

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

МАЗИНА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

Церебро - и эндотелиопротекторные свойства ароматических производных
ГАМК и глутаминовой кислоты при моделировании ишемии головного мозга

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Тюренков Иван Николаевич

ВОЛГОГРАД – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Нарушения мозгового кровообращения как медико-социальная проблема.....	13
1.2. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии нарушений мозгового кровообращения	18
1.3. Эндотелий как мишень фармакологической коррекции при нарушениях мозгового кровообращения.	29
ГЛАВА 2. Материалы и методы.	37
2.1. Методы моделирования ишемических повреждений головного мозга.	42
2.2. Метод моделирования дефицита половых гормонов.	44
2.3. Методы, используемые для оценки психоневрологических нарушений, вызванных ишемией головного мозга.	45
2.4. Методы оценки поведенческого статуса и когнитивных функций у животных.	49
2.5. Метод регистрации мозгового кровотока.	53
2.6. Метод определения степени гидратации головного мозга.	55
2.7. Методы определения потребления головным мозгом глюкозы, содержания продуктов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы.....	55
2.8. Изучение влияния исследуемых веществ на основные показатели гемостаза.	57
2.9. Методы статистической обработки результатов исследования.....	60

ГЛАВА 3. Поиск в ряду производных ГАМК и ГК веществ с цереброваскулярной активностью.....	62
3.1. Изучение влияния производных ГАМК и ГК на параметры мозгового кровотока в условиях нормы, в ишемический и постреперфузионный периоды.....	62
3.2 Изучение влияния производных ГАМК и ГК при ишемическом повреждении головного мозга, вызванного перевязкой сонных артерий.	69
3.3 Заключение	76
ГЛАВА 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединений РГПУ-135 и РГПУ-195 на модели необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.....	79
4.1 Выживаемость животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах после окклюзии общих сонных артерий..	80
4.2. Неврологический дефицит (по шкале McGrow) у животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах, после необратимой окклюзии ОСА	81
4.3. Когнитивный и поведенческий дефицит животных с необратимой окклюзией ОСА, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах	83
4.4. Мозговой кровоток и функциональное состояние эндотелия у животных после необратимой окклюзии ОСА, получавших исследуемые соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах.....	87
4.5. Выраженность отёка головного мозга у животных, получавших исследуемые соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах, после необратимой окклюзии ОСА.....	91
4.6 Заключение	93

ГЛАВА 5. Церебропротекторный эффект курсового лечебного введения производного ГАМК-РГПУ-195 при фокальной ишемии головного мозга и моделировании недостаточности половых гормонов у крыс на фоне эндотелиальной дисфункции.	95
5.1. Влияние лечебного курсового введения соединения РГПУ-195 на неврологический статус животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов.	96
5.2. Влияние лечебного курсового введения соединения РГПУ-195 на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс....	98
5.3. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на поведенческий статус животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга.	101
5.4. Влияние курсового лечебного введения исследуемого соединения РГПУ-195 на мнестический статус овариоэктомированных животных после фокальной ишемии головного мозга.	103
5.5. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на МК и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у овариоэктомированных животных, перенесших фокальную ишемию головного мозга.	106
5.6 Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на выраженность постишемического отека мозга у овариоэктомированных животных после фокальной ишемии головного мозга.	108
5.7. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на потребление головным мозгом глюкозы, содержание продуктов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной системы у овариоэктомированных животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга.	109

5.8. Изучение влияния введения соединения РГПУ-195 на плазменный и тромбоцитарный компонент гемостаза при фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.....	113
5.9 Заключение	119
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	122
ВЫВОДЫ.....	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:.....	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	136

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства мозгового кровообращения по-прежнему занимают лидирующие позиции среди причин смертности и стойкой утраты трудоспособности, приобретая тем самым огромное медико-социальное значение (Гусев Е.И. и др., 2013; Коваленко А.В., 2015; Петров Ю.Г., 2015). Ежегодно от инсульта погибают около 5 млн. человек, около 15 млн. человек переносят не фатальный инсульт. Число пациентов с сосудистыми поражениями мозга неуклонно растёт с каждым годом, прогнозируемая частота фатальных исходов от инсультов к 2020 году достигнет 7,7 млн, если не будут предприняты меры в борьбе с данной эпидемией. Основным методом лечения нарушений мозгового кровообращения остаётся фармакотерапия. Однако, существующие на сегодняшний день препараты для лечения острых и хронических нарушений мозгового кровообращения (НМК) в полной мере не удовлетворяют по своей эффективности ни клиницистов, ни пациентов (Гусев Е.И. и др., 2013; Рябченко А. Ю., 2014; Макарова Л.М., 2014; Данилов В.И. и др., 2014; Bettger P.J., et al., 2014). Одним из современных направлений в поиске и создании новых препаратов для лечения и профилактики НМК является мультитаргетное воздействие на факторы риска развития и этапы патогенеза основного заболевания, что позволяет снижать риск полипрагмазии в клинических условиях.

С этой точки зрения интерес представляют производные нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутаминовой кислоты), обладающие широким спектром действия (уменьшают активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, ограничивают симпатическое влияние на сосуды, обладают антиоксидантной, антигипоксантной и антитромботической активностью, в том числе, по мнению ряда авторов, и эндотелиопротекторным действием) (Бородкина Л. Е. 2009; Тюренков И. Н., 2008; Курдюмов И.Н. 2009; Воронков А. В, 2012, Волотова Е.В.и др, 2013; Макарова, Л.М. 2013; Куркин Д.В., 2013; Киселёв А.В., 2014; Тюренков И. Н. и др., 2014; Литвинов А.А., 2015). Совокупность свойств, характерных для

данных производных, делает целесообразным поиск веществ с церебро- и эндотелиопротекторными свойствами в ряду производных нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутаминовой кислоты).

Степень разработанности проблемы

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует обширный спектр средств терапии и профилактики НМК, в том числе и на основе производных нейроактивных кислот (пикамилон, аминалон и др.), применяющиеся для лечения указанной патологии, однако оказываемое ими церебропротекторное действие недостаточно эффективно в клинических условиях.

В исследованиях последних лет установлено, что нарушения нормального функционирования эндотелия является фактором риска развития различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая и НМК (Казак М.В., 2008; Рябчеко А.Ю. 2014; Старых Е.П. 2015, Федин А.И. и др., 2015). Вырабатывая в норме различные биологически активные вещества, эндотелий принимает непосредственное участие в поддержании сосудистого тонуса, атромбогенности сосудистой стенки, регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов, проявляет про- и антикоагулянтную, фибринолитическую активность, участвует в процессах воспаления и ангиогенеза (Maltais S., et al., 2011; Secomb T. W., Pries A. R., 2011; Mudau M., 2012; Булаева Н.И., 2013; Курапова М.В., 2015). Эндотелий сосудов постоянно подвержен воздействию различных неблагоприятных факторов: высокого артериального давления, активных форм кислорода, гликированных белков (при сахарном диабете), снижению эстрогенов и прогестеронов, стресса и многих других, которые могут провоцировать развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД), сопровождающейся недостаточной выработкой NO-синтазы, снижением выработки веществ, оказывающих вазодилатирующее, антитромботическое, противовоспалительное, антипролиферативное действие. Установлено, что при снижении выработки половых гормонов, значительно возрастает риск развития сердечно-сосудистых осложнений, в том числе острых и

хронических НМК. Поэтому своевременное назначение эндотелипротекторных препаратов лицам, имеющим один или несколько факторов риска развития цереброваскулярных заболеваний, позволит улучшить их прогноз, а включение эндотелипротекторов в терапию НМК может повысить эффективность её лечения.

На сегодняшний день известно о положительном влиянии на функциональное состояние эндотелия препаратов различных фармакологических групп (статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, β -блокаторов, ингибиторов фосфодиэстеразы и др.) (Тюренков И.Н. и др., 2012). Однако, если не считать сердечно-сосудистых средств с плеiotропным (эндотелиопротекторным) действием, других высокоэффективных препаратов коррекции ЭД с доказанной клинической эффективностью нет. Вместе с тем не все из этих препаратов возможно назначать для профилактики и лечения НМК.

Таким образом, актуальной проблемой экспериментальной и клинической фармакологии является поиск веществ для профилактики и лечения НМК с церебро- и эндотелиопротекторным действием.

Цель исследования

Экспериментально обосновать возможность применения производных ГАМК и глутаминовой кислоты с ароматическими заместителями, обладающих эндотелиопротекторными свойствами, для лечения нарушений мозгового кровообращения.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести скрининг соединений, обладающих церебро- и эндотелиопротекторной активностью, в ряду производных ГАМК и глутаминовой кислоты (ГК) с ароматическими заместителями в условиях ишемического - реперфузионного повреждения головного мозга и на модели необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий с оценкой

выживаемости животных, степени психоневрологического дефицита, состояния мозгового кровообращения.

2. Провести анализ зависимости «доза-эффект» для веществ, оказывающих наиболее выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие при НМК, сопоставив их эффективность.

3. Изучить влияние курсового 7-ми дневного введения соединения-лидера на степень психоневрологического дефицита, уровень мозгового кровотока при фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомизированных крыс.

4. Изучить возможные механизмы церебро- и эндотелиопротекторного действия наиболее активного соединения, оценив его влияние на вазодилатирующую функцию эндотелия, содержание продуктов процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы), на тромбоцитарный и плазменный компоненты гемостаза при фокальной ишемии головного мозга в условиях гипоестрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции.

Научная новизна исследования

Впервые проведено изучение церебропротекторного и эндотелиопротекторного действия новых производных ГАМК и глутаминовой кислоты с ароматическими заместителями в различных дозах на моделях обратимой билатеральной окклюзии, необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий, фокальной ишемии головного мозга.

Впервые изучено влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 в наиболее эффективной дозе при фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов у крыс самок. Проанализировано влияние данных веществ на уровень мозгового кровотока, вазодилатирующую функцию эндотелия, психоневрологический статус животных, процессы ПОЛ и активность антиоксидантной системы, основные параметры гемостаза, что позволило выделить вещество, перспективное для

дальнейшей разработки в качестве церебро- и эндотелиопротекторного средства для лечения различных нарушений мозгового кровообращения.

Научно-практическая ценность и реализация результатов работы

Полученные данные о церебро- и эндотелиопротекторном действии производных ГАМК и ГК свидетельствуют о перспективности разработки на основе данных соединений средств, улучшающих мозговое кровообращение.

Полученные в работе данные используются в учебном процессе на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ВолгГМУ и химиками-синтетиками Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена (Санкт-Петербург) при целенаправленном синтезе и поиске химических соединений, обладающих церебро- и эндотелиопротекторным действием.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислоты наиболее выраженным церебропротекторным действием при транзиторной, перманентной и фокальной ишемии головного мозга обладает производное ГАМК с пиридиловым заместителем в β -положении (соединение РГПУ-195). Данное соединение уменьшает выраженность явлений гипер- и гипоперфузии в постреперфузионный период, повышает выживаемость, снижает степень неврологических нарушений, улучшает МК и вазодилатирующую функцию эндотелия у животных, перенёсших неполную и фокальную ишемию головного мозга.
2. Механизм действия соединения РГПУ-195 обусловлен улучшением эндотелийзависимой вазодилатации, способностью снижать ПОЛ, повышать активность ферментов антиоксидантных систем и утилизацию глюкозы, уменьшать тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз и степень гидратации мозговой ткани.

Методология исследования

В проведённом исследовании использовался комплексный подход по оценке влияния новых производных ГАМК и ГК на мозговое кровообращение в условиях нормы и эндотелиальной дисфункции. Дизайн исследования соответствовал этическим правилам работы с лабораторными животными. В качестве теоретической и методологической основы использовались методические рекомендации отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме.

Исследование выполнено на современном уровне с использованием достаточного количества животных, современного оборудования и методов адекватных поставленным задачам, позволяющих получить репрезентативные и достоверные данные.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы. Проведён анализ данных литературы по теме диссертации, на основании чего разработаны протоколы и дизайн экспериментов, проведены исследования, анализ и дальнейшее описание полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе использовалось современное, высокотехнологичное оборудование и современные методы исследования, с помощью которых был получен значительный объём экспериментальных данных, проанализированный общепринятыми методами и критериями статистической обработки данных, что позволяет судить о степени достоверности результатов исследования. Материалы работы были представлены на целом ряде научных форумов: 3-м Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2011 г., БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики, Минск: ГУ РНМБ, 2011 г., VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной

медицинской конференции (Москва, 15 марта 2012 г.), аспирантских и докторантских чтениях: Дерзания нового времени – поиск инноваций: Москва, 2012 г., 70-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием – Волгоград: 2012, на 14-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство»:– Москва, 2012 г., «Инновации в современной фармакологии» – Казань 2012., V Международный молодёжный медицинский конгресс, «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013 г.», V Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). – 2014 г.. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав исследований, обсуждения результатов, выводов и списка используемой литературы, включающего 279 источников, из них 175 отечественных и 104 зарубежных автора. Диссертация изложена на 167 странице машинописного текста, содержит таблиц –22, рисунков –30.

ГЛАВА 1. Обзор литературы.

1.1. Нарушения мозгового кровообращения как медико-социальная проблема.

Сосудистая патология нервной системы по праву считается проблемой номер один в клинической неврологии, что определяется высокой заболеваемостью и значительной смертностью населения (Гусев Е.И. и др., 2013; Данилов В.И. и др., 2014; Bettger P.J., et al., 2014). Этим объясняется пристальное внимание, которое уделяется сейчас изучению различных аспектов, особенно вопросам диагностики, профилактики и лечения нарушений мозгового кровообращения.

Данная проблема перестала быть чисто медицинской и давно приобрела черты социально-экономической. Постоянно наблюдается рост показателей заболеваемости, смертности и инвалидности от нарушений мозгового кровообращения (Фонякин А.В. и др., 2010; Мухаметзянов А.М. и др., 2013).

В экономически развитых странах частота развития различных нарушений мозгового кровообращения встречается приблизительно у 15% населения, а смертельный исход от этой патологии превышает 30%. Согласно международным эпидемиологическим исследованиям (World Development Report) в мире от инсульта ежегодно умирают 4,7 млн. человек. Согласно отчету министра здравоохранения и социального развития В.И. Скворцовой (2014), нарушения мозгового кровообращения занимают второе место в структуре общей смертности в Российской Федерации, уступая лишь кардиоваскулярной патологии, и составляют 21,4%, а инвалидизация после перенесенного острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) достигает показателя 3,2 на 10000 населения, занимая первое место среди всех причин первичной инвалидности людей трудоспособного возраста (Пономарева Л.П. и др., 2010; Исайкин А.И., 2010). В России ежегодно ОНМК развивается более чем у 450000 человек. Это означает, что каждые 1,5 минуты один россиянин переносит инсульт, 35% из них умирают в остром

периоде заболевания (Котова О.В., 2012; Скворцова В.И. и др., 2014; Chalmers J. et al., 2000). Примерно 55%, доживших до конца 3-го года после перенесенного инсульта, в той или иной мере не удовлетворены качеством своей жизни (Asplund K. et al., 2004). Лишь около 20% выживших больных могут вернуться к прежней работе (Нечипуренко Н.И. и др., 2008; Barquera S. et al., 2015).

Важной причиной, ограничивающей трудоспособность и возможности социальной адаптации таких больных, являются тревога, депрессия, апатия, когнитивные нарушения и т.д., нередко имеющие прогрессирующее течение. (Бойко А.Н. и др., 2005). Учитывая высокую распространенность когнитивных нарушений у больных, вполне понятен тот интерес, который вызывает возможность их максимально ранней диагностики и коррекции. Таким образом, борьба с цереброваскулярными заболеваниями, их профилактика, лечение и трудовая реабилитация, представляются не только медицинской задачей, а и медико-социальной, имеющей большое значение для государства и его экономики.

Согласно современным представлениям, понятие "ишемический инсульт" отражает факт развития клинического синдрома острого сосудистого поражения мозга, являющегося исходом различных патологических состояний системы кровообращения и характеризующегося формированием инфаркта мозга. Под гетерогенностью ишемического инсульта понимают неоднородность этиологических факторов и патогенетических механизмов развития острой церебральной ишемии: (Верещагин Н.В. и др., 2001)

- морфологические изменения мозговых сосудов
- расстройства общей и церебральной гемодинамики
- нарушение физико-химических свойств крови
- индивидуальные и возрастные особенности метаболизма мозга

Последнее десятилетие ознаменовалось работами, свидетельствующими о динамичном характере структурно-функциональных

изменений мозговой ткани вследствие острой гипоперфузии и ишемии, а также механизмах их трансформации в инфаркт мозга.

При острой фокальной ишемии снижение мозгового кровотока и наступление основных метаболических и морфологических нарушений в поврежденной ткани определяются 4 критическими уровнями, в процессе которых проходит ряд последовательных реакций (Гусев Е.И. и др., 2001).

«Ядерная зона» инфаркта образуется в результате выраженного снижения мозгового кровотока до 10-12 мл на 100 г мозгового вещества в 1 мин, в течение 6-8 мин с момента развития острого нарушения кровотока. В течение нескольких часов центральный инфаркт окружен ишемизированной, но живой мозговой тканью – зоной «ишемической полутени», или «пенумбры», в которой мозговой кровоток снижен до 12-18 мл на 100 г ткани в 1 мин. Это обеспечивает в течение определенного времени жизнеспособность нервных клеток в области пенумбры с сохранением энергетического метаболизма и морфологической целостности, что и определяет границы временного окна («терапевтическое окно»), внутри которого наиболее эффективны лечебные мероприятия, направленные на восстановление функции нейронов «ишемической полутени». Формирование большей части инфаркта заканчивается через 3-6 ч с момента появления первых клинических симптомов инсульта. В эти же сроки существует «терапевтическое окно». Применение чувствительных диагностических методов позволило установить, что окончательное формирование инфаркта происходит через 24-48 часов с момента возникновения острой ишемии (рис 1).

Повреждение ткани головного мозга на фоне снижения церебрального кровотока



Рисунок 1. Реакции, происходящие в мозге, в результате ишемического повреждения связанного со снижением церебрального кровотока

В условиях нарастающей до критических значений ишемии мозговой ткани запускается ряд патобиохимических реакций, протекающих во всех основных клеточных пулах центральной нервной системы (рис.2) (Скворцова В.И. и др., 2009; Крыжановский С. и др., 2011; Фирсов А.А. и др., 2011)

В основе инициации нейрональной гибели при острой ишемии лежит активация глутамат-кальциевого каскада (Lai T.W. et al., 2011, 2014). При критическом снижении мозгового кровотока происходит дисбаланс между тормозными и возбуждающими нейротрансмиттерами в сторону последних (глутаминовая и аспарагиновая кислоты). В период нарастания ишемии головного мозга степень выраженности деструктивных изменений нейронов коррелирует с содержанием глутамата. Высвобождение его избыточного количества из пресинаптических терминалей в зоне ишемии приводит к перевозбуждению глутаматных рецепторов, что получило название эксайтотоксичности (Скворцова В.И. и др., 2003).

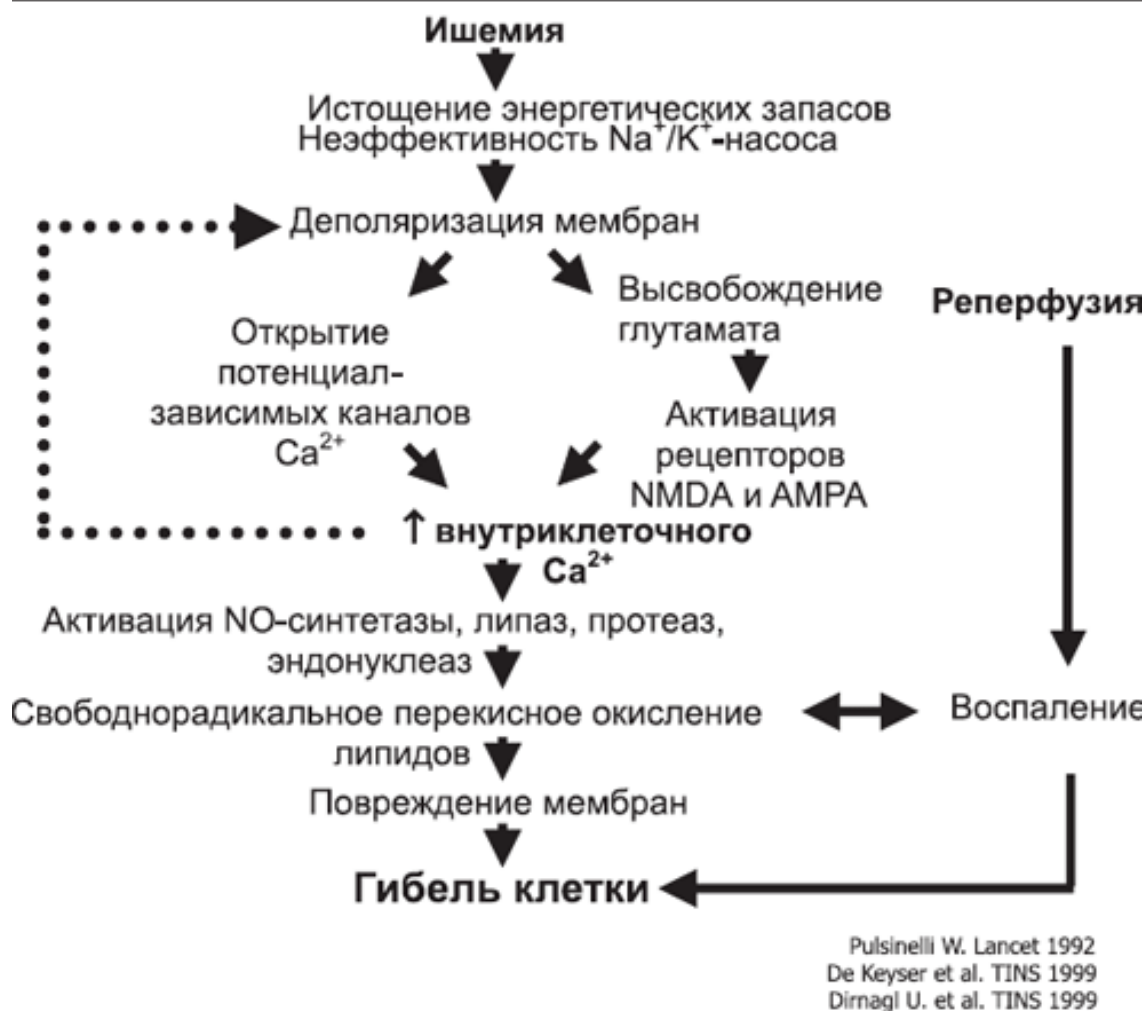


Рисунок 2. Последовательность патобиохимических процессов при ишемии головного мозга

Массивное внутриклеточное поступление ионов натрия и кальция стимулирует активацию фосфолипаз и протеиназ, в результате образуются цитокины, простагландины, лейкотриены, повреждающие цитоскелет клетки и вызывающие её гибель. С другой стороны, внеклеточное высвобождение провоспалительных цитокинов, медиаторов воспаления, высокоактивных свободных радикалов и острофазных астроцитарных белков оказывает негативное воздействие на межклеточные структуры и на сосудистую стенку. При этом происходит повреждение эндотелиальной выстилки сосудов, базальной сосудистой мембраны, межэндотелиальных контактов. Так формируется связь повреждающих механизмов при острой церебральной ишемии со структурно-функциональными изменениями со стороны внутреннего слоя сосудистой стенки, результатом которых является эндотелиальная дисфункция.

1.2. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии нарушений мозгового кровообращения

В последние годы всё большее внимание медицинского сообщества привлекает эндотелиальная система, поскольку изменения структуры и функциональных особенностей эндотелия сосудов ведёт к дисбалансу между продукцией вазодилатирующих, антитромботических, ангиопротекторных, антипролиферативных факторов, с одной стороны (NO, простациклин, тканевой активатор плазминогена, С-тип натрийуретического пептида, эндотелиального гиперполяризующего фактора) с другой стороны вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов (эндотелин, супероксиданион, тромбоксан A_2 , ингибитор тканевого активатора плазминогена и др.), снижению атромбогенных свойств сосудистой стенки и может привести к усиленной адгезии тромбоцитов к эндотелию стенки сосудов, активации системы гемостаза и тромбозу (Баркаган З.С., 2001; Марков Х.М., 2005; Суслина З.А и др., 2009; Münzel T. et al., 2008; Chen W. et al., 2008, Асташев П.Е. и др., 2011).

Эндотелий представляет собой метаболически активный монослой клеток кровеносных и лимфатических сосудов, регулирующий различные физиологические и патологические процессы.

По современным представлениям это не просто полупроницаемая мембрана, обеспечивающая гистогематическую функцию и несмачиваемость сосуда, а активный эндокринный орган, самый большой в организме, диффузно рассеянный по всем тканям (Филиппов А.Е. и др., 2006; Hwang, M. et al., 2014). Он синтезирует субстанции, важные для контроля свертывания крови, регуляции тонуса и артериального давления, фильтрационной функции почек, сократительной активности сердца, метаболического обеспечения мозга. Контролирует диффузию воды, ионов, продуктов метаболизма. Реагирует на механическое воздействие текущей жидкости, кровяное давление и ответное напряжение, создаваемое мышечным слоем сосуда. Чувствителен к химическим и структурным повреждениям, которые

могут приводить к повышенной агрегации и адгезии циркулирующих клеток, развитию тромбоза, оседанию липидных конгломератов (Грацианский Н.А., 1997; Васильева Е.М. и др., 1999; Марков Х.М., 2011).

Эндокринная активность эндотелия зависит от его функционального состояния, которое, в значительной мере, определяется воспринимаемой им информацией. На эндотелии находятся многочисленные рецепторы к различным биологически активным веществам, он воспринимает давление и объем движущейся крови – так называемое напряжение сдвига, стимулирующее синтез противосвертывающих и сосудорасширяющих веществ (Суслина З.А. и др., 2006; Насырова А.А., 2015).

Одна из основных функций эндотелия состоит в сбалансированном выделении регуляторных субстанций, определяющих целостную работу системы кровообращения. Среди них факторы, контролирующие сокращение и расслабление мышц сосудистой стенки, рост клеток, регулирующие воспаление, участвующие в свертывании и фибринолизе.

Все вещества, синтезируемые эндотелиоцитами, можно разделить на:

1. Вазоактивные субстанции (вазодилататоры и вазоконстрикторы) – оксид азота (NO), эндотелин-1, ангиотензин II (и, возможно, ангиотензин I), простагландин, тромбоксан и др.

2. Гемостатические и антитромботические факторы (про- и антикоагулянты) – простагландин, NO, тромбомодулин, гепариноподобный гликозаминогликан, тканевой активатор плазминогена, фактор Виллебранта и др.

3. Факторы роста – эндотелиальный и гепариноподобные ингибиторы роста и др.

4. Медиаторы воспаления – интерлейкин-I (стимулятор Т-лимфоцитов), интерлейкин-6 и др.

5. Ферменты – экспрессия на поверхности эндотелиальных клеток ангиотензинпревращающего фермента (киназа II), ответственного за

конверсию ангиотензина I в ангиотензин II и деградацию брадикинина (Громов Л.А., 1992; Петрищев Н.Н., 2003; Марков Х.М., 2011)

Нормальная работа эндотелия рассматривается как ключевая в поддержании сосудистого гомеостаза. Важнейшим пусковым моментом нарушения гемостаза считают изменение структуры и функции эндотелия (Суслина З.А. и др., 2000).

Необходимо отметить, что многие патогенетические факторы (оксидативный стресс (Марков Х.М., 2005; Sousa J.B. et al., 2015), гиперхолестеринемия, гипергликемия, инсулинорезистентность (Бутрова С.А., 2001; Pitocco D. et al., 2010; Hwang M.H. et al., 2014), гипертензия (Bonetti, P.O. et al., 2003; Джанашия П.Х. и др., 2008), снижение уровня половых гормонов (Тюренков И.Н. и др., 2009; Park J. et al., 2014), гипергомоцистеинемия (Калмыков Ю.М., 2009), курение (Campisi R. et al., 1998; Zeiher A.M. et al., 1995) и др.) могут нарушить работу эндотелия, сдвигая его основные функции в сторону вазоконстрикции, усиления процессов тромбообразования, воспаления, пролиферации и вызывая тем самым его дисфункцию (Brandes R.P., 2014).

В последние годы внимание исследователей привлечено к изучению состояния эндотелия сосудов при различных заболеваниях (Рис.3).

Формирование гипертензивных состояний, ишемических нарушений мозга и сердца, изменений гомеостаза, нарушений метаболизма по типу гиперхолестеринемии и гипергликемии, ведущих к возникновению атеросклероза, диабета, ожирения обусловлено изменениями функции эндотелия, и в первую очередь, нарушениями продукции дилатационных и констрикторных субстанций, а также факторов, регулирующих взаимодействие эндотелия с клетками крови (Щепанкевич Л.А. и др., 2011; Madden J.A., 2012; Федин А. И., 2014).

Таким образом, дисфункция эндотелия может являться самостоятельной причиной нарушения кровообращения в органе. С другой

стороны, нарушения регионарного кровообращения может приводить к развитию ЭД (Palluy O. et al., 1992).



Рисунок 3. Факторы, способствующие развитию эндотелиальной дисфункции

Стоит отметить то, что наиболее быстрые и тяжёлые нарушения функции эндотелия наблюдаются при заболеваниях, связанных с гормональной патологией различного генеза (недостаточность половых гормонов (НПГ), сахарный диабет и т.д.) (Сметник В.П. и др., 2001; Collins P. et al., 2007; Denison F.C. et al., 2010)

При снижении уровня эстрогенов в женском организме развивается ЭД, что приводит к снижению эндотелиозависимой вазодилатации, повышению тромбообразования, воспалению и пролиферации в сосудистой стенке (Virdis A. et al., 2000; Hamilton K.L. et al., 2008; Тюренков И.Н. и др., 2009; Робертус А.И. и др., 2009;).

Накопившиеся к настоящему времени научные данные свидетельствуют, что женские половые гормоны, в частности, эстроген, имеют прямое благотворное воздействие на сердечно-сосудистые заболевания. Предполагается, что в эндотелиальных клетках есть

эстрогеновые рецепторы, которые с помощью процессов фосфорилирования через протеинкиназные каскады активируют эндотелиальную NO-синтазу, предотвращая развитие ЭД (Figtree G. A. et al. 2010; Palmieri D. et al., 2014). Под влиянием эстрогенов увеличивается высвобождение релаксирующего фактора эндотелия, оксида азота, снижается секреция контрактильного фактора эндотелия и эндотелина-1 (Карева Е.Н. и др., 2010), ослабевает действие тромбксана и катехоламинов. Эстрогены подавляют экспрессию ангиотензиновых рецепторов 1 типа и повышают биодоступность NO, образующегося в эндотелии (Тюренков И.Н. и др., 2009). К тому же женские половые гормоны оказывают не только положительное прямое влияние на эндотелий сосудов, но и опосредованное на липидный профиль, обмен глюкозы и инсулина, систему гемостаза.

Вазодилатация под действием эстрогенов также обусловлена их блокирующим действием на кальциевые каналы (Тюренков И.Н. и др., 2009). У женщин с сохраненной менструальной функцией эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) зависит от фазы менструального цикла. ЭЗВД максимальна во время фолликулярной и лютеиновой фаз менструального цикла, когда уровень эстрадиола в сыворотке крови наиболее высок, во время менструации функция эндотелия у женщин не отличается от функции эндотелия у здоровых мужчин (Улубиева Е. А. и др., 2015; Hashimoto M. et al., 1995). Впервые резкое нарастание дисфункции эндотелия при наступлении менопаузы было отмечено D.S. Celermajer (1994). В условиях достаточного количества эстрогенов и прогестерона в организме, равновесие вазорегулирующих факторов отличается преобладанием сосудорасширяющих, антитромботических, противовоспалительных и антипролиферативных.

Дефицит эстрогенов и прогестерона может способствовать развитию ЭД и связанных с ней сердечно-сосудистых заболеваний. Еще в 1976 г. во Фремингемском исследовании было показано, что у женщин в постменопаузе в 2,6 раза увеличивается частота развития осложнений

сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с женщинами того же возраста в пременопаузе (Gordon T. et al, 1978). Установлено также, что преждевременная менопауза, наступившая в возрасте до 35 лет, увеличивает риск возникновения инфаркта миокарда в 2-3 раза, а тотальная овариэктомия в том же возрасте - в 7 раз (Нейфельд И.В. и др., 2012). К тому же снижение продукции половых гормонов ассоциировано с развитием метаболических нарушений, ожирения, атеросклероза.

Немаловажная роль в развитии дисфункции эндотелия при НПП отводится оксидативному стрессу. Отмечено, что у женщин в период постменопаузы отмечается ЭД более выраженная, чем у мужчин сходного возраста (Celermajer D.S. et al., 1994; Майчук У.Ю. и др., 2003; Тюренков И.Н. и др., 2006).

В развитии ЭД при сахарном диабете особое значение придается следующим факторам – гипергликемии, глюкотоксичности, оксидативному стрессу (Monnier L. et al., 2006; Pitocco D. et al., 2010; Sousa J.B. et al., 2015), конечным продуктам гликирования, нарушению липидного состава крови (повышению фракции атерогенных липидов, снижению антиатерогенных), изменению реологических свойств крови и барьерной функции эндотелия (Башкирова Ю.В. и др., 2008; Беляков Н.А. и др., 2008; Шварц В., 2009; Занозина О.В., 2010). Развитие ЭД при сахарном диабете также может быть сопряжено с такими патогенетическими звеньями, как инсулинорезистентность (ИР) и гиперинсулинемия (Шестакова М.В., 2001; Hsueh W.A. et al., 2004; Мкртумян А.М. и др., 2008; Ивашкин В.Т. и др., 2009; Yu Q. et al., 2011; Statsenko M.E. et al., 2014).

При наличии инсулинрезистентности происходит снижение продукции оксида азота, вследствие чего формируется повышенная чувствительность сосудистой стенки к действию сосудосуживающих веществ, нарушаются процессы эндотелий зависимой вазодилатации.

Эндотелий сосудистого русла не только доставляет метаболиты к тканям, но и индуктивный сигнал к органогенезу (нейрогенезу) (Lammert E et al., 2001; Matsumoto K et al., 2001).

В условиях гиперхолестеринемии инактивируется NOS-3 посредством повышения экспрессии гена кавеолина-1. Подавляется выработка основного мессенджера вазорегулирующих эффектов NO- ц-ГМФ (Wever R. et al., 1998), поддерживается высокий уровень свободных радикалов в плазме крови (Rubanyi G.M., 1993). В результате окисленные ЛПНП стимулируют синтез вазоконстрикторов (Rubbo H. et al., 1995; Osmar B.S. et al., 1998; Robert M.F. et al., 1998; Cotton J.M. et al., 2001).

Артериальная гипертензия также может изменять морфологию и функцию эндотелия (Мамедов М.Н., 2004; Попова А.А., 2009; Баранова Е.И., 2009; Воробьева Е.Н. и др., 2010). По сравнению с пациентами с нормальным давлением, в этих случаях развивается усиленное взаимодействие тромбоцитов и моноцитов с клетками эндотелия, за счет увеличения скорости сдвига крови, а повышенное давление крови благоприятствует, кроме того, окислительному стрессу, в результате уменьшается зависящая от эндотелия вазодилатация (рис.4) (Манухина Е.Б. и др., 2000; Майчук У.Ю. и др., 2003; Задонченко В.С. и др., 2009). АГ может стимулировать продукцию вазоактивных веществ которые, в свою очередь, способствуют увеличению плазменного пула цитокинов и факторов роста, что приводит к избыточной продукции внеклеточного матрикса и нарушению функции эндотелия (Laurent S. et al., 1996; Li Y.H. et al., 2015.).

Кроме этого отмечено, что с возрастом эндотелиальный синтез NO уменьшается, а выработка сосудосуживающих факторов и чувствительность к ним сосудистой стенки повышается. Это приводит к образованию порочного круга и усугублению дисфункции эндотелия у людей с гипертонической болезнью (Taddei S., 1997; Мартынов А.И. и др., 2005, Дедов И.И. и др., 2006; Шарипов Р.А., 2008; Загидуллин Ш.З. и др., 2010).



Рисунок 4. Основные гемодинамические факторы, обуславливающие нарушения мозгового кровообращения

Влияние сахарного диабета, артериальной гипертензии, НПГ вызывает дисбаланс синтеза и инактивацию эндотелийзависимых факторов со сдвигом в сторону прокоагуляционного звена, а эндотелиальная дисфункция может значительно влиять на степень поражения мозговой ткани при ишемии.

Эндотелиальная дисфункция идет рука об руку с оксидантным стрессом (как с универсальным звеном атерогенеза в сосудистой стенке). Снижение мозгового кровотока и, соответственно, возникновение гипоксии, приводит к его развитию. В то же время, оксидантный стресс – один из важнейших предиспозиционных факторов в развитии и прогрессировании множества заболеваний, включая болезни позднего возраста (в частности нейродегенеративные), диабет, атеросклероз (Ланкин В.З. и др., 2001; Марков Х.М., 2009; Dart C., 2010; Venditti P. et al., 2010; Zhao Y.X. et al., 2015).

