсии, особенно акинетических нарушений, устраняет невротические нарушения, вызванные органическими поражениями головного мозга или черепно-мозговыми травмами.

Известно, что субстрат цикла Кребса транс-бутендиовая (фумаровая) кислота в условиях выраженной гипоксии в NADH-фумаратредуктазной реакции восстанавливается в сукцинат, препятствуя быстрой деэнергизации митохондрий и оказывает благоприятное действие на структуру нейронов, в частности, на клеточную и ядерную мембраны, рибосомальный аппарат, митохондрии и лизосомы [138].

Механизм, с помощью которого эфиры фумаровой кислоты могут влиять на клеточную пролиферацию, заключается в их взаимодействии с GPR109A (HCA2), рецептором, ранее известным как тип 1 рецептора к никотиновой кислоте, связанным с G-белком [160, 234, 372, 421]. Диметилфумарат способствует повышению концентрации Nrf2, оказывая иммунные цитопротекторные эффекты, вызывает снижение морфологических и клинических проявлений нейродегенеративного процесса у пациентов с рассеянным склерозом. В культуре активированных Т-клеток монометилфумарат влияет на цитокиновый профиль (интерлейкины ИЛ-4, ИЛ-5) [258, 259].

Известно, что интермедианты цикла Кребса повышают устойчивость тканей к гипоксии через субстратный механизм. Антигипоксический эффект янтарной кислоты, активация сукцинатдегидрогеназного пути ресинтеза АТФ, снижения уровня НАД-зависимых субстратов цикла Кребса, жирных кислот и стимуляция активности цитохромоксидазы, наблюдается в условиях нормоксии тогда, как фумаровая кислота в условиях аноксии способствует повышению

концентрации сукцината в митохондриях. Кроме того, янтарная кислота активирует специфические рецепторы (SUCNR1). Модуляция активности SUCNR1-рецепторов через изменение концентрации сукцината является одним из способов контроля секреции метаболических гормонов или регуляции метаболической активности определенных клеток [160, 234].

На модели глобальной ишемии головного мозга, введенный за 30 минут перед операцией ФДЭС в дозе 10 мг/кг, обеспечивал статистически недостоверную тенденцию к повышению доли выживших животных на 33% ($p=0,09$) тогда, как в дозе 75 мг/кг – на 42% ($p=0,05$) статистически значимо увеличивал их координацию движений и способствовал сокращению времени нахождения в «безопасной» норке крысами (тест «Лабиринт Барнес»). Препарат сравнения цитофлавин не оказывал влияния на выживание животных при развитии тотальной ишемии мозга.

На модели контролируемого кортикального удара у крыс на 21 день после ЧМТ наблюдали статистически достоверное снижение неврологического дефицита, который был оценен в тестах «Стимулирование конечностей», «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка». Так, в тесте «Стимулирование конечностей» ФДЭС в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг в первые сутки после травмы мозга уменьшал неврологический дефицит у крыс в 3 раза и 3,1 раза соответственно по сравнению с группой контроля, а к 21-му дню ФДЭС практически полностью устранял неврологический дефицит у крыс. В тесте «Цилиндр» на 21-й день после ЧМТ у животных контрольной группы использование контрлатеральной очагу поражения лапы снижалось на 30%, что является статистически достоверным признаком фокального повреждения мозга. У животных, которым вводили ФДЭС в дозе 10 мг/кг на фоне ишемического повреждения головного мозга использование этой лапы было возможным в 31,5% попыток, что на 15% выше, чем в группе контрольных животных. У крыс в тесте «Сужающаяся дорожка», которым вводили ФДЭС и препараты соединения, при курсовом применении, выявлены близкие защитные свойства. Установлено, что неврологический дефицит в группе крыс, которым вводили ФДЭС (доза 10 мг/кг) в 1,8 раза был менее выражен, чем у животных контрольной группы. По эффективности исследуемое вещество в этих 3-х тестах было сопоставимо с препаратами сравнения пираретамом и цитофлавином.

Курсовое (21 день) введение ФДЭС в дозе 10 и 75 мг/кг вызывало статистически значимое уменьшение очага поражения головного мозга у крыс в 1,54 раза ($p<0,05$) и 1,38 раза ($p<0,05$) соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. Цитофлавин и пираретам данный показатель уменьшали в 1,3 раза ($p<0,05$) и 1,2 раза ($p<0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

В ходе проведения экспериментального исследования было установлено, что модификация структуры аминоэтанола за счёт увеличения длины заместителей при аминогруппе (замена метильных групп на этильные) и синтез фумарового эфира диэтиламиноэтанола способствует повышению липофильности новой молекулы, увеличивает ее проникновение через ГЭБ, а ФДЭС оказывает нейропротекторное действие на ЦНС.

Однократное применение препарата ФДЭС в дозе 10 мг/кг в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта проявлялось в сравнении с плацебо-контролем повышением поведенческой активности, менее выраженным ростом показателя эмоционального реагирования, а показатель психологического комфорта при этом снижался. Введение препарата ФДЭС в более высокой дозе (75 мг/кг) проявлялось снижением стрессовой реактивности организма животных (по сравнению с контрольной группой отмечалось снижение эмоционального реагирования, вегетативной лабильности, менее выраженное стрессовое угнетение ЦНС).

Короткое курсовое применение препарата ФДЭС практически не оказывало влияние на поведение животных в тестах ОП и ПКЛ. Для ФДЭС (75 мг/кг) наблюдали умеренное статистически значимое повышение комплексного показателя комфортности состояния животных в тесте ОП. Отмечалось также тенденция к снижению вегетативной лабильности, но выраженность этого эффекта была незначительной. Нами было установлено, ФДЭС статистически значимо не влияет на спонтанное поведение здоровых животных, т.е. не проявляет свойств психомоторного стимулятора, антидепрессанта, транквилизатора или седативного средства.

На модели скополаминовой амнезии в тесте УРПИ в группе интактных животных 75% животных сохранили памятный след через 24 часа после тренировки. Скополамин значительно ухудшил этот показатель, сократив количество обученных крыс до 41%. Под воздействием пиретама количество обученных животных через 24 часа составило 100%. ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг показали сопоставимый эффект с препаратом сравнения, увеличив количество крыс, сохранивших навык через 24 часа, до 91% (10 мг/кг) и 83% (75 мг/кг) соответственно [213].

Осуществлён компьютерный прогноз биологической активности соединения ФДЭС с помощью программы PASS 2014. В настоящем исследовании было установлено, что в качестве наиболее вероятных видов активности были представлены (в скобках - вероятность наличия соответствующей активности): ингибитор транскрипционного фактора NF kappa B1 (83,5%), ингибитор мембранной проницаемости (85,4%), агонист предсердного натрийуретического пептида (87,7%), антагонист фибриногеновых рецепторов тромбоцитов (90,9%), антигипоксанта (86,2%), агонист инсулиновых рецепторов (81,9%).

На модели амилоидной токсичности (индукция нейродегенеративных процессов) изучен механизм нейропротекторного действия ФДЭС. Известно, что синтетический амилоид A β способен оказывать влияние на активность потенциал-управляемых кальциевых каналов (N-, P- и Q-типов), на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), ионотропные глутаматные рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и N-метил-D-аспартата (NMDAR), допаминовые и серотониновые рецепторы, что может приводить к эксайтотоксичности и массовой гибели нейронов гиппокампа и больших полушарий [288], а также формировать неселективные ионные каналы в плазматической мембране, обогащенной фосфатидилсеринем, нарушая обмен ионов между клеткой и внеклеточной средой, нарушать работу ключевых ферментов митохондрий, приводя к окислительному стрессу и гибели нейронов [288], ухудшению памяти и мышления в целом, за счет нарушения инсулиновой сигнализации [300].

ФДЭС восстанавливал нейрональный депо-управляемый вход кальция до уровня группы интактных животных, а также увеличивает в 2,2 раза количество грибовидных дендритных шипиков на синапсах нейронов культуры клеток гиппокампа по сравнению с контролем. Механизм нейропластичного действия ФДЭС связан не только с его прямой и быстрой модуляцией морфологии дендритного аксона, но и за счёт уменьшения инсулиновой резистентности в ЦНС, увеличивая доставку сукцината в мозг. Известно, что сукцинат участвует в генерации сигнальной перекиси водорода в ответ на действие инсулина [371, 416]. Однако низкая биодоступность сукцинатов и отсутствие механизмов транспорта их в ЦНС ограничивает нейрональные эффекты сукцината. Известно, что янтарная соль холина – дихолинсукцинат обладает более высокой способностью к проникновению в ЦНС и достоверно улучшает активацию инсулиновых рецепторов в нейронах в ответ на низкие дозы инсулина [169, 371, 416]. Эти результаты позволяют объективизировать морфологический и функциональный механизм ноотропного действия нового соединения на уровне нейрональных мембран синаптических окончаний и, возможно, доставке сукцината в мозг и стимулирования нейропластичности. По эффективности в исследованиях *in vitro* ФДЭС был сопоставим с маркерным соединением гиперфоринем, который по механизму своего действия является ингибитором реаптейка моноаминов в синапсах, что обеспечивает ему антидепрессивное и нейропротекторное действие, способен защищать грибовидные шипики от амилоидной токсичности путем селективной активации нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) [443].

Фармакокинетические кривые для однократного перорального введения таблеток ФДЭС носят моноэкспоненциальный характер. Определены фармакокинетические параметры после однократного перорального введения 5 мг/кг ФДЭС у крыс ($AUC_{last} = 616,11$ нг*ч/мл; $AUC_{inf} =$

794,22 нг*ч/мл; $AUMC_{inf} = 11747,16$ нг*ч²/мл; $MRT = 14,79$ ч; $T_{1/2} = 0,37$ ч; $T_{max} = 0,5$ ч; $C_{max} = 178,03$ нг/мл; $Cl = 6,29$ л/час/кг; $Vd = 28,09$ л/кг; $Kel = 1,87$ ч; $F = 25\%$).

Концентрация ФДЭС в моче начинает определяться уже через 1 час после начала введения, достигая максимума ко 2 часу и продолжает определяться в моче до 24 часов. При этом более 90% экскретируемого соединения выделяется в первые 24 часа после введения.

На белых аутбредных лабораторных крысах обоего пола была определена LD₅₀ для испытуемой ФС при внутривенном и подкожном введении мышам и класс токсичности испытуемой ФС при однократном внутрижелудочном введении. При оценке острой токсичности исследуемой фармацевтической субстанции по экспресс-методу Прозоровского были определены дозы LD₅₀. Установлено, что LD₅₀ для мышей при внутривенном введении 2070 ± 220 мг/кг (самцы) и 1990 ± 250 мг/кг (самки), а при подкожном введении ФДЭС средняя летальная доза составляет 2550 ± 430 мг/кг (самцы) и 2550 ± 240 мг/кг (самки) [27, 30].

Однократное внутрижелудочное введение крысам растворов испытуемой ФС в исследуемом диапазоне доз (300 мг/кг; 2000 мг/кг) не оказывало статистически значимого влияния на динамику массы тела аутбредных крыс самцов и самок и не вызывало их гибели. Вскрытие животных на 14 день после введения исследуемой субстанции не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с интоксикацией. Данные макроскопического исследования изучаемых органов свидетельствуют о безопасности ФДЭС. Испытуемая субстанция не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и слизистую брюшной полости (местно-раздражающего действия в месте однократного введения препарата не выявлено). Все показатели абсолютной и относительной массы органов крыс самцов и самок находились в пределах физиологической нормы. Половых различий в течение наблюдения в опытных и контрольных группах не отмечалось. Статистически значимых различий исследуемых показателей не выявлено.

На белых аутбредных лабораторных крысах самцах и самках была изучена хроническая токсичность таблеток ФДЭС при ежедневном (1 раз в день в течение 180 дней) внутрижелудочном введении в трех экспериментальных дозах аутбредным крысам обоего пола. На всех испытанных дозах (5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг) клинические симптомы отравления животных отсутствовали. Внутрижелудочное введение испытуемого препарата все животные переносили хорошо: процедура введения не сопровождалась какими-либо признаками недовольства, болезненности.

Хроническое внутрижелудочное введение таблеток в исследуемом диапазоне доз в сравнении с группой контрольных животных не оказывало статистически значимого влияния на динамику прироста массы тела и патологических изменений органов аутбредных крыс самцов и самок. Испытуемое вещество не обладает раздражающим действием на слизистые в месте

введения. Данные исследования свидетельствуют о безопасности анализируемого вещества ФДЭС и его пероральной лекарственной формы, в изучаемых дозах, является безопасной фармакологически активной молекулой.

Изучены технологические свойства субстанции ФДЭС и массы для таблетирования, полученный методом влажной грануляции, составлена технологическая схема лабораторного производства таблеток.

На основании результатов проведенных исследований оценена фармакологическая эффективность доз 10 мг/кг и 75 мг/кг ФДЭС (Таблица 75).

Таблица 75 – Обобщённые фармакологические эффекты разных доз ФДЭС

Фармакологические показатели	Тесты	Показатели	ФДЭС, мг/кг	
			10	75
Нейропротекторная активность в условиях ишемии мозга				
Антигипоксический эффект	ОНГ, ОГГ, ОГтГ	Усредненная интегральная активность	1,02	1,34
		Средняя выживаемость животных	13%	57%
	Тотальная ишемия мозга	Выживаемость животных	↑ 33,3%	↑ 42%
Неврологический дефицит	Ротарод	Координация движений	↑188%	↑200%
	Экстраполяционное избавление	Обучение	↑ 75%	↑48%
		Пространственная память	↑ 35%	↑29%
	Стимулирование конечностей	Сенсомоторные нарушения	↓128,5	↓92,9
	Цилиндр		↓83%	↓ 226
	Сужающая дорожка		↓44%	↓31,5
	Ишемия мозга		↓53,9%	↓37,3%
Поведение				
В условиях ишемии	Открытое поле	Общая двигательная активность	↑206%	↑100%
Когнитивные функции				
Обучение, запоминание, хранение, построение программы действия	Лабиринт Барнс	Обучение	↑ 75%	↑42%
		Пространственная память	↑35%	↑29%
	Т-лабиринт	Оперативная память	↑50%	↑50%
Антиамнестический эффект	Скополаминовая амнезия	Индекс антиамнестического действия, ед	1,18	1,12
Физическая работоспособность	Вынужденное плавание с грузом	Длительность выполнения нагрузки	↑ 162%	↓ 9%

Примечание: Расчёты всех показателей проведены по отношению к группе контрольных животных, показатели которых взяты за 100%.

Новая молекула - янтарная соль фумарового эфира диэтилэтаноламина обладает низкой токсичностью, оказывает выраженную антигипоксическую, актопротекторную и нейропротекторную активность, активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики, за счёт специфической активации TRPC6-зависимого нДУВК, защищает грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности нового вещества в структурах мозга, стимулирует нейропластические процессы в мозге, устраняет неврологические (двигательные и когнитивные) нарушения, вызванные гипоксически-ишемическими поражениями мозга.

Разработка новых лекарственных препаратов представляет собой сложный комплексный процесс, состоящий из ряда последовательных этапов. Основные этапы разработки новых ноотропных препаратов на основе ФДЭС (Рисунок 40).