Понимание процессов, лежащих в основе развития ЭД при патологиях различного генеза, позволит провести своевременную диагностику, корректную оценку и адекватное лечение сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с его нарушением (Манушарова Р.А. и др., 2008; Карпов Ю.А., 2010).

Известно, что проявление дисфункции эндотелия в первую очередь связывают с недостатком продукции или нарушением биодоступности оксида азота (NO) (Brunner H., 2005; Рябченко А.Ю., 2014). Основная защитная роль в интактном эндотелии отведена NO, обеспечивающему вазодилатацию, торможение экспрессии молекул адгезии, оказывающему антипролиферативное, антиапоптотическое и антитромботическое действие (Vita J.A. et al., 1989; Лутай М.И., 2004; Головченко Ю.А. и др., 2008; Федин А.И. и др., 2015).

Таким образом, система синтеза NO играет ключевую роль в функционировании эндотелия и при этом является наиболее уязвимой к действию различных повреждающих агентов – именно она и послужила объектом при исследовании вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга.

Именно NO привлекает всё большее внимание в формировании острой ишемии головного мозга. С одной стороны дефицит NO в эндотелии сосудов сопровождается повышением уровня провоспалительных агентов, тромбозом, сосудистым повреждением и ремоделированием (Волошин П.В. и др., 2006; Расулова Х.А., 2013). В результате нарушения баланса сосудорасширяющих и сосудосуживающих факторов, сужение сосудов, активация тромбоцитов, ускорение свободнорадикального окисления, усиление коагуляции, тромбоз, сосудистое воспаление и возникновение атеросклеротических изменений (Vita J.A. et al., Keaney J.F. et al., 2002; Forstermann U. et al., 2006; Widmer R. et al., 2014). Кроме того, нейротрансмиттерная функция NO напрямую связана с активностью системы глутамата и работой NMDA- рецепторов, поскольку глутамат регулирует

образование NO в нервных клетках (Daniel J. et al., 2011; Гусев Е.И. и др., 2013). Известно, что в определённых условиях глутамат и его структурные аналоги могут оказывать нейротоксическое действие, что влечёт за собой развитие каскада реакций, ведущей к повреждению, дегенерации и гибели нейронов с развитием устойчивых нарушений деятельности мозга (Раевский К.С. и др. 2000).

Феномен эксайтотоксичности занимает ключевое положение среди ранних механизмов необратимого ишемического повреждения нейронов центральной нервной системы (ЦНС) (Hazell A.S., 2007). Сущность происходящих молекулярных событий, лежащих в основе эксайтотоксичности, такова: ишемическая деполяризация нейронов вызывает интенсивное высвобождение глутамата из глутаматэргических терминалей в синаптическую щель. Глутамат активирует ряд постсинаптических рецепторов: N-метил-D-аспаратат (NMDA)-рецепторы, α -аминометилизоксазолпропионатные (AMPA) рецепторы и каинатные рецепторы (Quinn N. et al., 1995; Беридзе М.З. и др., 2001; Дамулин И.В. и др., 2002). При этом активация NMDA-рецепторов приводит к открытию кальциевых каналов постсинаптической мембраны, а активация AMPA и каинатных рецепторов — к открытию натриевых каналов. Повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме постсинаптических нейронов вызывает активацию кальцийчувствительных протеаз (кальпаинов) и фосфолипаз. Резкое повышение концентрации ионов натрия в цитоплазме нейронов может провоцировать внутриклеточный отек. В совокупности указанные механизмы приводят к некрозу постсинаптических нейронов, что вносит существенный вклад в формирование зоны инфаркта (Chin-Dusting J.P. et al., 1996; Aarts M.M. et al., 2003).

В настоящее время не существует однозначного мнения о роли окиси азота в механизме токсического действия глутамата (табл.1), (Евсеев В.А. и др., 2002; Szydlowska K. et al., 2010). По мнению одних авторов, NO участвует в повреждении нейронов при воздействии глутамата (Смердова

Л.Н. и др., 2002), являясь свободнорадикальным соединением, окись азота цитотоксична и инициирует ряд цепных реакций (Захаров В.В. и др., 1994; Боченина Ю.А., 2015). Комплекс NO с супероксид-анионом – пероксинитрит способен блокировать тирозинкиназу, входящую в активный центр нейротрофических факторов (Kearney D. et al., 1999; Napoli C. et al., 2013).

Таблица 1

Двойственная роль NO в ишемической патологии мозга

Положительная	Отрицательная
- улучшение локального кровотока - подавление агрегации тромбоцитов - подавление адгезии тромбоцитов и нейтрофилов - блокирование NMDA- рецепторов	- первичная цитотоксичность NO Связывание с Fe-S- комплексами, окисление белков; нитрозилирование тиолов; нитрирование ДНК - вторичная цитотоксичность, обусловлена образованием пероксинитрита, гидроксирадикалов, двуокиси азота.

С другой стороны, по мнению некоторых авторов NO, образуемый в условиях острой фазы ишемии, активируя растворимую гемсодержащую гуанилатциклазу и повышая синтез цГМФ, может защищать нейроны при токсическом воздействии глутамата; формирование нитрозония NO, связывающего регуляторный центр NMDA-рецептора, уменьшает его возбудимость и эксайтотоксические явления, снижает чувствительность к действию агонистов (Johnstone M.T. et al., 1993; Schmidt H. et al., 1996).

Показано, что NO выполняет модулирующую функцию, направленную на адаптацию мозга к функционированию в условиях дефицита кровоснабжения при мозговом инсульте. При гипоксии действие NO приводит к вазодилатации и улучшению кровоснабжения, одновременно подавляя активность NMDA-рецепторов и снижая эксайтотоксический эффект глутамата, а при реперфузии преобладает повреждающий эффект NO,

провоцирующий процессы разрушения нейронов (Garry P.S. et al., 2015). Так проявляется присущая многим природным модуляторам двойственная природа окиси азота.

Истощение запасов NO начинается на ранней стадии повреждения головного мозга в независимости от этиологии (Cherian L. et al., 2000; Tuzgen S. et al., 2003; Ahn M.J. et al., 2004). Оно начинается одновременно со снижением уровня кровотока (Hlatky et al., 2003). L-аргинин усиливает выработку NO а также, повышает внутричерепное давление (Cherian L. et al., 2003; Lundblad C. et al., 2007; Chand S. et al., 2015).

Установлено, что ДЭ существенно увеличивает риск возникновения первичных ишемических инсультов и повторных транзиторных ишемических атак головного мозга. Повреждение эндотелия при постишемическом реперфузионном синдроме происходит под влиянием радикалов кислорода и оксида азота (Гайнуллина Д.К. и др., 2013).

На основании вышеизложенного материала установлено, что именно эндотелий стал рассматриваться как самостоятельная мишень терапевтического воздействия с целью профилактики, лечения и снижения риска развития сосудистых осложнений (Versari D. et al., 2009; Tamargo J. et al., 2010).

1.3. Эндотелий как мишень фармакологической коррекции при нарушениях мозгового кровообращения.

В настоящее время все больше исследований по экспериментальной и клинической фармакологии своей целью ставят поиск веществ с эндотелиопротекторным действием (ЭПД) как среди известных препаратов, так и новых соединений (Тюренков И.Н. и др., 2012; Старых Е.П., 2015).

Можно предположить, что методы коррекции ДЭ могут быть разделены на две группы:

- 1) устранение агрессивных для эндотелия факторов (гиперлипидемии, гипергликемии, инсулинорезистентности, постменопаузальных

гормональных изменений у женщин, высокого артериального давления, курения, малоподвижного образа жизни, ожирения) и, таким образом, модификации и уменьшения оксидативного стресса;

2) нормализация синтеза эндотелиального NO (Федин А.И. и др., 2015).

Однако, принимая во внимание сложность патогенеза ЭД, оптимального терапевтического эффекта возможно достичь при сочетанном методе коррекции.

На сегодняшний день наиболее изучаемыми в данном аспекте являются препараты для лечения сердечно-сосудистых патологий (табл. 2).

Таблица 2

Возможные механизмы улучшения функции эндотелия под влиянием препаратов, применяющихся для лечения ССЗ (Тюренок И.Н. и др., 2012)

Группа препаратов	Механизмы улучшения функции эндотелия
иАПФ	1.Снижение ИР, улучшение гликемического контроля, отсутствие отрицательного влияния на липидный и пуриновый обмен. 2.Уменьшение уровня ангиотензина II (индуктор оксидантного стресса) и повышение активности кининов (брадикинина – стимулятора высвобождения эндотелий-расслабляющих факторов – NO, простациклина). 3.Способность улучшать эндотелиальную функцию (прямое влияние на активность NO-синтазы, ↑ NO, ↑простациклин, ↓эндотелин) 4.Ингибирование процессов атерогенеза (впервые продемонстрирована в исследовании TREND). 5.Антиоксидантная активность некоторых иАПФ (лизиноприл) 6.Антитромботическая активность (↓прокоагуляционного потенциала) (Бутрова С.А., 2001; Задионченко В.С. и др., 2008; Медведев И.Н. и др., 2008; Краснова Н.М. и др., 2008; Taddei S., 2002; Patel A. et al., 2007).

Блокаторы АТ ₁ -рецепторов	1.Снижение ИР, благоприятное воздействие на метаболический профиль, в том числе на процесс оксидативного стресса, синдром пероксидации и развитие атеросклероза. 2. Улучшение эндотелиальной функции резистивных артерий на фоне терапии лозартаном за счет увеличения NO. 3. Оптимизация агрегации тромбоцитов (Задонченко В.С. и др., 2001; Taddei S., 2002).
Агонисты II-имидазолиновых рецепторов	1.Коррекция одного из основных звеньев патогенеза АГ – центральной гиперсимпатикотонии. 2. Повышение чувствительности периферических тканей к инсулину (Задонченко В.С. и др., 2001; Taddei S., 2002).
Антагонисты кальция	1.Вазопротекторные и антиатеросклеротические свойства 2.Снижение ИР. 3.Положительное влияние на показатели тромбоцитарно-сосудистого и фибринолитического звеньев гемостаза. 4.Антиоксидантные свойства (Краснова Н. М. и др., 2008; Taddei S., 2002).
α-адреноблокаторы	1.Способность повышать чувствительность тканей к инсулину (улучшение гликемического контроля) 2.Коррекция липидного профиля. 3.Благоприятное воздействие на гемостаз (Задонченко В.С. и др., 2001).
β-блокаторы	1. Снижение гиперсимпатикотонии. 2. Активация NO-синтазы (под действием небиволола и карведилола) (Олейников В.Э. и др., 2009; Taddei S., 2002).
Тиазидные диуретики	1.Повышение активности нейрональной NO-синтазы и эндотелиальной NOсинтазы. 2.Прямое вазодилатирующее действие за счет антиоксидантных свойств, повышение биодоступности NO, уменьшение его разрушения (индапамид). 3.Комбинированное лечение иАПФ (периндоприла) и индапамида сопровождается увеличением базального освобождения NO (Джанашия П.Х. и др., 2008; Краснова Н.М. и др., 2008; Patel A. et al., 2007).
Фибраты	1.Снижение активности воспаления в сосудистой стенке, восстановление барьерной функции эндотелия. 2. Антиоксидантный эффект. 3.Благотворное влияние на гемостаз (Джанашия

	П.Х. и др., 2008).
Статины	1.Улучшение ЭЗВД, увеличение растяжимости и уменьшение жесткости сосудистой стенки. 2.Коррекция дислипидемии 3.Антиагрегантное и антиоксидантное действия (Карпов Ю.А., 2001; Алеева Г.Н. и др., 2005; Аметов А.С. и др., 2006; Tawfik H.E., 2006).
Сулодексид	1.Вазопротекторное, антитромбогенное, фибринолитическое действие. 2.Липидкорректирующий эффект (Светухин А.М. и др., 2001; Чугунова Л.А. и др., 2009; Broekhuizen L.N. et al., 2010).

Однако, если не считать сердечно-сосудистых средств с плеiotропным (эндотелиопротекторным) действием и сулодексида, других высокоэффективных препаратов коррекции эндотелиальной дисфункции с доказанной клинической эффективностью нет (Тюренков И.Н. и др., 2012).

Одной из новых групп препаратов, которые потенциально могут стать эндотелиопротекторами, являются ГАМК – ергические средства.

Следует отметить, что ведущая роль в поддержании нормальных физиологических условий, происходящих в ЦНС, принадлежит глутаминовой кислоте, которая синтезируется непосредственно в ткани мозга, и ее производным – глутамину и ГАМК. По изменению уровня этих аминокислот косвенно можно судить о характере и степени нарушений, происходящих в ЦНС. Одной из важных биологических функций глутаминовой кислоты, является ее участие в детоксикации аммиака, связываясь с которым она переходит в глутамин.

Являясь естественным нейромедиатором, ГАМК служит центральным звеном в реализации процессов центрального торможения путем взаимодействия со специфическими ГАМК-рецепторами в различных регионах мозга. При этом также достигается благоприятное влияние на энергетику нейрона, нейродинамику, мозговое кровообращение, сочетание

успокаивающего и мягкого психостимулирующего действия, что имеет своим результатом положительный эффект в отношении когнитивных и неврологических функций, мозговой гемодинамики. Поэтому возможность с помощью ГАМК-содержащих препаратов эффективно регулировать центральные нейрометаболические процессы представляет особый интерес. В связи с этим назначение ГАМК и ее производных может стать потенциальной терапией последствий нарушения мозгового кровообращения и свести вероятность развития осложнений и инвалидизацию пациента к минимуму.

Так в работе Воронкова А.В. было изучено влияние ГАМК-ергических средств на эндотелий при моделировании стрептозотоцин индуцированного сахарного диабета и экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов. Одной из задач данного исследования было изучение механизма эндотелиопротекторного действия наиболее активных веществ из вновь синтезированных и препаратов сравнения у животных с помощью иммуногистохимического исследования, с оценкой уровня экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), эндотелина-1, каспазы -3, pF-kB, рецепторов TRAIL. В результате чего было установлено, что по выраженности эндотелиопротекторного действия соединения РГПУ-189 (производное ГАМК) и флавицин превосходят небилет, конкор, мексидол, предуктал, дибикор, нифедипин, фенибут, пикамилон, и флавоноиды, приближаясь по оказываемым эффектам к сулодексиду.

Впервые было установлено, что производное ГАМК – соединение РГПУ-189 выражено улучшает противовоспалительную, антипролиферативную функции эндотелия, уменьшает метаболические нарушения у животных с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) и НПГ (снижает гипергликемию, гиперхолестеринемию, индекс атерогенности). Эндотелиопротекторное действие, очевидно, обусловлено угнетением экспрессии маркеров апоптоза (TRAIL, каспаза-3, pF-kB), снижением эндотелина-1 и усилением активности eNOS.

На основании полученных данных в процессе исследования можно судить о положительном влиянии производных ГАМК на вазодилатирующую функцию сосудов при модификации синтеза оксида азота, как на модели ЭНПГ, так и НПГ возрастного генеза, можно сделать вывод, что соединения обладали эндотелиопротекторным действием.

Опубликованные за последние 30 лет данные многих экспериментальных и клинических исследований указывают на то, что терапия нейродегенеративных нарушений путем воздействия на систему гамма-аминомасляной кислоты является эффективной (Гаевый М.Д. и др., 1985; Мирзоян Р.С., 2003). Показано, что ГАМК-ергические вещества могут улучшать кровоснабжение головного мозга (Гаевый М.Д. и др., 1985, 2000; Акопян В.П., 2003; Мирзоян Р.С. и др., 1995, 2003), ауторегуляцию мозгового кровотока (Гаевый М.Д. и др., 1985; Акопян В.П., 2003; Мирзоян Р.С. и др., 2005; Smith W.S., 2004; Куркин Д.В., 2013), подавлять активацию глутаматно-кальциевого каскада (Кулинский В.И. и др., 1997; Луныгина Е.В. и др., 2002; Островская Р.У., 2003; Мирзоян Р.С. и др., 2005), а также повышать активность антиоксидантных систем (Ганнушкина И.В., 2000; Smith W.S., 2004; Перфилова В.Н., 2009; Тюренков И.Н. и др., 2008; Воронков А.В., 2011; Тюренков И.Н. и др., 2013). ГАМК и ее производные также оказывают мембранопротекторное действие (Мирзоян Р.С., 2003), улучшают утилизацию глюкозы и таким образом снижают выраженность энергодефицита (Розанов В.А., 1989; Pascual J.M. et al., 1998; Shaw F.Z., 2007). Также было показано, что оригинальные отечественные препараты фенибут и фенотропил обладают высокой нейропротекторной и ноотропной активностью (Ковалев Г.В., 1985, 1990; Петров В.И. и др., 1997, 2003; Островский О.В., 1987; Савченко А.Ю. и др., 2005). Поликомпонентное действие фенибута улучшало состояние кровотока, что выражалось в нормализации внимания, памяти, повышении физической и психической активности.

Необходимо отметить способность ГАМК-ергических средств (Морозов И.С., 1975, Едигарова Л.В. и др., 2000) снижать тонус мозговых сосудов и улучшать тем самым кровоснабжение головного мозга за счет прямого воздействия на ГАМК-рецепторы сосудистой стенки (Акопян В.П. и др., 1991; Гаевый М.Д. и др., 1985; Мирзоян С.А. и др., 1985; Кулинский В.И. и др., 1997; Мирзоян Р.С. и др., 1995; Акопян В.П., 2003; Мирзоян Р.С., 2003). ГАМК-миметики способны оказывать благоприятное терапевтическое воздействие при нарушениях мозгового кровообращения на антиагрегантную активность сосудистой стенки и на агрегацию тромбоцитов (Акопян В.П. и др., 1991).

Увеличение содержания ГАМК в головном мозге приводит к снижению артериального давления, уменьшению частоты сердечных сокращений, повышению ударного и минутного объемов сердца, оказывает антиаритмический эффект (Kishi T. et al., 2001), Повышение выработки NO под действием ГАМК обуславливает вазодилатирующие свойства медиатора (Робертус А.И. и др., 2009).

Кроме этого, в клинической неврологии в настоящий момент широко применяется ряд производных ГАМК (аминалон, баклофен, фенибут, пикамилон, ноотропил, фенотропил).

Многопрофильность физиологического действия ГАМК предопределяет достаточно широкий спектр фармакологической активности у ГАМК-ергических средств (Ковалев Г.В., 1985, 1990; Ashton H. et al., et al., 2003).

Таким образом, при анализе литературных данных, касающихся возникновения и формирования эндотелиальной дисфункции при различных патологических состояниях, четко просматривается возможность фармакологической коррекции и, соответственно, возникающих сосудистых осложнений. Совокупность фармакологических эффектов (влияние на вазодилатирующую, антитромботическую, пролиферативную и противовоспалительные функции эндотелия, а так же другие виды

активности), которые оказывают производные ГАМК, дает возможность использовать их не только как церебропротекторы, но и в качестве эндотелиопозитивных средств, как самостоятельный компонент терапии ЭД различного генеза, что и послужило предпосылкой настоящего исследования.

ГЛАВА 2. Материалы и методы.

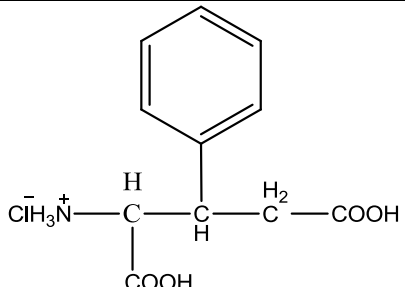
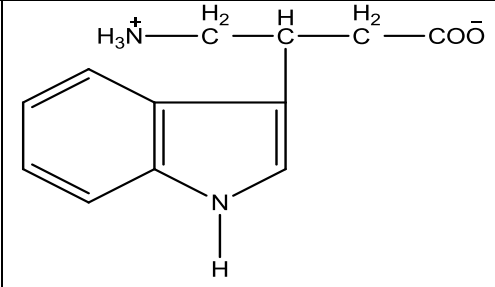
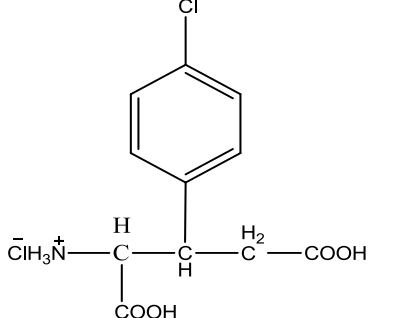
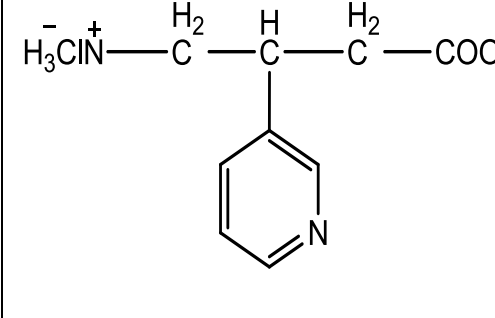
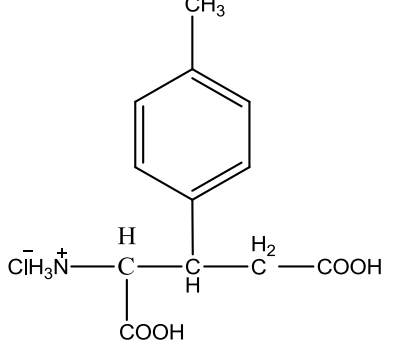
Исследование выполнено на 522 крысах самках и самцах, которые содержались в условиях вивария на базе НИИ фармакологии и кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ с естественным светотемновым режимом, с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP). Животные были получены из питомников «Столбовая» РАМН, Московская обл. и ФГПУ «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Эксперименты были одобрены комитетом по этической экспертизе доклинических исследований ВолгГМУ (протокол № 129-2011 от 5 марта 2011г.).

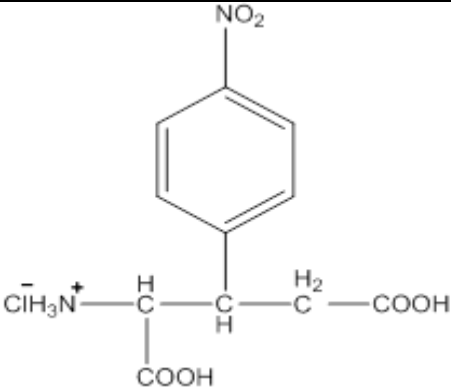
В работе изучено влияние новых производных ГАМК и ГК с ароматическими заместителями – соединений с лабораторными шифрами РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-136, РГПУ-202, РГПУ-217, РГПУ-146 на мозговой кровоток в условиях нормы и эндотелиальной дисфункции, их церебропротекторная и эндотелиопротекторная активность. Вещества были получены на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия)¹. Лабораторные шифры, молекулярная масса и структурные формулы изученных соединений приведены в таблице 3.

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

Таблица 3

Лабораторные шифры, молекулярная масса и структурные формулы изучаемых в работе соединений

Производные ГК, молекулярная масса, а.е.м.			Производные ГАМК, молекулярная масса, а.е.м.		
РГПУ-135	 $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClNO}_4$ $259,06$		РГПУ-136	 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ $218,11$	
РГПУ-146	 $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_4$ $293,02$		РГПУ-195	 $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $216,07$	
РГПУ-202	 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$ $273,08$				

РГПУ-217		$C_{11}H_{13}ClN_2O_6$ 304,05			
----------	--	----------------------------------	--	--	--

На начальном этапе исследуемые вещества вводились в дозах, составляющих 1/10 от молекулярной массы. Дозы изучаемых веществ были подобраны на основании результатов токсикологических исследований, проведенных ранее на кафедре с учетом положения о том, что для большинства производных ГАМК и ГК диапазон терапевтических доз укладывается в интервале от 1/100 до 1/30 от LD₅₀ (мг/кг) (при этом считается, что доза 1/100 от LD₅₀ (мг/кг) потенциально является минимальной эффективной, а 1/30 от LD₅₀ (мг/кг) – максимальной безопасной и эффективной и, как правило, близка к 1/10 от молекулярной массы). При углубленном исследовании препаратов лидеров анализ осуществлялся в широком диапазоне доз.

Таблица 4

Дозы исследуемых веществ

Название вещества	Исследуемые дозы, мг/кг	Название вещества	Исследуемые дозы, мг/кг
РГПУ-135	13, 26, 52, 78	РГПУ-195	11, 22, 44, 88
РГПУ-136	22	РГПУ-146	29
РГПУ-202	27	РГПУ-217	30
Фенибут	25	Кавинтон	3,2

В качестве препарата позитивного контроля использовали фенибут, полученный на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия) и кавинтон (раствор для внутривенного и внутримышечного введения 5 мг/мл Gedeon Richter (Венгрия)). В качестве растворителя для приготовления рабочих растворов использовался стерильный 0,9% раствор хлорида натрия.

На этапе скрининга и изучения зависимости доза-эффект соединения и препараты сравнения вводились однократно профилактически за 30 минут до наложения окклюдеров на сонные артерии, при моделировании фокальной

ишемии на фоне недостаточности половых гормонов - ежедневно однократно в течение 7 дней после фокальной ишемии головного мозга (ФИМ).

При моделировании ишемии путём обратимой окклюзии общих сонных артерий были сформированы группы численностью $n=6$ для исследуемых соединений. При моделировании необратимой окклюзии общих сонных артерий группы состояли из 20 животных, для ложнооперированной - из 10 животных. При фокальной ишемии группы были численностью $n=12$.

Этапы проведённого исследования:

1. Поиск в ряду производных ГАМК и ГК веществ с цереброваскулярной активностью в условиях ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга и на модели необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

2. Изучение влияния превентивного введения наиболее активных соединений в различных дозах на выживаемость, выраженность психоневрологического дефицита и уровень мозгового кровотока животных после необратимой одномоментной билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

3. Изучение влияния лечебного введения наиболее активного соединения на выживаемость, выраженность психоневрологического дефицита и уровень МК у животных с недостаточностью половых гормонов при моделировании фокальной ишемии головного мозга.

4. Изучение действия наиболее активного соединения на утилизацию глюкозы крови, выраженность процессов ПОЛ и активность антиоксидантных систем, сосудистый и плазменный компонент гемостаза у животных с нарушениями мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции.

2.1. Методы моделирования ишемических повреждений головного мозга.

2.1.1 Для изучения влияния исследуемых веществ на параметры мозгового кровотока использовалась *модель обратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий* (Мирзоян Р.С., 2003). Данная модель даёт возможность оценить влияние исследуемых веществ на параметры центральной и периферической гемодинамики и течение реперфузионного периода в условиях острого опыта.

После наркотизации животных (хлоралгидрат 400 мг/кг) и антисептической обработки операционного поля на передней поверхности шеи осуществлялся разрез мягких тканей. Далее выделялись левая и правая общие сонные артерии. После фиксирования исходных данных мозгового кровотока, выделенные сонные артерии клипировались специальными зажимами на протяжении 10 минут и одновременно методом забора крови через катетер, введённый в бедренную артерию, осуществлялось снижение давления до 50 мм.рт.ст., в результате чего кровоснабжение прекращалось в головном мозге по вертебробазилярной системе. Через 10 минут окклюзии снимались зажимы с сонных артерий и забранная кровь возвращалась.

2.1.2 *Метод моделирования ишемии головного мозга, вызываемой необратимой одномоментной билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс*

Данный метод отличается своей простотой и часто используется как модель для ишемического повреждения ткани головного мозга и оценки церебропротекторного действия исследуемых веществ. Методика выполнения аналогична модели обратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Отличие состоит в том, что срединный разрез осуществлялся под эфирным наркозом, после чего выделялись и необратимо перевязывались с обеих сторон общие сонные артерии. Затем рану послойно ушивали. Длительность операции после наступления наркоза была от 4 до 6 минут. С целью фиксации случаев ранней гибели в первые 3 часа

постоперационного периода вели непрерывное визуальное наблюдение за животными. Далее регистрация выживаемости животных проводилась через 6, 12, 24, 48 и 72 часа после операции. О наличии у веществ церебропротекторной активности при использовании данной модели ишемии головного мозга судили по увеличению на фоне их введения времени жизни, уменьшению процента гибели животных в группе и по выраженности неврологического дефицита (Yamamoto M. et al., 1983; Боголепов Н.Н., 1979).

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

Постоянная окклюзия средней мозговой артерии была вызвана путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити (Koizumi J. et al., 1986; Тюренков И.Н. и др. 2014). В качестве анестезии использовался хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг. Заранее приготавливались окклюдеры, представляющие собой отрезок нейлоновой нити длиной 50 мм и диаметром 0,18 мм, один конец которой был покрыт тонким слоем силикона на протяжении 4 мм, который увеличивал диаметр окклюдера до 0,3 мм. Под бинокуляром осуществлялся доступ к бифуркации левой общей сонной артерии. Общая сонная артерия перевязывалась на расстоянии 5 мм от бифуркации, внешняя сонная артерия перевязывалась у основания. Микрососудистым зажимом пережималась внутренняя сонная артерия, общая сонная фиксировалась пинцетом и пунктировалась. В образовавшееся отверстие вводился окклюдер, внутренняя сонная артерия высвобождалась, окклюдер осторожно продвигали в полость черепа на 20-22 мм от бифуркации до ощутимого незначительного сопротивления, затем обратимо фиксировался на 1 или 2 часа, после чего внутренняя сонная артерия необратимо перевязывалась. При попадании окклюдера в ответвляющуюся от внутренней сонной крылонебную артерию, окклюдер подавался назад, затем продвигался вперед под другим углом.

Операционную рану послойно ушивали, животных помещали под согревающую лампу до момента выхода из наркоза. Метод широко

используется, но обладает выраженным повреждающим действием (Топчян А.В. и др., 1996). В послеоперационном периоде животных переводили на щадящую пищу.

2.2. Метод моделирования дефицита половых гормонов.

Недостаточность половых гормонов, как модель нарушения функции эндотелия, вызывалась путем экстирпации матки с придатками у самок крыс, массой 180-210 гр., в возрасте 4-6 месяцев. После операции был проведен курс антибиотикотерапии (цефазолин 10 мг/кг внутримышечно) в течение 10 дней. Группам интактных животных вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Контроль эффективности кастрации производился с использованием цитологического метода определения стадии полового цикла у самок. Для анализа разного уровня эндогенных эстрогенов после операции были выбраны три наиболее характерные фазы полового цикла: диэструс, проэструс и эструс. Определение фаз полового цикла (диэструс, проэструс, эструс) у интактных крыс проводили с помощью характерных морфологических признаков по влагалищным мазкам согласно описанию у Я. Д. Киршенבלата (Киршенבלат Я.Д., 1973).

У самок на протяжении эстрального цикла наблюдается варьирование активности различных звеньев регуляции кровообращения. Наиболее стабильны фазы диэструса и эструса, хотя и представляют собой противоположные звенья адаптивности: диэструс – уровень эффективной адаптации и синхронизации всех ступеней регуляции кровообращения, эструс – состояние напряжения регуляторных систем (Hashimoto M. et al., 2005). Поэтому у групп ложнооперированных и интактных самок доплерографическое исследование выполнялось только в фазу диэструса, когда колебания гормонального фона минимальны. Моделирование фокальной ишемии выполнялось через 28 дней после удаления матки с придатками у крыс.

2.3. Методы, используемые для оценки психоневрологических нарушений, вызванных ишемией головного мозга.

Неврологический статус крыс после окклюзии общих сонных артерий оценивали по шкале stroke-index McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), при фокальной ишемии – использовались 9-бальная шкала Combs и D'Alecy (Combs D.J. et al., 1987), шкала Garcia (Garcia J.H. et al., 1995).

Таблица 5

Шкала оценки неврологического дефицита по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (Ганнушкина И.В., 2000)

симптомы	Index (баллы)
1. вялость	0.5
2. тремор	1
3. односторонний полуптоз	1
4. двухсторонний полуптоз	1.5
5. слабость конечности	1.5
6. односторонний птоз	1.5
7. двусторонний птоз	1.5
8. маневренные движения	2.0
9. парез 1-4 конечности	2-5
10. паралич 1-4 конечности	3-6
11. кома	7.0
12. летальный исход	10.0

Оценивалось количество крыс в группе с признаками неврологического дефицита легкой (0,5-2,5), средней (2,5-5,5) и тяжелой (5,5-10) степени. При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались.

Шкала оценки неврологического дефицита Combs и D'Alecy (Combs D.J. et al., 1987) представлена в таблице (табл.6). Состояние

экстрапирамидной системы оценивалась по сумме тестов, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие. При этом 0 баллов свидетельствует о максимальной выраженности нарушений, а 9 баллов – об их отсутствии. Для исключения погрешностей каждый двигательный тест проводился по два раза для одного животного, через 2-3 минуты между тестами.

Таблица 6

Шкала оценки неврологического дефицита Combs and D'Alecy

Балл	Удержание себя на экране-сетке	Тест на равновесие на стержне	Удержание себя передними лапами на веревке
0	Падение 0-5 секунд	Отсутствие хвата или баланса на стержне	Вис 0-2 секунды
1	Падение 6-10 секунд	Нахождение на стержне менее 10 секунд	Вис 3-4
2	Падение 11-14 секунд	Нахождение на стержне 11-20 секунд	Вис более 5 секунд, третья конечность не находится на веревке
3	Вис на экране больше 15 секунд	Нахождение на стержне 21-30 секунд	Вис более 5 секунд, третья конечность находится на веревке

Тест на мышечную силу. Использовался проволоочный экран размером 15×30 см, который мог совершать отклонение от горизонтального положения от 0° до 90°. Размер проволоочной ячейки составлял 0,6×0,6 см. Матрасик, установленный на высоте 70 см., был необходим для предотвращения травматизации при падении. Животное первично располагали на горизонтальном экране, затем его отклоняли в вертикальное положение и производили расчет времени до его падения. Время тестирования составляло 15 секунд.

Тест на равновесие. Использовался деревянный стержень, который устанавливали на высоте 40 см от матерчатой ткани, обеспечивающей мягкое падение животного со стержня. Крыс помещали на стержень диаметром 2,5 см и фиксировали время их падения на матерчатую ткань, которая располагалась на высоте 40 см. Время тестирования составляло 30 секунд.

Тест на цепкость-тягу. Вербку диаметром 0,5 см располагали горизонтально на высоте 70 см от матрасика, толщиной 8 см. При определении цепкости животного, возможно оценить его способность удерживаться на горизонтальной веревке передними лапами. Способность крыс подтягивать свешивающиеся задние конечности на веревке отражает мышечную силу и координацию. Передние лапы помещали на веревку и отпускали задние конечности животного. Фиксировали время до падения и способность крысы подтянуть хотя бы одну заднюю конечность на веревку.

Шкала оценки неврологического *дефицита Garcia* (Garcia J.H. et al., 1995) представляет собой балльную шкалу для оценки асимметрии движений и реакций животного, в котором оценивается сумма баллов в 6-и тестах. При этом 0 баллов свидетельствует о максимальной выраженности нарушений, а 3 балла – об их отсутствии.

Тест спонтанной активности. Исследование проводится в течение 5 минут в условиях естественного места нахождения (клетка). По способности животного подходить ко всем 4 стенкам клетки оценивали его активность.

Оценочные баллы:

3 балла – животное свободно передвигается по клетке кругами и исследует как минимум 3 стенки;

2 балла – движение животного слегка затруднены, но тем не менее оно достигает стенок клетки, колеблется перед движением, также периодически занимает стойку у одного края клетки;

1 балл – тяжелое повреждение – животное не достигает края клетки и едва двигается в клетке;

0 баллов – животное не двигается совсем.

Симметрия при движении четырех лап. Животное удерживают в воздухе за хвост для оценки симметрии движения лап.

Оценочные баллы:

3 балла – животное вытягивает лапы симметрично;

2 балла – лапы на одной стороне вытягиваются более или менее медленно чем на другой;

1 балл – движения лап одной стороны минимальны;

0 балл – движений лап нет совсем.

Вытягивание передних лап. Животное помещают на край стола, держа при этом его за хвост. Симметрию вытягивания передних лап оценивают, когда передние конечности находятся на столе, а задние в воздухе.

Оценочные баллы;

3 балла – передние конечности вытягиваются свободно, животное шагает симметрично;

2 балла – одна из лап вытянута не до конца, походка нарушена;

1 балл – одна лапа движется минимально;

0 баллов – одна лапа не движется совсем.

Залезание по сетке. Животное помещают на сетку и оценивают способность вскарабкиваться на нее. Также оценивают его способность удерживаться при попытке снять крысу за хвост.

Оценочные баллы:

3 балла – животное легко забирается по сетке и крепко держится за прутья;

2 балла – повреждение на одной стороне не позволяют животному крепко взяться за прутья и легко карабкаться на сетку;

1 балл – животное не может вскарабкаться на прутья совсем, или совершает маневренные движения вместо залезания на сетку;

Проприорецепция тела животного. Оценивают реакцию крыс на прикосновение тупой палочкой к сторонам его тела:

3 балла – животное реагирует на прикосновение поворотом головы;

2 балла – медленно реагирует на прикосновение к одной из сторон;

1 балл – совсем не реагирует на прикосновение.