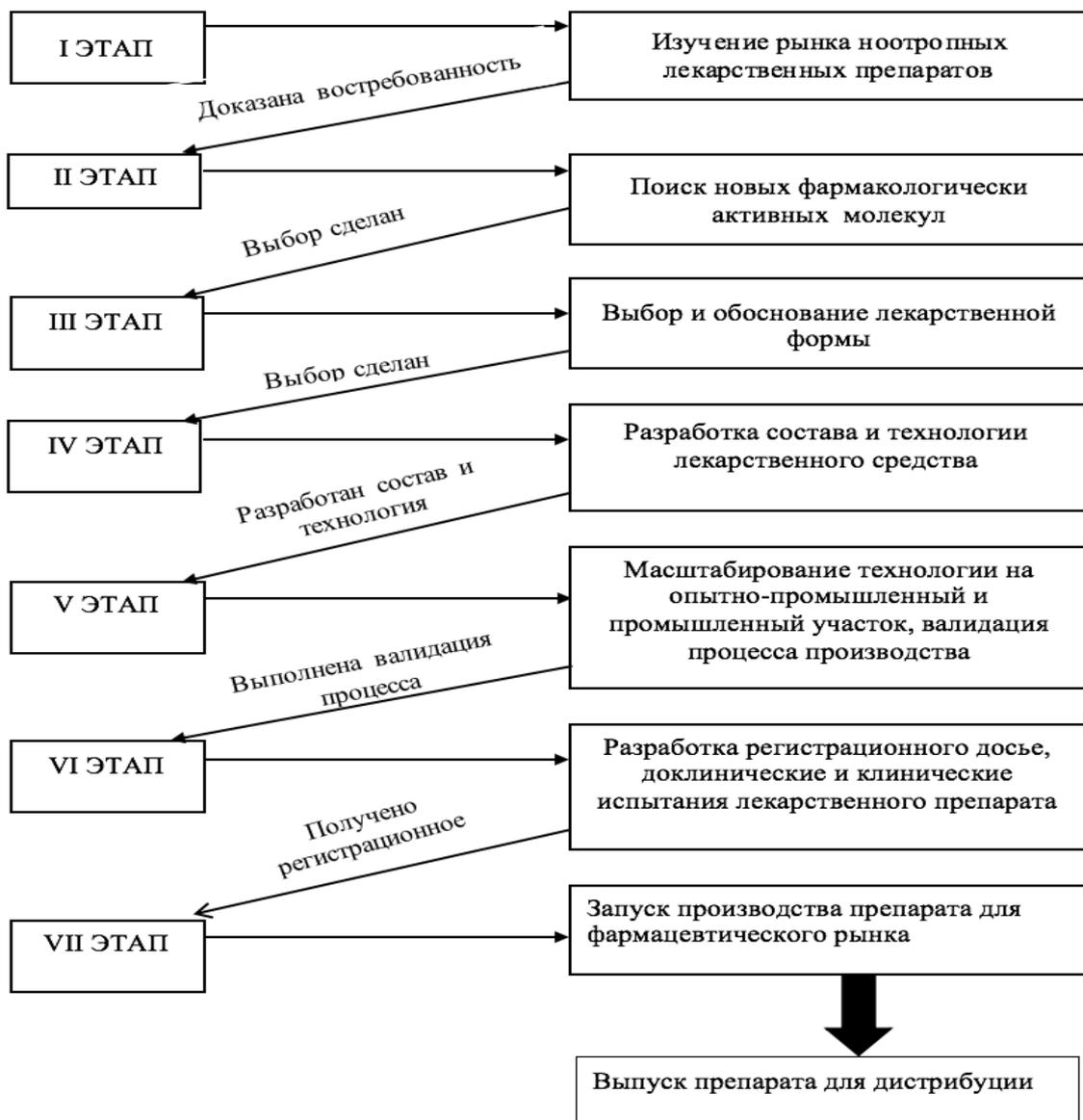


Рисунок 40 – Этапы разработки новых ноотропных препаратов на основе ФДЭС

ВЫВОДЫ

1. Скрининговое исследование 20 новых синтезированных производных солей янтарного и фумарового эфиров диметил- и диэтилэтаноламина показало наличие умеренного психоактивирующего и нейропротекторного (антигипоксического) действия. Наиболее высокая ноотропная активность была выявлена у янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтаноламина (ФДЭС).
2. ФДЭС в дозе 10 мг/кг оказывает умеренное, а в дозе 75 мг/кг - выраженное антигипоксическое действие. По антигипоксической активности соединение превосходит референтный препарат цитофлавин (доза 170 мг/кг).
3. ФДЭС оказывает нейропротекторное действие. На 21 день после двусторонней необратимой перевязки обоих общих сонных артерий у животных курсовое внутрижелудочное введение ФДЭС в дозе 75 мг/кг повышает выживаемость крыс, а после окклюзии средней мозговой артерии увеличивает координацию их движений и активацию когнитивных процессов, превосходя активность цитофлавина (доза 170 мг/кг). Позитивное влияние ФДЭС в дозе 10 мг/кг отмечалось на уровне статистических тенденций.
4. После дозированной фокальной черепно-мозговой травмы ФДЭС устранял сенсомоторный дефицит у крыс в тестах «Сужающаяся дорожка», «Цилиндр» и «Стимулирование конечностей». В дозах 10 и 75 мг/кг статистически значимо уменьшал очаг поражения головного мозга в 1,54 раза ($p < 0,05$) и 1,38 раза ($p < 0,05$), что превосходило нейропротекторное действие цитофлавина и пирацетама на данной модели.
5. У здоровых животных при однократном пероральном введении ФДЭС (доза 10 мг/кг) статистически значимо повышал поведенческую активность крыс ($p = 0,03$) и снижал показатель их психологического комфорта ($p = 0,02$) в тесте открытое поле. ФДЭС в дозе 75 мг/кг при однократном приеме снижал стрессовую реактивность животных ($p = 0,0004$). Двухнедельное курсовое применение препарата ФДЭС практически не оказывало влияние на поведение животных в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. ФДЭС (доза 75 мг/кг) демонстрировал умеренное статистически значимое повышение показателя комфортности животных в тесте открытое поле ($p = 0,05$), а также тенденцию к незначительному снижению вегетативной лабильности.
6. ФДЭС в эффективных дозах (10 и 75 мг/кг) статистически значимо улучшал когнитивные функции животных в тесте «Экстраполяционное избавление», способствовал закреплению алгоритма решения задачи и его сохранения во времени у крыс. При курсовом применении один раз в день на протяжении 14 дней оптимальной для проявления позитивного действия на когнитивные процессы является доза ФДЭС 10 мг/кг. В Т-образном лабиринте его введение существенно повышало эффективность обучения, запоминания и воспроизведения

информации у животных, оказывая дозозависимое действие. Данное действие вещества было сопоставимо с эффектом высокой (900 мг/кг) дозы пираретама.

7. ФДЭС устраняет амнезию, вызванную введением скополамина - блокатора m1AChR рецепторов, расположенных в гиппокампе. Антиамнестическое действие ФДЭС сопоставимо с активностью пираретама (индекс антиамнестического действия исследуемого соединения составил 1,18, для пираретама - 1,12).
8. Компьютерный прогноз биологической активности ФДЭС с помощью программы PASS 2014, в качестве наиболее вероятных видов активности, предсказал ингибирование транскрипционного фактора NF kappa B1(83,5%), уменьшение мембранной проницаемости (85,4%), агонизм к рецепторам предсердного натрийуретического пептида (87,7%), антагонизм к фибриногеновым рецепторам тромбоцитов (90,9%), антигипоксанта (86,2%), агонизм к инсулиновым рецепторам (81,9%).
9. ФДЭС демонстрирует нейропротекторные свойства в первичной гиппокампальной культуре мышей за счёт стабилизации и усиления синаптической передачи. В концентрации 100 нМ ФДЭС активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики, за счёт специфической активации TRPC6-зависимых ионных каналов и защищает грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности. Эффект сопоставим с действием эталонного препарата гиперфорина.
10. Изучена безопасность субстанции и таблеток ФДЭС. Средние летальные дозы (LD50) исследуемого соединения у мышей при внутривенном введении составили 2070 ± 220 мг/кг (самцы) и 1990 ± 250 мг/кг (самки), при подкожном - 2550 ± 430 мг/кг (самцы) и 2550 ± 240 мг/кг (самки). Введение таблеток ФДЭС в исследованных дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг длительностью (180 дней) не вызывала у крыс тяжёлых патологических изменений со стороны внутренних органов и систем организма. Установлено, что новая субстанция и таблетки ФДЭС безопасны при пероральном приеме.
11. Определены основные фармакокинетические параметры однократного перорального приема таблеток ФДЭС. Было установлено, что фармакокинетическая кривая для этого способа введения таблеток ФДЭС имеет моноэкспоненциальный характер. Биодоступность исследуемых таблеток составила 25,0%, максимальная концентрация наблюдалась через 30 минут после введения, объем распределения составил 28,09 л/кг, период полувыведения составил 0,37 ч (22,2 мин), среднее время удерживания в организме крысы составило 14,79 ч. ФДЭС определяли в плазме крови и мочи в более 24 часов. Основным метаболитом ФДЭС можно считать продукт окисления и гидроксирования катионной части молекулы с участием ферментов цитохрома семейства P 450 печени.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Соли кислот цикла Кребса и фумарового эфира производных аминоэтанола могут быть основой для разработки новых представителей класса ноотропных средств.

2. Янтарнокислая соль фумарового эфира диэтиламиноэтанола (ФДЭС) при внутрижелудочном введении в дозе 10 мг/кг обладает высокой антигипоксической, нейропротекторной и антиамнестической активностью, превосходящей референсный препарат цитофлавин (170 мг/кг), и сопоставимое с эффективностью высокой (900 мг/кг) дозы пирацетама, что позволяет рекомендовать использование этого соединения в качестве основы для создания эффективного лекарственного средства для профилактики и лечения когнитивных нарушений, при ишемически-гипоксическом повреждении мозга (нарушениях церебрального кровообращения, черепно-мозговых травмах).

3. Полученные в ходе исследования материалы, подтверждающие специфическую активность соединения ФДЭС, его низкую токсичность и особенностях фармакокинетики, включены в подготовленное регистрационное досье на новое лекарственное средство и получено разрешение на проведение его клинических испытаний.

4. Данные, представленные в диссертационном исследовании о новом ноотропном веществе, янтарнокислой соли фумарового эфира диэтиламиноэтанола, могут быть использованы в учебном процессе по дисциплине «Фармакология».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ОБОЗНАЧЕНИЙ И СПЕЦИАЛЬНЫХ ТЕРМИНОВ

ВВ	Вспомогательные вещества
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ XIV	Государственная фармакопея XIV издания
ИЗ	Индекс защиты
КА	Коэффициент активности
нДУВК	Нейрональный депо-управляемый вход кальция
ОГемГ	Острая гемическая гипоксия
ОГтГ	Острая гистотоксическая гипоксия
ОНГ	Острая нормобарическая гипоксия
ОП	Открытое поле
ОФС	Общая фармакопейная статья
ПИА	Поисково-исследовательскую активность
ПКЛ	Приподнятый крестообразный лабиринт
УРПИ	Условный рефлекс пассивного избегания
ФДЭС	Янтарная соль фумарового эфира диэтилэтаноламина
А642	Синтетический бета-амилоид 1-42
AUC	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время»
AUC _{inf}	Площадь под фармакокинетической кривой (зависимость концентрации от времени) от 0 до бесконечности
AUC _{last}	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время» в интервале времени от 0 до момента отбора последней пробы крови с измеряемой концентрацией
AUMC _{inf}	Площадь под кривой «произведение концентрации и времени» от нулевого момента до бесконечности.
Cl _R	Почечный клиренс
D	Коэффициент детерминации
F, %	Абсолютная биодоступность
T _{max} , ч	Время установления максимальной концентрации
T _{1/2} , ч	Период полувыведения вещества
PASS	Программа для предсказания спектра биологической активности веществ
TRPC6	Транзиторный рецепторный потенциалный канал 6
V _d , мл	Объем распределения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафьина, А. Эффективность нейрометаболического протектора Цитофлавина у больных, перенесших ишемический инсульт, в раннем восстановительном периоде (многоцентровое рандомизированное исследование). / А. Агафьина, А. Коваленко, С. Румянцева [и др.] //Врач. – 2006. – № 1. – С. 60 – 65.
2. Ажикова, А.К. Гинкго Двулопастный (Ginkgo Biloba L.): Перспективы использования в фармации / А.К. Ажикова// Прикаспийский вестник медицины и фармации. 2020 Т. 1, № 1. С. 6-13 DOI 10.17021/2020.1.1.6.13
3. Акрас, А. Церебролизин: общие сведения. / А. Акрас //В кн.: 3-й международный симпозиум по церебролизину. М. – 1991. – С. 5 – 16.
4. Александровский, Ю.А. Применение препарата «Нооклерин» в качестве антиастенического средства у больных с функциональной астенией. / Ю.А. Александровский, А.С. Аведисова, Д.В. Ястребов [и др.] //Психиатрия и психофармакотерапия. – 2003. – Т. 5. – № 4. – С. 164 – 166.
5. Александрович, Ю.С. Инфузионные антигипоксанты при критических состояниях у детей. / Ю.С. Александрович, К.В. Пшениснов //Общая реаниматология. – 2014. – № 3. – С. 59 – 74.
6. Амчславский, В.Г. Особенности мониторинга и интенсивной терапии критических состояний при острых церебральных повреждениях. / В.Г. Амчславский //Журнал неврологии и психиатрии. – 2009. – Т. 109. – № 7. – С. 43 – 56.
7. Андреева, Н.Н. Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии / Н.Н. Андреева //Медицинский альманах. – 2009 – Т. 4. – № 9 – С. 193 – 197.
8. Анисимов, В.Н. Влияние янтарной кислоты на частоту спонтанных опухолей и продолжительность жизни мышей С3Н/Sn. / В.Н. Анисимов, М.Н. Кондрашева //Доклады академии наук СССР. – 1979 – Т. 248. – №5. – С. 1242.
9. Арефьева, И.А. Изучение действия аналога АКТГ и тафцина на клетки нервной системы млекопитающих: автореф. дисс... кандидата биол. наук: 03.00.04/ Арефьева Ирина Александровна //М. – 1992. – 25с.
10. Арушанян, Э.Б. Ноотропные свойства препаратов гинкго билоба. / Э.Б. Арушанян, Э.В. Бейер //Эксп. клин. фармакол. – 2008. – Т. 71. – № 4. – С. 57 – 63.
11. Афанасьев, В.В. Клиническая фармакология реамберина (очерк). /В.В. Афанасьев //СПб: Полисан. – 2005. – 39 с.
12. Афанасьев, В.В. Нейропротекция при остром инсульте на догоспитальном этапе. / В.В. Афанасьев, С.А. Румянцева, С.А. Климанцев и др. //Неотложные состояния в неврологии. М. – 2009. – С. 144 – 147.

13. Ашмарин, И.П. Ноотропный аналог адренкортикотропина 4-10- Семакс (15-летний опыт разработки и изучения). / И.П. Ашмарин, В.Н. Незавибатько, Н.Ф. Мясоедов [и др.] //Журнал ВНД. – 1997 – Т. 47 – № 3. – С. 420 – 430.
14. Багметова, В.В. Экспериментальное сравнение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его соли с янтарной кислотой. / В.В. Багметова, А.Н. Кривицкая, И.Н. Тюренков [и др.] //Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19 – № 4. – С. 53 – 55.
15. Байрамкулов, Х.Д. Влияние сукцината натрия и альфа-кетоглутаровой кислоты на кровоснабжение ишемизированного миокарда и функциональную активность сердца. Фармакологическая коррекция кровоснабжения, метаболизма и жизнедеятельности ишемизированного миокарда. / Х.Д. Байрамкулов //Воронеж. – 1977. – С. 31 – 35.
16. Баранова, Н.И. Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов. / Н.И. Баранова, П.А. Алексеева, К.С. Чистяков [и др.] //Биомедицина. – 2014. – 32. – С. 17 – 24.
17. Баскин, И.И. Молекулярное моделирование рецепторов физиологически активных веществ для целей медицинской химии. / И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефилов //Успехи химии. – 2009. – Т. 78. – №. 6. – С. 539 – 557.
18. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький //2-е изд., перераб. и дополн., Гос.изд. мед. лит., Л. – 1963 – 153 с.
19. Белоус, М.В. Влияние сочетанного применения убихинона и сукцината на физическую работоспособность спортсменов в условиях гипоксии. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. / М.В. Белоус, А.В. Сучков //М. – 1988. – С. 11 – 21.
20. Белоусов, Ю.Б. Современный подход к цитопротекторной терапии: Методическое пособие для врачей. / Ю.Б. Белоусова. //М. – 2010. – 30 с.
21. Бельская, Г.Н. Влияние нейропротективной терапии на течение церебрального инсульта. /Г.Н. Бельская, Н.В. Пизова, М.А. Соколов [и др.] //Медицинский совет. – 2016. – № 11. – С. 26 – 31.
22. Беккер, Р. А. О роли нейроэндокринных нарушений в патогенезе когнитивной дисфункции при депрессивных состояниях. / Р. А. Беккер, Ю. В. Быков //Consilium Medicum. – 2016. – № 4. – С. 57– 61.
23. Благинин, А.А. Пограничные функциональные состояния организма операторов и методы их коррекции. / А. А. Благинин, М.В. Каптыгин, И.И. Жильцова //СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина. – 2014. – 172 с.
24. Блынская Е. В. Сравнительное изучение прессуемости таблеточных смесей ГМЛ-1, полученных технологией влажного гранулирования /Е. В. Блынская, Д. В. Юдина, К. В. Алексеев [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – № 2. – С.52-58.