Реакция на прикосновение к вибриссам. Оценивается реакция животных на прикосновение той же палочкой к вибриссам, таким образом, чтобы она не попадала в зрительное поле крыс:

3 балла – животное реагирует на прикосновение поворотом головы, и одинаково реагирует на прикосновения к каждой из сторон тела;

2 балла – медленно реагирует на прикосновение к одной из сторон;

1 балл – совсем не реагирует на прикосновение к одной из сторон;

На моделировании фокальной ишемии – оценка неврологического дефицита у животных производилась по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia через 1, 3, 7 суток от момента нанесения повреждения, в «тесте-лестница» до моделирования и на 7 сутки после, при перевязке общих сонных артерий оценка неврологического дефицита проводилась по шкалам McGraw через 6, 12, 24, 48 и 72 часа после операции.

2.4. Методы оценки поведенческого статуса и когнитивных функций у животных.

Целостность физиологической реакции крыс в постишемическом периоде исследовали в тесте «открытое поле» (ОП) (Воронина Т.А. и др., 2000; Миронов А.Н. и др., 2012), который позволяет оценить двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность, уровень эмоционального реагирования животных. Тестируемое животное помещается в центральный квадрат, хвостом к экспериментатору. Установка представляет собой круглую площадь диаметром 97 см, ограниченную бортами высотой 42 см. На площадке имеются отверстия, диаметром 2 см в количестве 16 штук. Визуальное наблюдение за животными ведётся в течение трех минут. До каждого тестирования для устранения побочных обонятельных сигналов, влияющих на характер поведения животного, тщательно протирали пол установки салфеткой, смоченной моющим средством (Буреш Я. и др., 1991).

При тестировании оценивается спонтанное поведение животных, набор стандартных показателей включает:

- количество пересеченных квадратов, что трактуется как спонтанная двигательная активность (ДА)
- суммарное количество стоек и количество обследованных отверстий-норок – как ориентировочно-исследовательская активность (ОИА) (Саркисова К.Ю. и др., 1996).

Тест «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) применяется для выявления специфических когнитивных функций. (Воронина Т.А. и др., 2000; Миронов А.Н. и др., 2012). Тест позволяет оценить влияние веществ на обучаемость, формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях патологии. Основан на защитно-оборонительной реакции пассивного типа, направленной на прекращение контакта с вредящим агентом.

Установка для эксперимента УРПИ состоит из двух смежных отсеков, один из которых открытый сверху и ярко освещенный (90 Лк), размерами 60х40х40 см, другой – затемненный, закрытый со всех сторон, имеющий четырехугольное отверстие (8х8) для сообщения с большим отсеком, меньшего размера (15х15х15 см) и электрифицированный пол. Тест состоит из 2 этапов: обучение навыку пассивного избегания и воспроизведение его с целью сохранности памятного следа о болевом воздействии. В ходе эксперимента тестируемое животное помещают на середину площадки освещенного отсека хвостом к отверстию в темный отсек. Визуальное наблюдение ведется в течение трех минут. В процессе обучения навыку после каждого захода в темный отсек животному наносят электроболевое раздражение (40 В, 3 импульса по 1 с, с интервалом 0,5 с). Крысы, не зашедшие в темную камеру за это время, из опыта исключались. На этапе обучения учитываются показатели: латентный период первого захода в темный отсек (время от момента помещения животного в середину площадки до первого захода в темный отсек) и количество заходов в него.

Воспроизведение выполняется аналогичным образом, но без электроболевого воздействия, а к регистрируемым показателям добавляется общее время нахождения в темном отсеке. При проверке выработки рефлекса пассивного избегания определяется латентный период первого захода в темный отсек и количество заходов в него и сравниваются с аналогичными показателями при обучении. Увеличение латентного периода и уменьшение числа заходов указывают на обученность животного, сохранность в памяти информации об аверсивном воздействии в темном отсеке (Буреш Я. и др., 1991). Общее время нахождения в темном отсеке, регистрируемое при воспроизведениях навыка, также отражает сохранность памятного следа у животного – чем меньше времени животное проводит в темном отсеке, тем лучше оно помнит о нанесенном ему здесь электроболевым раздражении (Буреш Я. и др., 1991).

Тест «экстраполяционного избавления» (Бондаренко Н.А., 1990; Миронов А.Н. и др., 2012) как правило, применяется для изучения ноотропной активности фармакологических веществ. Принцип метода: тестируемое животное помещается во внутренний прозрачный цилиндр диаметром 9 см и высотой 23 см, который закреплен в большом цилиндре диаметром 35 см с водой, имеющей температуру 16-18°C, при этом края внутреннего цилиндра погружаются в воду на 2,5 см. В течение 3 минут ведется наблюдение за животным. Перед животным стоит задача, решение которой заключается в подныривании под края внутреннего цилиндра и избавлении, таким образом, от аверсивной водной среды. Эксперимент проводят в 2 этапа: обучение навыку (выработка рефлекса избавления) и его воспроизведение через 24 часа. Животные, которые не решают задачу за время наблюдения на этапе обучения исключаются из опыта.

О сохранности памятного следа на этапе воспроизведения судили по латентному периоду (ЛП) подныривания (время от момента погружения животного в воду до подныривания под края колпака и выхода по лестнице), который отражает способность животного принять правильные решения и избавиться от аверсивной среды.

Обучение животных в тестах УРПИ и ТЭИ проводили перед моделированием патологии, воспроизведение – после ее создания.

Тест «сужающаяся дорожка»

Установка для теста «сужающаяся дорожка» представляет собой приподнятую горизонтальную дорожку длиной 165 см, с темной камерой с одной стороны. По обоим концам дорожки находятся «стартовая» (15х6 см) и «разгрузочная» (15х1,5 см) площадки. Между ними находится равномерно сужающаяся часть дорожки; от 6 см в начале и 1,5 см в конце. Слева и справа от дорожки находятся выступы для ослабших конечностей (Schallert T. et al., 2002; Тюренков И.Н. и др., 2014).

В первые два дня обучения крысу помещают в темный отсек на 1 минуту, затем на расстоянии 10-15 см от темной камеры. В дальнейшем это расстояние увеличивают до $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ длины доски. При воспроизведении, крысу запускают с широкой части доски, которая ещё делится на среднюю и узкую. Учитывается общее количество шагов, совершённых животным и делится на 3. На каждом участке дорожки подсчитывают количество ошибок, совершенных контралатеральной и ипсилатеральной конечностью. Делят эти суммы на число шагов по одной части дорожки и получают долю ошибок на один шаг. Для определения доли асимметрии, высчитывают разницу между контралатеральными и ипсилатеральными ошибками. Данный параметр получают для каждого животного, на определённом участке дорожки и используют для оценки тяжести поражения.

«Тест лестница» («Staircase test»).

Установка для проведения теста «лестница» представляет собой удлиненную камеру (285×90×60 мм) с приподнятой центральной плоской платформой внутри длиной $\frac{2}{3}$ камеры и шириной 27 мм, образующей узкое пространство над платформой. По обеим сторонам от платформы в дальнем конце камеры находится съёмная парная лестница с 7ю ступенями. Крысы, заняв место на платформе, имеет возможность дотянуться и собрать зерна, помещенные на ступенях парной лестницы по обеим сторонам от

платформы. Чтобы достать зерна, необходимо тянуться и собирать их только одной лапой с каждой стороны. Точность мелкой моторики позволяют интактному животному собрать практически все зерна от верхних (13 мм ниже платформы), до нижних (64 мм ниже платформы) ступеней. Ступени в тесте «лестница» представляют собой 7 уровней сложности этой задачи. Количественным показателем является число зерен, собранных крысой каждой конечностью.

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

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

2.5. Метод регистрации мозгового кровотока.

Регистрацию мозгового кровотока (МК) осуществляли в теменной области головного мозга крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) с помощью *ультразвукового доплерографа* для исследования

кровотока ММ-ДК производства компании «Минимакс», Санкт-Петербург, Россия. Для регистрации кровотока в теменной кости с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка bregma, бором просверливали отверстие диаметром 0,3 см до поверхности твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. Голова животного закреплялась в стереотаксическом приборе. Датчик доплерографа УЗДП-010-01с рабочей частотой 25 МГц, диаметром 3 мм устанавливали, В качестве контактной среды использовался гель для проведения УЗИ (Тюренков И.Н. и др., 2008).

Вазодилатирующую функцию эндотелия оценивали по реакции мозговых сосудов (изменению скорости мозгового кровотока) в условиях модификации синтеза эндогенного оксида азота при внутривенном введении анализаторов следующим образом: ацетилхолин (Acros organics, США) в дозе 0,01 мг/кг; нитроглицерин (МТХ, Москва) в дозе 0,007 мг/кг и нитро-L-аргинин (N-L-arg) (Acros organics, США) в дозе 10 мг/кг. Каждое введение анализатора осуществлялось после возвращения мозгового кровотока до исходного уровня. Регистрация его осуществлялась в проекции среднемозговой артерии в теменной области мозга крыс с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25МГц и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.9. (Санкт – Петербург, Россия) (Тюренков И.Н. и др., 2008, 2009, 2010).

При введении анализатора регистрировали изменение скорости МК и, таким образом, по его увеличению/уменьшению (в процентах) относительно исходного уровня судили о расширении или сужении сосудов и косвенно об участии системы оксида азота в регуляции тонуса сосудов и кровообращения исследуемого органа.

Введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина в условиях дисфункции эндотелия давало возможность оценить базальную и стимулированную продукцию оксида азота, степень нарушения вазодилатирующей функции эндотелия, а также эндотелиопротекторные свойства изучаемых соединений.

Для определения количества десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови использовали метод, который основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью АДФ. Для этого кровь, забранную из брюшной аорты, центрифугировали в течение 10 мин при 200g, затем плазму смешивают с раствором натриевой соли аденозиндифосфата (АДФ-Na). В течение 10 мин аккуратно перемешивают, путем встряхивания пробирки и повторно центрифугируют для осаждения эндотелиальных клеток. Полученный в результате осадок суспендируют в растворе NaCl. В камере Горяева подсчитывают количество эндотелиоцитов в 2 сетках камеры методом микроскопии, полученный результат умножают на $10^4/\text{л}$ (Hladovec J., 1978; Петрищев Н.Н. и др., 2001).

2.6. Метод определения степени гидратации головного мозга.

Для определения степени гидратации мозговой ткани у декапитированных животных забирали головной мозг, инкубировали в термостате при $t=37^{\circ}$ в течение 24 часов, по уменьшению массы препаратов до и после инкубации судили о степени выраженности отеков.

2.7. Методы определения потребления головным мозгом глюкозы, содержания продуктов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы.

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

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

Для определения использовался набор фирмы Агат-Мед (Россия). При взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой определялась концентрация ТБК-АП по образованию окрашенного комплекса К 3 мл 1% ортофосфорной кислоты добавляли 0,25 мл плазмы крови, затем приливали 1 мл 0,7 % раствора тиобарбитуровой кислоты и помещали в кипящую водяную баню на 60 минут. После охлаждения, добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 мин до образования однородной белой суспензии. После центрифугирования супернатант фотометрировали при двух длинах волн $\lambda=535$ нм и $\lambda=570$ нм против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет содержания ТБК-АП проводили по формуле:

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

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

Активность суммарной супероксиддисмутазы (СОД)

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

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

Расчет процента ингибирования проводили по формуле:

$$I = 100 - \frac{(D_{оп\ 0} - D_{оп\ 20})}{(D_{кон\ 0} - D_{кон\ 20})} * 100\%,$$

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

Принцип *определения активности каталазы* основывается на способности пероксида водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с солями аммония (Королук М.А. и др., 1988). Ход определения: К 1 мл 0,03% перекиси водорода добавляли 0,1 мл плазмы крови. В холостую пробу помещали 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали после 20 минут инкубации при 37⁰С, добавляя 1 мл 4% раствора молибдата аммония. Далее центрифугировали 20 минут при 8000 об/мин. Экстинкцию определяли при длине волны 410 нм против контроля. За единицу активности каталазы принимали то количество фермента, которое участвовало в превращении 1мккат перекиси водорода за 1 сек. при заданных условиях.

Расчёт производили по формуле:

$$A = (D_{хол} - D_{оп}) \times 0,1 \times 600 \times 22,2$$

где A – активность каталазы (мккат/л); D_{хол} и D_{оп} – экстинкция холостой и опытной проб; 0,1 – объем вносимой пробы; 600 – время инкубации; 22,2 – коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода.

2.8. Изучение влияния исследуемых веществ на основные показатели гемостаза.

Изучение влияния исследуемых веществ на тромбоцитарный компонент гемостаза (изменения агрегатного состояния крови)

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220

LA) научно-производственной фирмы "Биола" (г. Москва) по методу Born G. (Born G.V., 1962) в модификации Габбасова З.А. и соавторов (Габбасов З.А. и др., 1989). Метод основан на регистрации степени изменений светопропускания богатой тромбоцитами плазмы при добавлении веществ, индуцирующих агрегацию в условиях постоянного перемешивания, а также на анализе флюктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. В ходе эксперимента в кювету агрегометра вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37° С в течение 2 минут. После инкубации добавляли индуктор агрегации динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Reanal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ. При графической регистрации процесса агрегации кровяных пластинок (в течение пяти минут) получали кривые, отражающие падение оптической плотности обогащённой тромбоцитами плазмы. Интенсивность агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы.

Изучение влияния исследуемых веществ на плазменный (коагуляционный) гемостаз

Хронометрически на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701» с использованием наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия), были определены тромбиновое, протромбиновое, активированное частичное тромбопластиновое время и содержание фибриногена с использованием классических методик (Баркаган З.С., 2001). Интерпретация результатов коагуляционных тестов проводится по параметрам укорочения или удлинения времени свертывания. Для калибровки прибора и проведения тестов использовались калибровочная нормальная плазма и набор реактивов производства НПО «Ренам» (Россия). Лиофильно высушенные реактивы из наборов хранились при температуре 2-8°С и готовились ex tempore. Все коагуляционные анализы проводились на бедной тромбоцитами плазме, полученной при центрифугировании изучаемых образцов цитратной крови при 3000 об/мин в течении 15 минут.

Для определения *протромбинового времени* в кювету коагулометра вносят 100 мкл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы, магнитную мешалку и помещают ее в кюветное отделение. Через 120 секунд – время инкубации плазмы в автоматическом режиме при работающей магнитной мешалке. По окончании инкубационного времени вносят 200 мкл тромбопластин-кальциевой смеси со стандартизированной активностью. Время свертывания (клоттинговое время) считывается с табло коагулометра. Использование этого теста позволяет оценить нарушение активности факторов свертывания внешнего пути активации.

Тест *тромбиновое время* (ТВ) характеризует конечный этап свертывания, т.е. скорость превращения фибриногена в фибрин. Тест основан на определении времени образования фибринового сгустка при добавлении к плазме раствора тромбина необходимой активности. 100 мкл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы и магнитный якорь вносят в кювету. После инкубации пробы (120 секунд) в нее добавляют 200 мкл стандартизированного по активности рабочего раствора тромбина.

Измерения содержания *фибриногена* в плазме проводят при воспалительных, иммунных, деструктивных процессах, определение его является одним из четырех базовых тестов. Фибриноген в крови определяли хронометрически (по Клауссу). 200 мкл разведенной имидазоловым буфером плазмы (1:5) инкубировали в кюветном отделении при работающей мешалке. По окончании времени инкубации в кювету вносили 100 мкл прогретого рабочего раствора тромбина. Определение содержания фибриногена основано на измерении времени свертывания разведенной плазмы избытком тромбина. В этом случае время свертывания зависит только от концентрации фибриногена в плазме. Коагулометр автоматически регистрирует время образования первых нитей фибрина. Концентрацию фибриногена определяют по калибровочной прямой, используя плазму с известным содержанием фибриногена.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

является одним из наиболее распространенных и чувствительных тестов для выявления широкого диапазона коагуляционных нарушений. При определении АЧТВ регистрировали время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях контактной и фосфолипидной активации. Для этого к 100 мкл бедной тромбоцитами плазме добавляют реагент, представляющий собой водный раствор эллаговой кислоты (активатор внешнего пути свертывания) в комплексе с соевыми фосфолипидами. После проведения инкубации полученной смеси в кювету вносилось 100 мкл 0,28% раствора хлорида кальция (25 мМ). В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка. Использование этого теста позволяет оценить нарушение активности или дефицит факторов свертывания внутреннего пути активации.

2.9. Методы статистической обработки результатов исследования.

Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$ и $p < 0,01$. Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова (Реброва О.Ю., 2002). В случае подчинения данных нормальному распределению, для выявления различий выполнялся однофакторный дисперсионный анализ. При выявлении различий между выборками, множественное сравнение групп проводилось с помощью критерия Ньюмена-Кейлса (Гланц С., 1988; Реброва О.Ю., 2002). В случае принадлежности данных к ненормальному распределению, для выявления различий между группами использовался критерий Краскала-Уоллиса. Множественное сравнение групп между собой, проводилось с использованием непараметрического варианта критерия Данна, Ньюмена-Кейлса (Гланц С., 1988). Сравнение номинальных данных

между группами проведено с использованием критерия χ^2 . Количественные показатели каждой группы животных были отражены в таблицах и тексте как $M \pm m$. Обработка данных производилась с помощью пакетов программ Microsoft Excel XP и BioStat 2008.

ГЛАВА 3. Поиск в ряду производных ГАМК и ГК веществ с цереброваскулярной активностью.

Поиск веществ с цереброваскулярной активностью в ряду новых производных ГАМК и ГК включал в себя изучение их влияния на МК в условиях нормы, ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга, а также при неполной ишемии, вызванной необратимой перевязкой общих сонных артерий.

3.1. Изучение влияния производных ГАМК и ГК на параметры мозгового кровотока в условиях нормы, в ишемический и постреперфузионный периоды.

Согласно литературных данных (Мирзоян С.А. и др., 1985; Акопян В.П. и др., 1991, 2003; Гаевый М.Д. и др., 1985, 2000; Кулинский В.И. и др., 1997; Мирзоян Р.С. и др., 1995, 2003) производные ГАМК и ГК обладают цереброваскулярной активностью, однако они способны как повышать МК, так и приводить к его снижению. В условиях недостаточности мозгового кровообращения, при нарушении его ауторегуляции, оптимально использовать препараты, способные существенно увеличивать мозговое кровообращение, не вызывая эффекта «обкрадывания» (преимущественно улучшая кровоснабжение ишемизированной области мозга) (Миронов А.Н. и др., 2012).

В связи с этим представлялось целесообразным оценить влияние новых производных ГАМК и ГК на параметры МК в норме и при экспериментальном НМК. Для данной цели была выполнена серия экспериментов, заключающаяся в регистрации МК у наркотизированных животных в условиях нормы и при ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга. Перед введением исследуемых веществ регистрировались фоновый уровень МК. После внутривенного введения веществ регистрацию МК продолжали в течение 30 минут, далее животным накладывали окклюдеры на общие сонные артерии на 10 минут на фоне

управляемой гипотензии, после чего их снимали и продолжали регистрировать показатели МК ещё в течение 60 минут.

Исходные уровни МК у животных всех исследуемых групп не имели существенных отличий и составляли от $3,06 \pm 0,36$ до $3,60 \pm 0,17$ (табл.7).

Внутривенное введение физиологического раствора животным контрольной группы до момента окклюзии не приводило к значимым изменениям МК (отклонение от фоновых значений не выходило за пределы физиологической нормы (4%)) (табл. 7).

У животных, получавших новое производное ГАМК – соединение РГПУ-195 (рис.5Б) и производное ГК – соединение РГПУ-202 (рис.6Б) наблюдалось к 30-й минуте повышение уровня МК на 12% и 13%, соответственно (табл. 7).

Производные ГК – соединение РГПУ-146 у интактных крыс вызывало умеренное снижение МК на 10% относительно исходных значений.

Введение соединений под лабораторным шифром РГПУ-135, РГПУ-136 и РГПУ-217 не оказывало значительного влияние на МК интактных животных (табл. 7).

Таблица 7

Влияние однократного внутривенного введения исследуемых веществ на мозговой кровоток при ишемическо-реперфузионном повреждении головного мозга (n=6)

Группы	исход	Время, минуты										
		После введения исследуемых веществ		После двусторонней окклюзии сонных артерий			После снятия окклюдеров с сонных артерий					
		10	30	1	5	10	10	20	30	40	50	60
контроль	3,06± 0,36	2,96± 0,34	3,08± 0,33	1,65± 0,16	1,48± 0,13	1,67± 0,13	3,73± 0,33	2,1± 0,10	2,13± 0,12	2,03± 0,06	2,35± 0,11	2,51± 0,23
%	100	97	101	57	51	57	124	72	72	71	80	84
РГПУ-135 26 мг/кг	3,60± 0,17	3,37± 0,16	3,41± 0,12	2,23± 0,21#	2,31± 0,22#	2,26± 0,2#	3,70± 0,18*	3,16± 0,11*	3,07± 0,11#	2,86± 0,12#	2,83± 0,14#	2,93± 0,16#
%	100	94	95	62	64	63	104	89	86	80	79	82
РГПУ-136 22 мг/кг	3,44± 0,32	3,55± 0,19	3,53± 0,19	2,04± 0,16#	1,8± 0,11#	2,12± 0,2*	3,57± 0,32*#	2,33± 0,26#	2,48± 0,12#	2,43± 0,15#	2,68± 0,21#	2,44± 0,22#
%	100	106	106	62	56	64	105	68	75	74	81	74
РГПУ-146 30 мг/кг	3,36± 0,32	3,11± 0,31	2,96± 0,18	1,71± 0,15#	1,76± 0,1#	2,07± 0,2#	4,57± 0,32#	2,3± 0,26#	2,72± 0,25#	2,31± 0,16#	2,47± 0,31#	2,41± 0,12#
%	100	92	90	53	56	64	143	72	83	70	75	74
РГПУ-195 22 мг/кг	3,20± 0,15	3,44± 0,17*	3,59± 0,2*#	2,12± 0,16#	2,18± 0,16*#	2,28± 0,12*#	3,35± 0,07*	2,62± 0,12#	2,9± 0,12*#	2,99± 0,23*	2,87± 0,25	3,2± 0,2
%	100	108	112	67	69	72	106	83	91	94	90	100
РГПУ-202 27 мг/кг	3,15± 0,13	3,30± 0,23	3,57± 0,17*#	2,03± 0,17#	1,98± 0,2#	2,02± 0,16#	3,5± 0,12*#	2,3± 0,08#	2,33± 0,16#	2,05± 0,24#	2,58± 0,11#	2,78± 0,2
%	100	105	113	65	63	65	111	73	75	66	82	88
РГПУ-217 26 мг/кг	3,08± 0,29	3,18± 0,18	3,17± 0,17	1,83± 0,14#	1,62± 0,09#	1,9± 0,18#	3,95± 0,41#	2,25± 0,17#	2,32± 0,19#	2,38± 0,2#	2,33± 0,21#	2,5± 0,23#
%	100	106	106	62	56	64	128	74	76	79	76	81

Примечание: % – изменения относительно исходных значений; # – $p < 0,05$ различия достоверны по сравнению с исходными данными, *- $p < 0,05$ различия достоверны по сравнению с животными контрольной группы

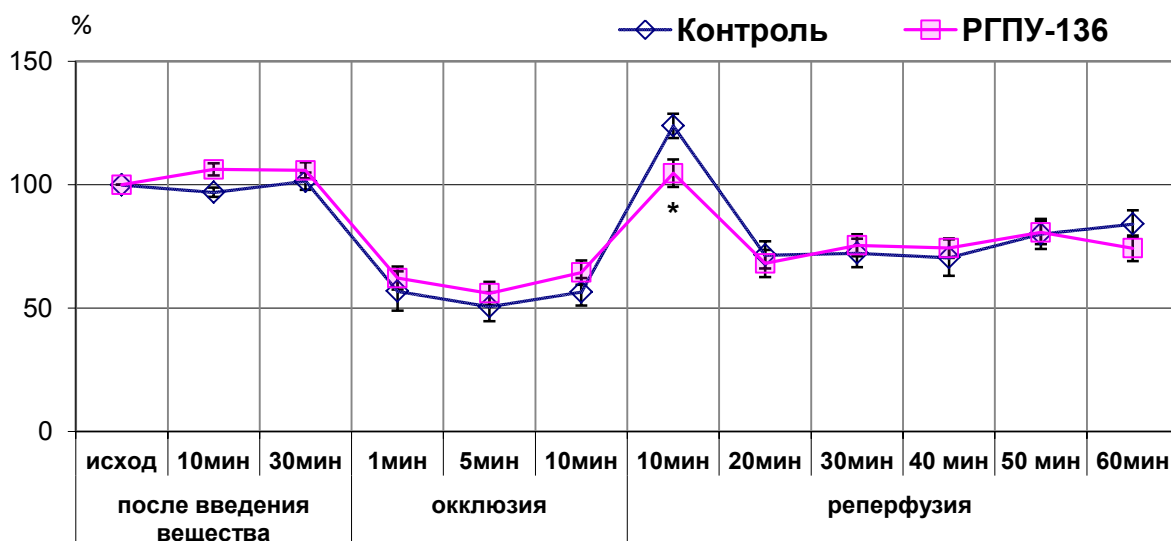
Через 30 минут после введения физиологического раствора/исследуемых веществ на сонные артерии накладывали окклюдеры на фоне управляемой гипотензии, что приводило к достоверному снижению МК во всех исследуемых группах (табл.7).

Наибольшее падение уровня МК (до 51% от исходного уровня) регистрировалось в группе животных, получавших физиологический раствор, наименьшее – (до 69% от исходного уровня) у получавших соединение РГПУ-195. К 10-й минуте окклюзии уровень кровотока в контрольной группе существенно не изменился и составил 57% от исходного (табл.7). МК крыс, внутривенно получавших соединение РГПУ-195, на 10 минуте после окклюзии составил 72% от исходного уровня. При анализе остальных соединений (РГПУ-135, РГПУ-136, РГПУ-146, РГПУ-202, РГПУ-217) установлено, что уровень МК был несколько выше, чем в контроле, но различия не имели статистической значимости (табл.7).

После снятия окклюдера у животных контрольной группы наблюдались последовательные стадии гипер- и гипоперфузии, которые характеризовались повышением мозгового кровотока (на 24%) с последующим его снижением (на 29%). На протяжении последующих 40 минут реперфузионного периода у крыс, получавших физиологический раствор, МК постепенно восстанавливался к исходному уровню, однако к концу наблюдения он полностью не восстановился, достигнув лишь 84% исходного уровня (табл.7).

После снятия окклюдера (реперфузионный период) у животных, получавших соединение РГПУ-195, в первые 10 минут МК возрос на 6% от исходного уровня, к 20 минуте наблюдений он снизился на 17%, а к 60-й почти достигал исходного уровня. Важно отметить, что на фоне введения исследуемого вещества падение мозгового кровотока во время реперфузионного периода было не столь значительно, как в контрольной группе (рис. 5Б).

А



Б

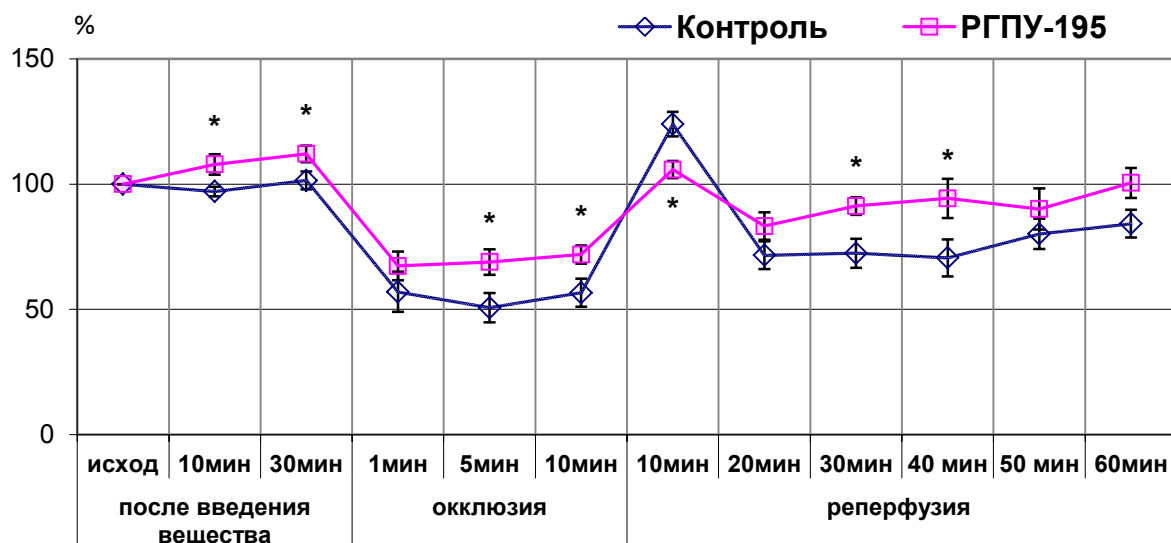


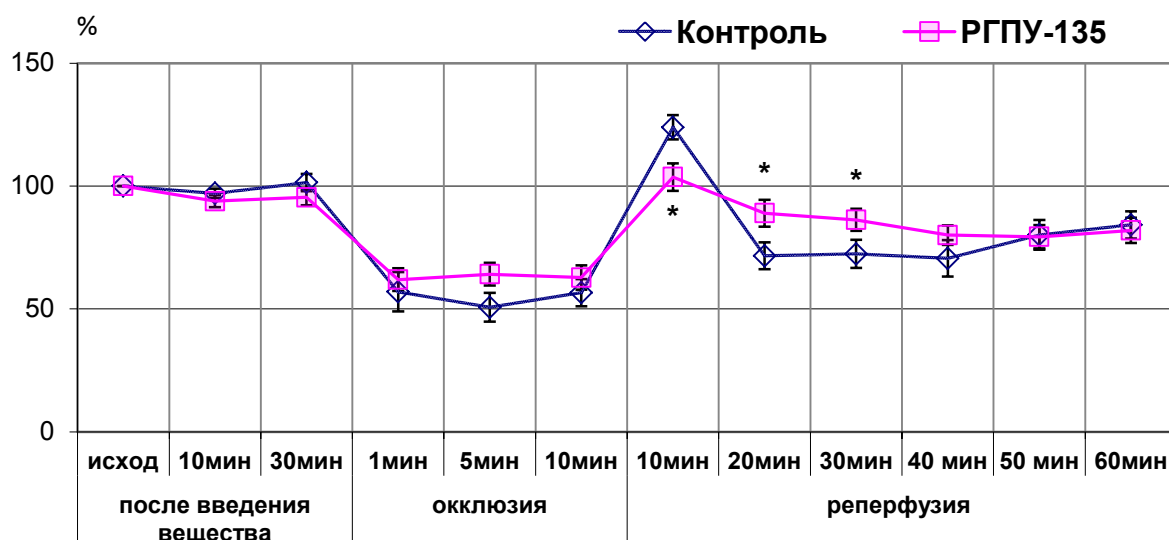
Рисунок 5. Влияние однократного внутривенного введения производных ГАМК – соединения РГПУ-136 (А) и РГПУ-195 (Б) на мозговой кровоток в ишемически-реперфузионный период.

*Примечание: изменение МК представлены в процентах относительно исходного уровня; *- $p < 0,05$ различия достоверны по сравнению с животными контрольной группы*

Предварительное введение соединения РГПУ-135 вызывало прирост МК до исходных значений в течение первых 10-ти минут от начала реперфузии, затем он постепенно снижался на 11-21 % от исходного уровня, сглаживая явление «гипоперфузии». На протяжении последующего

реперфузионного периода скорость МК постепенно возрастала и к концу наблюдения составила $2,93 \pm 0,16$. Таким образом, введение РГПУ-135 уменьшало степень падения кровотока во время ишемии, а явления гипер- и гипоперфузии в реперфузионный период были менее выражены по сравнению с показателями контрольной группы (рис.6А).

А



Б

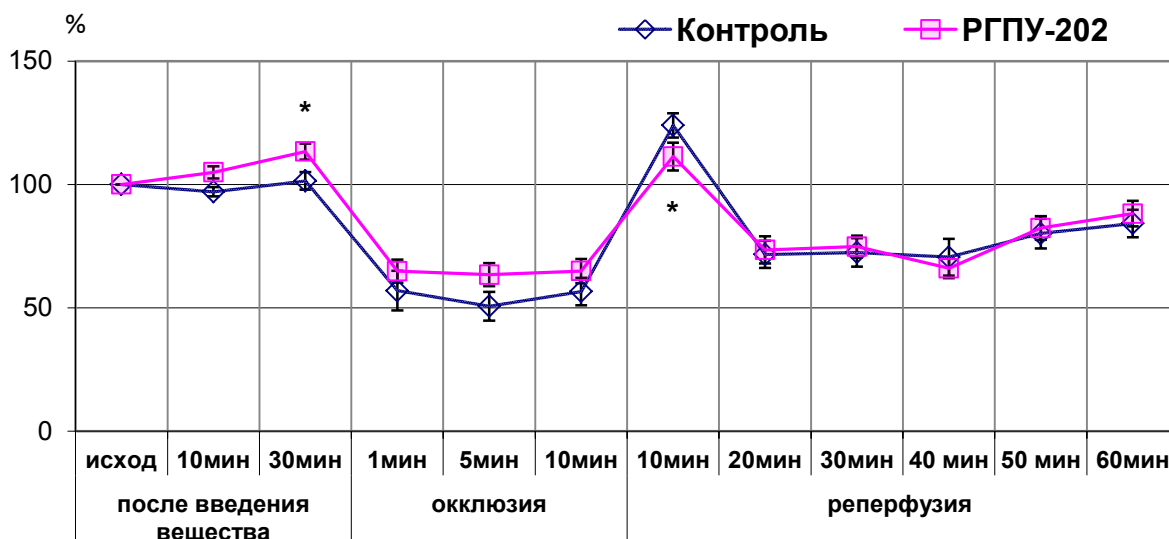


Рисунок 6. Влияние однократного внутривенного введения производных ГК – соединений РГПУ-135 (А) и РГПУ-202 (Б) на мозговой кровоток в ишемически-реперфузионный период.

Примечание: изменение МК представлены в процентах относительно исходного уровня;

**- $p < 0,05$ различия достоверны по сравнению с животными контрольной*

У животных, которым вводились соединения РГПУ-136 (рис.5А) и РГПУ-202 (рис.6Б), после снятия окклюдеров с сонных артерий стадия «гиперперфузия» была менее выражена, чем у крыс контрольной группы (МК увеличивался на 5% и 11% соответственно). Однако в дальнейшем уровень МК в данных группах не отличался от такового в контрольной (табл.7).

На фоне предварительного введения соединения РГПУ-146 отмечался наиболее выраженный прирост МК от исходных значений в течение первых 10-ти минут от начала реперфузии среди всех исследуемых групп. В дальнейшем изменения МК были сопоставимы с показателями животных контрольной группы. Следовательно, соединение РГПУ-146 оказывает негативное влияние на МК в постреперфузионный период, усугубляя явления «гиперперфузии» (табл.7).

Соединение РГПУ-217 статистически значимого не влияло на МК как в условиях ишемии, так и реперфузионный период. На фоне его введения изменения МК имели такую же тенденцию, что и у животных контрольной группы (табл.7).

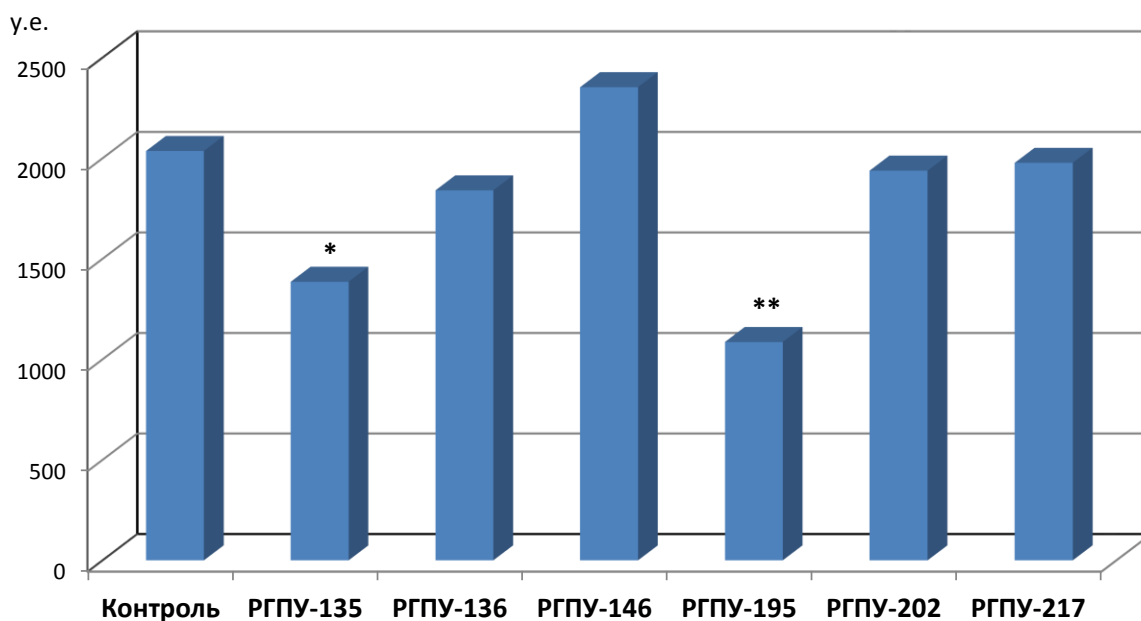


Рисунок 7. Изменение площади под кривой уровня МК под влиянием исследуемых соединений в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга.
Примечание: *, ** - $p < 0,05$, $p < 0,01$ различия достоверны по сравнению с группой контрольных животных

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что после перевязки общих сонных артерий развивается ишемическое повреждение головного мозга, при этом отмечается выраженное снижение уровня МК. Напротив, после удаления окклюдеров и восстановления кровотока, т.е. при реперфузии наблюдалось сначала повышение МК («гиперперфузия»), а затем его снижение ниже исходного уровня («гипоперфузия»). При этом уровень МК к концу постреперфузионного периода полностью не восстанавливался до исходных значений. Однако выраженность данных процессов у крыс, получавших исследуемые вещества, была неодинакова (табл.7, рис.7). Так меньшая площадь под кривой изменения уровня МК, т.е. менее выраженное его повышение или снижение относительно исходных значений, наблюдалось у животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 (рис.7). Данные соединения способствовали поддержанию МК на более высоком уровне в период ишемии и уменьшали выраженность его постреперфузионных колебаний.