25. Бобков, Ю.Г. Фармакологическая коррекция утомления. / Ю.Г. Бобков, В.М. Виноградов, В.Ф. Катков [и др.] //М.: Медицина. – 1984. – 208 с.
26. Боголепова А.Н., Коваленко Е.А., Махнович Е.В., Осиновская Н.А. Оценка эффективности применения препарата Этоксидол у пациентов с хронической ишемией мозга. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т.121, №9. – С.32–38. <https://doi.org/10.17116/jnevro202112109132>
27. Болотова, В.Ц. Разработка нового ноотропного препарата на основе производных фумаровой кислоты / В.Ц. Болотова//Биомедицинский журнал Medline.ru. Тематический выпуск, посвященный 100-летию со дня рождения акад. С.Н. Голикова. // СПб, 23-24 мая 2019. – 2019а. – С. 53 – 54.
28. Болотова В.Ц. Фармакологическая коррекция когнитивных нарушений: современные взгляды на механизмы действия и перспективы развития группы ноотропных препаратов / В.Ц. Болотова, Е.Б. Шустов //Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. – 2019б – Т. 23 – № 1 – С. 71 – 81.
29. Болотова В.Ц., Шустов Е.Б., Оковитый С.В. Изыскание соединений с актопротекторной активностью среди производных аминокэтанола с кислотами цикла Кребса. Формулы фармации. – 2020а. – Т.2 – №3– С.28-35
30. Болотова, В.Ц. Изучение безопасности нового ноотропного препарата на основе производного фумаровой кислоты /В.Ц. Болотова, Д.Ю. Ивкин, Е.Б. Шустов [и др.]// Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2020б – Т.21. – №1.– С.119 – 126.
31. Болотова В.Ц. Изучение нейропротекторной активности нового производного фумаровой кислоты / В.Ц. Болотова, И.А. Титович, Е.Б. Шустов // Биомедицина. – 2021 – Т.17 – №3 – С.100 – 104. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-100-104>.
32. Болотова В. Ц. Фармакопейный анализ таблеток производного диэтилэтаноламина / В. Ц. Болотова, О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19. – № 4. – С. 142-146. – DOI 10.19163/1994-9480-2022-19-4-142-146.
33. Бондаренко Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстрополяционного избавления. / Н.А. Бондаренко //Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1990. – № 11. – С. 506 – 508.
34. Бородкин Ю.С. Фармакология краткосрочной памяти. / Ю.С. Бородкин, В.А. Крауз //М.: Медицина. – 1978. – 232 с.
35. Бородкин Ю.С. Нейрохимические и функциональные основы долговременной памяти. / Ю.С. Бородкин, Ю.В. Зайцев //Л.: Медицина. – 1982. – 186 с.

36. Брагина Н.Н. Основные принципы клинического исследования послеоперационных состояний в нейрохирургии. / Н.Н. Брагина, Н.Я. Смирнова, Е.А. Хухлаева //Сборник научных работ: Интенсивная терапия, реанимация и анестезия в нейрохирургии. М. – 1982. – С. 18-27.
37. Бурчинский С.Г. Препараты гинкго в современной стратегии нейропротекции: возможности и перспективы. / С.Г. Бурчинский //Нов. мед. фарм. – 2011. – № 360. – С. 5 – 10.
38. Бурчинский С.Г. Клинико-фармакологические критерии эффективности и безопасности ноотропных средств. / С.Г. Бурчинский //Международный неврологический журнал. – 2015. – Т. 73 – № 3. – С. 77 – 78.
39. Бурчинский С.Г. Комплексная коррекция тревожных и когнитивных расстройств в ангионеврологии: цели, задачи, инструменты. / С.Г. Бурчинский //Международный неврологический журнал. – 2017. – Т. 94 – № 18. – С. 73 – 78.
40. Валенский Б.С. Принципы доказательной медицины, применительно к назначению нейропротекторной терапии при ишемическом инсульте. / Б.С. Валенский //Неврология. Поликлиника. – 2010. – № 2. – С. 28 – 31.
41. Вахитова Ю. В. Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Gly- дипептида /Ю. В. Вахитова, С. В. Садовников, С. С. Борисевич [и др.] // Acta naturae. – 2016. – Т. 8. – № 1 (28). – С. 90-98.
42. Виндиш М. Церебролизин - последние результаты в оценке мультимодального действия препарата / М. Виндиш //3-й Международный симпозиум по церебролизину. М. – 1991. – С. 81 – 86.
43. Волков А.В. Результаты применения регуляторных пептидов при реанимации после остановки сердца в эксперименте. / А.В. Волков, Ю.В. Заржецкий, А.Ю. Постнов //Терминальные состояния и постреанимационная патология организма: патофизиология, клиника, профилактика и лечение. М.: Ин-т общей реаниматологии РАМН. – 1992. – С. 69 – 76.
44. Волчегорский И.А. Инсулинопотенцирующее действие антиоксидантов при экспериментальном сахарном диабете. / И.А. Волчегорский, Л.М., Мирошниченко И.Ю. Рассохина. //Проблемы эндокринологии. – 2010. – № 2. – С. 27 – 35.
45. Волчегорский, И.А. Церебропротективные эффекты эмоксипина, реамберина и мексидола при аллоксановом диабете. / И.А. Волчегорский, Л.М. Рассохина, И.Ю. Мирошниченко // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 1. – С. 63 – 70.
46. Воронина Т.А. Диссоциация антиамнестического и противогипоксического эффектов у ноотропов и противогипоксических средств. / Т.А. Воронина, Т.Л. Гарибова, И.В. Хромова //Фармакология и токсикология. – 1987. – № 5. – С. 12 – 15.
47. Воронина Т. А. Экспериментальная психофармакология ноотропов. Фармакология ноотропов. / Т.А. Воронина, А. В. Вальдман //М.: Медицина, 1989. – С. 91–98.

48. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике. / Т.А. Воронина//РМЖ. – 2016. –№ 7. – С7 434-438. семакс
49. Востриков В.В. Место пираретама в современной практической медицине / В.В. Востриков //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т.15, №1. – С.14 -25 DOI: 10.17816/RCF15114-25
50. Гаврилов А.С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов : учебник / А. С. Гаврилов.// М. : ГЭОТАР-Медиа. – 2010 – 624 с.
51. Галенко-Ярошевский П.А. Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии острой ишемии миокарда. / П.А. Галенко-Ярошевский, Гацура В.В. //М.: Медицина. – 2000. – 383 с.
52. Галенко-Ярошевский П.А. Очерки фармакологии средств метаболической терапии. / П.А. Галенко-Ярошевский, И.С. Чекман, Н.А. Горчакова //М.: Медицина. – 2001. – 240 с.
53. Ганнушкина И.В. Коррекция церебральной ишемии у низкорезистентных к ней животных антистрессорным препаратом дельтаран. / И.В. Ганнушкина, И. Конорова, Е.В. Коплик [и др.] //Бюл. exper. Биол. и мед. – 2005. – Т. 141 – № 3. – С. 259 – 262.
54. Глушков Р.Г. Потенциальный лекарственный препарат, содержащий винпоцетин и янтарную кислоту. / Р.Г. Глушков, Н.И. Андреева, С.Д. Южак //Химико-фармацевтических журнал. – 2011. – Т. 45, № 4. – С. 9 – 11.
55. Головачева В.А. Нейрометаболическая терапия восстановительного периода инсульта / В.А. Головачева //Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т. 16. – № 29. – С. 24–30. DOI 10.33978/2307-3586-2020-16-29-24-30
56. Голиков А.П. Свободно-радикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антигипоксантами. / А.П. Голиков, С.А. Бойцов, В.П. Михин [и др.] //Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 35 – 37.
57. Горбатов С.В. Опыт применения раствора "Стерофундин изотонический" в комплексной терапии у тяжелобольных детей с нейрохирургической патологией / С.В. Горбатов, Е.В. Павлова, М.И. Лившиц, В.Е. Попов [и др.] //Вестник интенсивной терапии. – 2010. – № 3. – С. 50 – 53.
58. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 14-е изд. – М.: МЗ РФ. – 2018а. – Т. 1. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
59. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 14-е изд. – М.: МЗ РФ – 2018б. – Т. 2. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
60. Григорьян Г.А. Роль гликогенсинтазы киназы-3 в механизмах обучения и памяти. / Г.А. Григорьян //Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. – 2013. – Т. 63. – № 5 – 507 с.

61. Гусев Е.И. Церебральный инсульт: проблемы и решения. / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, М.Ю. Мартынов [и др.]//Вестник РГМУ. – 2006. – Т. 51. – № 4. – С. 28 – 32.
62. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга. / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова //М. – 2013. – 328 с.
63. Гусев Е.И. Неврология. Национальное руководство в 2-х томах. Том 2. 2-е издание. / Е.И. Гусев А.Н. Коновалов, В.И. Скворцова //ГЭОТАР-Медиа. – 2019. – 428 с.
64. Гурленя А.М. Фармакотерапия заболеваний нервной системы. / А.М. Гурленя, В.И. Талапин //Минск: Высшая школа. – 1978. – 288 с.
65. Дамулин И.В. Использование ипидакрина (аксамона) в неврологической практике. / И.В. Дамулин //Трудный пациент – 2007. – Т. 5. – № 11. – С. 15 – 20. www.t-pacient.ru/articles/6228.
66. Дергунова Л. В. Пептидный препарат АКТГ(4-7)РGP (Семакс) подавляет транскрипцию генов провоспалительных медиаторов, индуцированную обратимой ишемией мозга крыс. / Л. В. Дергунова, В. Г. Дмитриева, И. Б. Филиппенков [и др.]//Молекулярная биология. – 2021. – Т. 55, № 3. – С. 402-411 <https://doi.org/10.31857/S0026898421010043>
67. Деримедведь Л.В. БАДы на основе янтарной кислоты. / Л.В. Деримедведь, В.А. Тимченко //Провизор. – 2002. – № 13. – С. 10 – 13.
68. Домашенко, М.А. Применение цитиколина в остром периоде ишемического инсульта: от доказательной медицины к реальной клинической практике. / М.А. Домашенко, Д.В. Сергеев, М.А. Пирадов //РМЖ. – 2014. – № 2. – С. 1609 – 1613.
69. Достойнова Т.В. Эффективность церебролизина при ишемическом инсульте. / Т.В. Достойнова //Актуальные вопросы клинической ангионеврологии. СПб. – 1997. – С. 21 – 22.
70. Дунаев В.В. Влияние солей яблочной кислоты на физическую работоспособность и ее восстановление после истощающей мышечной деятельности. / В.В. Дунаев, В.С. Тишкин, Н.П. Милонова [и др.]//Фармакол. и токсикол. 1988. -Т. 51. – № 3. – С. 21–24.
71. Евтушенко И.С. Ноотропы и нейропротекторы в современной клинической нейрофармакологии. / И.С. Евтушенко //Международный неврологический журнал. – 2013. – Т. 3. – № 57. – 20 – 27.
72. Жуйкова С. Е. Физиологические и клинические эффекты синтетического аналога АКТГ4–10 семакса и его механизмы действия. /С.Е. Жуйкова //Интегративная физиология. – 2022. – Т. 3, № 2. – С. 204–220. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-2-204-220> EDN JRECUA
73. Зайцев Ю.В. Влияние этимизола на долговременную память. / Ю.В. Зайцев, С.С. Лосев //Физиология человека. – 1979. – № 1. – С. 175 – 177.
74. Зайцев Ю.В. Значение антигипоксических свойств этимизола в его ноотропном действии. / Ю.В. Зайцев, П.Д. Шабанов, С.И. Богословская //Фармакол. и токсикол. – 1988. – Т. 51, № 5. – С. 27 – 30.

75. Зайцев А.Г. Резистентность организма к холоду и ее фармакологическая коррекция: автореферат дисс. ... кандидата медицинских наук: 14.00.32, 14.00.25/ Зайцев Антон Георгиевич //ВМА,СПб. – 1997. – 23 с.
76. Заржецкий Ю.В. Влияние сукцината натрия на функциональные, биохимические и морфологические показатели восстановления ЦНС у крыс после 10-минутной остановки кровообращения. / Ю.В. Заржецкий, Е.А. Мутускина, И.Е. Трубина [и др.] //Анестезиол. и реаниматор. – 1994. – № 5. – С. 96 – 103.
77. Захаров В.В. Ведение пациентов с когнитивными расстройствами. / В.В. Захаров //РМЖ. – 2007. – № 6. – С. 510.
78. Захаров В.В. Когнитивные нарушения при цереброваскулярных заболеваниях. / В.В. Захаров, Н.В. Вахнина //Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 1. – С. 36 – 43.
79. Захаров В.В. Нейрометаболическая терапия в восстановительном периоде ишемического инсульта: влияние на качество жизни и когнитивные функции. / В.В. Захаров, Н.В. Вахнина, Д.О. Громова //Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2016. – № 2. – С.87 – 93.
80. Зезеров А.Е. Перекисное окисление липидов в крови человека при 120-суточной антиортостатической гипокинезии. / А.Е. Зезеров, С.М. Иванова, Б.В. Моргунов, А.С. Ушаков //Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1989. – № 2. – С. 28 – 33.
81. Иванникова Е.В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм. / Е.В. Иванникова //Журнал фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – № 2. – С. 1 – 17.
82. Иванова С.А. Поиск биомаркеров и разработка фармакогенетических подходов к персонализированной терапии больных шизофренией. / С.А. Иванова, О.Ю. Федоренко, Л.П. Смирнова [и др.]//Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – № 1. – С. 12 – 16.
83. Иванова С.А. Роль киназы гликогенсинтазы-3 β в патогенезе психических расстройств. / С.А. Иванова, И.С. Лосенков, Н.А. Бохан //Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – № 6. – С. 93 – 100.
84. Ивницкий Ю.Ю. Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма. / Ю.Ю. Ивницкий, А.И. Головкин, Г.А. Софронов //СПб.: «Оздоровительные технологии». – 1998. – 82 с.
85. Исаков В.А. Реамберин в терапии критических состояний: рук. для врачей. / В.А. Исаков, А.Л. Сологуб, А.Л. Коваленко [и др.]//СПб. – 2001. – 172 с.
86. Камчатнов П.Р. Нарушения мозгового кровообращения. Комбинированная терапия дисциркуляторной энцефалопатии / П.Р. Камчатнов [и др.] // Consilium Medicum. – 2005. – Т. 7. – № 8 – С. 21 – 25.

87. Камчатнов П.Р. Возможности применения экстракта гинкго билоба в неврологической практике. / П.Р. Камчатнов //Журн. неврол. психиат. – 2010. – Т. 110. – № 5. – С. 51 – 56.
88. Камчатнов П.Р. Метаболическая терапия в ведении больного ишемическим инсультом. / П.Р. Камчатнов, А.В. Чугунов //Фарматека. – 2014. – № 9. – С. 1 – 5.
89. Капелько В.И. Повышение максимальной интенсивности сократительной функции миокарда глутаминовой кислотой. / В.И. Капелько //Бюл. эксп. биол. – 1985. – Т. 100. – № 11. – С. 519 – 521.
90. Карасулова Е.Л. Тортоаномалии фронтальной группы зубов: комплексное ортодонтическое и медикаментозное лечение. / Е.Л. Карасулова, П.А. Галенко-Ярошевский, В.К. Леонтьев //Краснодар: Просвещение-Юг. – 2013. – 156 с.
91. Каркищенко Н.Н. Фармакокинетика. /Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева [и др.] //Изд-во Феникс Ростов - на -Дону. – 2001. – 383 с.
92. Каркищенко Н.Н. Очерки спортивной фармакологии. Т.1. Векторы экстраполяции /Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба, В.Н. Каркищенко [и др.]//М., СПб: Айсинг. – 2013. – 288 с.
93. Каркищенко Н.Н. Очерки спортивной фармакологии. Том 2. Векторы фармакопротекции. / Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба, В.Н. Каркищенко [и др.] //М., СПб.: Айсинг. – 2014. – 448 с.
94. Каркищенко Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации. / Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.]//ФМБА России, Москва. – 2017а. – 98 с.
95. Каркищенко Н.Н. Методические рекомендации по биомедицинскому (доклиническому) изучению лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. Методические рекомендации. /Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. [и др.] //ФМБА России, Москва. – 2017б. – 134 с.
96. Кленикова В.А. Влияние пираретама на метаболизм белков в нейронах и глиоцитах некоторых отделов головного мозга крыс. / В.А. Кленикова, Т.С. Глущенко, С. Тунева //Физиол. журнал СССР. – 1982. – № 1. – С. 9 – 12.
97. Клинические рекомендации по диагностике и лечению пострадавших с острыми нарушениями мозгового кровообращения в чрезвычайных ситуациях (в догоспитальном периоде, на этапах медицинской эвакуации). //М. – 2015. – 16 с.
98. Клинические рекомендации. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. – 2020. – 208 с.
99. Крапивин С.В. Нейрофизиологический анализ действия антигипоксантов в сравнении с психотропными средствами / С.В. Крапивин, А. О. Малышев, А.В. Харитонов [и др.] // Вестник РАМН. 2002. - № 8. - С. 32-37.

100. Ковалев Г.В. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов. / Г.В. Ковалев //Труды Волгоградского мед института. Волгоград. – 1985. – Т. 37. – № 5. – С. 295.
101. Ковалев Г.В. Ноотропные средства. / Г.В. Ковалев //Волгоград: Нижне-Волжское книжное издательство. – 1990. – 368 с.
102. Коваленко А.Л. Реамберин в клинической практике. Исследования, проведенные в 2005-2007 годах: практическое руководство для врачей. / А.Л. Коваленко //ОРИТ., СПб. – 2007. – 48 с.
103. Ковлер М.А. Пиридитол – новый отечественный психофармакологический препарат. / М.А. Ковлер, В.М. Авакумов, Р.П. Кругликова-Львова //Новые лекарственные препараты: Экспресс-информация. – 1981. – №4. – С. 2 – 8.
104. Кондрахин Е.А. Изучение нейрохимических механизмов специфического и неспецифического компонентов действия препаратов с ноотропными свойствами: автореф. дисс. ... кандидата медицинских наук: 14.03.06 / Кондрахин Евгений Анатольевич //М. – 2017. – 24 с.
105. Кондрашова М.Н. Адаптация к гипоксии путем переключения обмена на метаболизм янтарной кислоты /Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. / М.Н. Кондрашова //М.: Наука. – 1973. – С. 112 – 119.
106. Кондрашова М.Н. Выяснение и наметившиеся вопросы на пути исследования регуляции физиологического состояния янтарной кислоты. / М.Н. Кондрашова //Пушино. – 1976. – С. 6 – 8.
107. Кондрашова М.Н. Функциональный резерв адаптации внутриклеточного энергетического метаболизма к активной деятельности. /М.Н. Кондрашова //Функциональные резервы и адаптация. Киев. – 1990. – С. 68 – 71.
108. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты. / М.Н. Кондрашова //Вопр. биол. мед. и фарм. химии. – 2002. – № 1. – С. 7 – 12.
109. Коплик Е. В. Дельта-сон индуцирующий пептид и препарат дельтаран: потенциальные пути антистрессовой протекции. / Е. В. Коплик, П. Е. Умрюхин, И. Л. Конорова [и др.]//Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2007. – Т. 107. – № 12. – С. 50 – 54.
110. Косинец В.А. Опыт применения цитофлавина в спортивном питании. / В.А. Косинец, В. В. Столбицкий, И.П. Штурич //Клиническая медицина. – 2012. – № 7. – С. 56 – 58.
111. Костин В.И. К механизму антиангинального действия некоторых интермедитов энергетического обмена. / В.И. Костин, Ю.Н. Нестеров //Кардиология: успехи, проблемы, задачи. СПб. – 1993. – С. 96 – 97.
112. Коробцов А.В. Характеристика нейротрофинов и их локализация в неокортексе крыс при острой экспериментальной ишемии /А.В. Коробцов, С.Г. Калиниченко, Н.Ю. Матвеева// Вестник

- новых медицинских технологий, электронный журнал – 2018 – № 4. – С. 235-242 DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16130.
113. Кузнецов В.В. Место нейропептидного препарата Кортексин в терапии сосудистых заболеваний головного мозга. / В.В. Кузнецов //Участковый терапевт. – 2009. – № 4. – С. 39 – 40.
114. Кузник Б.И. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. / Б.И. Кузник, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон //СПб.: Наука. – 1998. – 310 с.
115. Куликова Т.Ю. Эффективность и переносимость фенотропила при терапии астенических расстройств невротического уровня. / Т.Ю. Куликова //Здоров'я України. – 2007. – № 8. – С. 23 – 24.
116. Куркин Д.В. Антиоксидатное действие Кортексина, Церебролизина и Актовегина у животных с хронической ишемией головного мозга./Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, А.В. Калатанова [и др.]// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т.121. – №7. – С. 84-89 <https://doi.org/10.17116/jnevro202112107184>
117. Лагунин А.А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PharmaExpert № 2006613590 от 16 октября 2006 г., Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. / А.А. Лагунин, В.В. Поройков, Д.А. Филимонов [и др.]//М. – 2006.
118. Лебедева Н.В. Опыт применения церебролизина у больных с острым нарушением мозгового кровообращения. / Н.В. Лебедева //В кн.: Труды 2ММИ. М. – 1975 – Т. 48. – № 2. – С. 80 – 85.
119. Лебедева О.В. Клиническое значение использования реамберина в профилактике церебральных и сердечно-сосудистых осложнений у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела. / О.В. Лебедева, Н.С. Черкасов, Е.А. О-Жи-Хо //Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2010. – №2. – С. 19 – 29.
120. Левченкова О.С. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия. / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова //Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2014. – Т. 13. – № 4. – С. 24 – 33.
121. Ленинджер А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функций клетки: перевод с английского /А. Ленинджер; под ред. и с предисл. А. А. Баева, Я. М. Варшавского. //Москва: Мир. – 1976. – 957 с.
122. Леонтьев В.К. Хронический генерализованный пародонтит: клиническая и экспериментальная фармакотерапия метаболитическими корректорами. / В.К. Леонтьев, Л.А. Фаустов, П.А. Галенко-Ярошевский [и др.]//Краснодар: Просвещение-Юг. – 2012. – 403 с.
123. Ливанов Г.А. Роль нарушений системы антиоксидантной защиты в формировании критических состояний у пациентов с острыми отравлениями веществами с угнетающим

- действием на ЦНС и возможности их коррекции препаратов реамберина / Г.А. Ливанов //Реамберин: реальность и перспективы: СПб. – 2002. – С. 34 – 44.
124. Ливанов Г.А. Пути фармакологической коррекции последствий гипоксии при критических состояниях у больных с острыми отравлениями. / Г.А. Ливанов, В.В. Мороз, Б.В. Батоцыренов [и др.]//Анестезиология и реаниматология. – 2003. – № 2. – С. 51– 54.
125. Ливанов Г.А. Использование метаболического антиоксиданта Цитофлавина в коррекции гипоксии и ее последствий при тяжелых формах отравлений нейротропными ядами. / Г.А. Ливанов //Вестник интенсивной терапии. – 2005а. – № 1. – С. 60 – 63.
126. Ливанов Г.А. Коррекция критических состояний при острых отравлениях ядами нейротропного действия на раннем госпитальном этапе. / Г.А. Ливанов, Б.В. Батоцыренов, М.Л. Калмансон [и др.]//Скорая медицинская помощь. – 2005б. – № 1. – С. 47 – 52.
127. Ливанов Г.А. Коррекция гипоксии тканей реамберином в лечении тяжелых форм острых отравлений нейротропными ядами. / Г.А. Ливанов, Б.В. Батоцыренов, А.Н. Лодягин [и др.]//Клиническая медицина. – 2010. – № 5. – С. 1– 4.
128. Лозинский М.О. Сукцинат моно[(2-диметиламино) этилового эфира] янтарной кислоты, обладающий адаптогенным и стресспротективным действием / М.О. Лозинский, Ю.Г. Бобков, А.П. Шиванюк [и др.]//А.с. СССР 1433957. Бюл. – 1988. – № 40. – 12 с.
129. Локшина А.Б. Ведение пациентов с деменцией: холинергический дефицит и его коррекция /А.Б. Локшина// Медицинский совет. – 2018 . –№ 12. – С.30-35 doi:10.21518/2079-701X-2018-12-30-35
130. Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы адаптогенного действия янтарной кислоты в условиях гипоксии. / Л.Д. Лукьянова //Физиология и клинические проблемы адаптации организма человека и животного к гипоксии, гипероксии, гиподинамии и неспецифические механизмы восстановления. Киев. – 1978. – С. 144.
131. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетические механизмы формирования гипоксических состояний и подходы к их фармакологической коррекции. / Л.Д. Лукьянова //Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М. – 1989. – С. 11 – 44.
132. Лукьянова Л.Д. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. Проблемы фармакологической коррекции гипоксии и поиска антигипоксантов / Л.Д. Лукьянова, В.В. Гацура, Л.В. Пастушенков [и др.] // М. – 1990а. – 20 с.
133. Лукьянова Л.Д. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим действием на энергетический обмен. / Л.Д. Лукьянова., В.Е. Романова //Хим. фарм. журнал. – 1990б. – № 8. – С. 9 – 11.

134. Лукьянова Л.Д., Изучение влияния периодической адаптации на состояние ЦНС крыс с различной резистентностью к кислородной недостаточности /Л.Д. Лукьянова, С.В. Крапивин, В.Е. Романова [и др.]//Журнал высшей нервной деятельности. – 1992. – Т. 42. – № 1. – С. 164-167.
135. Лукьянова Л.Д. Влияние окклюзионной ишемии мозга на функциональное состояние внутренних органов. / Л.Д. Лукьянова, Л.В. Молчанова, Г.Н. Чернобаева [и др.] //Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 6. – С. 54 – 56.
136. Маевский Е.И. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. / Е.И. Маевский, Е.В. Гришина, М.С. Окон //М.: НИИ фармакологии АМН СССР. – 1989. – С. 80 – 82.
137. Маевский Е.И. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. [Монография] / Е.И. Маевский, А.С. Розенфельд, Е.В. Гришина [и др.] //Рос. акад. наук. Ин-т теорет., и эксперим. биофизики. - Пушкино: Ин-т теорет. и эксперим. биофизики РАН. – 2001. – 155 с.
138. Маевский Е.И. Биохимические основы механизма действия фумарат-содержащих препаратов. / Е.И. Маевский, Е.В. Гришина //Medline.ru. – 2017. – Т. 18. – №2. – С. 50 – 80.
139. Макарова Т. И. Экспериментальное изучение нейропротекторной активности нооклерина: автореф. дисс. ... кандидата биологических наук: 14.00.25 / Макарова Тамара Ивановна //Купавна. – 2007. – 21 с.
140. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Ч.1 //Медицина. – 1977. – 624 с.
141. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. //Москва, Новая Волна. – 2005. – 1164 с.
142. Медведев В.Э. Новые возможности лечения астенических расстройств в психиатрической, неврологической и соматической практике. / В.Э. Медведев //Неврология. Психиатрия. – 2014. – Т. 4. – № 9. – С. 39 – 46.
143. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. / Ф.З. Меерсон //М.: Наука. – 1981. – 278 с.
144. Мирюлюбов А.В. Использование искусственных функциональных связей мозга для регуляции психофизиологического состояния человека: Автореф. дис. ... доктора медицинских наук: 14.00.17 / Мирюлюбов Александр Васильевич //ВМА, СПб. – 1996. – 40 с.
145. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. /А.Н. Миронова. //М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
146. Мищенко Т.С. Билобил Интенс в лечении больных с дисциркуляторной энцефалопатией, осложненной атеросклерозом и артериальной гипертензией. / Т.С. Мищенко, В.Н. Мищенко, И.А. Лапшина //Межд. неврол. журн. – 2012. – № 6. – С. 9 – 14.

147. Морозов П.В. Новый отечественный ноотропный препарат Нооклерин (обзор). / П.В. Морозов // Психиатр, и психофармакол. – 2003. – Т. 5. – № 6. – С. 262 – 267.
148. Мхитарян Э.А. Болезнь Альцгеймера и цереброваскулярные расстройства. / Э.А. Мхитарян, И.С. Преображенская // Неврологический журнал (приложение). – 2006. – № 1. – С. 4 – 12.
149. Наркевич И.А. Фармацевтическая композиция для лечения последствий черепно-мозговой травмы и способ её получения (варианты): пат. на изобрет. № 2693633 Рос. Федерация / И.А. Наркевич, А.А. Теслев, С.В. Оковитый [и др.] // Бюллетень №19 от 03.07.2019 г. – 17 с
150. Нечипуренко Н.И. Эффективность применения мексидола при экспериментальной ишемии головного мозга. / Н.И. Нечипуренко, Л.А. Василевская, Т.В. Грибоедова [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. (Прилож 1). – 2006. – С. 224 – 229.
151. Никитина Е.В. Янтарная кислота и ее соли как индивидуальные антиоксиданты и генопротекторы. / Е.В. Никитина, Н.К. Романова // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – № 10. – С. 375 – 381.
152. Новиков В.С. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. / В.С. Новиков, Е.Б. Шустов, В.В. Горанчук // СПб.: Наука. – 1998. – 544 с.
153. Носков Д.С. Деанола ацеглумат (нооклерин): клинико-фармакологические аспекты и актуальность применения в лечебной практике. / Д.С. Носков, В.В. Поройков, Е.В. Ших [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2013 – № 11. – С. 97 – 99.
154. Огнева И.В. Изменения клеточного дыхания волокон постуральных мышц крысы в условиях длительной гравитационной загрузки при добавлении в рацион сукцината. / И.В. Огнева, О.М. Веселова // Биофизика. – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 122 – 128.
155. Одинак М.М. Многоцентровое (пилотное) исследование эффективности глиатилина при остром ишемическом инсульте. / М.М. Одинак, И.А. Вознюк, М.А. Пирадов [и др.] // Анналы клин. и эксперим. неврологии. – 2010. – № 1. – С. 20 – 28.
156. Окон Е.Б. Нечувствительный к ротенолу путь окислительно-восстановительных взаимодействий янтарной кислоты и пиридин-нуклеотидов в митохондриях / Е.Б. Окон, Ю.Г. Каминский, М.Н. Кондрашова // Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пущино. – 1976. – С. 56 – 67.
157. Оковитый С. В. Актопротекторы как синтетические адаптогены нового поколения / С.В. Оковитый // Психофармакология и биологическая наркология. – 2003. – Т.3, № 1–2. – С. 510 – 516.
158. Оковитый С.В. Антигипоксанта в современной клинической практике / С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, В.А. Заплутанов [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90, № 9. – С. 69 – 74.