3.2 Изучение влияния производных ГАМК и ГК при ишемическом повреждении головного мозга, вызванного перевязкой сонных артерий.

Ишемия головного мозга моделировалась путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Все препараты вводились однократно, внутривенно за 30 минут до наложения и затягивания лигатур на общих сонных артериях. Животным ложно-оперированной группы (ЛО) лигатуры под общие сонные артерии подводились без дальнейшего их затягивания.

Исследуемые вещества вводили в дозе, составляющей 1/10 их молекулярной массы. Животным контрольной группы и ЛО с экспериментальной ишемией вводили 0,9% раствор NaCl в эквивалентном объёме.

У животных контрольной группы первая гибель отмечалась уже через 6 часов после операции, к окончанию первых суток погибло 40%, а через 72 часа – 70% животных (табл. 8).

Таблица 8

Влияние соединений на летальность животных в условиях ишемии головного мозга, вызванной двусторонней необратимой перевязкой общих сонных артерий

Группы	Время регистрации летальных исходов от момента операции, час.									
	6 часов		12 часов		24 часа		48 часов		72 часа	
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
ЛО	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%
Контроль	5/20	25%	6/20	30%	8/20	40%	12/20	60%	14/20	70%
РГПУ-135 26 мг/кг	4/20	20%	5/20	25%	6/20	30%	7/20	35%	7/20	35%#
РГПУ-136 22 мг/кг	4/20	20%	4/20	20%	7/20	35%	8/20	40%	10/20	50%
РГПУ-146 30 мг/кг	2/20	10%	8/20	40%	10/20	50%	10/20	50%	12/20	60%
РГПУ-195 22 мг/кг	3/20	15%	4/20	20%	7/20	35%	8/20	40%	8/20	40%
РГПУ-202 27 мг/кг	5/20	25%	6/20	30%	7/20	35%	8/20	40%	8/20	40%
РГПУ-217 30 мг/кг	4/20	20%	8/20	40%	12/20	60%	12/20	60%	12/20	60%
Фенибут 25 мг/кг	2/20	10%	4/20	20%	6/20	30%	8/20	40%	8/20	40%
Кавинтон 3,2 мг/кг	2/20	10%	4/20	20%	4/20	20%	6/20	30%	6/20	30%#

Примечание: N – количество животных в группе; n – количество умерших животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; # – достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор ($p < 0,05$).

К 48 часам процент гибели животных в группе, получавшей фенибут, составил 40% (табл.8). Однако, больше смертельных исходов в этой группе не отмечалось, и к концу наблюдения процент гибели был меньше, чем в группе контроля на 30%.

В группе животных, которым вводилось соединение РГПУ-195 в дозе 22 мг/кг, выживаемость к окончанию вторых суток была на 20 %, а через трое суток на 30% ниже, чем в контрольной и составила 40 %, что сопоставимо с гибелью крыс, получавшими фенибут.

В группе животных, получавших соединение РГПУ-135, процент гибели через 24 часа после операции составил 30, а через 72 часа – 35% (табл.8).

К 12 часам в группах, получавших соединения РГПУ-202, РГПУ-136, РГПУ-217 и РГПУ-146, количество выживших животных составило 70%, 80%, 60% и 60%, но уже к 48 часам в группах крыс, получавших соединение РГПУ-146 и РГПУ-217, выжило только 50% и 40% соответственно, а после введения соединений РГПУ-136, РГПУ-202, 60%, что на 20% больше чем у контрольной группы (табл. 8).

Таким образом, из всех исследуемых веществ профилактическое применение соединений под лабораторными шифрами РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-202 приводило к более значимому снижению количества летальных исходов у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Для оценки тяжести клинических проявлений ишемии был выполнен комплекс исследований, включающий анализ неврологических отклонений по шкале McGrow, тестирование крыс в тестах ОП, УРПИ, ТЭИ.

Балл неврологического дефицита у животных контрольной группы после моделирования ишемии возрастал в первые 24 часа с $6 \pm 0,64$ до $7,4 \pm 0,57$, а к концу третьих суток повысился до $7,9 \pm 0,77$ балла (табл.9). В первые сутки у выживших животных наблюдались вялость, односторонний и двусторонние блефароптозы, общий тремор, манежные движения, парезы одной или нескольких конечностей.

Таблица 9

**Степень неврологических нарушений по шкале McGrow у животных
после окклюзии сонных артерий**

Группы животных	Время после окклюзии сонных артерий				
	6 часов	12 часов	24 часа	48 часов	72 часа
ЛО	0,3±0,11	0	0	0	0
Контроль-ишемия	6,0±0,64	7,0±0,54	7,4±0,57	7,8±0,66	7,9±0,77
РГПУ-135 26 мг/кг	4,7±0,68	4,8±0,73#	5,2±0,78#	5,3±0,82#	5,0±0,87#
РГПУ-136 22 мг/кг	5±0,62	6,3±0,66	5,8±0,75	5,7±0,83	5,8±0,98
РГПУ-146 30 мг/кг	4,8±0,58	6,2±0,75	6,8±0,78	6,7±0,78	6,6±1,0
РГПУ-195 26 мг/кг	5 ±0,6	5±0,63#	5,7±0,9	5,5 ±0,88#	5,5 ±0,85#
РГПУ-202 27 мг/кг	5,3±0,68	6±0,72	6,1±0,77	6,2±0,8	5,9±0,84
РГПУ-217 30 мг/кг	4,7±0,64	5,9±0,78	7,0±0,85	6,9±0,87	6,8±0,41
Фенибут 25 мг/кг	5,7±0,5	6,1±0,54	5,8±0,7	6,0±0,79	5,7±0,84
Кавинтон 3,2 мг/кг	4,8±0,5	5,4±0,66	5,6±0,55 #	4,9±0,84#	4,7±0,86#

Примечание: # – различия достоверны по сравнению с группой негативного контроля (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

У животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195, балл неврологического дефицита на протяжении всего периода наблюдения после операции был ниже, чем у контрольных. и сопоставим с получавшими препараты-сравнения (фенибут, кавинтон (табл.9). Применение остальных исследуемых соединений менее значимо влияло на тяжесть неврологической симптоматики у крыс.

У животных, которым однократно вводились соединения РГПУ-135, РГПУ-136, РГПУ-195, РГПУ-202 через 72 часа после окклюзии сонных артерий локомоторная активность в тесте «открытое поле» была выше, чем у животных контрольной группы. При этом ориентировочно-исследовательская активность (сумма заглядываний в отверстия и вставания на задние лапы) была выше на фоне введения соединений РГПУ-135, РГПУ-

195 и препаратов сравнения фенибута и кавинтона, по сравнению с группой контроля (рис.8).

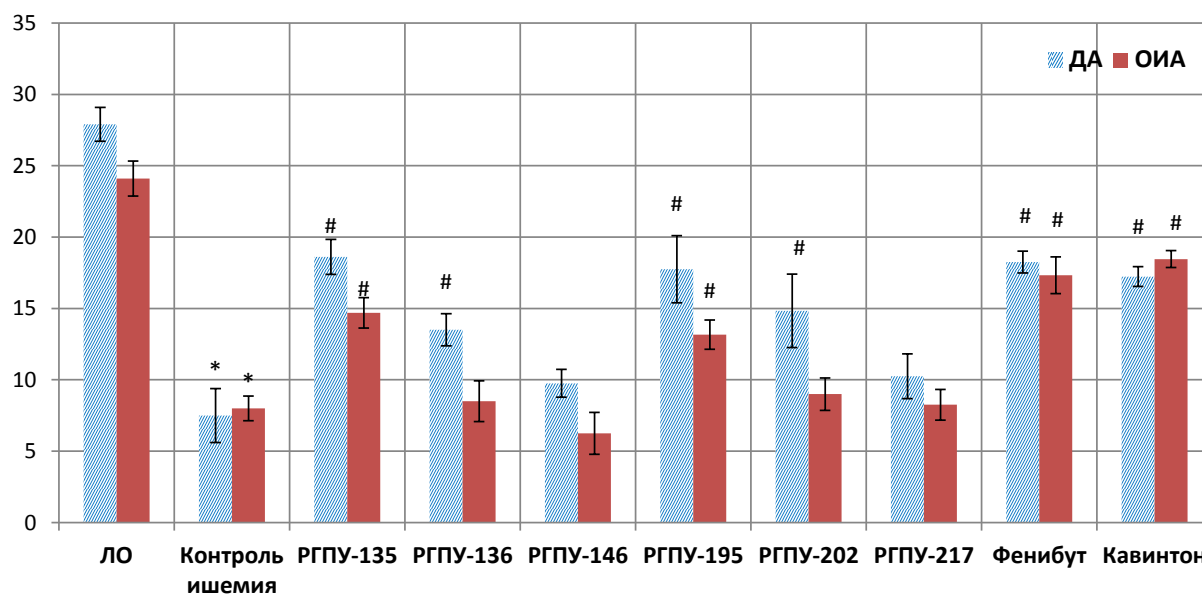


Рисунок 8. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

*Примечание: ДА – двигательная активность (количество пересечённых квадратов животными в тесте ОП); ОИА – ориентировочно-исследовательская активность (количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки); * – различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).*

При воспроизведении теста УРПИ через 72 часа после необратимой окклюзии общих сонных артерий у животных все исследуемые соединения увеличивали латентный период первого захода в темный отсек, уменьшая количество животных, зашедших в него (табл. 10, рис.9).

Таблица 10

Процент животных, не посетивших тёмный отсек в УРПИ и выплывших в ТЭИ через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий

Группы животных	% не зашедших животных в тесте УРПИ	% животных решивших задачу в ТЭИ
ЛО	100%	100%
Контроль-ишемия	0%	50%
РГПУ-135 26 мг/кг	46,2%	100%
РГПУ-136 22 мг/кг	40%	60%
РГПУ-146 30 мг/кг	25%	50%
РГПУ-195 22 мг/кг	50%	100%
РГПУ-202 27 мг/кг	41,6%	66,7%
РГПУ-217 30 мг/кг	37,5%	50%
Фенибут 25 мг/кг	41,7%	83,5%
Кавинтон 3,2мг/кг	42,9%	100%

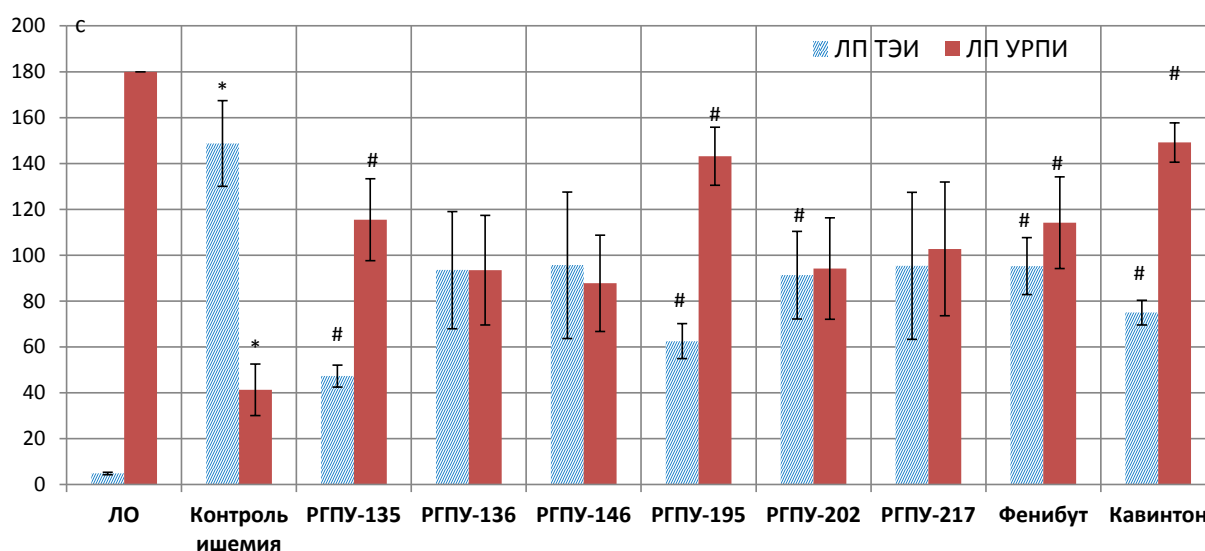


Рисунок 9. Оценка когнитивной и мнестической функции животных через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

*Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).*

Введение животным соединения РГПУ-195 до моделирования патологии обеспечивало снижение ($p < 0,05$) количества заходов (на 50%) относительно показателей контрольной группы, а у крыс, которым вводили соединения РГПУ-135, РГПУ-136, РГПУ-146, РГПУ-202 только на 46,2%,

40%, 25% и 41,7% соответственно (табл. 10, рис.9). Таким образом, при воспроизведении рефлекса пассивного избегания в тесте УРПИ у вышеуказанных соединений было отмечено наличие превентивной активности в отношении нарушения памятного следа.

Моделирование у крыс ишемии головного мозга приводило к нарушению воспроизведения памятного следа в тесте ТЭИ. Так, количество животных контрольной групп, получавших соединения РГПУ- 146 и РГПУ-217, выплывших в ТЭИ после моделирования патологии, составило 50%. Соединения РГПУ- 135 и РГПУ-195 обеспечивали 100% воспроизводимость навыка, что было сопоставимо с результатами животных, которым вводился кавинтон (табл. 10). При этом у крыс, получавших исследуемые соединения РГПУ- 135, РГПУ-195 и препараты сравнения, отмечалось снижение времени, затрачиваемого на решение задачи по сравнению с контрольной группой, что является свидетельством лучшей сохранности памятного следа (рис. 9).

Степень тяжести неврологических, когнитивных и поведенческих нарушений в условиях церебральной ишемии зависит от сохранности мозгового кровотока. Поэтому МК можно расценивать как интегральный показатель, снижение уровня которого коррелирует с выраженностью психоневрологических отклонений.

Показания уровня МК регистрировались на 3 день после моделируемой патологии. В результате чего было выявлено, что у животных, получавших соединения РГПУ -135, РГПУ-195, фенибут и кавинтон МК был достоверно выше, чем в группе негативного контроля (контроль-ишемия) и составил $3,32 \pm 0,11$, $3,34 \pm 0,1$, $2,92 \pm 0,15$ и $3,38 \pm 0,14$ соответственно. Уровень МК в группах животных, получавших соединения РГПУ-136, РГПУ-202 и РГПУ-217, превышал показатели контрольной группы, но был ниже, чем в группах крыс, получавших соединения РГПУ-135, РГПУ-195 и препараты сравнения (рис.10)

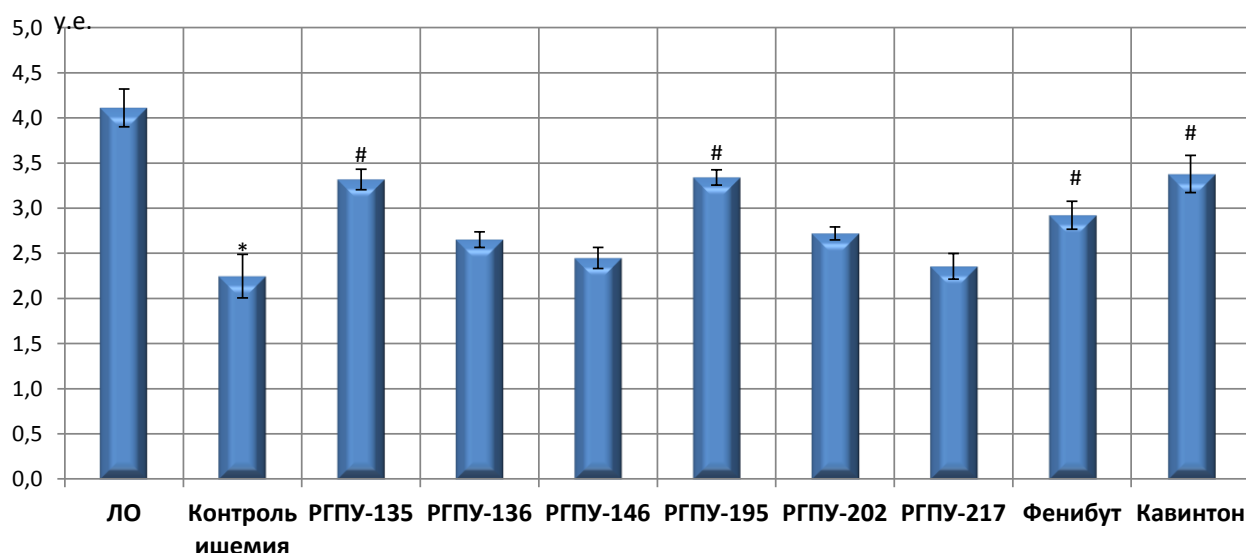


Рисунок 10. Оценка мозгового кровотока животных через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

*Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).*

Таким образом, при моделировании необратимой окклюзии общих сонных артерий наиболее выраженным церебропротекторным эффектом обладали соединения РГПУ-135 и РГПУ-195.

3.3 Заключение

В результате проведенного блока экспериментов было выявлено, что все исследуемые вещества в разной степени оказывают влияние на МК в условиях нормы и при моделировании ишемически – реперфузионного повреждения головного мозга.

Так, в условиях нормы уровень МК повышали два из исследуемых соединения – производное ГАМК с пиридиловым заместителем (РГПУ-195) и производное ГК с толильным заместителем (РГПУ-202).

В условиях транзиторной ишемии, вызванной обратимой 10-минутной окклюзией общих сонных артерий, способным сохранять уровень МК на более высоком уровне оказалось только одно производное ГАМК (РГПУ-

195), а предварительное введение производных ГК не оказало значимого влияния в тех же условиях на МК.

Анализ динамики изменений кровотока в постреперфузионный период показал, что явления «гиперперфузии» менее выражены на фоне предварительного введения фенильного (РГПУ-135) и толильного (РГПУ-202) производных ГК, а также пиримидинового (РГПУ-195) и индольного (РГПУ-136) производных ГАМК, а явление «гипоперфузии» только при предварительном введении производных ГАМК с пиримидиновым (РГПУ-195) и ГК с фенильным (РГПУ-135) заместителями в β -положении.

На данном этапе было также изучено церебротекторное действие структурных аналогов ГАМК и ГК с ароматическими заместителями в бета-положении при необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Фенилсодержащий, толильный аналог ГК и пиридилсодержащий аналог ГАМК в большей степени препятствовали высокой летальности экспериментальных животных к 72 часу наблюдения. Введение же в структуру ГАМК индольного заместителя (РГПУ-136) и парахлорфенила (РГПУ-146) в структуру ГК не влияло на выживаемость животных.

При анализе неврологического дефицита по шкале McGrow, на фоне введения фенилсодержащего производного ГК и пиридилсодержащего производного ГАМК было отмечено наименьшее нарастание неврологической симптоматики. При этом, фенилсодержащий аналог ГАМК (фенибут) уступал по данному положительному эффекту фенильному производному ГК (РГПУ-135). Под влиянием фенильных аналогов у крыс с ишемией головного мозга двигательная активность была выше, чем при введении других исследуемых веществ, а ориентировочно-исследовательская активность была наибольшей при введении в структуру ГАМК пиридила. Индолил в структуре ГАМК, парахлорфенил в составе ГК и толильный заместитель в ГК проявляли слабые психотропные свойства в условиях церебральной ишемии.

Менее выраженные нарушения памяти наблюдались так же в группах, получавших соединения РГПУ-135 (производное ГК) и РГПУ-195 (производное ГАМК).

Мозговой кровоток, на фоне данных производных, регистрировался на значительно более высоком уровне.

Таким образом, по совокупности эффектов, выявленных при скрининге производных ГАМК и ГК наиболее выраженное нейропротекторное действие, сопоставимое с таковым у кавинтона, оказывали соединения РГПУ-135 (фенильное производное ГК) и РГПУ-195 (β - пиридил ГАМК). Поэтому для дальнейшего изучения «дозы-эффект» и сопоставления выраженность церебро- и эндотелиопротекторной активности были выбраны соединения РГПУ-195 и РГПУ-135.

ГЛАВА 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединений РГПУ-135 и РГПУ-195 на модели необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

В данной серии экспериментов изучена зависимость «доза-церебропротективный эффект» соединений в сравнении с фенибутом и кавинтоном при одномоментной окклюзии общих сонных артерий у крыс. Поскольку на этапе скрининга соединения вводились в дозе 1/10 от их молекулярной массы, для определения эффективной дозы соединений - лидеров было необходимо оценить эффекты данных веществ в дозах в 2 раза меньших и 2 и 3 раза больше скрининговых. Для изучения возможного доза-зависимого церебропротекторного действия веществ РГПУ-135 и РГПУ-195 были выбраны следующие дозы (табл. 11):

Таблица 11.

Дозы исследуемых веществ

Название вещества	Исследуемые дозы	Название вещества	Исследуемые дозы
РГПУ-135	13,26,52,78 мг/кг	РГПУ-195	11,22,44,88 мг/кг
Фенибут	25 мг/кг	Кавинтон	3,2 мг/кг

Оценку выраженности церебро- и эндотелиопротективного действия проводили по следующим параметрам:

- 1) выживаемость животных и выраженность неврологического дефицита по шкале McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной
- 2) выраженность поведенческих, когнитивных нарушений (оценивали по результатам тестов: «Открытое поле» (ОП), «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и «тест экстраполяционного избавления» (ТЭИ))
- 3) сохранность мозгового кровотока и эндотелийзависимой вазодилатации церебральных сосудов
- 4) выраженность отёка головного мозга

4.1 Выживаемость животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах после окклюзии общих сонных артерий

Билатеральная окклюзия общих сонных артерий (ОСА) во всех группах приводила к частичной гибели животных. Введение исследуемых веществ снижало данный показатель, но выраженность этого эффекта была не одинакова. Суммарные данные о динамике гибели крыс после билатеральной необратимой окклюзии общих сонных артерий представлены в таблице 12.

Первые летальные исходы среди животных группы контроль-ишемия были отмечены уже через 6 часов после окклюзии общих сонных артерий, а к концу 3-х суток выжило всего 30% крыс, тогда как в группе ЛО летальные исходы не зафиксированы.

Таблица 12

Влияние исследуемых веществ – РГПУ-135 и РГПУ-195 в разных дозах на выживаемость животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Группа животных	Доза, мг/кг	Выживаемость животных после окклюзии ОСА									
		6 ч		12 ч		24 ч		48 ч		72 ч	
		n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
ЛО	-	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Контроль-ишемия	-	20/15	75%	20/14	70%	20/12*	60%	20/8*	40%	20/6*	30%
РГПУ-135	13	20/16	80%	20/15	75%	20/13	65%	20/11	55%	20/10	45%
	26	20/15	75%	20/15	75%	20/14	70%	20/13 [#]	65%	20/13 [#]	65%
	52	20/16	80%	20/13	65%	20/11	55%	20/9	45%	20/8	40%
	78	20/16	80%	20/12	60%	20/10	50%	20/8	40%	20/8	40%
РГПУ-195	11	20/16	80%	20/14	70%	20/10	50%	20/8	40%	20/8	40%
	22	20/18	90%	20/16	80%	20/12	60%	20/12	60%	20/12	60%
	44	20/20	100%	20/16	80%	20/15	75%	20/15	75%	20/15 [#]	75%
	88	20/20	100%	20/14	70%	20/12	60%	20/10	50%	20/8	40%
Фенибут	25	20/16	80%	20/14	70%	20/12 [#]	60%	20/12 [#]	60%	20/12 [#]	60%

Кавинтон	3,2	20/ 18	90%	20/ 16	80%	20/ 15 [#]	75%	20/ 15 [#]	75%	20/ 15 [#]	75%
-----------------	-----	-----------	-----	-----------	-----	------------------------	-----	------------------------	-----	------------------------	-----

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

Исследуемое производное глутаминовой кислоты – соединение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг к концу 3-их суток на 35% достоверно уменьшало гибель крыс после перевязки сонных артерий по сравнению с группой контроль-ишемия (табл.12). Данное защитное действие было сопоставимо с таковым у кавинтона. Превентивное однократное введение РГПУ-135 в дозах 13, 52 и 78 мг/кг оказывало менее выраженное протекторное действие, чем в дозе 26 мг/кг.

Профилактическое однократное введение исследуемого соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (в большей степени) и 22 мг/кг (в несколько меньшей степени), оказывало защитный эффект, о чём свидетельствовало достоверно меньшее количество летальных исходов по сравнению с контролем. Помимо этого, данные были сопоставимы с результатами в группе препарата сравнения – кавинтона.

Таким образом, при моделировании НМК выживаемость была выше в группах животных, получавших соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг и РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг. Соединение РГПУ-195 оказывало сопоставимое с кавинтоном церебропротекторное действие, превосходя таковое у фенибута и РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг.

4.2. Неврологический дефицит (по шкале McGrow) у животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах, после необратимой окклюзии ОСА

При оценке неврологического статуса у животных группы контроль-ишемия (негативный контроль) в условиях моделируемого НМК отмечался постепенный рост неврологического дефицита с $5,9 \pm 0,63$ (через 6 часов) до $7,8 \pm 0,64$ балла (через 48 часов), который сохранялся в последующем до

конца третьих суток наблюдения (табл.13). У выживших крыс наблюдались вялость, односторонний и двусторонние блефароптозы, общий тремор, маневные движения, парезы одной или нескольких конечностей.

На фоне однократного профилактического введения соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг выраженность неврологического дефицита у животных была наименьшей по сравнению с крысами, получавшими другие исследуемые дозы (13, 52, 78 мг/кг) данного соединения и физиологический раствор (группа контроль-ишемия) (табл.13). Оказываемое протекторное действие соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг было сопоставимо с кавинтоном и превосходило действие фенибута.

Таблица 13

Балл неврологического дефицита по шкале McGrow у животных после необратимой окклюзии сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемых соединений – РГПУ 135 и РГПУ-195 ($M \pm m$)

Группа животных	Доза, мг/кг	Время после необратимой окклюзии ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	-	5,9±0,63	6,9±0,53	7,3±0,56	7,8±0,64	7,8±0,79
РГПУ-135	13	5,2±0,62	6±0,61	6,1±0,71	6,8±0,7	7,2±0,72
	26	4,8±0,71	4,7±0,74 [#]	5±0,79 [#]	5,1±0,84 [#]	4,9±0,88 [#]
	52	4,8±0,68	6,2±0,7	6,4±0,79	7,0±0,8	6,8±0,92
	78	4,8±0,61	6,4±0,75	6,7±0,79	7,2±0,8	6,8±0,91
РГПУ-195	11	5,5 ±0,63	6,0 ±0,71	6,9 ±0,76	7,7 ±0,71	7,2±0,82
	22	4,8 ±0,55	4,9 ±0,69 [#]	5,6 ±0,84	5,7 ±0,84 [#]	5,4 ±0,88 [#]
	44	4,2 ±0,36 [#]	4,6 ±0,66 [#]	4,7 ±0,84 [#]	4,6 ±0,81 [#]	4,6 ±0,8 [#]
	88	4,2±0,48 [#]	5,6±0,7	5,7±0,84	6,3±0,88	7,1±0,82
Фенибут	25	5,4±0,58	6,6±0,63	6,2±0,74	6,1±0,85	5,8±0,84
Кавинтон	3,2	4,9±0,49	5,2±0,64	5,1±0,77 [#]	4,9±0,73 [#]	4,6±0,77 [#]

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

У животных, получавших соединение РГПУ-195 в дозах 22 мг/кг и 44 мг/кг, а также кавинтон, суммарный индекс McGrow был достоверно ниже по

сравнению с показателями контрольной группы (табл.13). Так через 72 часа наблюдений эти баллы составили соответственно $5,4 \pm 0,88$, $4,6 \pm 0,8$ и $4,6 \pm 0,77$, что на 28%, 41% и 39% ниже, чем в контрольной группе.

Таким образом, профилактическое введение животным соединений РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (в большей степени) и РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (несколько в меньшей) уменьшает степень неврологической симптоматики после необратимой окклюзии ОСА. По выраженности церебропротекторного действия соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 были сопоставимы с кавинтоном и превосходили фенибут.

4.3. Когнитивный и поведенческий дефицит животных с необратимой окклюзией ОСА, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах

Оценку поведения животных проводили в тесте ОП, когнитивных функций – в тестах УРПИ и ТЭИ.

Через 72 часа после окклюзии ОСА животные контрольной группы были менее активны по сравнению с ЛО, о чём свидетельствовало снижение количества пересечённых квадратов в тесте ОП и меньшая ориентировочно-исследовательская активность.

У животных, которым однократно превентивно вводилось соединение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг, выраженность локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности (сумма заглядываний в отверстия и вставания на задние лапы) крыс была выше, чем у контрольной группы (рис. 11).

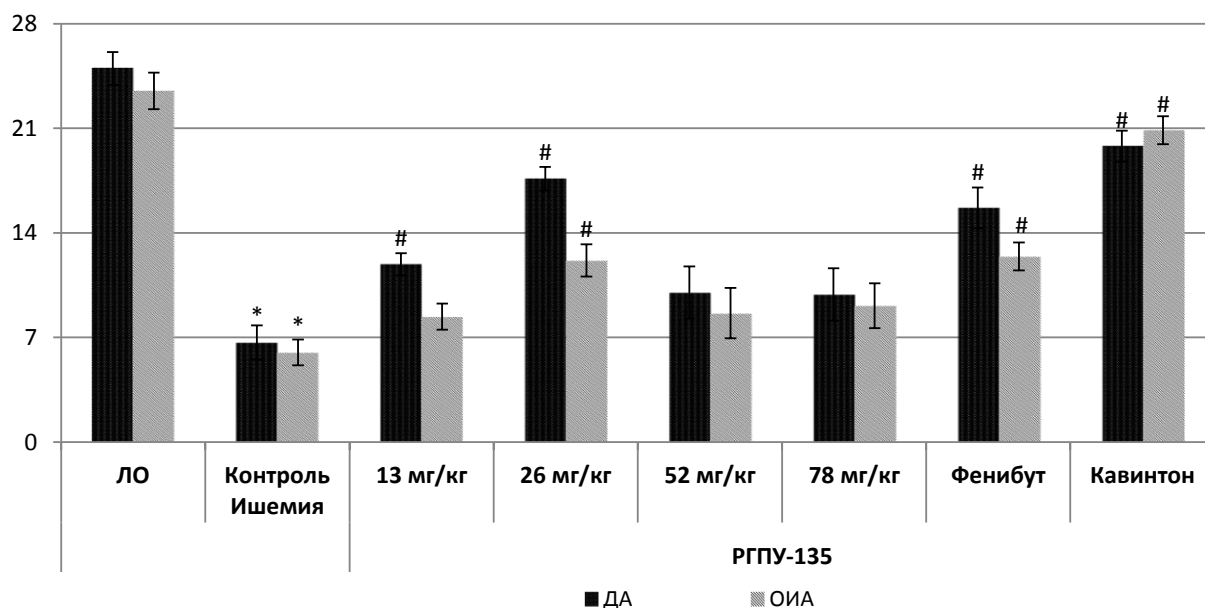


Рисунок 11. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемого соединения – РГПУ 135.

*Примечание: ДА – двигательная активность (количество пересечённых квадратов животными в тесте ОП; ОИА – ориентировочно-исследовательская активность (количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).*

Более низкие показатели двигательной и суммарной ориентировочно-исследовательской активности отмечались при снижении дозы вещества РГПУ-135 до 13 мг/кг или увеличении дозы до 78 мг/кг, по сравнению с животными, получавшими тоже соединение в дозе 26 мг/кг (рис.11).

При оценке двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте ОП у животных, получавших соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг и кавинтон в дозе 3,2 мг/кг, отмечалось большее число пересеченных квадратов и выполнено больше стоек и заглядываний в норки, чем у животных в группе контроль-ишемия (рис. 12).

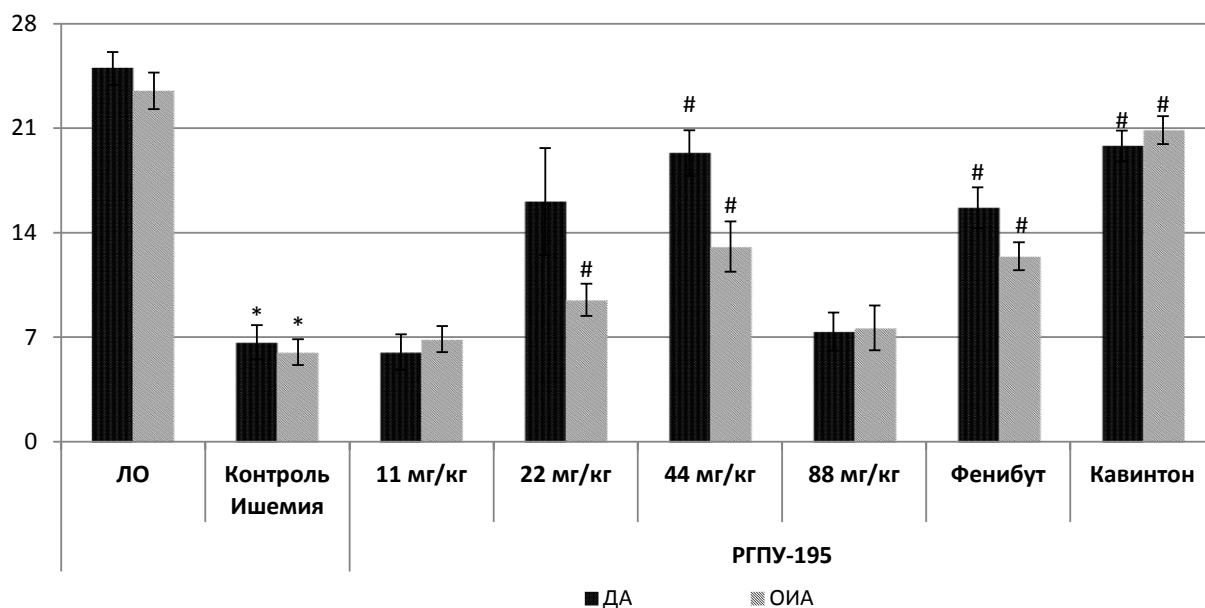


Рисунок 12. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемого соединения – РГПУ 195.

Примечание: ДА – двигательная активность (количество пересечённых квадратов животными в тесте ОП); ОИА – ориентировочно-исследовательская активность (количество суммированных актов стоек и заглядываний в норки; * – различия достоверны в сравнении с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

Однократное введение РГПУ-195 в других исследуемых дозах оказывало менее выраженное влияние на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность крыс, когда животные совершали меньшее количество стоек, заглядываний в отверстия и пересекали меньшее число секторов после необратимой окклюзии сонных артерий в тесте ОП.