159. Оковитый С.В. Применение сукцинатов в спорте. / С.В. Оковитый, С.В. Радько // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2015а. – № 6. – С. 59 – 65.
160. Оковитый С.В. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективные мишени фармакотерапии. / С.В. Оковитый, С.В. Радько, Е.Б. Шустов // Химико-фармацевтический журнал. – 2015б. – Т. 49, № 9. – С. 24 – 28.
161. Оковитый С.В. Нейропротекторное средство на основе бис{2-[(2e)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-n,n-диэтилэтанаминия} бутандиоата / С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова [и др.] // Патент на изобретение №2588365. М. – 2016. – 12 с.
162. Оковитый С.В. Работоспособность. Утомление. Коррекция. / С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова // М.: Кнорус, 2019. – 330 с.
163. Орлов Ю.П. Энергетический дефицит при критических состояниях: значение сукцинатов. / Ю.П. Орлов // Медицинский алфавит. – 2013. – № 17. – С. 27 – 32.
164. Островская Р.У. Нейрофармакологическая характеристика класса ноотропов. Антидепрессанты и ноотропы / Р.У. Островская // Труды ЛНИПНИ им. Бехтерева. Л. – 1982. – Т. 101. – С. 101–113.
165. Песков А.Б. Оценка эффективности «малых воздействий» в клинике внутренних болезней. / А.Б. Песков, Е.И. Маевский, М.Л. Учитель [и др.] // Ульяновск: УлГУ. – 2006. – 201 с.
166. Пизова Н.В. Производные янтарной кислоты в терапии цереброваскулярных заболеваний. / Н.В. Пизова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2010. – № 1. – С. 67 – 68.
167. Пилипович А.А. Умеренные когнитивные расстройства: современные аспекты диагностики и терапии. / А.А. Пилипович, О. В. Воробьева // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2020. – Т. 120. – № 11. – С. 124 – 130. <https://doi.org/10.17116/jnevro2020120111124>
168. Платонова Т. Н. Кортексин – многолетнее применение в педиатрической практике. / Т.Н. Платонова, А.П. Скоромец, Н.П. Шабалов // Кортексин: Пятилетний опыт отечественной неврологии. СПб.: Наука. – 2005. – С. 1 – 9.
169. Помыткин И.А. Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности. / И.А. Помыткин, И. А. Красильникова, В.Г. Пинелис [и др.] // Биомедицина. – 2018. – № 3. – С. 17 – 34.
170. Попугаева Е.А. Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа – новый подход к лечению болезни Альцгеймера: автореф. дисс... доктора биологических наук: 14.03.06 и 03.03.01. / Попугаева Елена Александровна // М. – 2021. – 49 с.
171. Привалов А.А. Применение реамберина в лечении больных с нарушениями мозгового кровообращения по ишемическому типу. / А.А. Привалов, Н.В. Холманских, Н.Г. Обухов [и др.] // Консилиум. – 2005. – № 4. – С. 28 – 29.

172. Приходько В.А., Селизарова Н.О., Оковитый С.В. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть I. *Архив патологии*. – 2021. – Т. 83, №2. – 52–61. <https://doi.org/10.17116/patol20218302152>
173. Приходько В.А. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть II. /В.А. Приходько, Н.О. Селизарова, С.В. Оковитый //Архив патологии. – 2021. – Т. 83, №3. – С.62–69. <https://doi.org/10.17116/patol20218303162>
174. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. / В.Б. Прозоровский// Психофармакол. биол. наркол. 2007. – Т. 7. – № 3–4. – С. 2090–2120.
175. Путилина М.В. Современные представления о ноотропных препаратах. /М.В. Путилина //Лечащий врач: Журнал для практикующего врача. – 2006. – № 5. – С. 10 – 14.
176. Путилина М.В. Персонифицированный выбор препаратов — предшественников холина с позиций доказательной медицины. / М.В. Путилина //Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.–2020. – Т. – №120(6), – С.144–151. <https://doi.org/10.17116/jnevro2020120061144>
177. Пчицкая Е.И. Переход от классического деления дендритных шипиков нейронов на типы к альтернативным методам анализа. / Е.И. Пчицкая, И.С. Крылов, О.Л. Власова [и др.] //Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 88 – 100. DOI: 10.18721/JPM.12207.
178. Раевский К.С. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. / К.С. Раевский, В.П. Георгиев //М.: Медицина. – 1986. – 240 с.
179. Рогаткин С.О. Лечение детей, перенесших перинатальную гипоксию в периоде ранней неонатальной адаптации. / С.О. Рогаткин, Е.В. Людковская, Н.Н. Володин //Вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии. – 2005. – № 1. – С. 20 – 25.
180. Розенфельд А.С. Теоретико-методологические аспекты действия сукцината при спортивных нагрузках и гипоксии. / А.С. Розенфельд, Е.И. Маевский //Екатеринбург: Изд-во РГППУ. – 2007. – 173 с.
181. Романцов М.Г. Реамберин в клинической практике. Исследования, проведенные в 2005–2007 годах: Практическое руководство для врачей. / М.Г. Романцова, А.Л. Коваленко //ОРИТ. СПб.: Тактик-Студио – 2007. – 48 с.
182. Рощина Л.Ф. Влияние пираретама на устойчивость организма к гипоксии. / Л.Ф. Рощина, Р.У. Островская //Фармакология и токсикология. – 1981. – № 2. – С. 210 – 212.
183. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях /Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. //М. – 2010. – 173 с.
184. Рыжак, Г.А. Кортексин и регуляция функций головного мозга. / Г.А. Рыжак, В.В. Малинин, Т.Н. Платонова //СПб: ИФК «Фолиант». – 2003. – 208 с.

185. Саакян, И.Р. Двойная реципрокная регуляция системы окисления сукцината в митохондриях сердца и печени в условиях патологии. / И.Р. Саакян, А.Г. Саакян //Вопросы медицинской химии. – 1998. – Т. 44. – № 2. – С. 151 – 157.
186. Сазонов И.Э. Изучение дозозависимого эффекта цитофлавина в терапии острого периода ишемического инсульта. / И.Э. Сазонов, А.А. Кудинов, Е.П. Федотова //Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117. – № 2. – С. 64 – 67. <https://doi.org/10.17116/jnevro20171172164-67>.
187. Салмина А.Б. Инсулин и инсулинорезистентность: новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии заболеваний центральной нервной системы. / А.Б. Салмина, Н.А. Язуина, Н.В. Кувачева [и др.] //Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12. – № 5. – С. 104 – 118.
188. Сединкин В.А. Реамберин в интенсивной терапии диабетического кетоацидоза. / В.А. Сединкин, Е.Н. Клигуненко //Вестник интенсивной терапии. – 2006. – № 2. – С. 74 – 77.
189. Селиванов Е.А. Разработка препаратов антигипоксического действия на основе фумарата натрия. / Е.А. Селиванов, Л.В. Слепнева, Н.Н. Алексеева //Антигипоксантаы и актопротекторы: Итоги и перспективы. СПб. – 1994. – С. 85.
190. Семенов С.В. Малат моно[(2-диметиламіно)-етилового ефіру] бурштинової кислоти, який має адаптогенні та стреспротекторні властивості. / С.В. Семенов, С.А. Олійник, В.Е. Шевченко //Пат. 84789 Украина. – 2008. – 13 с.
191. Сергеев Д.В. Цитиколин в лечении ишемического инсульта – новые доказательства эффективности. / Д.В. Сергеев, М.А. Пирадов //Рус. мед. журн. – 2012. – №. 31. – С. 1552 – 1554.
192. Серегин В.И. Применение глиатилина и мексидола в интенсивной терапии тяжелого острого ишемического инсульта. / В.И. Серегин // Фарматека. – 2006. – №5. – С. 130 – 133.
193. Серезникова. Т. К. Психомодулирующее действие сукцината фенотропила в условиях информационно-физического стресса. / Т. К. Серезникова, М.А. Самотруева, И.Н. Тюренков [и др.] //Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 9. – С. 212.
194. Силачѐв Д. Н. Оценка сенсомоторного дефицита в отдаленном периоде после ишемии/гипоксии головного мозга неонатальных крыс. / Д. Н. Силачѐв, М. И. Шубина, С. С. Янкаускас [и др.] //Журнал высшей нервной деятельности. – 2013. – Т. 63. – № 3. – С. 405 – 416.
195. Скворцова В.И. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности мексидола в комплексной терапии ишемического инсульта в остром периоде. / В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская, Я.Р. Нарциссов [и др.] //Журн. невропатол. и психиатр. – 2006 – № 18 – С. 47 – 54.
196. Скрипник О.Ю. Лечение детей с ушибом головного мозга средней степени тяжести в амбулаторных условия. / О.Ю. Скрипник, В.В. Суменко, О.Ю. Трусова [и др.] //Журнал

неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т.120, №3. – С. 29-33.
<https://doi.org/10.17116/jnevro202012003129>

197. Слепнева Л.В. Коррекция метаболических нарушений различными антигипоксантами при экспериментальном геморрагическом шоке. / Л.В. Слепнева, Н.Н. Алексеева, Г.А. Хмылова //Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. Гродно. – 1991. – Ч.3. – С. 331.
198. Слепнева Л.В. Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими препаратами. / Л.В. Слепнева, Г.А. Хмылова //Трансфузиология. – 2013. – Т. 14. – № 2. – С. 49 – 65.
199. Слободин Т.А. Когнитивный резерв: причины снижения и защитные механизмы. / Т.А. Слободин, А.В. Горева //Международный неврологический журнал. – 2012. – Т. 49. – № 3. – С. 161– 165.
200. Смирнов Л.Д. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний алкилзамещенными 3-оксипиридинами. / Л.Д. Смирнов, Т.А. Воронина //Фармакологическая коррекция кислородзависимых состояний. М. – 1984. – С. 87.
201. Смирнов А.В. Янтарная кислота и ее применение в медицине. Ч. I. Янтарная кислота: метаболит и регулятор метаболизма организма человека. / А.В. Смирнов, О.Б. Нестерова, Р.В. Голубев //Нефрология. – 2014. – Т. 18. – № 2. – С. 33 – 41.
202. Спивакова Р.П. Влияние тонибрала и его аналогов на физическую работоспособность. / Р.П. Спивакова, Ю.Г. Бобков, А.Б. Томчин [и др.] //Фармакологическая регуляция физической и психической работоспособности. М. – 1980. – С. 35 – 36.
203. Сухомлин А.К. Прошлое, настоящее и будущее инфузионных фумаратсодержащих антигипоксантов в терапии неотложных и критических состояний. / А.К. Сухомлин, А.Ю. Иванов, Л.В. Слепнев //Журнал международной медицины. – 2016. – Т. 1. – № 18. – С. 60 – 69.
204. Сухоруков В.П. Реамберин как средство потенцирования лечения диабетической периферической нейропатии. / В.П. Сухоруков, С.В. Иванов, А.А. Соболев //Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. – 2003. – № 4. – С. 131 – 132.
205. Сысоев Ю.И., Оковитый С.В., Узуеббунам Б. Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы. Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 95-105.
206. Сысоев Ю.И. Механизм действия нового производного этаноламина - бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтил-этанаминия} бутандиоата. / Ю.И. Сысоев, Е.А. Попугаева, Д.П. Чернюк [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019а. – Т. 82. – № 4. – С. 3 – 10.

207. Сысоев Ю.И. Производные этаноламина как нейропротекторные средства. / Ю.И. Сысоев, И.А. Титович, С.В. Оковитый [и др.] //Фармация. – 2019б. – Т. 68. – № 1. – С. 48 – 55.<https://doi.org/10.29296/25419218-2019-01-07>
208. Танащян М.М. Новые возможности нейропротекции в лечении пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения. / М.М. Танащян, М.А. Домашенко //Нервные болезни. – 2016. – № 1. – С. 16 – 20.
209. Терентьева О. А. Разработка состава и технологии таблеток производного диэтиламиноэтанола, обладающих нейропротекторным действием: автореф. дисс...кандидата фармацевтических наук: 14.04.01/ Терентьева Оксана Андреевна //СПб. – 2020. – 24 с.
210. Титович И.А. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола. / И. А. Титович, В. Ц. Болотова //Биомедицина. – 2016. – №. 1. – С. 77 – 83.
211. Титович И.А. Нейротропная активность нового производного аминокэтанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. / И.А. Титович, Ю.И. Сысоев, В.Ц. Болотова [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017а. – Т. 80. – № 5. – С. 3 – 6.
212. Титович И.А. Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных. / И.А. Титович, С.В. Радько, Д.С. Лисицкий [и др.] //Биомедицина. – 2017б. – № 3. – С. 102 – 110.
213. Титович И.А. Антигипоксическая и ноотропная активность янтарной соли фумарового эфира диэтиламиноэтанола: автореф. дисс. ... кандидата биологических наук: 14.03.06 / Титович Ирина Александровна //СПб. – 2018. – 24 с.
214. Тишкин В.С. Влияние α -кетоглутарата, малата и α -глицерофосфата на биоэнергетические процессы в ишемизированном сердце. / В.С. Тишкин //Укр. биохим. журн. – 1990. – Т. 62. – № 4. – С. 93 – 96.
215. Федин А.И. Эффективность кортексина и мемантинола (мемантина) в лечении когнитивных нарушений у больных с хронической ишемией мозга /А.И. Федин //Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. . –Т118, №1. – С. 30-36 <https://doi.org/10.17116/jnevro20181181130-36>
216. Филатова Г.Ф. Содержание катехоламинов в органах крыс при охлаждении на фоне производных янтарной кислоты. / Г.Ф. Филатова, Г.А. Кузнецова, Ю.Г. Бобков //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – Т. 102. – № 9. – С. 315 – 316.
217. Филимонов Д.А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15 сентября 2006 г. / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков, Т.А. Глориозова [и др.] //Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2006.

218. Филимонов Д.А. Прогноз спектров биологической активности органических соединений. / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков //Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 66 – 75.
219. Фирсов А.А. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики новых лекарственных средств /А.А. Фирсов, В.П. Жердев, Ю.А. Портной. /В кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А. Н. Миронова. Часть 1. //М.: «Гриф и К». – 2013. – 944 с.
220. Хебенштрайт Г.Ф. Эффективность аминокислотного пептидного соединения при церебральной дисфункции со специальной ссылкой на геронтопсихиатрию. / Г.Ф. Хебенштрайт //Матер. Междунар. симпозиума по применению препарата церебролизин. М. – 1991. – С. 16 – 20.
221. Хребтова А.Ю. Адаптогенная и актопротекторная активность сукцинатов: опыт применения оксиметилэтилпиридина сукцината (Мексидола) в гандболе. / А.Ю. Хребтова, Н.А. Шаламова //Теория и практика физической культуры. – 2015. – № 5. – С. 48 – 51.
222. Цыган В.Н. Память, внимание, сон ... и кортексин (коррекция нарушений интегративных функций мозга). Кортексин: Пятилетний опыт отечественной неврологии. / В.Н. Цыган //СПб.: Наука. – 2005. – С. 136 – 145.
223. Чернев О.В. Застосування сукцинату натрію та його вплив на психофункціональний стан спортсменів після фізичних навантажень. / О.В. Чернев //Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 2. – № 4. – С. 291 – 294.
224. Чернев О.В. Влияние однократного применения сукцината натрия на процессы восстановления футболистов после физических нагрузок в различных зонах интенсивности. / О.В. Чернев, П.П. Павличенко //Світ медицини та біології. – 2015. – Т. 3. – № 52. – С. 63 – 68.
225. Шабанов П.Д. Метаболические корректоры гипоксии. / П.Д. Шабанов, И.В. Зарубина, В.Е. Новиков [и др.] //СПб.: Информ-Навигатор. – 2010. – 916 с.
226. Шах Б.Н. Механизмы развития полиорганной недостаточности при шокогенной травме: клинический подход к проблеме. / Б.Н. Шах, В.Н. Лапшин, В.М. Теплов [и др.] //Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2011. – Т. 170. – № 6. – С. 93 – 97.
227. Шахмарданова С.А. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний (обзоры). / С.А. Шахмарданова, О.Н. Гулевская, Я.А. Хананашвили [и др.] //Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2006. – № 3. – С. 16 – 30.
228. Шахмарданова С.А. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний. / С.А. Шахмарданова, О.Н. Гулевская, Я.А. Хананашвили [и др.] //Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2016. – №3. – 16 – 30 с.