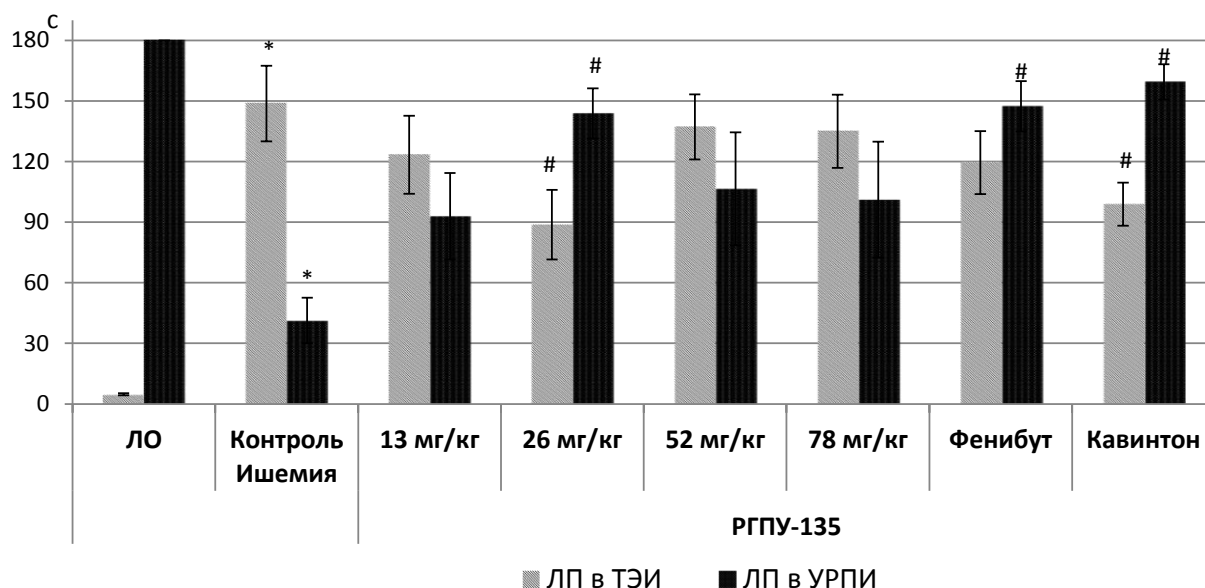


Рисунок 13. Время (с) решения экстраполяционной задачи в ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в УРПИ животных с необратимой билатеральной окклюзией общих сонных артерий, получающих соединение РГПУ-135

*Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).*

В тестах УРПИ и ТЭИ через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий оценивали когнитивные и мнестическую функции крыс (рис.13, 14). У животных контрольной группы в указанных тестах отмечались признаки постишемической амнезии, о чём свидетельствовали увеличение ЛП подныривания в ТЭИ и уменьшение ЛП захода в темный отсек в УРПИ (рис. 13, 14).

При воспроизведении теста УРПИ на животных, получавших до окклюзии ОСА фенибут, кавинтон, соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг, РГПУ-195 в дозе 22 мг/кг и 44 мг/кг, отмечался статистически значимо больший латентный период первого захода в темный отсек ($p < 0,05$), что указывает на сохранность памятного следа у крыс с окклюзированными сонными артериями.

В ТЭИ животные, которым превентивно до окклюзии ОСА вводили соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (рис.13) и РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (рис.14) быстрее решали задачу экстраполяционного избавления, чем

животные контрольной группы. Увеличение и снижение доз исследуемых соединений РГПУ-135 и РГПУ-195 не повышало их эффективность.

Таким образом, соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг и РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг уменьшали степень выраженности поведенческого, когнитивного дефицитов у животных с перевязанными ОСА.

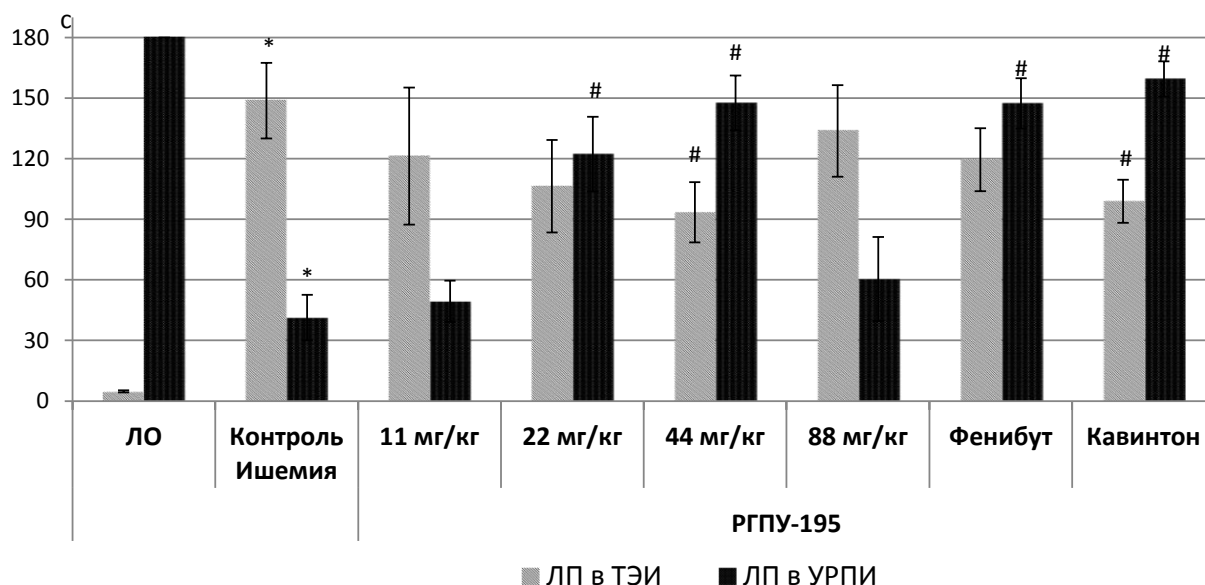


Рисунок 14. Время (с) решения экстраполяционной задачи в ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в УРПИ животных с необратимой билатеральной окклюзией общих сонных артерий.

Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).

4.4. Мозговой кровоток и функциональное состояние эндотелия у животных после необратимой окклюзии ОСА, получавших исследуемые соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах

Известно, что влияние эндотелия на сосудистый тонус осуществляется за счет высвобождения вазоактивных веществ, оказывающих как сосудорасширяющее, так и сосудосуживающее действие (Асташев П.Е. и др., 2011). ЭД ведёт к нарушению баланса между этими факторами и недостаточности синтеза NO. Система синтеза NO играет ключевую роль в функционировании эндотелия и при этом является наиболее уязвимой к действию различных повреждающих агентов – именно она и послужила

объектом при исследовании вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга.

Поэтому после проведения поведенческих тестов регистрировался мозговой кровоток. Далее, по изменению МК исследовали реакцию сосудов на введение ацетилхолина (эндотелий-зависимая вазодилатация (ЭЗВД) и эндотелий-независимую вазодилатации (ЭНВД).

Как видно из данных представленных на рисунке 15 профилактическое введение исследуемого соединения РГПУ-135 в дозе 26мг/кг способствовало сохранности мозгового кровотока по сравнению с контрольной группой. В остальных исследуемых группах данные показатели были выше, чем в группе контроля, но не превосходили уровень МК у крыс, получавших РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг, фенибут и кавинтон.

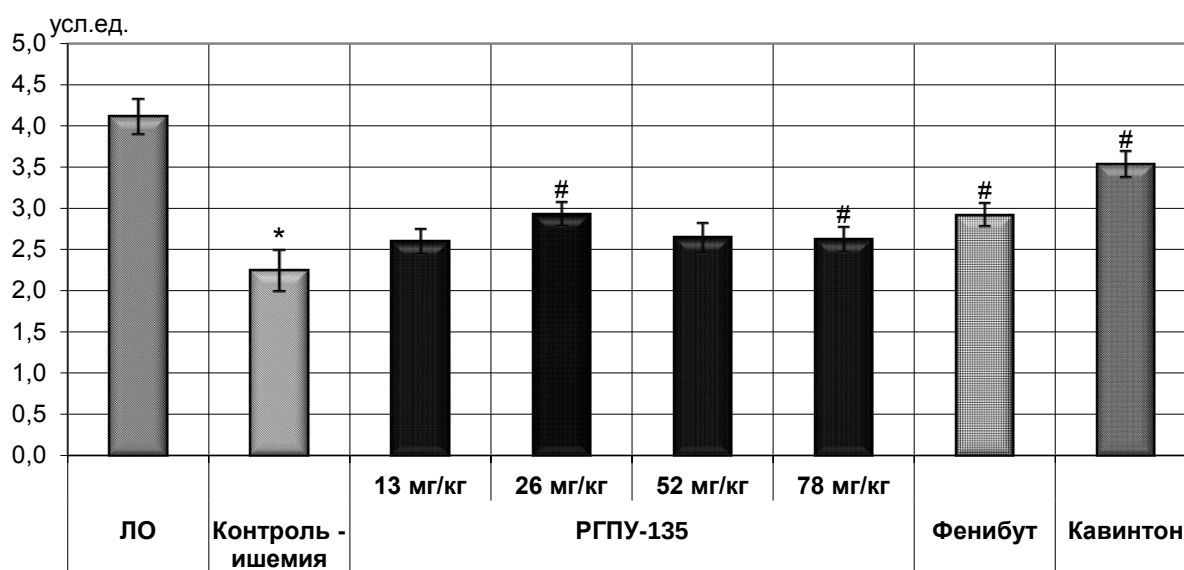


Рисунок 15. Уровень мозгового кровотока у животных через 72 часа после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий, получавших соединение РГПУ-135

*Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).*

Соединение РГПУ-195 в дозах 22 и 44 мг/кг обеспечивало сохранность мозгового кровотока после окклюзии ОСА на достаточно высоком уровне по сравнению с группой контроля (рис.16), а в дозе 44мг/кг его эффект был

сопоставим с препаратом сравнения – кавинтоном и превосходил таковой у соединения РГПУ-135 на 20,1% (табл.14).

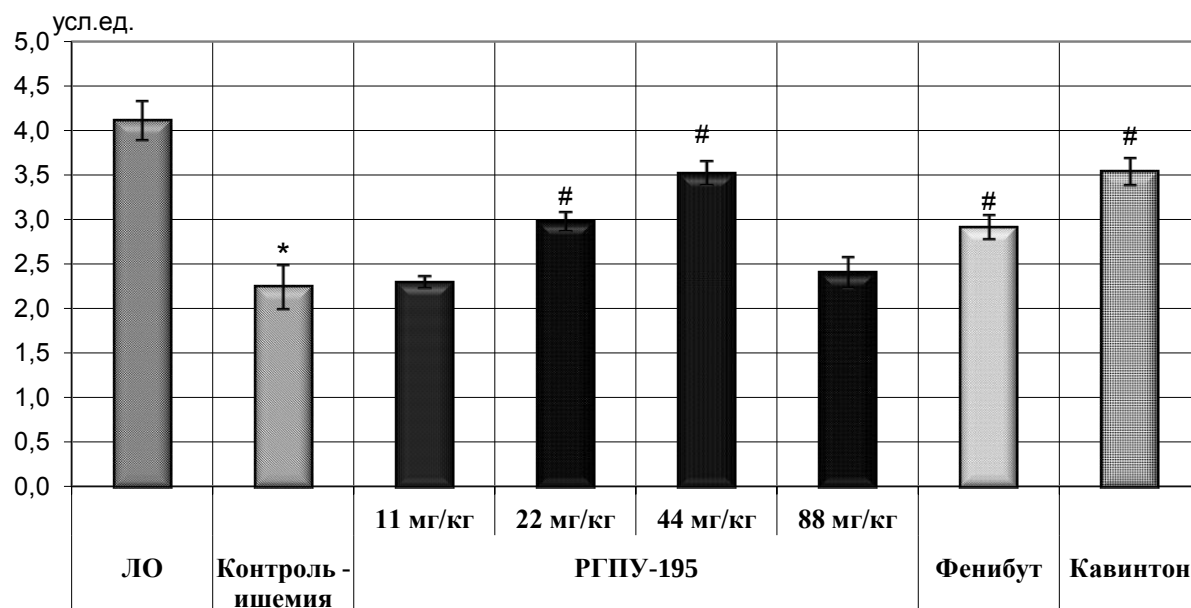


Рисунок 16. Уровень мозгового кровотока животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий, получавших соединение РГПУ-195

Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).

Состояние эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) мозговых сосудов оценивали по реакции на введение ацетилхолина. Об эндотелий-независимой вазодилатации (ЭНВД) судили по изменению кровотока после введения нитроглицерина.

По разнице между ЭЗВД и ЭНВД рассчитывали индекс ЭД по следующей формуле: $ЭД = [1 - ЭЗВД / ЭНВД]$. Данный показатель имеет относительное значение, и чем он ближе к 1, тем, соответственно, выше степень развития ЭД.

Таблица 14

ЭЗВД и ЭНВД, индекс эндотелиальной дисфункции у животных через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий

Группа	Доза, мг /кг	МК (у.е) исходный	Прирост кровотока (в %) на введение		Индекс ЭД	Количество ЦЭК (*10 ⁴ /л)
			ацетилхолина	нитроглицерина		
ЛО	-	4,11±0,21	28±2,6	39,9±3,6	0,27±0,07	2,9±0,6
Контроль-ишемия	-	2,25±0,24*	6±2,8*	38±2	0,84±0,07*	7,33±0,8*
РГПУ-135	13	2,59±0,15	6,81±1,28	35,3±2,0	0,8±0,04	7,11±0,96
	26	2,93±0,18#	21,8±1,28#	40±2,3	0,43±0,05#	4,23±0,38#
	52	2,64±0,18	8,4±2,2	36,1±2,0	0,75±0,07	5,42±0,67
	78	2,62±0,15	6,5±1,6	37,8±1,4	0,83±0,04	5,50±0,87
РГПУ-195	11	2,30±0,06	11,9±2,5	34,3±2,26	0,64±0,09	7,25±0,75
	22	2,98±0,11	22,1±1,8	37,4±2,0	0,40±0,06	4,83±0,75
	44	3,52±0,13#	25,4±2,9#	36,4±2,5	0,33±0,08#	3,71±0,42#
	88	2,40±0,16	11,0±2,27	37,6±2,5	0,71±0,06	6,00±0,41
Фенибут	25	2,92±0,13#	16±2,27	36±2,1	0,52±0,08	5,33±0,7
Кавинтон	3,2	3,54±0,15#	27,3±1,4#	37,9±1,5	0,3±0,03	4,13±0,4#

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

При оценке ЭЗВД путем введения ацетилхолина установлено, что прирост кровотока у крыс, получавших исследуемое соединение РГПУ -135 в дозе 26 мг/кг, фенибут и кавинтон, был более выраженный по сравнению с аналогичным у контрольных животных. В группах, получавших соединение РГПУ-135 в дозах 13 мг/кг, 52 мг/кг, 78 мг/кг и контрольной введение ацетилхолина вызывало значительно меньший прирост кровотока (табл.14). Такие данные, позволяют считать, что при необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий снижается синтез оксида азота и его выброс, стимулированный введением ацетилхолина.

У животных, получавших соединение РГПУ-195 в дозе 44мг/кг, прирост МК после введения ацетилхолина был наибольший и составил 25,4±2,9%. Эти данные превышали показатели групп животных, получавших фенибут и соединение РГПУ-135 (13-78 мг/кг), прирост МК в которых

составлял 16% и 6,81-21,8%, соответственно (табл.14). В группах, получавших соединение РГПУ-195 в дозах 11 и 88 мг/кг, прирост составил $11,9 \pm 2,5\%$ и $11,0 \pm 2,27\%$ соответственно и был лишь незначительно выше, чем у животных контрольной группы.

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

Показатели индекса ЭД были статистически значимо ниже у групп животных, получавших соединения РГПУ- 135 в дозе 26 мг/кг и РГПУ- 195 в дозах 22 и 44 мг/кг, чем у крыс контрольной группы и получавших фенибут. Наименьший индекс ЭД отмечен в экспериментальных группах, которым вводились соединения РГПУ-195 (44мг/кг) и препарат сравнения кавинтон (3,2 мг/кг). При введении фенибута различия не достигали статистической значимости по сравнению с группой контроля. При оценке ЭД в качестве её критерия широко используется подсчёт циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК), которые отражают степень повреждения эндотелия сосудов. Фенильное производное глутаминовой кислоты – РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (несколько в меньшей степени) и пиридиловое производное ГАМК – РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (в большей степени) способствовали достоверному снижению уровня ЦЭК по сравнению с показателями контрольной группы (табл.14), что может быть связано с их эндотелиопозитивным действием.

4.5. Выраженность отёка головного мозга у животных, получавших исследуемые соединения РГПУ-135 и РГПУ-195 в различных дозах, после необратимой окклюзии ОСА.

На фоне ишемии в результате повреждения эндотелия церебральных сосудов внеклеточного и внутриклеточного накопления ионов натрия, хлора и ацидоза развивается цитотоксический отёк, степень которого, нарастает в течение первых суток, что ухудшает течение НМК и требует своевременной коррекции (Яснецов В.В. и др., 1994; Литвинов А.А., 2015).

Так у животных, переживших 72 часа после моделирования патологии, выявлено увеличение накопления жидкости в мозговой ткани по сравнению с группой ЛО.

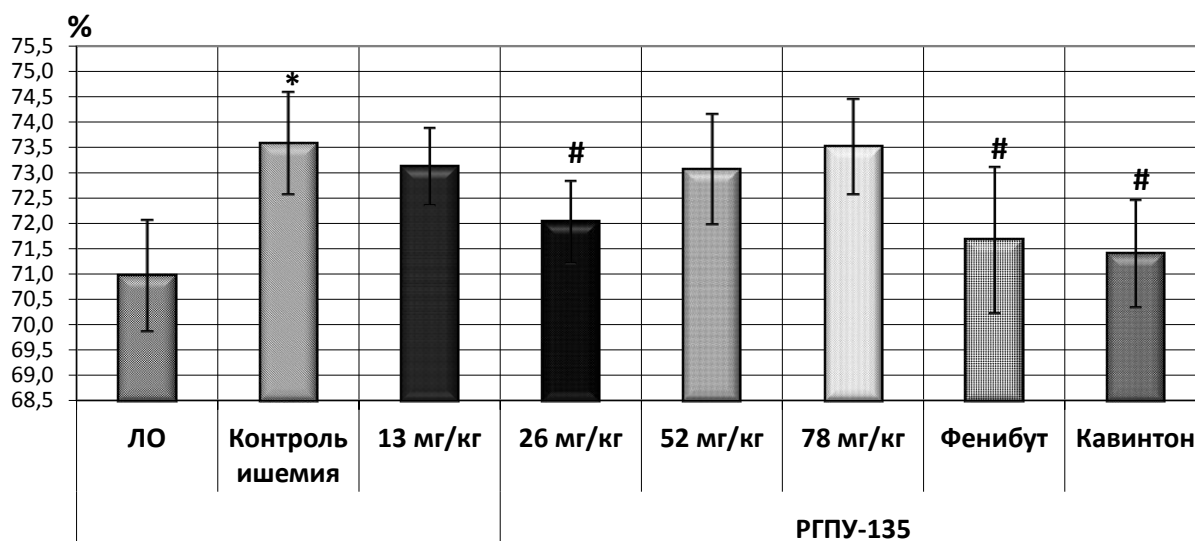


Рисунок 17. Процент гидратации мозга животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий, получавших соединение РГПУ-135 и препараты сравнения фенибут и кавинтон

*Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).*

При превентивном однократном введении исследуемого вещества РГПУ-135 только в дозе 26 мг/кг зафиксировано статистически значимое уменьшение отёка мозга. Однако оказываемый эффект был менее выражен, чем у препаратов сравнения (рис.17).

Процент гидратации головного мозга был достоверно меньше, чем у контроля и на фоне введения препарата РГПУ-195 в дозах 22 и 44 мг/кг (рис.18). Однако, однократное превентивное введение РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг оказывало наибольший защитный эффект относительно препаратов сравнения и соединения РГПУ-135.

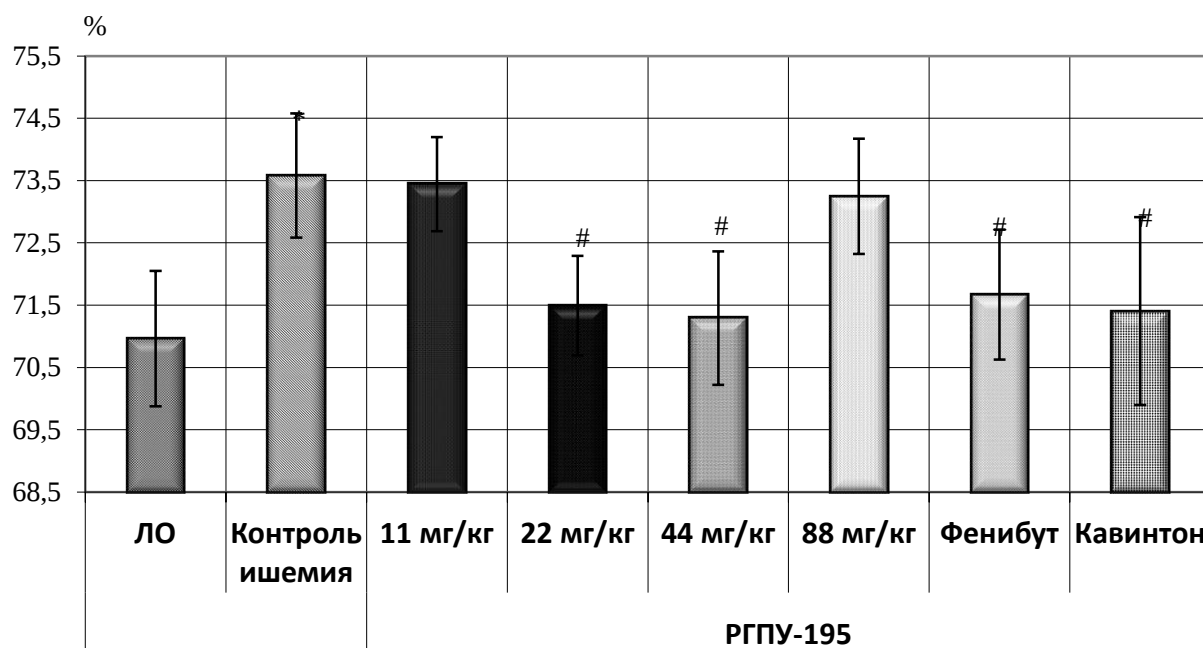


Рисунок 18. Процент гидратации мозга животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

*Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).*

Положительного влияния в исследуемых дозах 11, 88 мг/кг соединения РГПУ-195 на данный параметр не наблюдалось, и даже было сопоставимо со степенью выраженности отёка в группе контроль-ишемия.

4.6 Заключение

Таким образом, недостаточность мозгового кровообращения, вызванная одномоментной необратимой билатеральной окклюзией общих сонных артерий, сопровождается высокой смертностью животных, а у выживших крыс выраженным нарушением когнитивных функций и психоэмоционального состояния.

Оба исследуемых соединения оказывали доза-зависимое церебро-и эндотелипротекторное действие. При этом у соединения РГПУ-135 наиболее эффективной была доза 26 мг/кг, а у соединения РГПУ-195 – 44 мг/кг. Однако по совокупности показателей (выживаемости животных, психоневрологического дефицита, мозгового кровотока, эндотелийзависимой вазодилатации, числа десквамированных эндотелиоцитов, степени

гидратации мозговой ткани) профилактическое применение РГПУ-195 оказывало более выраженное церебро- и эндотелипротекторное действие, чем вещество РГПУ-135.

Поэтому для дальнейшего углубленного исследования было выбрано соединение РГПУ-195 (44 мг/кг), как наиболее перспективное для создания на его основе средства профилактики и лечения НМК.

ГЛАВА 5. Церебропротекторный эффект курсового лечебного введения производного ГАМК-РГПУ-195 при фокальной ишемии головного мозга и моделировании недостаточности половых гормонов у крыс на фоне эндотелиальной дисфункции.

Известно, что риск формирования сосудистых нарушений повышается у женщин с недостаточностью половых гормонов, а эндотелиальная дисфункция является её следствием. Снижение уровня и доступности оксида азота и окисление его до пероксинитрита являются существенными маркерами прогрессирования эндотелиальной дисфункции при гормональных патологиях различного генеза (Башкирова Ю.В. и др., 2008).

При церебральной ишемии на разных стадиях микроциркуляторно – клеточного каскада эндотелий претерпевает ряд существенных изменений: структурные повреждения, функциональные перестройки, приобретение гемостатических прокоагуляционных свойств, увеличение проницаемости его базальной мембраны и трансэндотелиальных контактов для нейтрофилов и жидкости на фоне угнетения абсорбции. Это способствует дальнейшему нарушению микроциркуляции, формированию цитотоксического отёка глии и нейронов, проникновению токсических веществ из сосудистого русла в мозговую ткань на фоне продолжающихся оксидативных и прокоагулянтных реакций, что приводит к гибели нейронов с формированием инфарктного очага (Белоусова М.А., 2015; Рябченко А.Ю., 2014). С учётом результатов, полученных на предыдущих этапах исследования, свидетельствующих о наличии церебропротекторных свойств у соединения РГПУ-195 при однократном профилактическом введении, целесообразно было провести углубленное изучение возможных механизмов церебро- и эндотелиопротекторного действия данного вещества при его курсовом лечебном введении животным, перенесшим фокальную ишемию на фоне гипоестрогенемии.

5.1. Влияние лечебного курсового введения соединения РГПУ-195 на неврологический статус животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов.

Учитывая ранее проведённые исследования на кафедре Фармакологии и биофармации ФУВ, в которых было показано, что экспериментальная недостаточность половых гормонов приводит к формированию эндотелиальной дисфункции, данная патология была выбрана как экспериментальная модель ЭД. Фокальную ишемию моделировали через 28 дней после операции овариоэктомии.

Для оценки неврологического статуса животных использовали шкалы Combs и Garcia. Оценка параметров двигательных тестов, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу, координацию движений и равновесие, осуществлялась через 1, 3 и 7 суток после моделирования ФИМ, мелкая моторика в «тесте-лестница» до моделирования и на 7 сутки после. Когнитивные и поведенческие нарушения регистрировали по результатам тестов «Открытое поле», «ТЭИ» и «УРПИ».

У крыс после моделирования ФИМ, наблюдалось снижение балла по шкале Combs, что свидетельствует о развитии неврологического дефицита. На 3 сутки после моделирования патологии, наиболее выраженные неврологические нарушения наблюдались у группы контроль-ишемия $1,75 \pm 0,18$ балла, этот же показатель в группе ЛО был $7,50 \pm 0,23$. Лечебное введение исследуемых соединений снижало тяжесть неврологического дефицита к 3 суткам, указанные различия были достоверны по отношению к группе контроль-ишемия ($p < 0,05$). К 7 суткам после ФИМ во всех анализируемых группах было отмечено улучшение неврологического статуса. Однако, у животных, получавших соединение РГПУ-195, нарушения были менее выражены, чем у крыс контрольной группы. Важно отметить, что данные были статистически значимо выше, чем и у животных, получавших препараты сравнения – фенибут и кавинтон. (табл.15).

Таблица 15

Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs у животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга на фоне НПГ (n=12)

Группа	1 сутки	3 сутки	7 сутки
ЛО	3,75±0,39	7,50±0,23	8,42±0,19
Контроль-ишемия	2,17±0,41	1,75±0,18	2,25±0,41
РГПУ-195 44 мг/кг	3,50±0,29*	5,17±0,42*	6,50±0,29*
Фенибут 25 мг/кг	2,33±0,26	2,58±0,19	2,67±0,36
Кавинтон 3,2 мг/кг	2,67±0,36	3,58±0,29*	4,58±0,23*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия*

Шкала оценки неврологического дефицита по Garcia позволяет оценить асимметрию движений и реакции животных. Как видно из полученных данных (табл. 16), на фоне лечебного введения исследуемого вещества, неврологический дефицит у крыс, получавших соединение РГПУ 195, был менее выражен, чем в группах контроля и у животных, получавших препараты сравнения.

Таблица 16

Выраженность неврологического дефицита по шкале Garcia у животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне НПГ

группа	1 сутки	3 сутки	7 сутки
ЛО	15,92±0,38	17,67±0,14	17,75±0,13
контроль-ишемия	6,50±0,53	8,67±0,72	11,00±0,49
РГПУ-195 44 мг/кг	10,33±0,56	13,33±0,41*	15,67±0,36*
Фенибут 25 мг/кг	7,33±0,59	10±0,33	12,83±0,44*
Кавинтон 3,2 мг/кг	8,33±0,50	11,33±0,36*	13,50±0,29*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия*

Таким образом, к 3-м суткам отмечалось повышение показателей по суммированным баллам во всех исследуемых группах. Тем не менее, в

группе контроль-ишемия он был наименьшим и составил $8,67 \pm 0,72$ к 3-м и $11,00 \pm 0,49$ к 7-м суткам наблюдений. В результате полученных данных можно утверждать, что ФИМ приводит к нарушению симметрии движений у крыс.

У животных, получавших соединение РГПУ-195 через 3 дня после ФИМ, балл по шкале Garcia составили $13,33 \pm 0,41$, что превышает показатели в группах препаратов сравнения. К 7 суткам эксперимента данные показатели возросли и достигли в группе, получавшей вещество РГПУ-195, $15,67 \pm 0,36$ балла, что статистически значимо отличалось от показателей животных, получавших физиологический раствор ($p < 0,05$) и превышало показатели в группах с препаратами сравнения. Так у крыс, получавших фенибут, балл составил $12,83 \pm 0,44$, а кавинтон – $13,50 \pm 0,29$.

5.2. Влияние лечебного курсового введения соединения РГПУ-195 на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.

5.2.1 Влияние лечебного курсового введения соединения ГАМК – РГПУ-195 на сенсомоторный дефицит после ФИМ у овариоэктомированных животных в тесте «сужающаяся дорожка» или «Balance-beam test».

В ранее проведенных работах было показано, что при моделировании ФИМ происходит формирование моторных нарушений (Литвинов А.А., 2015). Для оценки данного состояния проводился тест «сужающаяся дорожка», позволяющий оценить у животных с унилатеральным повреждением головного мозга тяжесть асимметричных моторных нарушений.

К 3 суткам после моделируемой фокальной ишемии процент асимметрии на широкой части дорожки был наиболее высоким в группе контроль-ишемия и составил $20,4 \pm 2,8$. По мере сужения дорожки эти данные возрастали и составили $24,8 \pm 2,4$ на средней части и $53,8 \pm 3,0$ на узкой части

дорожки. Процент асимметрии на широкой части планки был достоверно ниже, по отношению к контрольной группе, у животных, получавших соединение РГПУ-195, и составили $7,9 \pm 1,8$. На среднем анализируемом участке процент асимметрии снизился и был значительно меньше, чем в группах животных, получавших препараты сравнения. На узкой части показатели во всех группах были достоверно ниже, по отношению к группе контроля. Введение соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг приводило к результату сопоставимому с препаратом сравнения - кавинтоном, что говорит о лучшем функциональном состоянии сенсомоторной функции у животных, получающих после ФИМ исследуемое вещество (табл. 17).

Таблица 17

Процент асимметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 3 суток после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне овариэктомии у крыс при лечебном курсовом введении исследуемого соединения (n-12)

группа	Широкая часть	Средняя часть	Узкая часть
ЛО	$-1,4 \pm 1,0 \%$	$-2,2 \pm 0,8 \%$	$-0,88 \pm 1,25 \%$
контроль-ишемия	$20,4 \pm 2,8 \%$	$24,8 \pm 2,4 \%$	$53,77 \pm 3,0 \%$
РГПУ-195 44 мг/кг	$7,9 \pm 1,8 \%^*$	$12,6 \pm 1,9 \%^*$	$32,03 \pm 2,19 \%^*$
Фенибут 25 мг/кг	$14,9 \pm 1,6 \%$	$15,9 \pm 2,6 \%$	$37,21 \pm 3,63 \%^*$
Кавинтон 3,2 мг/кг	$11,1 \pm 1,9 \%^*$	$17,9 \pm 2,7 \%$	$31,83 \pm 3,37 \%^*$

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия*

К 7 суткам после окклюзии средней мозговой артерии в группе контроль-ишемия отмечался высокий процент асимметрии, который составил $25,0 \pm 3,6$ на широком участке дорожки. В дальнейшем показатель только возрастал и на среднем участке составил $30,0 \pm 25,7$, а на узком уже $47,3 \pm 3,74$. Эти результаты свидетельствуют о значительном нарушении двигательной функций животных и координации движений. Процент асимметрии возрос во всех группах животных. На более сложном, узком

участке дорожки, у крыс, получавших РГПУ-195 и кавинтон, показатель был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 18).

Таблица 18

Процент асимметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 7 суток после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне овариоэктомии у крыс при лечебном курсовом введении исследуемых соединений (n=12)

группа	Широкая часть	Средняя часть	Узкая часть
ЛО	-0,2±1,2 %	-1,8±0,6 %	-0,73±1,04 %
контроль-ишемия	25,0±3,6 %	30,0±25,7 %	47,3±3,74 %
РГПУ-195, 44 мг/кг	11,9±1,3 %*	11,4±2,1 %*	23,77±3,27 %*
Фенибут 25 мг/кг	18,0±2,4 %	14,9±1,9 %*	35,06±3,63 %*
Кавинтон 3,2 мг/кг	14,1±1,9 %*	15,8±2,4 %*	24,32±3,49 %*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия*

Таким образом, полученные в этой серии экспериментов данные, позволяют сделать вывод, что введение после ФИМ исследуемого соединения РГПУ-195, кавинтона и, в меньшей степени, фенибута приводило к уменьшению неврологического дефицита, асимметрии, улучшению моторной функции, т.е. к меньшему поражению головного мозга после ФИМ.

5.2.2. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на сенсомоторный дефицит после ФИМ у овариоэктомизированных животных в тесте «Staircase test» (Montoya и др., 1991).

Проведение лестничного теста позволило оценить нарушения мелкой моторики передних конечностей у овариоэктомизированных животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга.

На 3 день обучения количество собранных зерен левой и правой передней конечностью были сопоставимы во всех исследуемых группах. Через 7 суток после воспроизведения ФИМ у животных контрольной группы отмечалось значительное снижение количества (до 5,10±1,66) собранных зёрен правой конечностью. На фоне введения исследуемого соединения

РГПУ-195, кавинтона и фенибута эти значения были достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$), что говорит о менее выраженном моторном нарушении у животных, которым после ФИМ вводились указанные вещества (табл.19).

Таблица 19

Количество зерен, собранных животными в тесте «Staircase-test» после моделирования фокальной ишемии мозга у овариоэктомированных крыс (n=12)

Группы	Исход		7 сутки после ФИМ	
	ИЛ	КЛ	ИЛ	КЛ
ЛО	13,3±1,4	13,6±2,0	13,1±1,37	13,1±2,33
контроль-ишемия	13,2±2,0	14,1±1,7	11,1±2,33	5,10±1,66
РГПУ-195 44 мг/кг	13,4±1,4	14,1±1,9	13,4±1,43	10,3±1,34*
Фенибут 25 мг/кг	12,9±1,4	14,1±2,0	12,9±1,37	8,70±2,11*
Кавинтон 3,2 мг/кг	13,7±1,2	13,8±1,5	13,7±1,16	9,70±2,71*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия, ИЛ-ипсилатеральная. КЛ-контрлатеральная*

Исходя из изложенного, можно сделать вывод о том, что исследуемое соединение при лечебном введении существенно предотвращает развитие сенсомоторного дефицита, что свидетельствует о церебропротекторном действии, сопоставимом с препаратами сравнения.

5.3. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на поведенческий статус животных, перенёвших фокальную ишемию головного мозга.

Для оценки двигательной и ориентировочно – исследовательской активности животных с фокальной ишемией головного мозга на фоне овариоэктомии был использован тест «открытое поле», адаптацию к которому проводили до моделирования НПГ, воспроизведение 1 и 2– за сутки до ФИМ и на 7 сутки после неё.

На 7 сутки, после проведённой окклюзии средней мозговой артерии, показатели двигательной активности животных контроль-ишемия снизились с $19,5 \pm 1,2$ до $8,9 \pm 1,7$. На фоне лечебного введения соединения РГПУ-195, кавинтона и фенибута двигательная активность, была статистически значимо выше относительно группы контроля – $17,0 \pm 1,6$, $16,6 \pm 2,0$ и $13,3 \pm 1,0$, соответственно (табл. 20).

Таблица 20

Показатели двигательной активности после фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных животных в тесте «Открытое поле» на фоне курсового лечебного введения исследуемых соединений

Группа	Обучение (адаптация к манежу)	1 сутки до ФИМ	7 сутки после ФИМ
ЛО	$27,5 \pm 1,6$	$21,0 \pm 0,7$	$20,3 \pm 0,7$
контроль-ишемия	$28,3 \pm 1,0$	$19,5 \pm 1,2$	$8,9 \pm 1,7$
РГПУ-195 44 мг/кг	$27,3 \pm 1,8$	$20,1 \pm 1,2$	$17,0 \pm 1,6^*$
Фенибут 25 мг/кг	$27,3 \pm 1,9$	$18,1 \pm 0,7$	$13,3 \pm 1,0^*$
Кавинтон 3,2 мг/кг	$25,3 \pm 1,7$	$19,4 \pm 1,0$	$16,6 \pm 2,0^*$

Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия

Ориентировочно-исследовательская активность животных после овариоэктомии снизилась, но во всех группах она была сопоставима и не имела достоверных отличий (табл.21). Однако, на 7 сутки после моделирования фокальной ишемии в группе контроль – ишемия ОИА снизилась до $6,8 \pm 0,7$. Что касается других животных, столь значительного снижения показателей не отмечалось. Так в группе, получавшей кавинтон в дозе 3,2 мг/кг, этот показатель был $10,8 \pm 0,8$, фенибут (25 мг/кг) – $9,5 \pm 0,7$, соединение РГПУ-195 – $11,1 \pm 0,7$, что статистически значимо превышает показатели животных контрольной группы при $p < 0,05$ (табл. 21).

Таблица 21

**Показатели ориентировочно-исследовательской активности после
фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных
животных в тесте «Открытое поле» на фоне курсового лечебного
введения исследуемых соединений (n=12)**

группа	Обучение (адаптация к манежу)	1 сутки до ФИМ	7 суток после ФИМ
ЛО	17,0±0,7	12,1±1	14,8±1,1
контроль-ишемия	16,2±1,0	12,2±0,9	6,8±0,7
РГПУ-195 44 мг/кг	17,1±0,9	13,8±1	11,1±0,7*
Фенибут 25 мг/кг	16,6±0,7	12,3±0,8	9,5±0,7*
Кавинтон 3,2 мг/кг	16,1±0,7	13,2±0,7	10,8±0,8*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, ФИМ – животные с фокальной ишемией головного мозга; * – $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия*

Исходя из вышеизложенного, на фоне лечебного введения исследуемого вещества, отмечается положительная динамика в восстановлении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у овариоэктомированных животных с фокальной ишемией.

**5.4. Влияние курсового лечебного введения исследуемого
соединения РГПУ-195 на мнестический статус овариоэктомированных
животных после фокальной ишемии головного мозга.**

В тесте УРПИ при анализе полученных данных до и через 7 дней после моделирования фокальной ишемии головного мозга, у животных отмечалось ухудшение памяти по сравнению с группой ЛО, в которой все крысы запомнили болевое раздражение в тёмном отсеке установки и повторно в него не заходили. В группе контроль-ишемия процент, зашедших в тёмный отсек, был равен 41,7 (табл.22). Сохранность памятного следа была лучше у крыс в группе РГПУ-195, при этом процент животных, зашедших в тёмный отсек, составил 16,7%, а ЛП захода в тёмный отсек был статистически значимо больше, чем у животных контрольной группы. Введение

исследуемого соединения РГПУ-195 при фокальной ишемии головного мозга способствовало лучшему воспроизведению навыка пассивного избегания в тесте УРПИ, что свидетельствует о положительном его влиянии на сохранность памятного следа у крыс с НПГ (рис.20).

Таблица 22

Количество животных, зашедших в темный отсек в тесте УРПИ во время обучения и через 7 дней после моделирования фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомизированных животных при курсовом лечебном введении исследуемых соединений (n=12)

группы	обучение		7 день	
	N/n	%	N/n	%
ЛО	12/ 12	100	0 / 12	-
контроль-ишемия	12/ 12	100	5/12	41,7
РГПУ-195 44 мг/кг	12/ 12	100	2/12	16,7
Фенибут 25 мг/кг	12/ 12	100	4/12	33,3
Кавинтон 3,2 мг/кг	12/ 12	100	3/12	25

Примечание: N-число животных, зашедших в темный отсек; n – число животных в группе; ЛО-ложнооперированные животные;

В тесте ТЭИ скорость решения экстраполяционной задачи (ЛП подныривания) у животных с ФИМ на 7 сутки после операции была втрое больше, чем у крыс группы ЛО. При ишемическом повреждении головного мозга уменьшение ЛП подныривания при воспроизведении навыка отмечалось во всех исследуемых группах (рис.19).

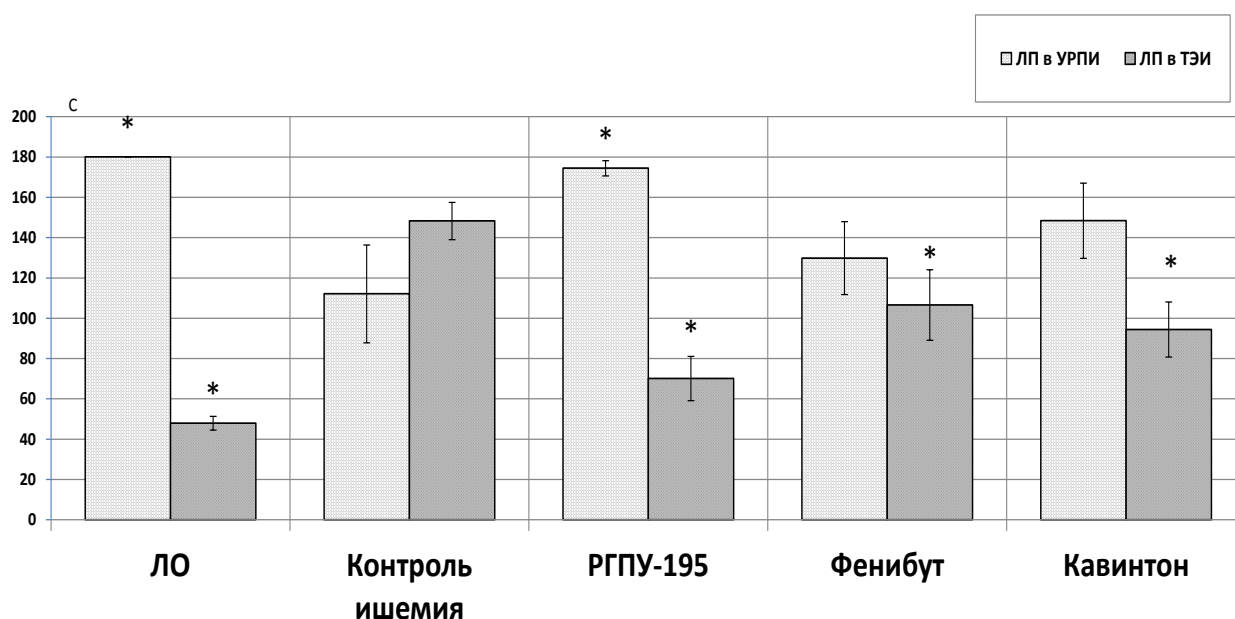


Рисунок 19. Время (с) решения экстраполяционной задачи в ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в УРПИ овариозэктомированных животных на 7 день после моделирования фокальной ишемии головного мозга.

*Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).*

Скорость решения экстраполяционной задачи была достоверно выше в группах животных, получавших препараты сравнения относительно контроля. При введении кавинтона крысам среднее время по решению задачи составило $94,4 \pm 13,7$ секунд, а в группе, получавшей фенибут $106,6 \pm 17,5$ секунд. Следует отметить, что наименьшее время решения задачи наблюдалось при введении соединения РГПУ-195, что было быстрее по сравнению с группами, получавшими кавинтон и фенибут.

В результате проведённых исследований можно отметить положительное влияние соединения РГПУ-195 на течение постинсультного периода, что проявлялось в более высоких показателях двигательной, исследовательской активности и сохранности памятного следа. По церебропротекторному действию соединение РГПУ-195 превосходило препараты сравнения кавинтон и в ещё большей степени фенибут.

5.5. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на МК и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у овариэктомированных животных, перенесших фокальную ишемию головного мозга.

Эндотелий выполняет ключевую роль в регуляции тонуса и роста сосудов, гемостаза, воспаления, пролиферации и т.д. Решающую роль при этом играет образующийся в эндотелии оксид азота (NO), которому отводится ведущее место в патогенезе эндотелиальной дисфункции.

Блокада и активация синтеза эндогенного оксида азота влияют на тонус сосудов, что в свою очередь, повышает или наоборот снижает скорость кровотока (Garry P.S. et al., 2015). Маркером эндотелиальной дисфункции является ослабление сосудорасширяющей реакции на введение ацетилхолина или ее извращение. Сопоставляя полученные данные об эндотелиозависимой вазодилатации у животных разных групп, мы можем судить о выраженности эндотелиальной дисфункции.

Изучение мозгового кровотока было выполнено в условиях активации синтеза эндогенного оксида азота при введении ацетилхолина и при блокаде синтеза эндогенного оксида азота с помощью нитро-L-аргинина.

В ходе проведённого исследования исходный уровень церебрального кровотока в группах животных с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов и ФИМ был достоверно ниже ($p < 0,05$), чем у ЛО. У крыс, которым вводили соединение РГПУ-195, МК превышал показатели группы контроль-ишемия и препаратов сравнения (рис. 20).

На следующем этапе вводился ацетилхолин как активатор синтеза эндогенного оксида азота, при этом определялась степень изменения скорости кровотока в мозге. Затем животному внутривенно вводился блокатор NO-синтазы – нитро-L-аргинин и регистрировались изменения кровотока, по отношению к исходному. Эндотелийнезависимая вазодилатация была оценена с помощью введения нитроглицерина.

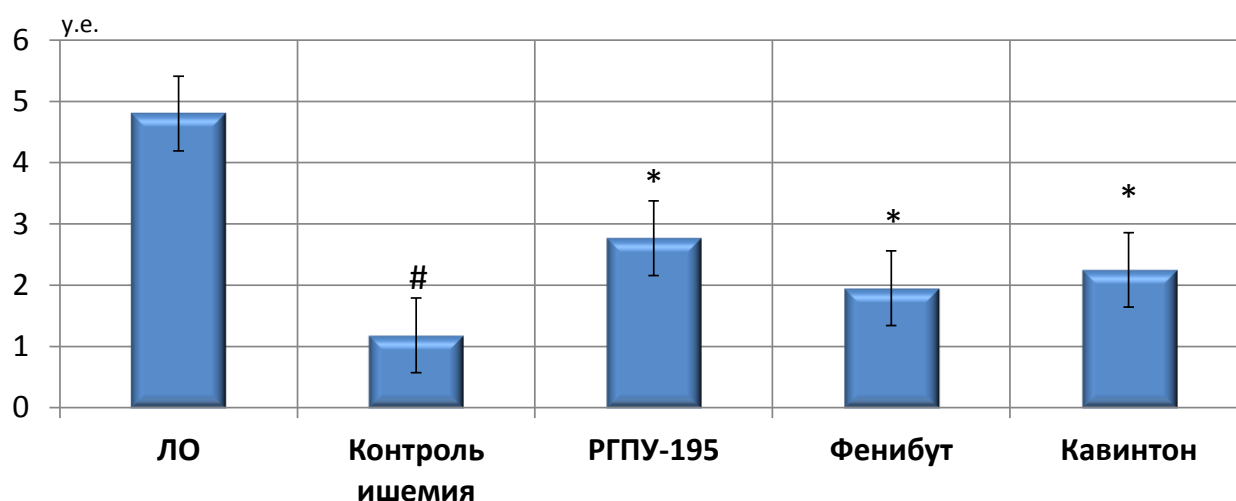


Рисунок 20. Уровень мозгового кровотока после фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс, получавших исследуемые вещества

Примечание: ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$), # – различия достоверны в сравнении с группой ЛО

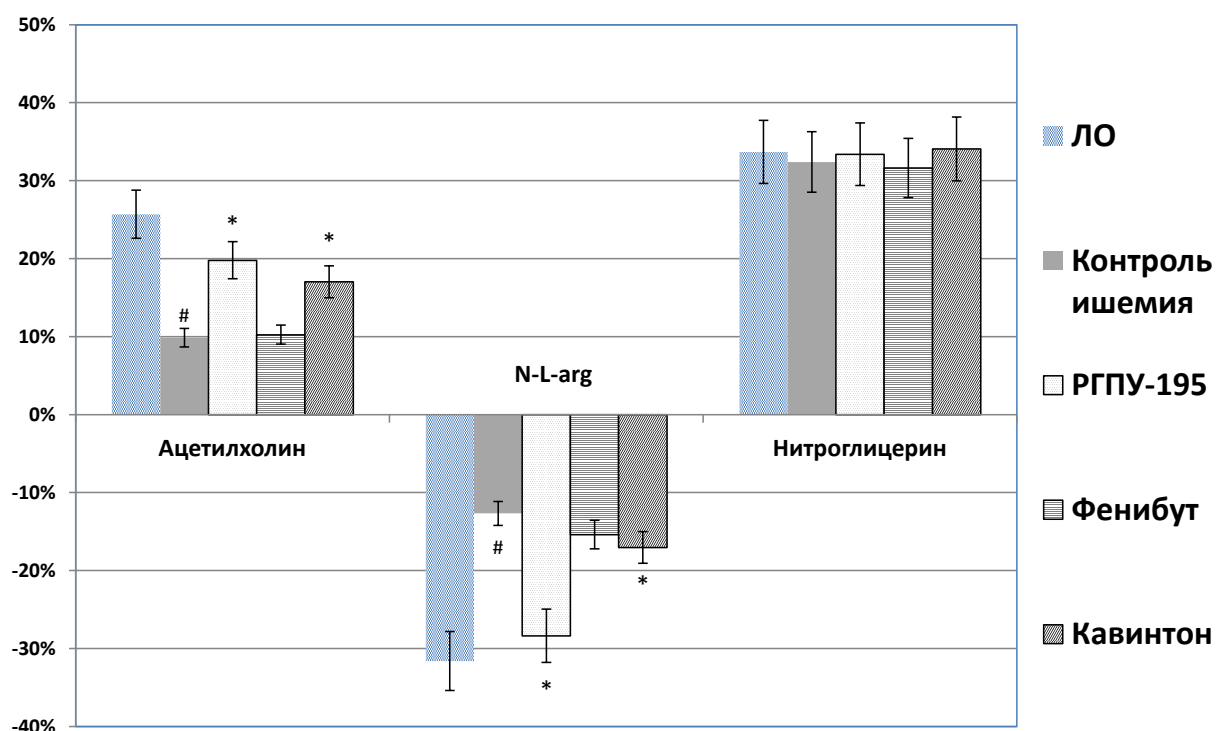


Рисунок 21. Изменение уровня мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза оксида азота после фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

Примечания: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО

Так, у животных в группе контроль-ишемия отмечается статистически значимо меньшая реакция на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина,

чем у ЛО крыс, тогда как реакция на нитроглицерин практически не отличается во всех исследуемых группах (рис. 21).

У животных, получавших соединение РГПУ-195 сосудистая реакция в ответ на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина была достоверно выше, чем в группе контроль-ишемия, что свидетельствует о более высокой базальной и стимулируемой продукции оксида азота и, соответственно, менее выраженной эндотелиальной дисфункции на фоне введения исследуемого соединения.

По ранее проведённым работам известно, что при недостаточности половых гормонов существенно снижается выработка оксида азота (Тюренков И.Н. и др., 2009), а уменьшение сосудорасширяющей реакции сосудов на ацетилхолин свидетельствует о ЭД. По полученным данным, можно говорить о менее выраженной дисфункции эндотелия и ее возможной коррекцию соединением РГПУ-195.

5.6 Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на выраженность постишемического отека мозга у овариоэктомированных животных после фокальной ишемии головного мозга.

Важно отметить, что нарушение мозгового кровообращения может вызывать отёк мозга, который в свою очередь оказывает существенное влияние на мозговое кровообращение и прогноз развития заболевания в условиях развивающейся ишемии. Являясь самостоятельным звеном патогенеза, формирование отёка головного мозга приводит к ухудшению прогноза в постинсультном периоде.

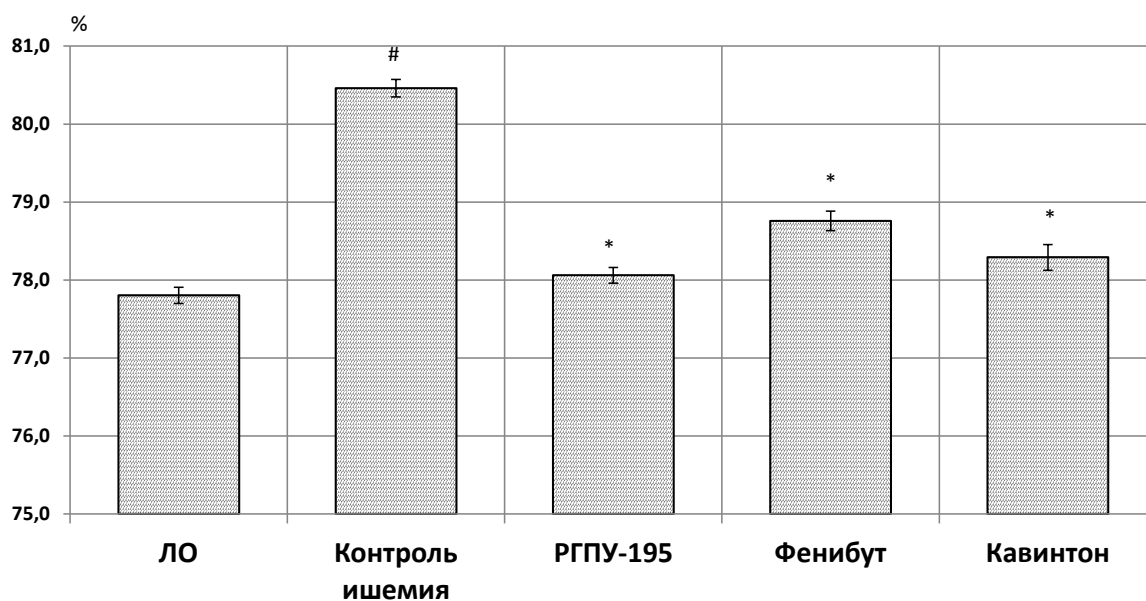


Рисунок 22. Процент гидратации мозга после ФИМ у овариэктомированных животных

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой ЛО.*

Фармакологическая профилактика или коррекция мозгового отёка является важной задачей современной медицины (Яснецов В.В. и др., 1994, Vakili A. et al., 2011).

В группе контроля было отмечено наибольшее накопление жидкости в мозговой ткани. У животных, получавших соединения РГПУ-195 и кавинтон, процент гидратации мозговой ткани был сопоставим с группой ЛО и достоверно менее выражен относительно группы контроля, что свидетельствует о меньшем отёке мозговой ткани (рис.22).

5.7. Влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 на потребление головным мозгом глюкозы, содержание продуктов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной системы у овариэктомированных животных, перенёсших фокальную ишемию головного мозга.

Одной из последовательных стадий клеточного каскада при острой церебральной ишемии являются метаболические изменения головного мозга,

ухудшающие его энергетический и углеводный метаболизм, активирующие перекисное окисление липидов, а также уменьшающие активность антиоксидантных систем. В связи с этим как вероятный механизм цереброрепротекторного действия РГПУ-195 было рассмотрено его влияние на указанные параметры.

5.7.1. Влияние соединения РГПУ-195 на утилизацию глюкозы мозговой тканью после фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных животных.

Состояние головного мозга в условиях его нарушенного кровообращения сопровождается снижением потребления глюкозы тканью мозга, активацией ПОЛ, что усугубляет негативное влияние ишемии (Pascual J.M. et al., 2001; Гусев Е.И. и др., 2001). Поэтому на данном этапе исследования мы определяли влияние соединения РГПУ-195 на утилизацию глюкозы мозгом у животных с ФИМ. У животных забиралась артериальная кровь из сонной артерии и из венозного сагиттального синуса. По артериовенозной разнице рассчитывали утилизацию глюкозы мозгом.

У животных с ФИМ отмечалось значительное уменьшение разницы между концентрацией глюкозы в артериальной и венозной крови, что свидетельствует о нарушении её утилизации.

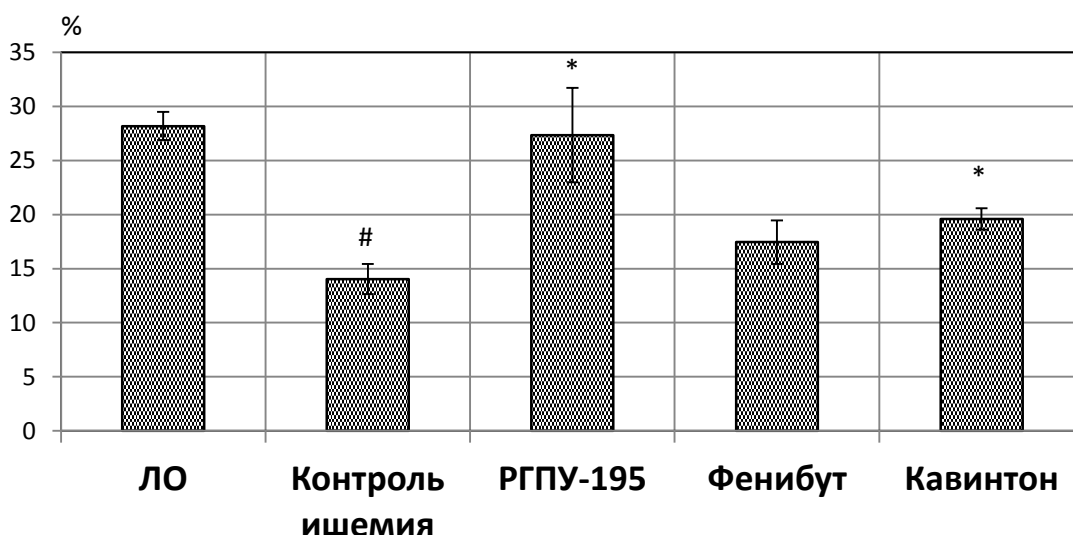


Рисунок 23. Утилизация глюкозы мозговой тканью (%) после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных животных.

*Примечания: ЛО- ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия, # – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$).*

На фоне лечебного введения соединения РГПУ-195 и препарата сравнения – кавинтона процент утилизации глюкозы мозговой тканью был статистически более высокий, чем в группе контроля, что может способствовать лучшей трофики головного мозга (рис.23). У крыс, получавших препарат сравнения фенибут, процент утилизации глюкозы был несколько выше, чем у животных в группе контроля, однако, данные изменения не достигали уровня статистической значимости.

5.7.2. Влияние соединения РГПУ-195 на выраженность процессов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов после фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных животных.

Доказано, что активация свободнорадикальных процессов, приводящая к интенсификации перекисного окисления липидов, так же является одним из ключевых механизмов повреждения головного мозга при острой ишемии и реперфузии (Викторов И.В., 2000; Ланкин В.З. и др., 2001). Даже на ранних стадиях ишемического повреждения происходит повышенное образование продуктов ПОЛ. Так у животных в группах контроля и, получавших

исследуемые вещества, наблюдалось снижение активности основных ферментов антиоксидантной системы.

Накопление и увеличение концентрации ТБК – активных продуктов в плазме крови в большей степени отмечалось в группе контроля и было на 52,7% больше, чем группе ЛО. На фоне лечебного действия соединения РГПУ-195, фенибута и кавинтона концентрация ТБК-активных продуктов была на 29,5%, 19, 24,3% меньше, чем у животных контрольной группы (рис. 24).

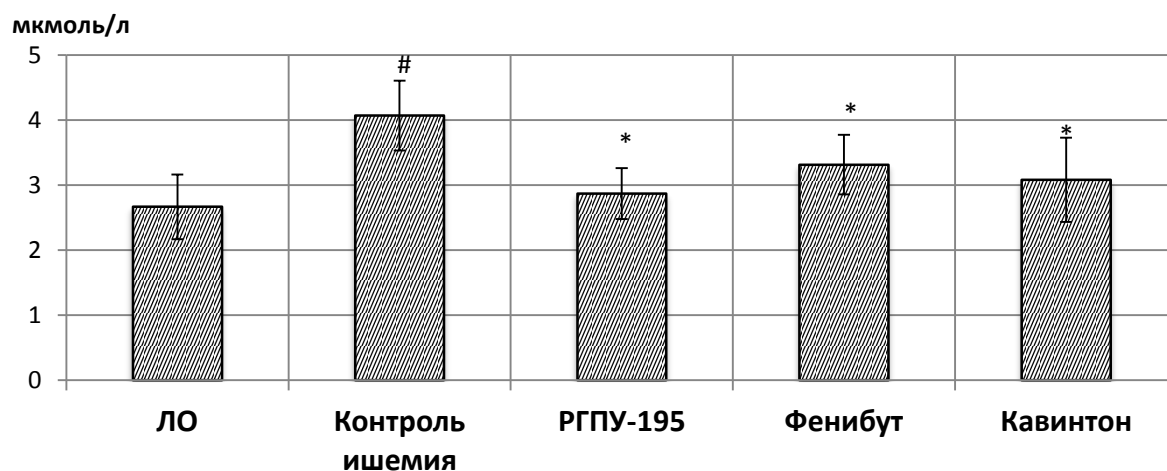


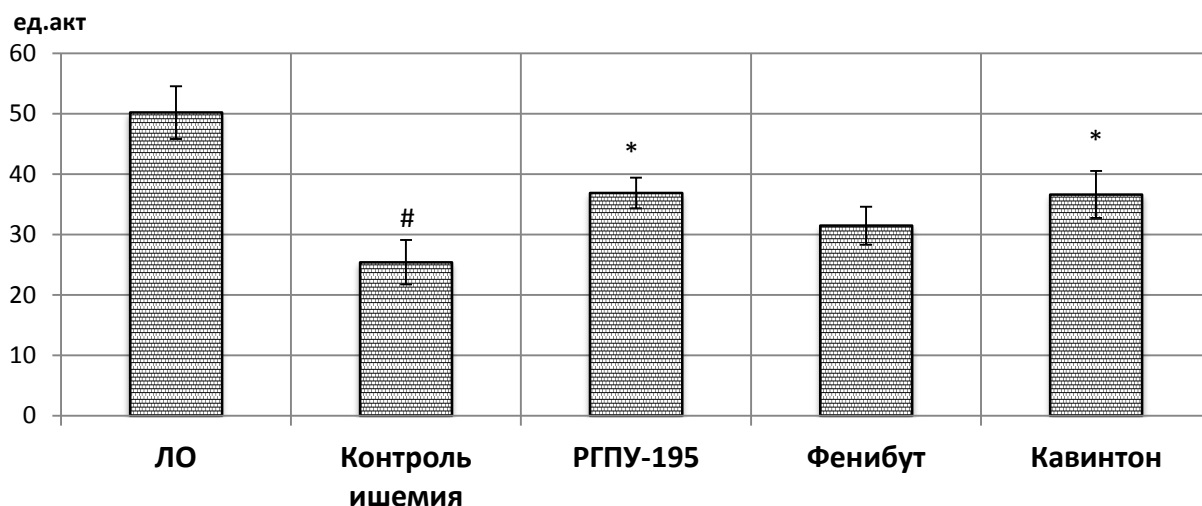
Рисунок 24. Концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

Введение исследуемых соединений статистически значимо повышало уровень СОД при ишемии головного мозга. Так её концентрация в группах получавших соединение РГПУ-195, фенибут и кавинтон составила $36,87 \pm 2,53$, $31,45 \pm 3,14$ и $36,63 \pm 3,88$ соответственно (рис.25-А), а в группе контроля - $25,4 \pm 3,68$.

Активность каталазы у животных с ФИМ во всех исследуемых группах была сопоставима (рис.25-Б).

А



Б

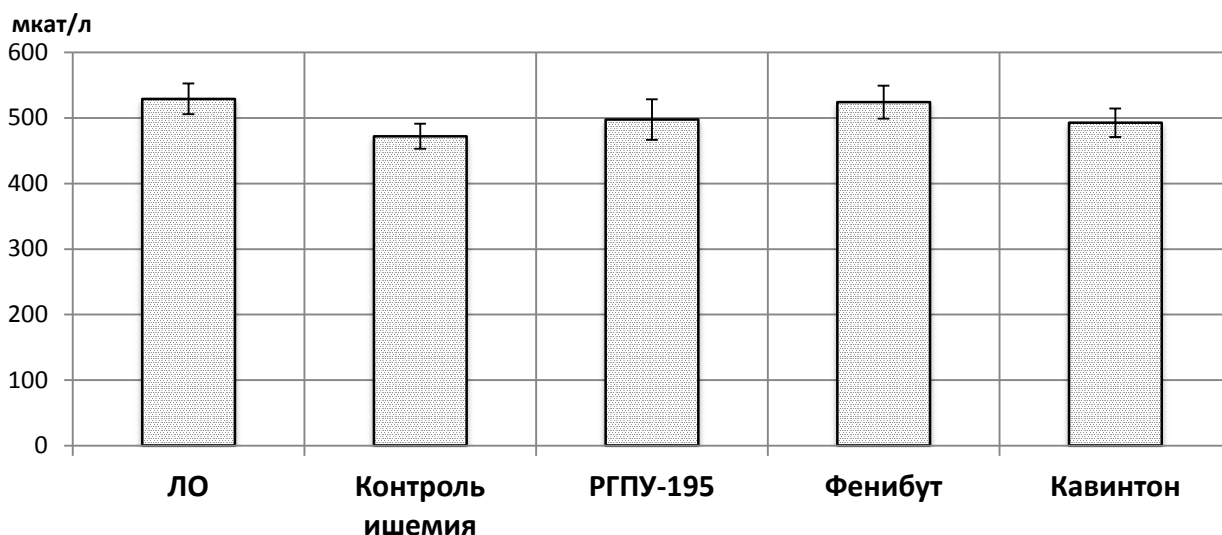


Рисунок 25. Активность СОД (ед. акт.) (А) и каталазы (мкат/л) (Б) у животных с фокальной ишемией головного мозга, получавших в течение 7 дней соединение РГПУ-195 и препараты сравнения.

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

5.8. Изучение влияния введения соединения РГПУ-195 на плазменный и тромбоцитарный компонент гемостаза при фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

В патогенезе ишемии головного мозга важную роль играет нарушение сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза.

Известно, что при нормальных физиологических условиях существует равновесие между системой коагуляции и антисвёртывающими факторами. Однако повреждение сосуда и, как следствие, нарушение целостности эндотелия запускает комплексную гемостатическую реакцию, которая, разделяется на первичную и вторичную. При первичном гемостазе повреждение сосудов вызывает: 1) вазоспазм; 2) нарушение целостности эндотелия с обнажением субэндотелиального коллагена, что приводит к адгезии тромбоцитов при участии фактора фон Виллебранда; 3) активации и агрегации тромбоцитов, в результате которой образуется тромб. При вторичном гемостазе вследствие одновременного обнажения субэндотелиального тканевого фактора активируется коагуляционный каскад с формированием гемостатического фибринового тромба.

Учитывая важность этих факторов в обеспечении гемореологии, свёртываемости крови и кровотока, целесообразно было изучить влияние исследуемых веществ на показатели системы гемостаза после моделирования фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.

5.8.1. Влияние соединения РГПУ-195 на тромбоцитарный компонент гемостаза после фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных животных.

В условиях фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов происходило повышение агрегации тромбоцитов, которое проявлялось в статистически значимом увеличении степени агрегации тромбоцитов на 61% ($p < 0,05$) и скорости агрегации тромбоцитов на 58% в контрольной группе ($p < 0,05$) по сравнению с ЛО (рис.26)

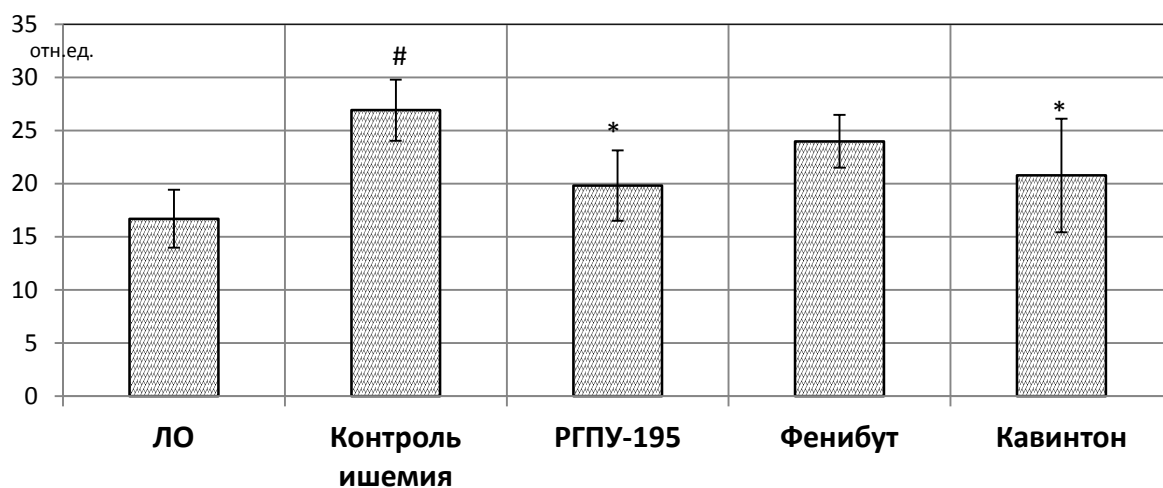
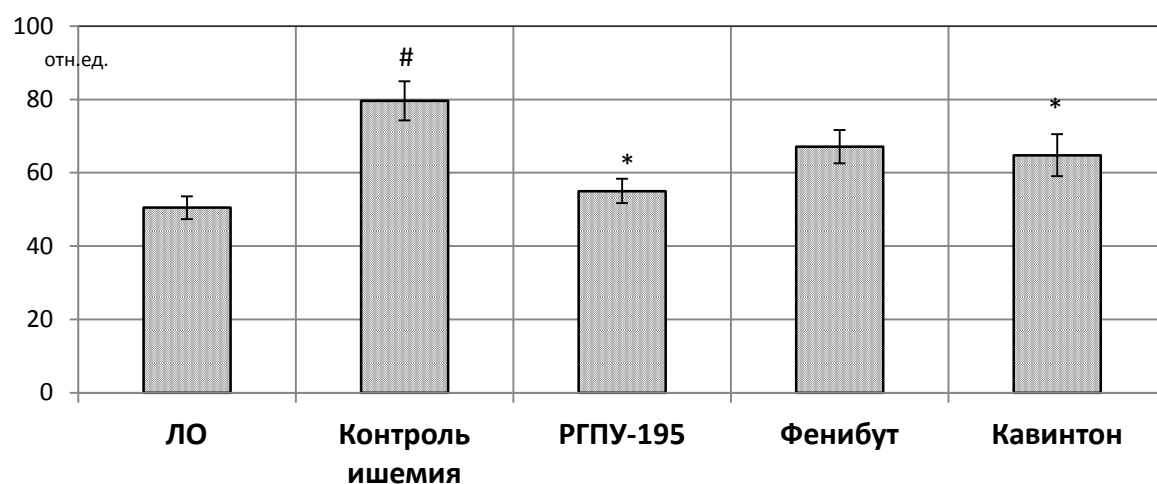
А**Б**

Рисунок 26. Влияние соединения РГПУ-195 и препаратов сравнения на степень (А) и скорость (Б) агрегации тромбоцитов

*Примечания: ЛО-ложнооперированные животные,; * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

В группах, которым вводилось исследуемое соединение и препараты сравнения, степень агрегации тромбоцитов была меньше, чем в группе контроля. Так, на фоне лечебного действия соединения РГПУ-195 она снизилась на 26%, а у препарата сравнения кавинтона – на 23% по сравнению с группой контроль-ишемия.

При введении соединения РГПУ-195 скорость агрегации тромбоцитов, была ниже по сравнению с контрольной группой крыс и животными, получавшими фенибут и кавинтон на 31%, 16%, 19% соответственно.

5.8.2. Влияние соединения РГПУ-195 на плазменный (коагуляционный) гемостаз после фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных животных.

Учитывая изменения, возникающие при нарушениях мозгового кровообращения целесообразно оценить состояние свёртывающей системы, а именно внешний, внутренний и общий пути свёртывания.

Одним из маркеров целостности внутреннего механизма свёртываемости крови является АЧТВ. При анализе данного показателя было выявлено, что в группе контроля отмечалось его укорочение на 38,5% по сравнению с группой ЛО, что свидетельствует о нарушениях в системе внутреннего каскада свертывания крови. Под влиянием исследуемых соединений наблюдалось удлинение АЧТВ, после введения соединения РГПУ-195 – на 34,5%, кавинтона - на 35,5% ($p < 0,050$ по сравнению с группой контроля (рис.27)).

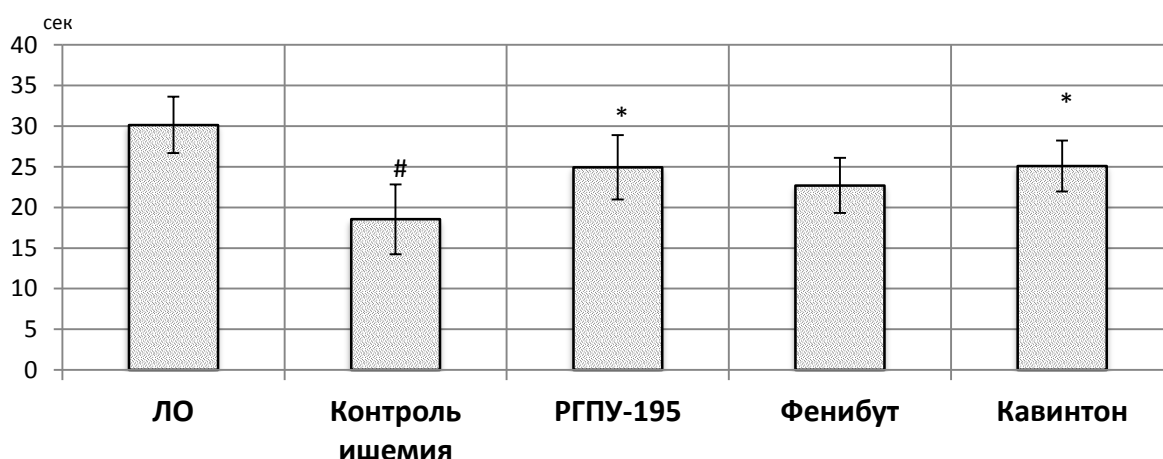


Рисунок 27. Изменение АЧТВ на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при фокальной ишемии головного мозга

*Примечания: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

Таким образом, наиболее выраженное действие на данный показатель, характеризующий первую фазу коагуляции – протромбинообразования, наблюдалось у группы животных, получавшей соединение РГПУ-195, что может свидетельствовать о меньших изменениях со стороны антикоагулянтной системы.