229. Шекунова Е.В. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. / Е.В. Шекунова, М.А. Ковалева, М.Н. Макарова [и др.] // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. – 2020. – Т. 10. – № 1. – 19-28. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28>
230. Шоломов И.И. Церебропротекторный компонент интенсивной терапии при мультиорганной дисфункции. / И.И. Шоломов, Е.В. Верижникова, Л.М. Дорошенко // *Кортексин: Пятилетний опыт отечественной неврологии*. СПб.: Наука. – 2005. – С. 101 – 106.
231. Штрыголь С.Ю. Побочные эффекты ноотропных средств. / С.Ю. Штрыголь, Т.В. Картунова, Д.В. Штрыголь // *Провизор*. – 2003. – № 11. – С. 31 – 36. – <http://www.provisor.com.ua>.
232. Шустов Е.Б. Повышение устойчивости к экстремальным воздействиям при астении: Автореф. дис. ... доктора медицинских наук : 14.00.32, 14.00.25 / Шустов Евгений Борисович // СПб. – 1996. – 38 с.
233. Шустов Е.Б. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств / Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко [и др.] // *Биомедицина*. – 2013. – № 4. – С. 149-157.
234. Шустов, Е.Б. Экс-орфанные рецепторы как мишени для потенциальных лекарственных средств. / Е.Б. Шустов, С.В. Оковитый // *Биомедицина*. – 2015а. – № 2. – С. 15 – 29.
235. Шустов Е.Б. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием / Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов [и др.] // *Биомедицина*. – 2015б. – №1. – С. 18 – 23.
236. Шустов Е.Б. От исследований *in vivo* и *in vitro* к методологии *in silico*. / Е.Б. Шустов // *Вестник образования и развития науки РАЕН*. – 2016. – Т. 20. – № 2. – С. 91 – 96.
237. Юсковец В.Н. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат и способ его получения. / В.Н. Юсковец, И.А. Наркевич, Н.М. Чернов [и др.] // патент № 0002600315 – 2016.
238. Ягупов П.Р. Эффективность воздействия ацефена и бефола на показатели внимания у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. / П. Р. Ягупов, Н. А. Корнеева // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. – 2014. – № 2. – С. 33 – 35.
239. Яхно Н.Н. Лечение легких и умеренных когнитивных нарушений. / Н.Н. Яхно, В.В. Захаров // *РМЖ*. – 2007. – № 10. – С. 797.
240. Яхно Н.Н. Деменции: руководство для врачей. / Н.Н. Яхно, В.В. Захаров, А.Б. Локшина [и др.] // М.: МЕДпресс-информ. – 2010. – 264 с.
241. Adibhatla R.M. Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, R.I. Dempsey // *J. Neurochem*. – 2002. – V. 80. – P. 12 – 13.

242. Alhowail A. Molecular insights into the benefits of nicotine on memory and cognition (Review). / A. Alhowail //Mol Med Rep. – 2021. – V. 23. – №6 – 398p. doi: 10.3892/mmr.2021.12037.
243. Amenta F. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. / F. Amenta, S.K. Tayebati //Curr. Med. Chem. – 2008. – V. 15. – P. 488 – 498.
244. Ariza A.C. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related condition. / A.C. Ariza, P.M.T. Deen, J.H. Robben //Front Endocrinol (Lausanne). – 2012. – V. 3. – № 22. – P. 1 – 8.
245. Artemida Trial (A Randomized Trial of Efficacy, 12 Months International Double-Blind Actovegin): A Randomized Controlled Trial to Assess the Efficacy of Actovegin in Poststroke Cognitive Impairment. / A. Guekht, I. Skoog, S. Edmundson [et al.] //Stroke. – 2017. – V. 48. – №5. – 1262 – P. 1270. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.014321. 40.
246. Arroyo A.I. Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. / A.I. Arroyo [et al.] //EMBO Mol. Med. – 2014. – V. 6. – № 3. – P. 398 – 413.
247. Barbagallo Sangiorgi G. alpha-Glycerophosphocholine in the mental recovery of cerebral ischemic attacks. An Italian multicenter clinical trial. / G. Barbagallo Sangiorgi, M. Barbagallo, M. Giordano [et al.]// Ann N Y Acad Sci. – 1994. – V. 717. – P. 253-269. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb12095.x.
248. Belova L.A. Efficacy of Korteksin in acute period of hemispheric ischemic stroke. / L.A. Belova, V.V. Mashin, V.V. Abramova [et al.] //Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova. – 2018. – V. 118. – № 7. – P. 30 – 34. doi: 10.17116/jnevro20181187130.
249. Blad C.C. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. / C.C. Blad, C. Tang, S. Offermanns //Nature Reviews Drug Discovery. – 2012. – V. 11. – № 8. – P. 603 – 619.
250. Blin O.I. Effects of dimethylaminoethanol pyroglutamate (DMAE p-Glu) against memory deficits induced by scopolamine: evidence from preclinical and clinical studies. / O.I. Blin, C. Audebert, S. Pitel [et al.] //Psychopharmacology (Berl). – 2009. – V. 207. – № 2. – P. 201 – 212.
251. Bogdanova N.A. The action of antifeins with different memory effects on the cAMP-independent protein kinases of brain chromatin. / N.A. Bogdanova, O.G. Kulikova, Iu.S. Borodkin //Biull Eksp Biol Med. – 1991. – V. 111. – № 2. – P. 159 – 161.
252. Bomprezzi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. / R. Bomprezzi //Ther Adv Neurol Disord. – 2015. – V. 8. – № 1. – P. 20-30. doi: 10.1177/1756285614564152.
253. Bourne J. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? / J. Bourne, K.M. Harris //Curr Opin Neurobiol. – 2007. – V. 17. – № 3. – P. 381 – 386.

254. Bourne R.S. Mills G.H., Minelli C. Melatonin therapy to improve nocturnal sleep in critically ill patients: encouraging results from a small randomised controlled trial. / R.S. Bourne, G.H. Mills, C. Minelli // *Crit Care*. – 2008. – V. 12. – № 2. – P. 52. doi: 10.1186/cc6871. Epub 2008 Apr 18.
255. Bornstein N.M. Safety and efficacy of Cerebrolysin in early post-stroke recovery: a meta-analysis of nine randomized clinical trials. / N.M. Bornstein, A. Guekht, J. Vester [et al.] // *Neurol Sci*. – 2018. – V. 39. – № 4. – P. 629 – 640. doi: 10.1007/s10072-017-3214-0. Epub 2017 Dec 16
256. Brainin M. Cerebrolysin: a multi-target drug for recovery after stroke. Review. / M. Brainin // *Expert Rev Neurother*. – 2018. – V. 18. – № 8. – P. 681 – 687. doi: 10.1080/14737175.2018.1500459. Epub 2018 Jul 18.
257. Breuer J. Endothelin-A receptor antagonists prevent amyloid- β -induced increase in ETA receptor expression, oxidative stress, and cognitive impairment. / J. Breuer, S. Herich, T. Schneider-Hohendorf [et al.] // *J Alzheimers Dis*. – 2011. – V. 23. – P. 491 – 503.
258. Breuer J. Dual action by fumaric acid esters synergistically reduces adhesion to human endothelium. / J. Breuer, S. Herich, T. Schneider-Hohendorf [et al.] // *Mult Scler. Multiple Sclerosis Journal*. – 2017. – V. 24 - Is. 14. – P. 1871 - 1882. doi: 10.1177/1352458517735189.
259. Briyal S. Endothelin-A receptor antagonists prevent amyloid- β -induced increase in ETA receptor expression, oxidative stress, and cognitive impairment. / S. Briyal, T. Philip, A. Gulati // *J Alzheimers Dis*. – 2011. – V. 23. – P. 491–503.
260. Bubser M. Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition / M. Bubser, N. Byun, M.R. Wood, C.K. Jones // *Handb Exp Pharmacol*. – 2012. – V. 208. – P. 121 – 166.
261. Bullock R. The clinical benefits of rivastigmine may reflect its dual inhibitory mode of action: a hypothesis. / R. Bullock // *Int. J. Clin. Pract*. – 2002. – V. 56. – № 3. – P. 206 – 214.
262. Burness C.B. Dimethyl Fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. / C.B. Burness, E.D. Deeks // *CNS Drugs*. – 2014. – V. 28. – P. 373 – 387.
263. Cairns C.B. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. / C.B. Cairns, A.A. Ferroggiaro, J.M. Walther [et al.] // *Circulation*. – 1997. – V. 96. – № 9. – P. 260 – 265.
264. Campolo M. Multiple mechanisms of dimethyl fumarate in amyloid β -induced neurotoxicity in human neuronal cells. / M. Campolo, G. Casili, M. Lanza [et al.] // *J Cell Mol Med*. – 2018. – V. 22. – № 2. – P. 1081 – 1094.
265. Cao L.H. Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system. / L.H. Cao, X.L. Yang // *Prog. Neurobiol*. – 2008. – V. 84. – № 3. – P. 234 – 248.
266. Casili G. Dimethyl fumarate attenuates neuroinflammation and neurobehavioral deficits induced by experimental traumatic brain injury. / G. Casili, M. Campolo, I. Paterniti [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2018. – V. 1. – № 35(13). – P. 1437 - 1451. doi:10.1089/neu.2017.5260.

267. Chase C.H. A new chemotherapeutic investigation: piracetam effects on dyslexia. / C.H. Chase //Annals of Dislexia. – 1984. – V. 34. – P. 29 – 48.
268. Chehrehnegar N. Early detection of cognitive disturbances in mild cognitive impairment: a systematic review of observational studies. / N. Chehrehnegar, V. Nejati, M. Shati [et al.] //Psychogeriatrics. – 2020. – V. 20. – P. 212 – 228. <https://doi.org/10.1111/psyg.1248>
269. Chen H. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. / H. Chen, J.C. Assmann, A. Krenz [et al.] //The Journal of Clinical Investigation. – 2014. – V. 124. – № 5. – P. 2188 – 2192.
270. Chen J. Glycine confers neuroprotection through microRNA-301a/PTEN. / J. Chen, Y. Zhuang, Z.F. Zhang [et al.] //Mol Brain. – 2016. – V. 9. – № 1. – P. 59. doi: 10.1186/s13041-016-0241-3.
271. Chen I.C. Formulated Chinese Medicine Shaoyao Gancao Tang Reduces Tau Aggregation and Exerts Neuroprotection through Anti-Oxidation and Anti-Inflammation. / I.C. Chen, T.H. Lin, Y.H. Hsieh [et al.] //Oxid Med Cell Longev. – 2018. – P. 9595 – 9741. doi: 10.1155/2018/9595741.
272. Chernyev O. V. Efektivnist zastosuvannya ne zaboronenih v sporti metabolitotropnih zasobiv pid chas trenuvalno- zmagalnoyi diyalnosti atletiv /O. V. Chernyev, V. P. Rudenko, S. I. Stupchenko //Lugansk. - Ukrayinskiy morfologichniy almanah. – 2013. – V. 11. – № 2. – P. 27 – 31.
273. Clarke D.W. Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. / D.W. Clarke, L. Mudd, F.T. J. Boyd [et al.] //J. Neurochem. – 1986. – V. 47. – № 3. – P. 831 – 836.
274. Clark W.M. A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients. Citicoline Stroke Study Group. / W.M. Clark, S.J. Warach, L.C. Pettigrew [et al.] //Neurology. – 1998. – V. 49. – P. 671– 678.
275. Clark W. M. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. /W. M. Clark, B. J. Williams, K. A. Selzer [et al.] //Stroke. – 1999. – V. 30. – № 12. – P. 2592 – 2597.
276. Cline B. H. The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. / B. H. Cline, H. W. Steinbusch, D. Malin [et al.] //BMC Neurosci. – 2012. – V. 13. – 110 p. doi: 10.1186/1471-2202-13-110.
277. Cline B.H. Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression. / B.H. Cline, J.P. Costa-Nunes, R. Cespuglio [et al.] //Front. Behav. Neurosci. – 2015. – V. 9. – № 37. – P. 1 – 18. | <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00037>.
278. Cohem D.E. Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction. / D.E. Cohem, A.M. Supinski, M.S. Bonkowski [et al.] //Genes Develop. – 2009. – V. 23. – P. 2812 – 2817

279. Cohen P.A. Presence of Piracetam in Cognitive Enhancement Dietary Supplements. / P.A. Cohen, I. Zakharevich, R. Gerona //JAMA Intern Med. – 2020. – V 1. – №180 (3). – P. 458-459. doi: 10.1001/jamainternmed.2019.5507. PMID: 31764936; PMCID: PMC6902196.
280. Cui S. Cerebrolysin for vascular dementia. / S. Cui, N. Chen, M. Yang, [et al.] //Cochrane Database Syst. Rev. 2019;2019(11). doi: 10.1002/14651858.
281. Cummings B.J. Adaptation of a ladder-beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury / B.J. Cummings, C. Engesser-Cesar, G. Cadena [et al.] //Behav Brain Res. – 2007. – V. 177. – № 2. – P. 232 – 241.
282. Davalos A. International Citicoline Trial on acUte Stroke (ICTUS) trial investigators. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). / A. Davalos, J. Alvarez-Sabín, J. Castillo [et al.] //Lancet. – 2012. – V. 380. – P. 349 – 357.
283. Davenport A. Hyperlactatemia and metabolic acidosis during hemofiltration using lactate buffered fluids. / A. Davenport, E.J. Will, A.M. Davison //Nephron. – 1991. – V. 59. – № 3. – P. 461 – 465.
284. Deacon R.M.J. T-maze alternation in the rodent. / R.M.J. Deacon, J.N.P. Rawlins //Nature protocols. – 2006. – V. 1. – № 1. – P. 7 – 12.
285. Deen R.M.T. Succinate receptors in the kidney. / R.M.T. Deen, J.H. Robben //J Am Soc Nephrol. – 2011. – V. 22. – № 8. – P. 1416 – 1422.
286. De Ryck M. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. / M. De Ryck, J. Van Reempts, M. Borgers [et al.] //Stroke. – 1989. – V. 10. – № 20. – P. 1383 – 1390.
287. Demuro A. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. /A. Demuro, I. Parker, G.E. Stutzmann //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – № 17. – P. 12463 – 12468.
288. Deuster P. Dietary supplements and military divers. A Synopsis for undersea medical officers. / P. Deuster, S. Maier, V. Moore [et al.] //Uniformed Services University of the Health Sciences. – 2004. – 117 p.
289. Diederich K. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats. / K. Diederich, K. Frauenknecht, J. Minnerup [et al.] // Stroke. – 2012. – V. 43. – № 7. – P. 1931 – 1940.
290. Dimpfel W. Efficacy of dimethylaminoethanol (DMAE) containing vitamin-mineral drug combination on EEG patterns in the presence of different emotional states. Eur. / W. Dimpfel, W. Wedekind, I. Keplinger //J Med Res. – 2003. – V. 30. – № 8(5). – P. 183 – 191.
291. Dickstein D.L. Dendritic spine changes associated with normal aging. / D.L. Dickstein, C.M. Weaver, J.I. Luebke [et al.] //Neuroscience. – 2013. – V. 251. – P. 21 – 32.

292. Dmitrieva V. G. Effects of ischemia on the expression of neurotrophins and their receptors in rat brain structures outside the lesion site, including on the opposite hemisphere. / V.G. Dmitrieva, V.V. Stavchansky, O.V. Skvortsova [et al.] //Mol Biol (Mosk). – 2016. – V. 50. – № 5. – P. 775 – 784.
293. Drachuk O. Syntesis, structure analysis and biological activiti spectrum prediction of Antilactate. / O. Drachuk, S. Semenov, S. Oliynik //Вісник проблем біології і медицини (Україна) – 2011. – Is. 2, V. 1. – P. 120 – 125.
294. Duarte A.I. Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons-- involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. / A.I. Duarte, M.S. Santos, C.R. Oliveira [et al.] //Free Radic Biol Med. – 2005. – V. 39. – № 7. – P. 876 – 889.
295. Duron E. Hypertension, cognitive decline and dementia. / E. Duron, O. Hanon //Archives of cardiovascular diseases. – 2008. – V. 3. – № 101. – P. 181 – 189.
296. Fanne R.A. Insulin and glucagon share the same mechanism of neuroprotection in diabetic rats: role of glutamate. / R.A. Fanne, T. Nassar, S.N. Heyman [et al.] //Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2011. – V. 301. – № 3. – P. 668 – 673.
297. Fedorenko O. A schizophrenia-linked mutation in PIP5K2A fails to activate neuronal M-channels. / O. Fedorenko, N. Strutz-Seebohm, U. Henrion [et al.] //Psychopharmacology. – 2008. – V. 199. – № 1. – P. 47 – 54.
298. Fedorenko O. PIP-5K2A-dependent regulation of excitatory amino acid transporter EAAT3. / O. Fedorenko, C. Tang, M. Sopjani [et al.] //Psychopharmacology. – 2009. – V. 206. – № 3. – P. 429 – 435.
299. Felice F.G. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers /Felice F.G. De [et al.] //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – V. 106. – № 6. – P. 1971 – 1976.
300. Fisher M. Ballierie's clinical neurology, cerebrovascular disease (Hachinski V. ed.). / M. Fisher, K. Takano //London. – 1995. – P. 279 – 296.
301. Frohlich E.D. Vascular e cts of the Krebs intermediate metabolites. / E.D. Frohlich //Amer J. Physiol. – 1965. – V. 208. – № 1. – P. 149 – 153.
302. Gabryel B. Nootropics: pharmacological properties and therapeutic use. / B. Gabryel, H. I. Trzeciak //Pol. J. Pharmacol. – 1994. – V. 46. – № 5. – P. 383 – 394.
303. Gharbawie O. A. The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. / O.A. Gharbawie, P.A. Whishaw, I.Q. Whishaw //Behav Brain Res. – 2004. – V. 151. – № 1 – 2. – P. 125 – 135.
304. Giurgea C. Clinical significance of nootronil: symposium. /Giurgea C. //USB. Belgium. – 1976. – P. 1 – 10.