Вторую фазу коагуляционного гемостаза характеризует *протромбиновое время (ПВ)*. Протромбиновое время является показателем целостности внешнего механизма свёртывания крови и последних общих звеньев коагуляционного каскада.

Значения ПВ в группе ЛО животных статистически значимо отличаются от контрольной группы в сторону снижения ($p < 0,05$), что свидетельствует о процессах гиперкоагуляции, происходящих на фоне ишемии мозга.

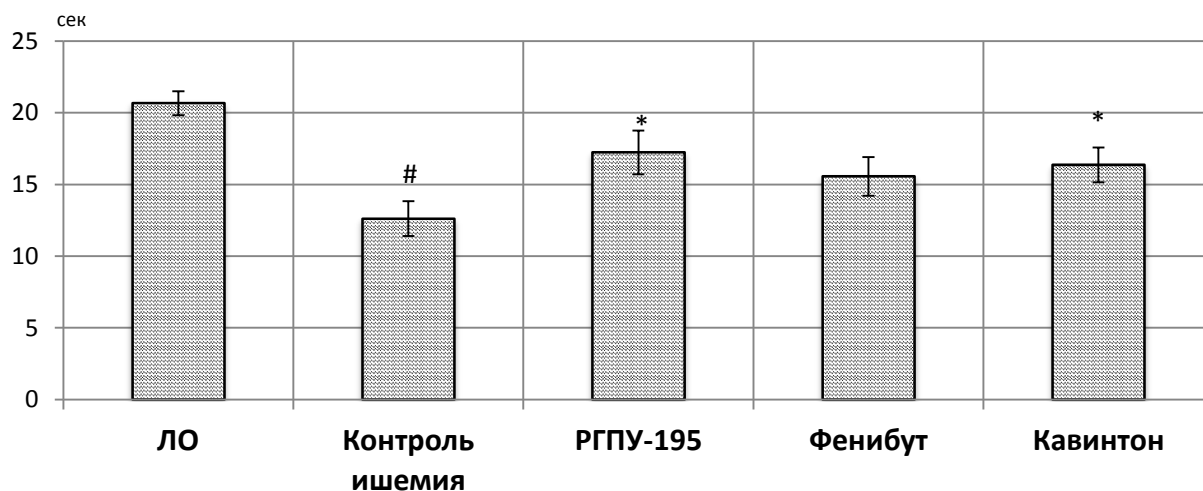


Рисунок 28. Изменение ПВ после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при фокальной ишемии головного мозга

Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО

У животных, получавших соединение РГПУ-195 и кавинтон, показатель ПВ был выше на 36,6 и 29,7% соответственно по сравнению с группой контроля при $p \leq 0,05$ (рис.28). Удлинение ПВ на фоне введения

исследуемых веществ свидетельствует о менее выраженной гиперкоагуляции. Так как главным инициатором внешнего пути свертывания является тканевой фактор (ТФ), который увеличивает прокоагулянтную активность эндотелия, способность исследуемых веществ повышать ПВ может косвенно свидетельствовать об их влиянии на ТФ.

Третья фаза системы гемостаза объединяет 2 важных показателя тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме. *Тромбиновое время* отвечает за конечный этап процесса свертывания – превращение *фибриногена* в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина. В свою очередь, уровень фибриногена в плазме крови является одним из маркеров нарушения функции эндотелия, т.к. его возрастание приводит к увеличению вязкости крови и усилению процессов тромбообразования.

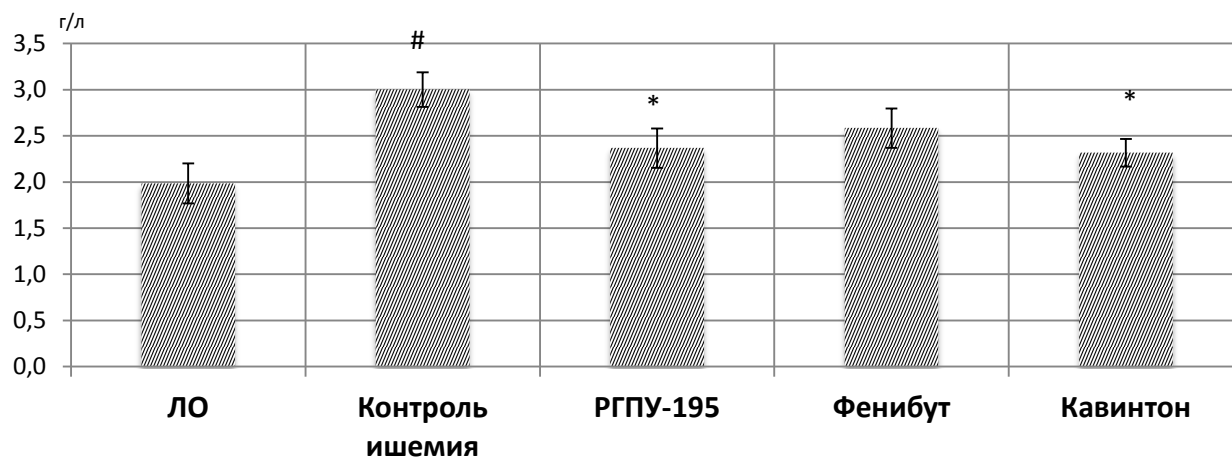


Рисунок 29. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание фибриногена у крыс с фокальной ишемией.

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

Концентрация фибриногена у самок группы ЛО была равна $1,98 \pm 0,22$, в то время как у животных группы контроля, получавших физиологический раствор – $3,0 \pm 0,19$, что на 51,3 % ($p \leq 0,01$) выше и может говорить о риске

ускоренного тромбообразования. На фоне лечебного действия соединения РГПУ-195 и кавинтона уровень фибриногена был статистически значимо ниже на 21,1% и 22,8% соответственно по сравнению с показателями группы контроля (рис.29).

Известно, что тромбиновое время зависит от уровня фибриногена. О преобладании процессов гиперкоагуляции у самок с ФИМ свидетельствует также укорочение тромбинового времени, которое наблюдалось у животных группы негативного контроля. При оценке тромбинового времени были следующие результаты – в группе контрольных животных оно сократилось на 25,3% по сравнению с ЛО (рис.30). Введение соединения РГПУ-195 приводило к повышению ТВ на 22,3%, что несколько больше чем у крыс получавших препараты сравнения.

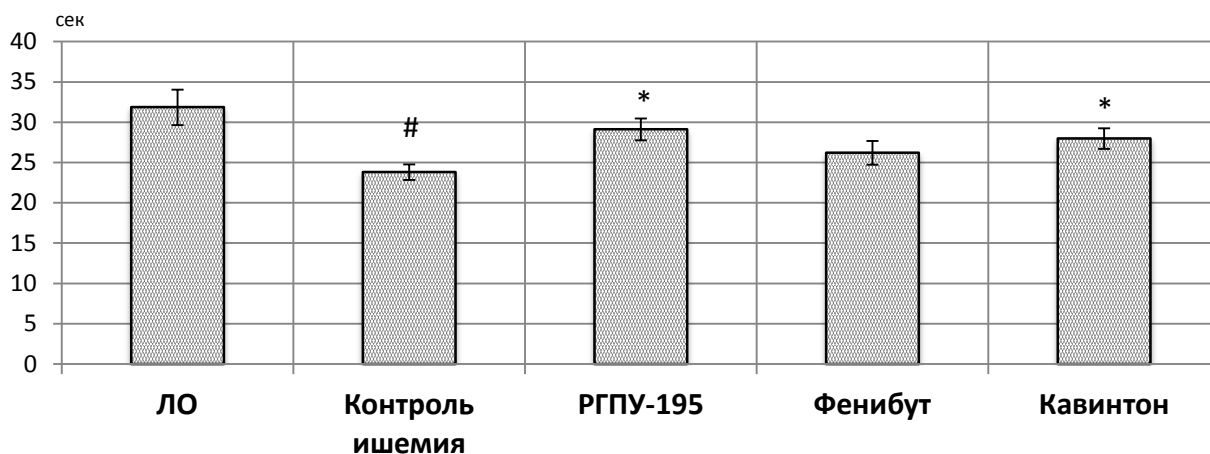


Рисунок 30. Изменение ТВ у животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга при введении исследуемых соединений и препаратов сравнения.

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

5.9 Заключение

В данной серии экспериментов было оценено влияние курсового, лечебного введения соединения РГПУ-195 на ряд показателей, таких как неврологический дефицит, мозговой кровоток, биохимические показатели

крови, коагуляционное и тромбоцитарное звено гемостаза, отёк головного мозга.

В результате исследований было отмечено, что моделирование ФИМ у овариозэктомированных животных приводило к развитию тяжелого неврологического дефицита, снижению показателей двигательной активности, нарушению координации, асимметричности движений, мелкой моторики.

Курсовое лечебное введение соединения РГПУ-195 значительно ограничивало развитие неврологических нарушений. Так, в процессе наблюдения от 1 до 7 суток, оценка неврологического дефицита по шкале Garcia, Combs и D'Alecy в группе, получавшей соединение РГПУ-195, выявила менее выраженный психоневрологический дефицит, при этом, оказываемое протекторное действие соединения РГПУ-195 превосходило таковое у препаратов сравнения кавинтон и фенибут. Нарушения моторики, координации движений, ориентировочно-исследовательской активности также были меньше на фоне лечебного введения соединения РГПУ-195.

Уменьшение сосудорасширяющей реакции на ацетилхолин, свидетельствует о ЭД во всех группах животных с фокальной ишемией, однако, исследуемое соединение РГПУ-195 оказывает церебропротекторное и эндотелиопозитивное действие, которое превосходит таковое у препаратов сравнения, о чем свидетельствует большая сохранность кровотока, вазодилатирующей функции эндотелия.

Процент гидратации мозговой ткани был снижен на фоне соединения РГПУ-195 по сравнению с группой контрольных животных и сопоставим с ложнооперированными.

Исследуемое вещество повышало активность антиоксидантных систем и процент утилизации глюкозы мозговой тканью по сравнению с ишемизированными животными контрольной группы.

В ходе дальнейшего исследования было выявлено, что моделируемая патология приводила к нарушению как со стороны коагуляционного

гемостаза, так и со стороны сосудисто-тромбоцитарного звена. Проявлялось это в увеличении степени и скорости агрегации тромбоцитов у контрольной группы по сравнению с ЛО животными. В системе коагуляционного гемостаза нарушения проявлялись снижением тромбинового времени, показателя активированного частичного тромбопластинового времени, укорочением протромбинового времени и повышением уровня фибриногена по сравнению с аналогичными показателями ложнооперированных животных.

Введение производного ГАМК соединения РГПУ-195 способствовало улучшению состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и антикоагулянтной активности. Это проявлялось в снижении скорости, степени агрегации тромбоцитов, количества фибриногена и ускорении тромбинового времени и АЧТВ.

Таким образом, было выявлено, что производное ГАМК – соединение РГПУ-195 не уступало, а даже превосходило эндотелиопротекторное действие препаратов сравнения кавинтона и фенибута, что позволяет рекомендовать его в качестве церебропротектора с эндотелиопозитивным компонентом действия для коррекции нарушений мозгового кровообращения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапия цереброваскулярных расстройств продолжает оставаться одной из наиболее важных проблем современной фармакологии и неврологии (Шмонин А. А. и др., 2015; Бурчинский С. Г., 2015; Гинзбург М. Л. и др., 2015; Козелкин А. А., Новикова Л. В., 2015). Несомненно, обусловлено это тем, что сосудистые заболевания мозга составляют высокий процент среди причин смертности, а также характеризуются значительными показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидности, что является свидетельством огромной их медицинской и социальной значимости (Карпова Е. Н. и др., 2015; Cadilhac D. A. et al., 2016). Лишь около 10-20% выживших больных в состоянии вернуться к прежнему труду. По другим данным, около 30 % лиц, перенесших инсульт, восстанавливаются в неполной мере, а еще 20 % глубоко инвалидизируются и нуждаются в посторонней бытовой помощи (Котова О. В, 2012, Bettger P.J., et al., 2014; Thrift A. et al., 2014; G.Walker R. W. et al., 2016).

В настоящее время, по мнению многих авторов (Малахов В. А., Завгородняя А. Н., 2007; Волошин П. В. И др., 2006; Кистенев Б. А. и др., 2007; Щепанкевич Л. А. и др., 2011; Ижбульдина Г. И., 2009; Белова Ю. А. и др., 2015; Sobrino T. et al., 2007; Canavero I. et al., 2016; Regueiro A. et al., 2015; Yuan L. et al., 2015), эндотелиальная дисфункция рассматривается как один из основных патогенетических механизмов НМК, причём, важное значение имеют не только структурные изменения сосудистой стенки, но и нарушения ее функциональных свойств (Булгаков М. С., 2015, P.S. Garry 2015). Эндотелий – однослойный пласт плоских клеток мезенхимного происхождения, выстилающий внутреннюю поверхность всех кровеносных и лимфатических сосудов (Федин А. И. и др., 2015) представляет собой высокоспециализированную, метаболически активную систему, продуцирующую значительное число биологически активных веществ, являющихся конечным звеном нейрогенной и гуморальной регуляции, сосудистого тонуса, его антитромботической, противовоспалительной и

антипролиферативной функции. Нормальная работа эндотелия рассматривается как ключевой фактор в поддержании сосудистого гомеостаза (Тюренков И.Н. и др., 2012). Однако необходимо отметить, что различные патогенетические процессы (повышенный уровень артериального давления, оксидативный стресс, снижение уровня половых гормонов, пожилой возраст и мн. др.) могут нарушать работу эндотелия, в результате чего происходит преобладание продукции вазоконстрикторных факторов над вазодилататорными, усиливаются процессы тромбообразования и пролиферации, что в итоге приводит к прогрессированию атеросклероза и сердечно-сосудистым инцидентам. Поэтому основой одного из новых клинических направлений терапии НМК является необходимость коррекции ЭД (т.е. нормализации функции эндотелия) и своевременного назначения эндотелипротекторов (Федин А. И. и др., 2015; Chen W., 2008; Chiu J.-J., Chien S., 2011). Однако, в настоящее время препаратов, действие которых непосредственно направленно на коррекцию ЭД при НМК с доказанной эффективностью, нет, а существуют только лекарственные средства, у которых «эндотелипротекция» является плеiotропным эффектом. При этом их назначение в условиях НМК ограничено. Поэтому, поиск и разработка эндотелиопротекторов для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний в настоящее время весьма актуальна.

В этом отношении несомненный интерес представляют производные нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутаминовой), которые по результатам многочисленных исследований, проводимых в том числе на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, могут оказывать мультитаргетное действия (Тюренков И.Н., 2010, 2012, Перфилова В.Н., 2009, Куркин Д.В., 2013, Волотова Е.В., 2013, Киселев А. В., 2014, Макарова Л.М., Приходько М.А. и др., 2014). Исходя из этого была продолжена работа по поиску среди структурных аналогов ГАМК и глутаминовой кислоты веществ, оказывающих церебро- и эндотелиопротекторное действие при НМК. Для исследования были выбраны 6 соединений (4 производных

глутаминовой кислоты и 2 производных ГАМК), имеющие в β -положении ароматический заместитель.

Учитывая гетерогенность инсультов в клинических условиях, для более разносторонней оценки указанных эффектов исследуемых веществ, НМК моделировалось несколькими методами. В данной работе использовали модель ишемическо-реперфузионного повреждения головного мозга, необратимой окклюзии ОСА, фокальной ишемии, вызванной окклюзией среднемозговой артерии. При этом действие исследуемых веществ анализировалось как при профилактическом однократном, так и при лечебном 7-ми дневном их введении с оценкой выживаемости животных, выраженности неврологических нарушений, уровня мозгового кровотока, вазодилатирующей функции эндотелия, влияния веществ на агрегацию тромбоцитов, свёртываемость крови, состояние процессов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы.

В результате целенаправленного поиска среди 6 новых производных ГАМК и глутаминовой кислоты были выбраны соединения, проявляющие наиболее выраженное церебропротекторное действие при ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга и в условиях необратимой окклюзии ОСА. Так на фоне предварительного введения фенильного производного ГК (соединения РГПУ-135) и пиридилового производного ГАМК (соединения РГПУ-195) наблюдались менее выраженные явления гипер- и гипоперфузии, меньшая гибель экспериментальных животных с окклюдируемыми ОСА, а у выживших – менее выраженный психоневрологический дефицит, восстановление двигательной, ориентировочно-исследовательской активности, сохранение МК на более высоком уровне. Другие производные ГАМК (с индольным заместителем – соединение РГПУ-136) и ГК (с парахлорфенильным (РГПУ-146), толильным (РГПУ-202), паранитрофенильным (РГПУ-217) заместителями) значительно уступали по активности соединениям РГПУ-135 и РГПУ-195.

Учитывая литературные данные (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Камчатнов П. Р., Зайцев К. А., 2010; Москаленко Ю. Е., 1986) о том, что мозговой кровоток тесно связан с интенсивностью процессов, протекающих в головном мозге, а также, что его падение ниже 50 мл в минуту на 100 г вещества мозга вызывает запуск каскада патогенетических реакций, приводящих в конечном итоге к апоптозу и гибели нейрона, можно предполагать, что церебропротекторное действие соединений РГПУ-135 и РГПУ-195 в условиях ишемии опосредовано их способностью улучшать МК. В результате чего снижается количество летальных исходов у животных, получавших данные вещества, а у выживших – в меньшей степени выражены неврологический и когнитивный дефицит. Эти данные согласуются с результатами проведенных клинических исследований, показывающих, что НМК и снижение МК оказывают несомненное действие на развитие когнитивных расстройств и деменции у больных в постинсультный период (Преображенская И. С., 2013). При этом в работе Агафоновой И.Г., Колосовой Н.Г. отмечено, что нарастание симптомов НМК и когнитивных расстройств, происходит на фоне прогрессирования ишемического повреждения и снижения МК. Однако, на данном этапе не представлялось возможным оценить, связана ли способность соединений улучшать МК непосредственно с их возможными эндотелиотропными свойствами.

При исследовании зависимости церебропротекторного действия от дозы было установлено, что выживаемость животных через 3 суток после моделирования ишемического повреждения головного мозга была более высокой при однократном профилактическом введении соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (75%) и меньше при его введении в дозе 22 мг/кг и применении РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (60 и 65 % соответственно). Также у выживших животных, получавших пиридиновое производное ГАМК (РГПУ-195) в дозе 44 мг/кг, регистрировался наименьший балл неврологического дефицита ($4,6 \pm 0,8$), более высокая двигательная, ориентировочно-

исследовательская активности, лучшее сохранение памятного следа, мозгового кровотока, меньший индекс ЭД.

По литературным данным, как уже ранее было отмечено, тяжесть неврологических отклонений при ишемии головного мозга в значительной мере зависит от степени нарушения мозгового кровообращения. В проведенном исследовании профилактическое введение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг и, в большей степени, РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг обеспечивало сохранность мозгового кровотока на более высоком уровне, чем при использовании других доз, а пиридиловое производное ГАМК оказывало эффект превосходящий таковой у препарата сравнения – кавинтона. При этом способность веществ сохранять МК в условиях ишемии была прямо пропорциональна выраженности неврологических отклонений, которые были менее значимы у животных, получавших соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг и РГПУ-195 44 мг/кг.

С другой стороны, уровень МК в большей степени зависит от функционального состояния эндотелия, поэтому на данном этапе было изучено влияние исследуемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия, количество циркулирующих эндотелиоцитов и степень отека головного мозга (как маркеров повреждения целостности эндотелия церебральных сосудов).

При оценке ЭД отмечалось меньшее нарушение вазодилатирующей функции под действием соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг и, в большей степени, РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, что проявлялось в более выраженной реакции мозгового кровотока на введение ацетилхолина. Индекс эндотелиальной дисфункции и уровень циркулирующих эндотелиальных клеток, как один из важных критериев поражения эндотелиальной выстилки сосудов, был так же ниже при превентивном введении вышеуказанных доз соединений. Отек головного мозга развивается, в том числе и по причине нарушения эндотелиального слоя, в то время как его снижение может косвенно указывать на улучшение функционального состояния эндотелия.

По результатам нашего исследования у крыс, получавших соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/ кг процент гидратации головного мозга был достоверно ниже, чем у животных контрольной группы и незначительно меньше, чем у животных, получавших кавинтон.

Таким образом, соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/ кг, оказывающее более выраженное эндотелипротекторное действие при НМК, в значительной большей мере, чем препарат сравнения фенибут, уменьшало гибель животных, уменьшало степень тяжести психоневрологических нарушений и было выбрано как более перспективное для дальнейшего углубленного изучения с целью возможного создания на его основе средства коррекции НМК.

В настоящее время для коррекции сосудистых заболеваний головного мозга существует широкий спектр лекарственных средств, однако поиск новых соединений, оказывающий церебропротекторное действие не прекращается, что объясняется низкой эффективностью лечения имеющимися препаратами, которая не удовлетворяет ни врачей, ни больных. Можно предположить, что это связано с сопутствующими заболеваниями, ухудшающими общую картину течения болезни. Например, в последнее время увеличивается продолжительность жизни населения РФ и, вследствие этого растёт число женщин в постменопаузе. Так же отмечается рост гинекологических заболеваний (доброкачественные и злокачественные опухоли матки и ее придатков, эндометриоз и другие), требующих радикального оперативного вмешательства с удалением яичников, а иногда и матки, что приводит к омоложению контингента женщин с недостаточностью половых гормонов, а это в свою очередь ведет к развитию климактерического синдрома и росту сосудистых заболеваний. Таким образом, актуальным становится вопрос коррекции ЭД и сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе тех, которые ассоциированы с недостаточностью эстрогеновых половых гормонов, т.к. эти процессы тесно взаимосвязаны. Поэтому нами было изучено церебропротекторное действие

соединения РГПУ-195 при ишемии головного мозга у животных с гипоестрогениндуцированной ЭД.

При оценке неврологических нарушений, которые возникали после фокальной ишемии головного мозга, на фоне НПГ было отмечено, что курсовое введение соединения РГПУ-195, приводило к менее выраженным их проявлениям. Отражалось это в повышении баллов по шкале Combs и Garsia. Сенсомоторный дефицит в тесте «сужающаяся дорожка» и лестничном тесте так же был менее выражен на фоне применения соединения РГПУ-195. Отмечалась положительная динамика и в восстановлении двигательной, ориентировочно-исследовательской активности и когнитивной функции.

Для изучения вазодилатирующей функции эндотелия тестировалось система оксида азота. Снижение стабильности и мощности эндотелиальной NO-синтазной системы, ослабление эндотелиозависимой вазодилатации, на фоне экспериментально-вызванной недостаточности половых гормонов, свидетельствовало о более выраженной эндотелиальной дисфункции, что согласуется с литературными данными (Timothy W., Secomb 2011, Робертус А. И., 2010; Воронков А. В., 2011). Так введение ацетилхолина на фоне лечебного действия пиридинового производного ГАМК вызывало больший прирост МК, чем в группах контроля и у животных, получающих препараты сравнения кавинтон и фенибут, что говорит о менее выраженных нарушениях системы синтеза NO. Введение блокатора NO, оказывало противоположный эффект, т.е. в группе ЛО крыс и которым вводили исследуемое соединение РГПУ-195, падение МК было выражено более значительно. Таким образом, исходя из полученных собственных результатов и опираясь на другие научные исследования (Едигарова Л.В. 2001, Робертус А.И., 2010, Волотова Е.В, 2013), можно предположить, что защитный механизм пиридинового производного ГАМК (РГПУ-195) в условиях ишемии головного мозга связан с его эндотелиопротекторным действием.

Наличие у сосудистого эндотелия выраженной тромборезистентности играет важную роль в сохранении жидкого состояния крови и предупреждении тромбообразования (Zaheer Z., Robinson T., Mistri A.K., 2011). При нарушении функции эндотелиальные клетки синтезируют большое количество прокоагулянтов и вазоконстрикторов, что вызывает дисбаланс в сторону увеличения сосудосуживающего и тромбогенного потенциалов. Поэтому немаловажную роль в оценке эндотелиопротекторной активности исследуемых соединений при нарушениях мозгового кровообращения играет их способность улучшать не только вазодилатирующую функцию, но и снижать агрегацию тромбоцитов и свёртывание крови.

В наших исследованиях было оценено состояние клеточного (сосудисто-тромбоцитарного) и плазменного (коагуляционного) компонентов гемостаза. Моделирование фокальной ишемии в условиях гипоэстрогемии приводило к повышению показателей агрегации тромбоцитов, укорочению тромбинового и протромбинового, а также активированного частичного тромбопластинового времени и повышению уровня фибриногена. Полученные данные согласуются с результатами ряда как экспериментальных, так и клинических исследований, которые подтверждают существенную роль данных факторов при НМК. (Марков, Х.М., 2005; Баркаган З.С., Момот А.П., 2008; Fitzgerald D.J. 2001; Miller V. M., 2009; Pitocco D., 2010; Patel R. P., Hogg N., Kim-Shapiro D. B., 2011; Robinson T., Zaheer Z., Mistri A. K., 2011).

Изучение влияния соединения РГПУ-195 на тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз показало, что оно обладает способностью снижать повышенную агрегационную активность тромбоцитов, уменьшать явления гиперкоагуляции, вызванные фокальной ишемией на фоне недостаточности половых гормонов, что согласуется с данными о возможной взаимосвязи терапевтического действия ГАМК-ергических средств при нарушениях мозгового кровообращения с их влиянием как на антиагрегантную

активность сосудистой стенки, так и на агрегацию тромбоцитов (Ледяев М.Я., 1986; Акопян В.П., 2000) .

Поскольку универсальным звеном патогенеза, лежащим в основе развития эндотелиальной дисфункции, является оксидативный стресс (Venditti P., Stefano L., Meo S., 2010), можно предположить, что вещества, обладающие антиоксидантной активностью, будут проявлять и эндотелиопротекторные свойства. В результате применения производного ГАМК (РГПУ-195) в условиях ишемии головного мозга повышалась активность ключевого фермента антиоксидантной системы – СОД и снижалась концентрация и накопление ТБК-активных продуктов. Известно, что при ишемии головного мозга снижается потребление основного энергетического субстрата – глюкозы и поэтому важно было изучить влияние, исследуемого соединения, на утилизацию глюкозы при окклюзии средней мозговой артерии, что может быть ещё одним механизмом нейропротекторного действия соединения РГПУ-195. В этих условиях было отмечено повышение процента её утилизации мозговой тканью.

Таким образом, проведённое исследование позволило выявить среди 6 ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислоты вещество с лабораторным шифром РГПУ-195 (β-пиридил ГАМК) с высокой церебропротекторной активностью при острой преходящей и перманентной окклюзии общих сонных артерий, а также при фокальной ишемии головного мозга при субхроническом лечебном его введении.

Соединение РГПУ-195 также оказывало эндотелиопротекторное действие у животных с недостаточностью половых гормонов, улучшая эндотелиозависимую вазодилатацию. Помимо этого данное вещество снижало агрегацию тромбоцитов и свёртываемость крови. Одновременно с этим у крыс с фокальной ишемией головного мозга на фоне НПГ пиридиловое производное ГАМК улучшало утилизацию глюкозы мозговой тканью, снижало перекисное окисление липидов, одновременно повышая активность фермента антиоксидантной защиты (СОД), уменьшало отёк

мозга. Всё представленное позволяет заключить, что соединение β -пиридил ГАМК является перспективным для дальнейшего изучения с целью создания на его основе лекарственного средства для лечения острых и хронических нарушений мозгового кровообращения.

ВЫВОДЫ

1. Среди изученных ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислот большей церебропротекторной активностью обладали соединения под лабораторными шифрами РГПУ-135 (β -фенил-ГК), РГПУ-195 (β -пиридил-ГАМК) и меньшей РГПУ-136(β -пиридил-ГАМК) РГПУ-202(β -толил-ГК). Соединения РГПУ-146 (парахлорфенилГК) и РГПУ-217 (паранитрофенил ГК) не обладали церебропротекторными свойствами.
2. В условиях 10-ти минутной окклюзии общих сонных артерий только профилактическое применение соединения РГПУ-195 способствовало меньшему снижению МК. В постреперфузионный период явления «гиперперфузии» были менее выражены на фоне предварительного введения соединений РГПУ-135, РГПУ-202, РГПУ-195, РГПУ-136, а явление «гипоперфузии» только при предварительном применении веществ РГПУ-135, РГПУ-195.
3. При моделировании необратимой окклюзии общих сонных артерий большая выживаемость животных (на 30-35%) наблюдалась на фоне превентивного введения соединений РГПУ-135, РГПУ-202, РГПУ-195, а нарастание неврологического дефицита (по шкале McGrow) – отмечено меньше на фоне введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-195; большая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность у животных, получавших РГПУ-135, РГПУ-136, РГПУ-195, РГПУ-202, а менее выраженные нарушения памяти и более высокие показатели МК у животных, получавших РГПУ-135 и РГПУ-195.
4. Проведённый анализ зависимости «доза-эффект» установил, что наиболее выраженное церебро- и эндотелипротекторное действие оказывает соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, превосходя по активности соединение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг.
5. Курсовое 7-ми дневное лечебное введение соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг животным с недостаточностью половых гормонов,

перенесшим фокальную ишемию мозга, уменьшало выраженность неврологического и когнитивного дефицита, нарушений координации движений, снижения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности.

6. Механизм церебропротекторного действия соединения РГПУ-195 в условиях фокальной ишемии головного мозга обусловлен увеличением мозгового кровотока, улучшением ЭЗВД, увеличением процента утилизации глюкозы мозгом (на 13,4%), снижением содержания продуктов ПОЛ (МДА на 30%), повышением активности СОД (на 45%), уменьшением агрегации тромбоцитов (на 26%), снижением коагуляционного компонента гемостаза, снижением выраженности отёка головного мозга

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты фармакологических исследований соединения РГПУ-195 свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки на его основе средства для профилактики и лечения нарушений мозгового кровообращения ишемического генеза.
2. Целесообразно продолжить синтез новых производных ГАМК с ароматическими заместителями в β -положении для продолжения поиска веществ с высокой церебро-и эндотелиопротекторной активностью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

NMDA – N-метил-D-аспартат

NO – оксид азота

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

АДФ – аденин-динуклеотид фосфат

АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГК – глутаминовая кислота

ГМ – головной мозг

ДА – двигательная активность

ДМСО – диметилсульфоксид

ИР – инсулинорезистентность

ЛО – ложнооперированные животные

ЛП – латентный период

МК – мозговой кровоток

НПГ – недостаточность половых гормонов

НМК – нарушение мозгового кровообращения

ОИА – ориентировочно - исследовательская активность

ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения

ОП – открытое поле

ОСА – общие сонные артерии

ПВ – протромбиновое время

ПОЛ – перикисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТБК-АП – ТБК-активные продукты

ТВ – тромбиновое время

ТЭИ – тест экстраполяционного избавления

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ЦНС – центральная нервная система

ФИМ – фокальная ишемия мозга

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова И.Г. Сравнительный анализ изменения мозгового кровообращения у крыс с индуцированным острым нарушением мозгового кровообращения методом магнитно-резонансной томографии / И.Г. Агафонова, Н.Г. Колосова, В.А. Рассказов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С.104-107.
2. Акопян В.П. Об особенностях действия ГАМК-ергических средств на микроциркуляцию мозга в условиях двигательной активности и гиподинамии/ В.П.Акопян, Л.С.Балян, К.В. Мелконян // Фармакология и токсикология – 1991. – Т. 54. – № 5. – С. 17-20.
3. Акопян В.П. Участие системы ГАМК в адаптационной перестройке мозгового кровообращения в условиях гипокинезии / В.П. Акопян // ЭКФ. – 2003. – Т.66, №3. – С.4-8.
4. Алеева Г.Н., Журавлева М.В., Сапельникова Э.Р. Гиполипидемическая терапия у больных сахарным диабетом 2-типа / Г.Н. Алеева, М.В. Журавлева, Э.Р. Сапельникова // Российский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 6. – С. 377.
5. Асташев П.Е. Эндотелий – структурная основа системы кровообращения: история проблемы / Ю.Л. Шевченко, П.Е. Асташев, С.А. Матвеев, В.Г. Гудымович // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова. – 2011. – Т. 6, № 2. – С.9-15.
6. Багметов М.Н. Церебропротекторное действие композиций фенибута и фенотропила и их солей в условиях экспериментальной ишемии головного мозга: Дис...канд. мед. наук / М.Н. Багметов, Волгоградский гос. мед. универ. – Волгоград. – 2006. – 187 с.
7. Багметова В.В. Сравнительное экспериментальное изучение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его метилового эфира / В.В.Багметова, Л.Е.Бородкина, И.Н.Тюренок и др. // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10 (3). – С. 467 – 471.

8. Баранова Е.И. Артериальная гипертензия в постменопаузе: патогенез и подходы к терапии / Е.И. Баранова // Фарматека. – №12. – 2009. – С. 24-26/
9. Баркаган З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М. Ньюдиамед, 2008. —292 с.
10. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.
11. Башкирова Ю.В. Эндотелиальная дисфункция и микроциркуляторные нарушения у больных сахарным диабетом 2 типа / Ю.В. Башкирова, Т.А. Рудницкая, Р.С. Хапаев и др. // Бюл. Сиб. отд. Рос. акад. мед. наук. – 2008. – №6. – С. 182-186.
12. Белова Ю.А. Уровень эндотелиальных прогениторных клеток у больных с ишемическим инсультом и эффективность реабилитации / Белова Ю.А., Чуксина Ю.Ю., Шевелев С.В. и др. // Альманах клинической медицины. – 2015. – № 39. – С.45-50.
13. Белоусова М.А. Нейропротекторная эффективность коэнзима Q10 на модели фокальной ишемии головного мозга в эксперименте: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология / Белоусова Маргарита Алексеевна. – М., 2015. – 146 с.
14. Беляков Н.А. Сахарный диабет как основной компонент патогенеза метаболического синдрома / Н.А. Беляков, С.Ю. Чубриева // Мед. акад. журн. – 2008. – № 1. – С.116-127.
15. Беридзе М.З. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте. Журн / М.З. Беридзе, И.Т. Урушадзе, Р.Р. Шакаришвили // Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт (приложение). – 2001. – № 3 – С.35-40.
16. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии / Н.Н. Боголепов. – М.: Медицина. – 1979 г. – 157с.
17. Бойко А.Н. Применение сосудорасширяющих препаратов для лечения больных с хроническими расстройствами мозгового кровообращения.

Методические рекомендации / А.Н. Бойко, Т.Т. Батышева, П.Р. Камчатнов и др.. Москва, 2005 – 36 с.

18. 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.

19. Бородкина Л.Е. Нейропротекторные свойства и механизм действия новых производных аналогов гамма-аминомасляной кислоты: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук: 14.00.25 / Бородкина Людмила Евгеньевна. – Волгоград, 2009. – 47 с.

20. Боченина Ю.А. Особенности состояния сосудодвигательной функции эндотелия и показателей системного воспаления в зависимости от тяжести ремоделирования сердца при хронической сердечной недостаточности на фоне ишемической болезни сердца: дис ... канд. мед. наук: 14.01.05 / Боченина Юлия Александровна. – Оренбург, 2015. – 136 с.

21. Булаева Н.И. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии кардиоваскулярной патологии / Н.И. Булаева, Е.З. Голухова // Креативная кардиология. – 2013. – №1. – С. 14-22.

22. Булгаков М.С. Роль оксидативного стресса в регуляции периферического кровообращения у больных с нейроциркуляторной астенией: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.01.04 / Булгаков Михаил Сергеевич. – Москва, 2015. – 117 с.

23. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высш. шк. – 1991. – 399 с.

24. Бурчинский С.Г. ГАМК-ергические средства в фармакотерапии хронической церебральной ишемии / С.Г. Бурчинский // Міжнародний неврологічний журнал. – 2015. – № 1. – С. 101-105.

25. Бутрова С.А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С.А. Бутрова // Рос. мед. журн. – 2001. – №2. – С.56-60.