305. Gobert Y. Nootropil in neurological and psychiatric practice: material of a symposium. / Y. Gobert //USB. Belgium. – 1978. – P. 3 – 5.
306. Gutiérrez-Fernández M. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. / M. Gutiérrez-Fernández, B. Rodríguez-Frutos, B. Fuentes // *Neurochem. Int.* – 2012. – V. 60. – № 3. – P. 310 – 317.
307. Gwanyanya A. Ethanolamine: A Potential Promoiety with Additional Effects in the Brain. [Mini review] / A. Gwanyanya, C.N. Godsmark, R. Kelly-Laubscher // *CNS & Neurological Disorders Drug Targets.* – 2022. – V. 21. – №2. – P. 108-117. doi: 10.2174/1871527319999201211204645
308. Hakus, M. Un nouvelle antiasthenique: la tonibral. /Hakus M., Guillot-Eliot N. // *Gas.Med.Fr.* – 1972. – V. 79. – P. 2353 – 2356.
309. Hamel D. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. / D. Hamel, M. Sanchez, F. Duhamel [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2014. – V. 34. – № 2. – P. 285 – 293.
310. Harris K.M. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. / K.M. Harris, F.E. Jensen, B. Tsao // *J. Neurosci.* – 1992. – V. 12. – P. 2685 – 2705.
311. Hatchison M. Cognition-enhancement drugs. / M. Hatchison, J. Morgenthaler //Santa Cruz. – 1991. – 286 p.
312. Haubrich D. R. Deanol affects choline metabolism in peripheral tissues of mice. / D.R. Haubrich, N.H. Gerber, A.B. Pflueger // *J Neurochem.* – 1981. – V. 37. – № 2. – P. 476 – 482.
313. Hawkins B.J. Mitochondrial complex II prevents hypoxic but not calcium- and proapoptotic BCL-2 protein-induced mitochondrial membrane potential loss. / B.J. Hawkins, M.D. Levin, P.J. Doonan [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 34. – P. 26494 – 26505.
314. He W. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. /He W., F.J. Miao, D.C. Lin [et al.] // *Nature.* – 2004. – V. 429. – № 6988. – P. 188 – 193.
315. Heinrich M. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local caucasian knowledge. / M. Heinrich, T.H. Lee // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2004. – V. 92. – P. 147 – 162. DOI:10.1016/j.jep.2004.02.012.
316. Hertz L. The astrocyte-neuron lactate shuttle: a challenge of a challenge. / L. Hertz // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2004. – V. 24. – № 11. – P. 1241–1248.
317. Herrschaft H. Die Wirkung von Centrophenoxin auf die regionale Gehirndurchblutung bei Patienten mit zerebrovaskulärer Insuffizienz. /H. Herrschaft, F. Gleim, P. Duus // *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift.* – 1974. – V. 99. – №35. – P. 1707 – 1714.

318. Hodge H. C. Tabulation of toxicity classes. / H. C. Hodge, J. H. Sterner // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* – 1949 – V. 10 – P. 93 – 96.
319. Hoffmann C. Dimethylfumarate induces glutathione recycling by upregulation of glutathione reductase. / C. Hoffmann, M. Dietrich, A-K. Herrmann [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2017. – ID 6093903. – 8 p. <https://doi.org/10.1155/2017/6093903>.
320. Honegger C.G. Occurrence and quantitative determination of 2-dimethylaminoethanol in animal tissue extracts. / C.G. Honegger, R. Honegger // *Nature.* – 1959. – V. 184. – P. 550 – 552.
321. Hong Y. Progesterone exerts neuroprotective effects against A β -induced neuroinflammation by attenuating ER stress in astrocytes. / Y. Hong, X. Wang, S. Sun [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2016. – V. 33. – P. 83 – 89. doi: 10.1016/j.intimp.2016.02.002.
322. Hooper C. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. / C. Hooper, R. Killick, S. Lovestone // *J Neurochem.* – 2008. – V. 104. – P. 1433 – 1439.
323. Hurtado O. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: Effects on glutamate transport. / O. Hurtado, M.A. Moro, A. Cárdenas [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2005. – V. 18. – № 2. – P. 336 – 345.
324. Isaev N.K. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. / N.K. Isaev, S.V. Novikova, E.V. Stelmashook [et al.] // *Biochemistry. Biokhimiia.* – 2012. – V. 77. – № 9. – P. 996 – 999.
325. Jope R.S. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. / R.S. Jope, G.V. Johnson // *Trends Biochem Sci.* – 2004. – V. 29. – P. 95 – 102.
326. Kaschel B. Ginkgo biloba: specificity of neuropsychological improvement – a selective review in search of differential effects. / B. Kaschel // *Hum. Psychopharmacol.* – 2009. – V. 24. – P. 343 – 370.
327. Kawachi I. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. / I. Kawachi, H. Lassmann // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2017. – V. 88. – P. 137 – 145.
328. Kim T.Y. Role of GSK3 signaling in neuronal morphogenesis. / T.Y. Kim, E.M. Hur, W.D. Snider [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* – 2011. – V. 4. – P. 31 – 39.
329. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. / J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa [et al.] // *Stroke.* – 1986. – V. 8. – P. 1 – 8.
330. Kostnikova I.V. The effect of succinate combined with cyt chrome C on postischemic disorders in the skeletal muscle of the extremities. / I.V. Kostnikova, I.V. Ovchinnikov // *Eksp Klin Farmakol.* – 1995. – V. 58. – № 2. – P. 42 – 43.
331. Kuhn P.L. Motor function analysis of myelin mutant mice using a rotarod. / P.L. Kuhn, E. Petroulakis, G.A. Zazanis [et al.] // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 1995. – V. 13. – № 7. – P. 715 – 722.

332. Kuryata O.V. Serum Levels of the Biomarkers Associated with Astrocytosis, Neurodegeneration, and Demyelination: Neurological Benefits of Citicoline Treatment of Patients with Ischemic Stroke and Atrial Fibrillation. / O.V. Kuryata, Y.S. Kushnir, V.S. Nedzvetsky [et al.] //Neurophysiology. – 2021. – V.53. – №1. – P.2-12. doi: 10.1007/s11062-021-09907-3.
333. Kuroda K. Inhibitory effect of fumaric acid on forestomach and lung carcinogenesis by a 5-nitrofurantoin derivatives in mice. / K. Kuroda, M. Kanisawa, M. Akao //JNCI. – 1982. – V. 69. – № 6. – P. 1317 – 1320.
334. Kushnir M.M. Analysis of dicarboxic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylamonic acid in serum, plasma, and urine. / M.M. Kushnir [et al.] //Clin Chem. – 2001. – V. 47. – № 11. – P. 1993 – 2002.
335. Lagunin A. Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS. / A. Lagunin, D.A. Filimonov, V.V. Poroikov //Cur. Phar. Des. – 2010. – V. 16. – № 15. – P. 1703 – 1717.
336. Lecanu L. Caprospinol: moving from a neuroactive steroid to a neurotropic drug. /L. Lecanu, L. Tillement, G. Rammouz [et al.] //Expert Opin Investig Drugs. – 2009. – V. 18. – № 3. – P. 265 – 276. doi: 10.1517/13543780902762827.
337. Lehmann M.L. NF-kappa B activity affects learning in aversive tasks: possible actions via modulation of the stress axis. / M.L. Lehmann [et al.] //Brain Behav. Immun. – 2010. – V. 24. – № 6. – P. 1008 – 1017.
338. Lender P. Pharmacotherapy of epilepsy: safety problems. / P. Lender //Epilepsia. Modern Aspects of Treatment. Chicago: Illinois Univ. Ed. – 2010. – P. 184 – 199.
339. Leskiewicz M. Effects of neurosteroids on hydrogen peroxide- and staurosporine-induced damage of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. / M. Leskiewicz, M. Regulska, B. Budziszewska [et al.] //J. Neurosci Res. – 2008. – V. 86. – № 6. – P. 1361 – 1370. doi:10.1002/jnr.21591.
340. Levine L. Specific antibodies to thermally denatured deoxyribonucleic acid to phage T₄. / L. Levine, W.T. Murakami, H. Van Vunakis [et al.] //Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 1960. – V. 46. – P. 1038 – 1043.
341. Livingston G. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the *Lancet* Commission. / G. Livingston, J. Huntley, A. Sommerlad [et al.] //Lancet. – 2020. – V.396, №10248. – P.413–446. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6
342. Lohr J.I. Effect of dimethylaminoethanol, an inhibitor of betaine production, on the disposition of choline in the rat kidney. /J.I. Lohr, M. Acara //J Pharmacol Exp Ther. – 1990. – V. 252. – № 1. – P. 154 – 158.
343. Longa E.Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats /E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson // Stroke. – 1989 – V. 20. – P. 84-91.

344. Luo T.D. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on rat neurotrophin receptor expression after nerve injury. / T.D. Luo, T.B. Alton, P.J. Apel [et al.] //Muscle Nerve.–2016. – V. 54. – № 4. – P. 769 - 775. doi: 10.1002/mus.25106. Epub 2016 Aug 3.
345. Lv W. Schwann cell plasticity is regulated by a weakened intrinsic antioxidant defense system in acute peripheral nerve injury. / W. Lv, B. Deng, W. Duan [et al.] //Neuroscience. – 2018 – V. 382. – № 1. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.018>
346. Malanga G.I. New insights on dimethylaminoethanol (DMAE) features as a free radical scavenger. / G.I. Malanga, M.B. Aguiar, H.D. Martinez [et al.] //Drug Metab Lett. – 2012. – V. 6. – № 1. – P. 54 – 59.
347. Malykh A.G. Piracetam and piracetam-Like drugs. From Basic Science to Novel Clinical applications to CNS Disorders. / A.G. Malykh, M.R. Sadaie //Drugs. – 2010. – V. 70. – № 3. – P. 287 – 312.
348. Malík, M.; Tlustoš, P. Nootropics as Cognitive Enhancers: Types, Dosage and Side Effects of Smart Drugs. / M. Malík; P. Tlustoš, //Nutrients. – 2022. – 14, 3367. <https://doi.org/10.3390/nu14163367>
349. Mashin V.V. Evaluation of the efficacy and safety of application of the drug cortexin in the complex rehabilitation of verticalization in patients with ischemic stroke in the acute period. / V.V. Mashin, L.A. Belova, I.F. Aizatullin [et al.] //Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova. – 2019. – V.119. – № 9. – 62 – 67. doi: 10.17116/jnevro201911909162.
350. Marti-Masso J.F. Cinnarizine-induced parkinsonism: ten years later. / J.F. Marti-Masso, J.J. Poza //Mov. Disord. – 1998. – V. 13. – P. 453 – 456.
351. Martin-Arenas F.J. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. / F.J. Martin-Arenas, C.O. Pintado //Proceedings of Measuring Behavior. – 2014. – P. 1-5.
352. Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. / R. Mayeux, Y. Stern //ColdSpring Harb Perspect Med. – 2012. – V. 2. – № 8. – P. 1 – 18.
353. Michan S. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. / S. Michan, Y. Li, M.M-H. Chou [et al.] //J. Neuroscience. 2010. – V. 30. – № 29. – P. 9695 – 9707.
354. Martí-Carvajal A.J. Citicolina for treating people with acute ischemic stroke. /A.J. Martí-Carvajal, C. Valli, C.E. Martí-Amarista [et al.] //Cochrane Database of Systematic Reviews 2020, Issue 8. Art. No.: CD013066. DOI: 10.1002/14651858.CD013066.pub2.
355. Micheli F. Flunarizine- and cinnarizine-induced extrapyramidal reactions, / F. Micheli, M.F. Pardo, M. Gatto [et al.] //Neurology. – 1987. – V. 37. – P. 881 – 884.
356. **Millili G. P. The Strength of Microcrystalline** Cellulose Pellets: The Effect of Granulating with Water / G. P. Millili, J. B. Schwartz // Ethanol mixtures, drug development and industrial pharmacy. – 2008. – V. 16 – № 8. – P. 1411 – 1426, doi: 10.3109/03639049009115970. Лучшая прессуемость

357. Miller B. F. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of kollidon VA64 dissociate its protective effects from membrane resealing after controlled cortical impact in mice. / B.F. Miller, E. Keles, L. Tien [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – V. 34. – № 8. – P. 1347 – 1353. doi: 10.1038/jcbfm.2014.89.
358. McKinney R.A. Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. / R.A. McKinney // *Biochem Soc Trans.* – 2005. – V. 33. – № 6. – P. 1299 – 1302.
359. Moreira N.C.D.S. Neuroprotective Effects of Cholinesterase Inhibitors: Current Scenario in Therapies for Alzheimer's Disease and Future Perspectives. / N.C.D.S. Moreira, J.E.B.F. Lima, M.F. Marchiori [et al.] // *J Alzheimers Dis Rep.* 2022 Apr 18;6(1):177-193. doi: 10.3233/ADR-210061. PMID: 35591949; PMCID: PMC9108627.
360. Mosergoon F. Protective effect of piracetam in experimental barbiturate intoxication: EEG and behavioral studies. / F. Mosergoon, C. Guirgea // *Arch. int. Pharmacodyn.* – 1974. – V. 210. – P. 38 – 48.
361. Muratov F.K. Influence of multimodal effect of cytoflavin in the acute brain stroke in patients with metabolic syndrome. / F.K. Muratov, F.K. Shermukhamedova, B.V. Batocyrenov [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova.* – 2016. – V. 116. – №12. – P. 44 – 47. doi: 10.17116/jnevro201611612144-47.
362. Nagy I.Z. The biological waste product formation in the light of the membrane hypothesis of aging / I. Z. Nagy // *Archives of gerontology and geriatrics.* – 2002. – V. 34. – №3. – P. 329 – 341.
363. Odinak M.M. Efficacy of cytoflavin in patients in the acute ischemic stroke. / M.M. Odinak, V.I. Skvortsova, I.A. Vozniuk [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova.* – 2010. – V.110. – №12. – P. 29 – 36.
364. O'Leary T.P. Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze / T.P. O'Leary, R.E. Brown // *Learning & Memory.* – 2013. – V. 20. – №. 2. – P. 85 - 96.
365. Ostroff L.E. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. / L.E. Ostroff, J.C. Fiala, B. Allwardt [et al.] // *Neuron.* – 2002. – V. 35. – № 3. – P. 535 – 545.
366. Otmakhov N. Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. / N. Otmakhov, J.H. Tao-Cheng, S. Carpenter [et al.] // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – № 42. – P. 9324 – 9331.
367. Overgaard K. The effects of citicoline on acute ischemic stroke: a review. / K. Overgaard // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* – 2014. – V. 23. – № 7. – P. 1764 – 1769.

368. Parnetti L. Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approach or need for re-evaluation? / L. Parnetti, F. Mignini, D. Tomassoni [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2007. – V. 257. – P. 264 – 269.
369. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson // 6th-е изд., Academic Press. – 2007. – 456 p.
370. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates. / G. Paxinos, C. Watson // 7th edition. – Academic press. – 2013. – P.12.
371. Pearson-Leary, J. Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory. / J. Pearson-Leary, E.C. McNay // *J. Neurosci.* – 2016. – V. 36. – № 47. – P. 11851-11864.
372. Pedata F. Effect of nootropic agents on brain cholinergic mechanisms. / F. Pedata, F. Moroni, G.C. Pepeu // *Clin. Neuropharmacology.* – 1984. – V. 7. – № 1. – P. 772.
373. Penke B. Key peptides and proteins in Alzheimer's disease. / B. Penke, F. Bogár, G. Paragi [et al.] // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2019. – V. 20. – № 6. – P. 577 – 599. doi: 10.2174/1389203720666190103123434.
374. Pennington V.M. Clinical results with the use of deanol (Deaner) in schizophrenia. / V.M. Pennington // *Am J. Psychiat.* – 1959. – V. 116. – P. 165 – 166.
375. Penzes P. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. / P. Penzes, M.E. Cahill, K.A. Jones [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2011. – V.14. – P. 285 – 293.
376. Petersen R.C. Mild Cognitive Impairment. / R.C. Petersen // *Continuum (Minneap Minn).* – 2016. – V. 22. – P. 404 – 418. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000313>
377. Petretto D.R. Dementia and Major Neurocognitive Disorders: Some Lessons Learned One Century after the first Alois Alzheimer's Clinical Notes. / D.R. Petretto, G.P. Carrogu, L. Gaviano [et al.] // *Geriatrics (Basel).* – 2021 – V.11; № 6. – 5 p. doi: 10.3390/geriatrics6010005. PMID: 33440669; PMCID: PMC7838901.
378. Pfeiffer C.C. Stimulant effect of 2-dimethylaminoethanol; possible precursor of brain acetylcholine. / C.C. Pfeiffer, E.H. Jenney, W. Gallagher [et al.] // *Science.* – 1957 – V.126. – № 3274. – P. 610 – 611.
379. Pickhardt M. Screening of a neuronal cell model of tau pathology for therapeutic compounds. / M. Pickhardt, M. Tassoni, P. Denner [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2019. – V. 76. – P. 24 – 34. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.026.
380. Perialisi G. Effects of a standardized ginseng extract combined with Dimethylaminoethanol bitartrate, vitamins, minerals, and trace elements on physical performance during exercise. / G. Perialisi, P. Ripari, L. Vecchiet // *Clin Ther.* – 1991. – V. 13. – № 3. – P. 373 – 382.

381. Pluvinaige R. Etude critique del'action psychotonique du cyprodemanol. / R. Pluvinaige //Rev. Med. – 1970. – V.7. – P. 397 – 399.
382. Pogodin P.V. PASS Targets: ligand-based multi-target computational system based on public data and naïve / P.V. Pogodin, A.A. Lagunin, D.A. Filimonov [et al.] //Bayes approach. SAR and QSAR in Environmental Research. – 2015 – V.26. – №10. – P. 783-793.
383. Pomytkin I. A. H₂O₂ signalling pathway: a possible bridge between insulin receptor and mitochondria. / I. A. Pomytkin //Curr. Neuropharmacol. – 2012. – V. 10. – P. 311 – 320. doi: 10.2174/157015912804143559.
384. Pooler A. M. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. / A. M. Pooler, W. Noble, D. P. Hanger //Neuropharmacology. – 2014. – V. 76. – P. 1 – 8. Protein Data Bank URL [<http://www.rcsb.org/pdb/>].
385. Popugaeva E. Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease. / E. Popugaeva, C. Supnet, I. Bezprozvanny //Messenger. –2012. – V. 1. – P. 53 - 62.
386. Popugaeva E. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. / E. Popugaeva, E. Pchitskaya, A. Speshilova [et al.] // Mol Neurodegener. – 2015. – V. 10, № 1. – P. 37.
387. Prince M. Policy Brief: The Global Impact of Dementia 2013–2050. / M. Prince, M. Guerchet, M. Prina. – 2013. <https://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>
388. Przybyłowska M. Therapeutic Potential of Multifunctional Derivatives of Cholinesterase Inhibitors. / M. Przybyłowska, K. Dzierzbicka, S. Kowalski [et al.] //Curr Neuropharmacol. 2021;19(8):1323-1344. doi: 10.2174/1570159X19666201218103434. PMID: 33342413; PMCID: PMC8719290.
389. Rayasam G.V. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. / G.V. Rayasam, V.K. Tulasi, R. Sodhi [et al.] //British Journal of Pharmacology. – 2009. – V. 156. – № 6. – P. 885 – 898.
390. Rawanduzy A. Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. / A. Rawanduzy, A. Hansen, T.W. Hansen [et al.] //Journal of Neurosurgery 1997. – 1997. – V. 87. – №6. – P. 916 – 920.
391. Regard J.B. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. / J.B. Regard, I.T. Sato, S.R. Coughlin //Cell. – 2008. – V. 135. – № 3. – P. 561-571.
392. Reikhardt B. A. Participation of adenosine receptors in regulating the functional activity of neuronal chromatin by antifeines. /B.A. Reikhardt, O.G. Kulikova //Biokhimiia. – 1994. – V. 59. – № 9. – P. 1426 – 1432.
393. Ryck M.D. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. / M.D. Ryck [et al.] // Stroke. – 1989. – V. 10, № 20. – P.1383-1390.

394. Rodriguez A. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. / A. Rodriguez, D. B. Ehlenberger, D. L. Dickstein [et al.] // *PloS One*. – 2008 – V. 3. – № 4 – P. e1997.
395. Rojas-Fernandez C.H. Successful use of donepezil for the treatment of dementia with Lewy bodies. / C.H. Rojas-Fernandez // *Ann. Pharmacother.* – 2001. – V.35. – №2. – P. 202 – 205.
396. Roz N. Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. / N. Roz, M. Rehavi // *Life Sciences*. – 2003. – V. 73. – № 4. – P. 461 – 470. doi:10.1016/s0024-3205(03)00295-9. pmid 12759140.
397. Rybal'chenko V.K. The surface-active properties of dimethylethanolamine and its effect on the ecto-ATPase activity of plasma membranes. / V.K. Rybal'chenko, S.A. Lukoshko, G.V. Ostrovskaja [et al.] // *Biull Eksp Biol Med*. – 1991. – V. 111. – № 2. – P. 157 – 159.
398. Rudik A.V. MetaTox: Web Application for Predicting Structure and Toxicity of Xenobiotics' Metabolites. / A.V. Rudik, V.M. Bezhentsev, A.V. Dmitriev [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2017. – V. 57. – № 4. – P. 638 – 642.
399. Ruggieri S. Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis. / S. Ruggieri, C. Tortorella, C. Gasperini // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. – 2014. – V.10. – P. 229 – 239.
400. Sacamoto M. Cardioprotective effect of succinate against ischemia-reperfusion injury. / M. Sacamoto, K. Takeshige, H. Yasui // *Surg. Today*. – 1998. – V. 28. – № 5. – P. 522 – 528.
401. Sangha N. Treatment targets in intracerebral hemorrhage. / N. Sangha, N.R. Gonzales // *Neurotherapeutics*. – 2011. – № 8. – P. 374 – 387.
402. Scondia V. Nootropic drugs. / V. Scondia // *21 Ann. Czechoslovak Psychopharmacological meeting. Iesenic Spa*. – 1979. – P. 40 – 54.
403. Secades J.J. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2022 update. / J.J. Secades, P. Gareri // *Rev Neurol*. – 2022. – V.30. – № 75(s05). – P. 1-89. doi: 10.33588/rn.75s05.2022311.
404. Sedel F. Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. / F. Sedel, D. Bernard, D.M. Mock [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2016. – V. 110. – P. 644-653.
405. Schmidt H. Erfahrungen bei der iBehandlung von iZuständen zerebraler Insuffizienz mit centrophenin (Helfergin) /H. Schmidt, H. Broicher Klinische // *Medsche Welt*. – 1970. – V. 33. – P. 1432 – 1436.
406. Shipkowski K.A. Comparative disposition of dimethylaminoethanol and choline in rats and mice following oral or intravenous administration. / K.A. Shipkowski, J.M. Sanders, J.D. McDonald [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2019. – V.1. – № 378. – P.1145-1192. doi: 10.1016/j.taap.2019.05.011.

407. Singh N. Neuroprotective effect of Nrf2 activator dimethyl fumarate, on the hippocampal neurons in chemical kindling model in rat. /N. Singh, S. Vijayanti, L. Saha [et al.] //Epilepsy Res.– 2018. – V. 143. – P. 94 – 104. pii: S0920-1211(17)30527-2.
408. Snowdon D.A. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer's disease. / D.A. Snowdon, L.H. Greiner, J.A. Mortimer [et al.] //The Nun Study JAMA. – 1997. – V. 277. – № 10. – P. 813 – 887.
409. Song C. Astrocyte-Conditioned Medium Protects Prefrontal Cortical Neurons from Glutamate-Induced Cell Death by Inhibiting TNF- α Expression / C. Song, Y.S. Wu, Z.Y. Yang [et al.] // Neuroimmunomodulation. – 2019 – V. 26, №1– P. 33-42. doi: 10.1159/000495211.
410. Spacek J. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. / J. Spacek, K.M. Harris //J Neurosci. – 2004. – V. 24. – № 17. – P. 4233 – 4241.
411. Stakhovskaya L.V. The results of a randomized double-blind multicenter, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy and safety of Mexidol during long-term sequential therapy in patients in the acute and early recovery periods of hemispheric ischemic stroke (EPICA). / L.V. Stakhovskaya, N.A. Shamalov, D.R. Khasanova [et al.] //Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. – 2017. – V. 117. – № 3 – P. 55 – 65.
412. Stys P.K. Axonal degeneration in multiple sclerosis: is it time for neuroprotective strategies? / P.K. Stys //Ann Neurol. – 2004. – V. 55. – P. 601 – 603.
413. Steen E. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease: Is this type 3 diabetes? / E. Steen, B. Terry, E. Rivera, J. Cannon [et al.] //Journal of Alzheimer's Disease. – 2005. – V. 7. – P. 63 – 80.
414. Stewart M.G. Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. /M.G. Stewart, N.I. Medvedev, V.I. Popov [et al.] //Eur J Neurosci. – 2005. – V. 21. – № 12. – P. 3368 – 3378.
415. Storozheva Z.I. Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia. /Z.I. Storozheva, A.T. Proshin, V.V. Sherstnev [et al.] //BMC Pharmacology. – 2008. – V. 8. – P.1.
416. Storozhevykh T. P. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. / T. P. Storozhevykh, Y. E. Senilova, N. A. Persiyantseva [et al.] //BMC Neurosci. – 2007. – V. 8. – 84 p. doi: 10.1186/1471-2202-8-84.

417. Sun S. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. / S. Sun, H. Zhang, J. Liu [et al.] // *Neuron*. – 2014. – V. 82. – № 1. – P. 79 – 93. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.019.
418. Tamaki M. Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase. / M. Tamaki, K. Miyashita, S. Wakino [et al.] // *Kidney Int*. – 2013. – V. 85. – № 6. – P. 1330-1339. doi: 10.1038/ki.2013.473.
419. Tampellini D. Synaptic activity and Alzheimer's disease: a critical update. / D. Tampellini // *Front. Neurosci*. – 2015. – V. 4, № 9. – 423 p. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00423>.
420. Tang B.L. SIRT1 and neuronal diseases. / B.L. Tang, C.E.L. Chua // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2008a. – V. 29. – P. 187 – 200.
421. Tang H. The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist. / H. Tang, J.Y. Lu, X. Zheng [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2008b. – V. 375. – P. 562 – 565.
422. Tayebati S.K. Effect of choline-containing phospholipids on brain cholinergic transporters in the rat. / S.K. Tayebati, D. Tomassoni, A. Di Stefano [et al.] // *J. Neurol. Sci*. – 2011. – V. 302. – P. 49 – 57.
423. Teather L. A. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. / L.A. Teather, R.J. Wurtman // *Learning & Memory*. – 2005. – V. 12, №1. – P. 39 – 43. doi:10.1101/lm.83905
424. Tonnesen J. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. / J. Tonnesen, G. Katona, B. Rozsa [et al.] // *Nat Neurosci* – 2014. – V. 17 – № 5 – P. 678 - 685.
425. Trapp B. D. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. / B.D. Trapp, P.K. Stys // *Lancet Neurol*. – 2009. – V. 8. – P. 280 – 291.
426. Trepanier C.H. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. / C.H. Trepanier, M.F. Jackson, J.F. MacDonald // *FEBS J*. – 2012. – V. 279. – № 1. – P. 12 – 19.
427. Underwood P.K. Long-term pharmacotherapy in cardiology and cardiovascular risk: how it can be reduced? / P.K. Underwood, R. Lindsey // *Ann. Cardiovasc. Pharmacol*. – 2011. – V. 6. – P. 44 – 60.
428. Vavougiou G.D. The emerging epigenetics of PARK7 and its implication in neurodegenerative disease. / G.D. Vavougiou, S.G. Zargiannis // *Neural Regen Res*. – 2018. – V. 13. – № 9. – P. 1542 – 1543. doi: 10.4103/1673-5374.237117.
429. Venci J.V. Dimethylfumarate (Tecfidera): a new oral agent for multiple sclerosis. / J.V. Venci, M.A. Gandhi // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2013. – V. 47. – № 12. – P. 1697 – 1702.
430. Vojtechovsky M. The influence of centrophenoxine (Lucidril) on learning and memory in alcoholics. / M. Vojtechovsky, B. Soukupova, V. Safratova [et al.] // *Int. J. Psychobiol*. – 1970. – V. 1. – P. 49-56.

431. Wahren G. Glucose and amino acid metabolism during recovery after exercise. / G. Wahren, T. Felig, K. Hendler // *J. Amer. Physiol.* – 1973. – V. 34. – P. 839 – 845.
432. Walf A.A. The use of the reevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. / A.A. Walf, C.A. Erye // *Nature Protocols.* – 2007. – V. 2. – № 2. – P. 322 – 328.
433. Wang, Z. Cerebrolysin for functional recovery in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. / Z. Wang, L. Shi, S. Xu [et al.] // *Drug Des Devel Ther.* – 2017. – V. 19. – № 11. – P. 1273 – 1282. doi: 10.2147/DDDT.S124273.
434. Wasserman S. Levetiracetam versus placebo in child - hood and adolescent autism: a double-blind placebo-controlled study. / S. Wasserman et al. // *Int. Clin. Psychopharmacol.* – 2006. – V. 21. – № 6. – P. 363 – 367.
435. Westergaard N. Release of alpha- ketoglutarate, malate and succinate from cultured astrocytes: possible role in amino acid neurotransmitter homeostasis. / N. Westergaard, U. Sonnewald, A. Schousboe // *Neuroscience Letters.* – 1994. – V. 176. – № 1. – P. 105 – 109.
436. Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical use. / B. Winblad // *CNS Drug Rev.* – 2005. – V. 11. – P. 169 – 182.
437. Yamada K. Interaction of BDNF/TrkB signaling with NMDA receptor in learning and memory. / K. Yamada, T. Nabeshima // *Drug News Perspect.* – 2004. – V. 17. – № 7. – P. 435 – 438.
438. Yoshimura Y. Identification of protein substrates of Ca (2+)/calmodulin-dependent proteinkinase II in the postsynaptic density by proteinsequencing and mass spectrometry. / Y. Yoshimura, T. Shinkawa, M. Taoka [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 290. – P. 948 – 954.
439. Zahniser N.R. Is 2-dimethylaminoethanol (deanol) indeed a precursor of brain acetylcholine? A gas chromatographic evaluation. / N.R. Zahniser, D. Chou, I. Hanin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1977. – V. 200. – № 3. – P. 545 – 59.
440. Zander R. Physiology and clinical aspects of the extracellular bicarbonate pool: plea for cognizant use of HCO₃. / R. Zander // *Infusionsther. Transfusionsmed.* – 1993. – V. 20. – № 5. – P. 217 – 235.
441. Zhang Y. I. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. / Y. I. Zhang, M. Huo, J. Zhou [et al.] // *Comput Methods Programs Biomed.* 2010. Sep. – 2010. – V. 99. – № 3. – P. 306 – 314. doi: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007. Epub 2010 Feb 21.
442. Zhang L. Anti-Inflammatory Effects of Vinpocetine in Atherosclerosis and Ischemic Stroke: A Review of the Literature. / L. Zhang, L. Yang // *Molecules.* – 2015. – V. 20. – P. 335 – 347; doi:10.3390/molecules20010335.
443. Zhang H. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A new therapeutic target for Alzheimer's disease. / H. Zhang, S. Sun, L. Wu [et al.] // *Treatment J Neurosci.* – 2016. – V. 36. – № 47. – P. 11837 – 11850.

444. Zhang D. Efficacy and safety of cerebrolysin for acute ischemic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. / D. Zhang, Y. Dong, Y. Li [et al.] //Biomed Res Int. 2017. – 2017. – P. 4191 – 4670. doi: 10.1155/2017/4191670.
445. Zhao W.-Q. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. /W.-Q. Zhao [et al.] //The FASEB Journal. – 2007. – V. 22. – № 1. – P. 246 – 260.