26. Васильева Е.М. Влияние системы L-аргинин-NO на активность АТФаз и ПОЛ эритроцитов / Е.М. Васильева, М.И. Баканов, Х.М. Марков // Бюл. Экспер. биол. – 1999. – Т. 128, № 9. – С. 321-323.
27. Верещагин Н.В. Лечение и предупреждение расстройств познавательной функции у больных артериальной гипертонией и атеросклерозом / Н.В. Верещагин, З.А. Суслина, С.А. Тимербаева и др.// Тер.архив. – 2001. – №4. – С. 1-8.
28. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И.В. Викторов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2000. – № 4. – С. 5-10.
29. Винокуров И.А. Обоснование оптимального алгоритма применения различных методов защиты головного мозга и почек пациента при операциях на дуге аорты: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.26 – сердечно – сосудистая хирургия / Винокуров Иван Андреевич. – М., 2015. – 97с.
30. Волотова Е.В. Сравнительный анализ влияния бета-фенильных производных глутаминовой и гамма-аминомасляной кислоты на мозговой кровоток и функциональное состояние эндотелия сосудов головного мозга животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий / Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Н.В. Мазина и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, №6. – С. 11-13.
31. Волошин П.В. Ключевые механизмы эндотелиальной дисфункции острых церебральных ишемий в динамике медикаментозной коррекции / П.В. Волошин, В.А. Малахов, Г.Н. Завгородняя // Український вісник психоневрології. – 2006. – № 14-4. – С. 5-7.
32. Волошин П.В. Эндотелиальная дисфункция при цереброваскулярной патологии. / П.В. Волошин, В.А Малахов, А.Н. Завгородняя // Харьков: 2006. – 92 с.
33. Воронина Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская //

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум». – 2000. – С. 153-161.

34. Воронина Т.А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум». – 2000. – С. 126-130.

35. Воронков А.В. Поиск и изучение эндотелиопротекторной активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-ОНА на фоне моделирования недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков, И.П. Кодониди, А.В. Мамлеев // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 285.

36. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Воронков Андрей Владиславович. – Волгоград, 2011. – 237 с.

37. Габбасов З.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов *in vitro* / З.А.Габбасов, Е.Г.Попов, И.Ю. Гаврилов и др. // Бюлл.экспер.биол.и мед. – 1989. – № 10. – С. 437-439.

38. Гаевый М.Д. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой / М.Д. Гаевый, Л.М. Аджиенко, Л.М. Макарова, А.А. Абдулсалам // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2000. – Т.63, №3. – С.63-64.

39. Гаевый, Г.В. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов; под. ред. Г.В. Ковалева / Г.В Гаевый, М.Д. Ковалев. – Волгоград, – 1985. – С.183-193.

40. Гайнуллина Д.К. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия / Д.К. Гайнуллина, О.О. Кирюхина, О.С. Тарасова // Успехи физиологических наук. – 2013. – Т. 44, № 4. – С. 88-102.

41. Ганнушкина И.В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга / И.В. Ганнушкина // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2000. – N 9. – С. 22-27.
42. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика. – 1999. – 459 с.
43. Головченко Ю.И. Современные представления о физиологии и патологии эндотелия головного мозга/ Ю.И. Головченко, М.А. Трещинская // Украинский химиотерапевтический журнал. – 2008. – № 1-2(22). – С. 22-28.
44. Грацианский Н.А. Нестабильная стенокардия – острый коронарный синдром. III. Предупреждение обострений ишемической болезни сердца. Статины и антибиотики / Н.А. Грацианский // Кардиология. – 1997. – № 11. – С. 4-10.
45. Громов Л.А. Нейропептиды / Л.А. Громов. – Киев: Здоровье. – 1992. – 243 с.
46. Гусев Е.И. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов // Доктор. Ру. – 2013. – № 5 (83). – С. 7-12.
47. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова – М.: Медицина. – 2001. – 327с.
48. Гусев Е.И. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. – 2007. – №8. – С. 4-10.
49. Гусев Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов, А.Н. Ясаманова, И.А. Щукин, Т.И. Колесникова. // Consilium Medicum. – 2014. – № 12. – С. 13-17.
50. Дамулин И.В. Болезнь Альцгеймера и сосудистая деменция / под ред. Н.Н. Яхно. – М., 2002. – 85 с.
51. Данилов В.И. Инсульт. Современные подходы диагностики, лечения и профилактики: метод. рекомендации / под ред.: В. И. Данилова, Д. Р. Хасановой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 248 с.

52. Дедов И.И. Сахарный диабет и артериальная гипертония / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М.: МИА. – 2006. – С. 39-52.
53. Джанашия П.Х. Нарушение липидного обмена при сахарном диабете 2 типа и варианты его коррекции / П.Х. Джанашия, Е.Ю. Мирина // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т.16, №11. – С. 1561-1567.
54. Джанашия П.Х. Ремоделирование сердца и его роль в формировании аритмий у больных сахарным диабетом типа 2 и артериальной гипертонией / П.Х. Джанашия // Рос. кардиол. журн. – 2008. – № 6. – С. 10-14.
55. Евсеев В.А. Нейроиммунопатология: иммуноагрессия, дисрегуляция, перспективы адаптивной иммунотерапии / В.А. Евсеев, О.И. Миковская // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2002. – Т. 102, №5. – С. 60-64.
56. Едигарова Л.В. Антиагрегантная активность сосудистой стенки и возможность ее коррекции ГАМК-ергическими средствами в условиях гипокинезии/ Л.В. Едигарова, В.П. Акопян. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, №5. – С. 41-43.
57. Загидуллин Ш.З. Значение дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях и методы ее медикаментозной коррекции / Ш.З. Загидуллин, К.Ф. Валеева, Н., Гассанов Ш.З. Загидуллин // Кардиология. – 2010. – №5. – С. 54-60.
58. Задионченко В.С. Влияние заместительной гормональной терапии на показатели микроциркуляции у пациенток с хирургической менопаузой / В.С. Задионченко, В.Ю. Рябышева, А.М. Торчинов и др. // Русский Медицинский журнал. – 2007. – Т.15, № 9. – С.777-782.
59. Задионченко В.С. Дисфункция эндотелия и артериальная гипертония: терапевтические возможности / В.С. Задионченко, Т.В. Адашева, А.П. Сандомирская// Российский медицинский журнал. – 2001. – Т. 1, № 145. – С.11-15.
60. Занозина О.В. Окислительный стресс: особенности при сахарном диабете – источники образования, характеристика составляющих, патогенетические

механизмы токсичности (обзор) / О.В. Занозина // Урал. мед. журн. – 2010. – № 1. – С.79-87.

61. Захаров В.В. Медикаментозная терапия деменций / В.В. Захаров, И.В. Дамулин, Н.Н. Яхно // Клиническая фармакология и терапия. – 1994. – Т. 3., № 4. – С. 69-75.

62. Ижбульдина Г.И. Состояние свободнорадикального окисления липидов, системы гемостаза и функции эндотелия у больных в остром периоде ишемического инсульта, эффекты корректоров метаболизма: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.00.13 / Ижбульдина Гульнара Ильдусовна; – Пермь, 2009. – 128 с.

63. Исайкин А.И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта / А.И. Исайкин // Трудный пациент. – 2010. – № 4. – С.21-25.

64. Казак М.В. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе ишемического инсульта у пациентов с артериальной гипертензией / М.В. Казак // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН . – 2008. – №2. – С.17-18.

65. Калмыков Ю.М. Гомоцистеин – предиктор патологических изменений в организме человека / Ю.М. Калмыков // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17, № 4. – С.224-228.

66. Камчатнов П.Р. Церебральная гипоперфузия и когнитивные нарушения / П.Р. Камчатнов, К.А. Зайцев // Фарматека. – 2010. – № 13. – С. 48-53.

67. Карева Е.Н. Гестагены и головной мозг / Е.Н. Карева, О.М. Олейникова, В.О. Панов и др. // Вестник Рос. академии мед. наук. – 2010. – №. 6. – С. 40-49.

68. Карпов Ю.А. Дисфункция артериального эндотелия и ее значение для оценки прогноза у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / Ю.А. Карпов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2010. – № 2. – С.69-73.

69. Карпова Е.Н. Эпидемиология и факторы риска развития ишемического инсульта / Е.Н. Карпова, К.А. Муравьев, В.Н. Муравьева и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 441.

70. Киршенблат Я.Д. Сравнительная эндокринология яичников. Монография / Я.Д. Киршенблат. – М. Наука. -1973г. – 175 с.
71. Киселев А.В. Исследование биологической активности ампасе, кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты: дис. ... канд.мед.наук: 14.03.06 / Киселев Алексей Витальевич. – М., 2014. – 126 с.
72. Кистенев Б.А. Ишемический инсульт у больного, страдающего железодефицитной анемией / Б.А. Кистенев, М.Ю. Максимова, А.В. Лагутин // Нервные болезни. – 2007. – № 2. – С.28-32.
73. Ковалев Г.В. Ноотропные средства / Г.В. Ковалев. Волгоград: Нижне-Волжское книжное издательство, 1990. – 368 с.
74. Ковалев Г.В. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов / под. ред. Г.В. Ковалева. – Волгоград. 1985. – С.11-21.
75. Коваленко А.В. Влияние целлекса на восстановление когнитивных и речевых нарушений в остром периоде инсульта / А.В. Коваленко, М.Н. Сафронова //Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 4, №1. – С.40-44.
76. Кожина А.В. Фармакотерапия больных, перенесших ишемический инсульт, в период реабилитации / А.В. Кожина, О.С. Левин // Современная терапия в психиатрии и неврологии. – 2015. – № 1.– С. 4-11.
77. Козелкин А.А. Эффективность комплексной нейрометаболической терапии у больных с первичным и повторным мозговым ишемическим полушарным инсультом / А.А. Козелкин, Л.В. Новикова // Міжнародний неврологічний журнал. – 2015. – № 2. – С. 70-75.
78. Колб В.Г. Справочник по клинической химии, 2-е изд., перераб. и доп / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь. – 1982. – 366 с.
79. Королук М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, Н.О. Майорова, В.Е. Токарев и др. // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С.16-19.

80. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т.36, № 2. – С.88-91.
81. Котова О. В. Профилактика инсультов: неучтенные возможности / Котова О.В. // Российский медицинский журнал. -2012. – № 10. – С.514-517.
82. Краснова Н.М. Влияние комбинаций верапамила с эналаприлом и индапамидом на плазменный, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз и биохимические маркеры дисфункции эндотелия у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом / Н.М. Краснова, Т.П. Калашникова, А.И. Венгеровский // Российский кардиологический журнал. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 49-54.
83. Крушинский А.Л. Влияние ингибиторов нейрональной и индуцибельной NO-синтазы на развитие геморрагического инсульта в эксперименте / А.Л. Крушинский, В.С. Кузенков, В.Е. Дьяконова, В.П. Реутов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т. 114, № 8-2. – С. 21-27.
84. Крыжановский С. Особенности ведения пациентов в остром и восстановительном периодах после ОНМК / С. Крыжановский, М. Можаровская // Врач. – 2011. – № 9. – С.37-40.
85. Кулинский В.И. Нейропротекторный эффект ГАМК-ергических веществ при ишемии головного мозга / В.И. Кулинский, Г.В. Михельсон // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1997. – Т.60, №1. – С.56-58.
86. Курапова М.В. Клинико-диагностическое значение эндотелиальной дисфункции у больных хронической болезнью почек: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.04 / Курапова Марина Владимировна. – Самара, 2015. – 145 с.
87. Курдюмов И.Н. Цереброваскулярные эффекты ГАМК-ергических веществ в условиях геморрагического и ишемического поражений мозга: дис. ...канд. биол. наук: 14.00.25 / Курдюмов Илья Николаевич. – Москва, 2009. – 127 с.

88. Куркин Д.В. Церебропротекторные свойства композиций фенибута с некоторыми органическими кислотами при нарушениях мозгового кровообращения: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Куркин Денис Владимирович. – Волгоград. – 2013. – 24 с.
89. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях: пособие для врачей / В.З. Ланкин. – М., 2001. – 135 с.
90. Литвинов А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимасляной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Литвинов Андрей Андреевич. – Волгоград, 2015. – 25 с.
91. Луныгина Е.В. Влияние лекарственной композиции, содержащей пироглутаминовую кислоту и пирролидон на мозговое кровообращение / Е.В. Луныгина, Т.С. Ганынина, Р.С. Мирзоян // Эксперим. и клинич. фармакология. -2002. – Т.65, №3. – С.3-5.
92. Лутай М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез / М.И. Лутай // Український кардіологічний журнал. – 2004. – №1 – С. 22-34.
93. Майчук У.Ю. Особенности формирования артериальной гипертензии у женщин в постменопаузе/ У.Ю.Майчук, С.В. Юренева, И.В. Печенкина, А.И. Мартынов // Русский Медицинский журнал. – 2003. – Том 11, № 9. – С. 507-511.
94. Макарова Л.М. Влияние производного глутаминовой и аповинкаминовой кислот на метаболизм головного мозга в постишемическом периоде / Л.М. Макарова, М.А. Приходько, В.Е. Погорелый, С.Я. Скачилова, Р.С. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – № 2. – С.12-15.
95. Макарова, Л.М. Новые производные нейромедиаторных аминокислот как перспективные нейропротекторы / Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Проблемы фармацевтической науки и практики: сборник материалов III

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Владикавказ, 2013. – С.196-197.

96. Малахов В. А. Система оксида азота при церебральном ишемическом инсульте: некоторые патогенетические аспекты / В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя // Украинский медицинский Часопис. – 2007. – Т. 2, № 58. – С. 97-100.

97. Мамедов М.Н. Артериальная гипертензия в рамках метаболического синдрома: особенности течения и принципы медикаментозной коррекции / М.Н. Мамедов // Кардиология. – 2004. – Т.44, № 4. – С. 95-100.

98. Манухина Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, Ю.В. Архипенко // Вестник РАМН. – 2000. – № 4. – С.16-21.

99. Манушарова Р.А. Современные возможности диагностики и лечения климактерического синдрома / Р.А. Манушарова, Э.И. Черкезова // Русский Медицинский Журнал. – 2008. -Том 16, № 25. -С. 1712-1714.

100. Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х.М. Марков // Кардиология. – 2005. – № 12. – С.62-67.

101. Марков Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Фармакотерапия атеросклероза и оксид азота / Х.М. Марков // Кардиология. – 2011. – №3. – С. 86-94.

102. Марков Х.М. Оксидативный стресс и дисфункция эндотелия / Х.М. Марков // Пат.физиология и экспериментальная терапия. – 2005 – № 4 – С.5-9.

103. Марков, Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Оксид азота, дисфункция сосудистого эндотелия и патогенез атеросклероза / Х.М. Марков // Кардиология. – 2009. – №11. – С.64-74.

104. Мартынов А.И. Дисфункция эндотелия у больных гипертонической болезнью. / А.И. Мартынов, Н.Г. Аветян, Е.В. Акатова и др. // Кардиология. – 2005. – №10. – С. 101-104.

105. Марцевич С.Ю. Характеристика пациентов с мозговым инсультом или транзиторной ишемической атакой, включенных в регистр лис-2 (люберецкое исследование смертности больных, перенесших мозговой инсульт) / С.Ю. Марцевич, Н.П. Кутишенко, А.Ю. Суворов и др. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 18-24.
106. Медведев И.Н. Ослабление агрегационной способности тромбоцитов у больных артериальной гипертонией при метаболическом синдроме на фоне лозартана / И.Н. Медведев, Т.А. Кумова // Российский кардиологический журнал. – 2008. – № 5. – С.53-56.
107. Мирзоян Р.С. Нейропротекторные и цереброваскулярные эффекты ГАМК-миметиков / Р.С. Мирзоян // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2003. – Т.66, №2. – С.53-56.
108. Мирзоян Р.С. Пути фармакологической регуляции мозгового кровообращения / Р.С. Мирзоян // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1995. – Т.58, №4. – С.3-7.
109. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 т. / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян. – М.: Гриф. и К. -2012. – 944 с.
110. Морозов И.С. Влияние нейроактивных аминокислот и их производных на механизмы сосудистой регуляции: Автореферат дис. ... канд. мед. наук. – М. – 1975. – С. 24.
111. Москаленко Ю.Е. Реактивность мозговых сосудов: физиологические основы, информационная значимость, критерии оценки / Ю.Е. Москаленко // Физиол. журн. СССР. – 1986. – Т. 72, № 8. – С. 1027-1038.
112. Мухаметзянов А.М. Организация медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения в республике Башкортостан / А.М. Мухаметзянов, М.Ю. Павлова, Г.А. Шебаев, Э.Ф. Киреева // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т.8., №1. – С.18-22.

113. Насырова А.А. Функциональные показатели магистральных артерий и риск отторжения трансплантированного сердца : автореферат дис... канд. мед. наук: 14.01.24 / Насырова Альфия Айратовна. – Москва, 2015 – 26 с.
114. Нейфельд И.В. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний женщин / И.В. Нейфельд, А.И. Жирняков, И.Н. Скупова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – Общество с ограниченной ответственностью Наука и инновации. – 2012. – Т. 2, №. 12. – С. 994-996.
115. Нечипуренко Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко // Медицинские новости. – 2008. – №1. – С.7-13.
116. Нечипуренко Н.И. Роль оксида азота при ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко // Медицинские новости. – 2004. – №. 1. – С. 7-10.
117. Олейников В.Э. Влияние карведилола на инсулинорезистентность как фактор, определяющий клиническую эффективность при метаболическом синдроме / В.Э. Олейников, И.Б. Матросова, И.В. Елисеева, Ю.А. Томашевская // Российский кардиологический журнал. – 2009. – № 9. – С.59-65.
118. Островская Р.У. Эволюция проблемы нейропротекции / Р.У. Островская // Эксперим. и клинич. фармакология. -2003. – Т.66., №2. – С.32-37.
119. Островский О.В. Фармакологическая коррекция стресса и нейрохимические аспекты механизма действия антистрессорных веществ: дис. на соиск. уч ст. канд. мед. наук: 14.00.25 / Островский Олег Владимирович – Волгоград, 1987. – 256с.
120. Перфилова В.Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК: Автореферат диссертации... докт. биол. наук. – Волгоград, 2009. – 49 с.
121. Петрищев Н.Н. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови / Н.Н. Петрищев, О.А. Беркевич, Т.Д. Власов // Клинич. лаб. диагностика. – 2001. – №1. – С.50-52.

122. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / С. – Петерб. Гос. мед.ун-т. им. Акад. И.П. Павлова // под редакцией проф. Н.Н. Петрищева. – СПб, 2003. – С. 82 – 85.
123. Петров В.И. Создание и фармакология ноотропных и антидепрессивных препаратов на основе лигандов ВАК-рецепторов / В.И. Петров // Эксперим. и клинич. Фармакология. – 2003. – Т.66, №2. – С.20-23.
124. Петров В.И. Эмоциональный стресс: теоретические и клинические аспекты / Под ред. К.В. Судакова, В.И. Петрова // Приложение к Вестнику Волгоградской медицинской академии. – Волгоград, 1997 – Т.53, №3. – 168с.
125. Петров Ю. Г. Особенности ранней психосоциальной реабилитации пациентов, перенесших церебральный инсульт / Петров Ю.Г., Пряников И.В., Пузин М.Н. // Клиническая неврология. – 2015. – № 1. – С.18-19.
126. Петросян К.Р. Структурно-функциональные изменения артерий у курящих мужчин в возрастном аспекте / К.Р. Петросян, А.Г. Автандилов // Российский кардиологический журнал – 2008 – № 3 – С.35-40.
127. Пономарева Л.П. Клинический опыт применения церетона при ишемическом инсульте и дисциркуляторной энцефалопатии / Л.П. Пономарева, Л.Ф. Тимошкина, Л.Н. Саранцева, А.А Буланов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2010. – №2. – С. 62-64.
128. Попова А.А. Дисфункция эндотелия и ее роль в развитии артериальной гипертензии / А.А. Попова // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2009. – № 4. – С.58-62.
129. Преображенская И.С. Постинсультные когнитивные расстройства: причины, клинические проявления, лечение / И.С. Преображенская // Фарматека. – 2013. – Т. 9. – С. 49-53.
130. Раевский К.С. Методические указания по изучению нейрорепрогенеративной активности фармакологических веществ / К.С. Раевский, В.Б. Наркевич // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 114-120.

131. Расулова Х.А. Нарушение обмена оксида азота при ишемическом инсульте в зависимости от его патогенетических подтипов / Х.А. Расулова // Медицинский альманах. – 2013. – №1. – С. 111-114.
132. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиасфера. – 2006. – 312 с.
133. Робертус А.И. Оценка взаимосвязи между уровнем фибриногена и скоростью тромбообразования у животных с недостаточностью половых гормонов на фоне введения производного ГАМК РГПУ-189/ А.И. Робертус, А.В.Воронков // Сборник трудов межвузовской научной конференции, посвященной памяти профессора Владислава Васильевича Пичугина и 75-летию КГМУ. «Актуальные вопросы фармакологии и фармации» 400с. – Курск. -2009. -С.308-309.
134. Робертус А.И. Эндотелиопротективные свойства производных ГАМК при недостаточности половых гормонов: дис. ...канд. биол. наук: 14.03.06 / Робертус Александра Игоревна. – Волгоград, 2010. – 155 с.
135. Розанов В.А. Метаболическая роль ГАМК-шунта в центральной нервной системе при экспериментальных состояниях / В.А. Розанов // Успехи современной биологии. – 1989. – Т.107, №3. – С. 375-390.
136. Рябченко А.Ю. Клинико – патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции у больных с ишемическим инсультом на фоне гипертонической болезни: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.11 – Нервные болезни / Рябченко Александр Юрьевич. – М., 2014. – 106с.
137. Савченко А.Ю. Лечение последствий органического поражения головного мозга фенотропилом / А.Ю. Савченко, Н.С. Захарова, И.Н. Степанов // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2005. – № 12. – С.22-26.
138. Саркисова Д.С. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544с.

139. Светухин А.М. Результаты применения сулодексида у больных с диабетической стопой без критической ишемии / А.М. Светухин, А.Б. Земляной // Терапевтический архив. – 2001. – № 4. – Р.31-33.
140. Скворцова В.И. Ишемический ОНМК у больных молодого возраста / В.И. Скворцова, Е.А. Кольцова, Е.И. Кимельфельд // Журнал неврологии и психиатрии. ОНМК. – 2009. – № 10. – С.3-14.
141. Смердова Л.Н. Метод визначення участі оксиду азоту в механізмі дії хімічних речовин / Смердова Л.Н, Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. // Совр. пробл. токсикологии. – 2002. – № 4. -С.32-34.
142. Сметник В.П. Руководство по климактерию / В.П. Сметник, В.И. Кулакова. М., – 2001. – 685с.
143. Смирнов И.Е. Факторы риска и маркеры эндотелиальной дисфункции у детей, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения / И.Е. Смирнов, Н.Л. Нечаева, А.Г. Кучеренко, Л.М. Кузенкова // Российский педиатрический журнал . – 2014. – Т. 17, № 1. – С.9-14.
144. Старых Е.П. Состояние сосудистого эндотелия больных с атеросклеротической хронической ишемией мозга: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.11 – Нервные болезни / Старых Евгения Петровна. – М., 2015 – 144с.
145. Суворов А. Ю. Оценка соответствия современным клиническим рекомендациям сердечно-сосудистой терапии, направленной на улучшение исходов у пациентов после перенесенного инсульта (по данным регистра лис-2) / А.Ю. Суворов, С.Ю. Марцевич, Н.П. Кутишенко // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 247-252.
146. Суворов А. Ю. Способ оценки соответствия современным клиническим рекомендациям медикаментозной терапии, направленной на снижение риска повторного инсульта (по данным регистра лис-2) / А.Ю. Суворов, С.Ю. Марцевич, Н.П. Кутишенко // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11. – № 1. – С.45-52.

147. Суслина З.А. Антиоксидантная терапия при ишемическом инсульте / З.А. Суслина, Т.Н. Федорова, М.Ю. Максимова и др. // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.Н. Корсакова. – 2000. – № 10. – С.34-38.
148. Суслина З.А. Атеросклероз и ишемические нарушения мозгового кровообращения / З.А. Суслина, М.М. Танашян, О.В. Лагода // Атеротромбоз. – 2009. – № 2. – С. 60 – 67.
149. Суслина З.А., Танашян М.М., Ионова В.Г. Концепция дизрегуляции гемостаза как универсального фактора патогенеза ишемического инсульта / З.А. Суслина М.М. Танашян, В.Г. Ионова // Материалы IX всероссийского съезда неврологов. – 2006. – 489с.
150. Тадтаева Н.Е. Клиническое течение сахарного диабета 2 типа в сочетании артериальной гипертензией: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.04 – внутренние болезни / Тадтаева Нелли Ефремовна. – М., 2015. – 103с.
151. Топчян А.В. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии. / Р.С. Мирзоян, М.Г. Баласанян // Эксперим. и клин, фармакол. – 1996. – Т.59, №5. – С.62-64.
152. Тюренков И. Н. Недостаточность половых гормонов, эндотелиальная дисфункция и ее коррекция эстрогенами / Тюренков И.Н., Воронков А.В., Робертус А.И. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Vol. 72. – №. 6. – Р. 57-59.
153. Тюренков И.Н. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 9. – С. 8-12.
154. Тюренков И.Н. Изучение скорости локального мозгового кровотока с модификацией синтеза эндогенного оксида азота на фоне недостаточности половых гормонов у крыс обоего пола / И.Н.Тюренков, А.В.Воронков, А.И.Робертус и др.// Научные труды VII международной научно-

практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» 23-26 ноября 2006 г., – Москва, 2006. – С. 510-511.

155. Тюренков И.Н. Кардиоваскулярные и кардиопротекторные свойства ГАМК и её аналогов / Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. – Волгоград: ВолГМУ. – 2008. – 203 с.

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

157. Тюренков И.Н. Морфологическая оценка эндотелиальной дисфункции, в сосудах почек крыс обоего пола, с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, Г.Л. Снигур и др. // Сборник трудов научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии» посвященной памяти член корр. РАМН, з.д.н. РФ, д.м.н., проф. В.Б.Писарева. – Волгоград. – 2010. – С.145-149.

158. Тюренков И.Н. Психостимулирующее действие фенильного производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135, глутарон) в опытах на экспериментальных животных / И.Н. Тюренков, В.В. Багметова, Ю.В. Чернышева, М.А. Яркова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – №11. – С. 7-12.

159. Тюренков И.Н. Развитие эндотелиальной дисфункции при недостаточности половых гормонов / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.И. Робертус // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2009. – № 4. – С.33-36.

160. Улубиева Е.А. Влияние возраста, курения на эндотелиальную функцию у женщин / Е.А. Улубиева, А.Г. Автандилов // Проблемы женского здоровья. – 2015. – Т.10, №2. – С. 47-54.

161. Федин А. И. Эндотелиальная дисфункция у больных с хронической ишемией мозга и возможности ее фармакологической коррекции / А.И.

- Федин, Е.П. Старых, М.В. Путилина и др. // Лечащий врач. – 2015. – Т. 5. – С. 15-20.
162. Федин А.И. Избранные лекции по амбулаторной неврологии / А.И. Федин. – М.: ООО «АСТ 345». – 2014. – 128с.
163. Федин А.И. Эндотелиальная дисфункция у больных с хронической ишемией мозга и возможности ее фармакологической коррекции / Федин А.И., Старых Е.П., Путилина М.В. // Лечащий врач. – 2015. – № 5. – С. 15-20.
164. Филиппов А.Е. Дисфункция эндотелия и факторы риска при ишемической болезни сердца / А.Е. Филиппов, А.М. Ханджян, К.А. Солодухин и др. // Клиническая медицина. – 2006. – № 2. – С. 28 – 32.
165. Фирсов А.А. Метаболическая цитопротекторная терапия в острый период ишемического ОНМК / А.А. Фирсов, М.В. Смирнов, Т.А. Усанова // Поликлиника. – 2011. – № 1. – С.34-36.
166. Фонякин А.В. Профилактика сердечно-сосудистых осложнений после ишемического инсульта: стандарты, действительность и перспективы / А.В.Фонякин Л.А. Гераскина, В.А. Шандалин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2010. – №1. – С.24-29.
167. Хохлов А.Л. Аспекты коррекции дисфункции эндотелия при ишемическом инсульте / А.Л. Хохлов // Архивъ внутренней медицины. – 2015. – № 4. – С. 24-29.
168. Чугунова Л.А. Применение гликозаминогликанов в лечении диабетической нефропатии / Л.А. Чугунова, М.В. Шестакова, М.Ш. Шамхалова // Сахарный диабет – 2009. – Т. 3, № 4. – С.34-36.
169. Шарипов Р.А. Артериальная гипертензия и сахарный диабет / Р.А. Шарипов // Рос. кардиол. журн. – 2008. – №3. – С.71-76.
170. Шварц В. Воспаление как фактор патогенеза инсулинорезистентности и сахарного диабета 2 типа / В. Шварц // Терапевт. арх. – 2009. – № 10. – С.74-80.

171. Шестакова М.В. Дисфункция эндотелия – причина или следствие метаболического синдрома? / М.В. Шестакова // Российский медицинский журнал – 2001. – Т.9, № 2. – С.88-93.
172. Шмонин А.А. Современная терапия хронического нарушения мозгового кровообращения. Часть 2 / А.А. Шмонин, В.С. Краснов, И.А. Шмони́на, Е.В Мельникова // Neuropsychiatry. – 2015. – Т. 1. – С. 99-106.
173. Щепанкевич Л.А. Ишемический инсульт: оценка параметров сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в остром периоде заболевания / Л.А. Щепанкевич, Е.В. Вострикова, П.И. Пилипенко и др.// Вестн. неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2011. – № 1. – С.11-13.
174. Щепанкевич Л.А. Эндотелиальная дисфункция при ишемическом инсульте у больных сахарным диабетом / Л.А. Щепанкевич, Е.В. Вострикова, П.И. Пилипенко, А.В. Ярмошук и др. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 28-30.
175. Яснецов В.В. Фармакотерапия отека головного мозга / В.В. Яснецов, В.Е. Новиков. – М.: ВИНТИ, 1994. – 176 с.
176. Aarts M.M. Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke / M.M. Aarts, M. Arundine, M. Tymianski // Expert Rev. Mol. Med. – 2003. – Vol. 5, № 30. – P. 1-22.
177. Ahn M.J. The effects of traumatic brain injury on cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide levels and cytokine expression / M.J. Ahn, E.R. Sherwood, D.S. Prough et al. // J. Neurotrauma. – 2004. – Vol. 21, № 10. – P.1431-1442.
178. Ashton H. GABA-Ergic Drugs: Exit Stage Left, Enter Stage Right / H. Ashton, H. Young // J. Psychopharmacol. – 2003. – Vol. 17. – P. 174 – 178.
179. Asplund K, Stegmayr B, Eriksson M Declining mortality from subarachnoid hemorrhage: changes in incidence and case fatality from 1985 through 2000 / K. Asplund, B. Stegmayr, M. Eriksson // Stroke. – 2004. – Vol. 35, № 9. – P.2059-2063.

180. Barquera S. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease / S. Barquera, A. Pedroza-Tobias, C. Medina et al. // Archives of medical research. – 2015. -V.46, № 5. – P.328-338.
181. Bettger P.J. The association between socioeconomic status and disability after stroke: Findings from the Adherence eValuation After Ischemic stroke Longitudinal (AVAIL) registry / P.J. Bettger, X. Zhao, C. Bushnell et al. // BMC Public Health. – 2014. – Vol. 14. – P. 281.
182. Born G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G. V. Born // Nature (Lond). – 1962. – Vol. 194. – P.927-929.
183. Brandes R.P. Endothelial dysfunction and hypertension / R.P. Brandes // Hypertension. – 2014. – Vol. 64, № 5. – P.924-928.
184. Broekhuizen L.N. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus / L.N. Broekhuizen, B.A. Lemkes, H.L. Mooij et al. // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53, № 12. – P.2646-2655.
185. Brunner H. Endothelial function and dysfunction. Part II. / H. Brunner, J.R. Cockcroft, J. Deanfield et al. // J. Hypertension. – 2005. – Vol. 23. – P.233-246.
186. Cadilhac D.A. National stroke registries for monitoring and improving the quality of hospital care: A systematic review / D.A. Cadilhac, J. Kim, N.A. Lannin et al. // International Journal of Stroke. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. 28-40.
187. Campisi R. Effects of long-term smoking on myocardial blood flow, coronary vasomotion, and vasodilator capacity / R. Campisi, J. Czernin, H. Scheder // Circulation. – 1998. – Vol. 98. – P.119-25.
188. Canavero I. Effects of Acute Stroke Serum on Non-Ischemic Cerebral and Mesenteric Vascular Function / I. Canavero, H.A. Sherburne, S.M. Tremble et al. // Translational stroke research. – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 156-165.
189. Celermajer D.S. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women / D.S. Celermajer, K.E. Sorensen, D.J. Spiegelhalter et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1994. – № 24. – P.471-476.

190. Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. Second ed. / J. Chalmers, S. Mac Mahon, C. Anderson et al. – London, 2000. – 129 p.
191. Chand S. Endothelial nitric oxide synthase single nucleotide polymorphism and left ventricular function in early chronic kidney disease. / S. Chand, C.D. Chue, N.C. Edwards et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P.116-120.
192. Chen W. Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition / W. Chen, S. Pendyala, V. Natarajan // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2008. – Vol. 295, № 4. – P. 575-583.
193. Cherian L. Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats / L. Cherian, J.C. Goodman, C.S. Robertson // J. Neurophysiol. – 2000. – Vol. 83, № 4. – P. 2171-2178.
194. Cherian L. L-arginine and free radical scavengers increase cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide concentrations after controlled cortical impact injury in rats / L. Cherian, C.S. Robertson // J. Neurotrauma. – 2003. – Vol. 20, № 1. – P. 77-85.
195. Chin-Dusting J.P. Effects of in vivo and in vitro L-arginine supplementation on healthy human vessels / J.P. Chin-Dusting, C.T. Alexander, P.I. Arnold et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1996. – Vol. 28, № 1. – P.153-166.
196. Chiu J.J. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives / J.J. Chiu, S. Chien // Physiol. Rev. – 2011. – Vol. 91, № 1. – P. 327-387.
197. Collins P. Management of cardiovascular risk in the peri-menopausal woman: a consensus statement of European cardiologists and gynaecologists / P. Collins, G. Rosano, C. Casey et al. // European Heart Journal. – 2007. – Vol. 28, № 16. – P.2028-2040.
198. Combs D.J. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol / D.J. Combs, L.G. D'Alecy // Stroke. – 1987. – Vol. 18, № 2. – P. 503-511.

199. Cotton J.M. Effects of nitric oxide synthase inhibition on basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo / J.M. Cotton, M.T. Keamey, P.A. Mac Carthy et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104. – P.2318-2323.
200. Dart C. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function / C. Dart // *J. Physiol*. – 2010. – Vol. 588. – P.3169-3178.
201. Denison F.C. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function / Denison F.C., Roberts K.A., Barr S.M., Norman J.E. // *Reproduction*. – 2010. – Vol. 140, № 3. – P. 373-385.
202. Figtree G.A. Functional estrogen receptor alpha promoter polymorphism is associated with improved endothelial-dependent vasodilation / G.A. Figtree, T.Guzik, B.G. Robinson et al. // *International journal of cardiology*. – 2010. – Vol. 143. – №. 2. – P. 207-208.
203. Fitzgerald D.J. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet vessel wall adhesion / D.J. Fitzgerald // *Neurology*. – 2001. – Vol. 57. – P.1-4.
204. Forstermann U. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace / U. Forstermann, T. Munzel // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P.1708-1714.
205. Garcia J.H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats / J.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu, X.J. Hu // *Statistical validation. Stroke*. -1995. – Vol. 26, № 4. – P.627-634.
206. Garry P.S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside / P.S. Garry, M. Ezra, M.J. Rowland // *Exp Neurol*. – 2015. – Vol. 263. – P. 235-243.
207. Gordon T. Menopause and coronary heart disease: the Framingham Study / T. Gordon, W. B. Kannel, M. C. Hjortland et al. // *Annals of Internal Medicine*. – 1978. – Vol. 89, №. 2. – P. 157-161.
208. Green D.J. Flow-Mediated Dilation and Cardiovascular Event Prediction: Does Nitric Oxide Matter? / D.J. Green, H. Jones, D. Thijssen et al. // *Hypertension*. – 2011. – Vol. 57, № 3. – P. 363-369.

209. Guo J.Y. Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway / J.Y. Guo, T. Yang, X.G. Sun // J. Biomed. Sci. – 2011. – Vol. 18. – P. 79.
210. Hamilton K.L. Effect of ovariectomy on cardiac gene expression: inflammation and changes in SOCS gene expression / K.L. Hamilton, L. Lin, Y. Wang, A.A. Knowlton // Physiol. Genomics. – 2008. – Vol. 32. – P.254-263.
211. Hashimoto M. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle / M. Hashimoto, M. Akishita, M. Eto et al. // Circulation. – 2005. – V.92. – P.3431-3435.
212. Hashimoto M. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle / M. Hashimoto, M. Akishita, M. Eto, M. Ishikawa et al. //Circulation. – 1995. – Vol. 92, № 12. – P. 3431-3435.
213. Hazell A.S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies / A.S. Hazell // Neurochem. Int. – 2007. – Vol. 50, № 7-8. – P.941-953.
214. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions / J. Hladovec / TPhysiol. Bohemoslov. – 1978. – Vol. 27, № 2. – P.140-144.
215. Hlatky R. Role of nitric oxide in cerebral blood flow abnormalities after traumatic brain injury / R. Hlatky, J.C. Goodman, A.B. Valadka, C.S. Robertson // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2003. – Vol. 23. – P.582-588.
216. Hsueh W.A. Insulin resistance and the endothelium / W.A. Hsueh, C.J. Lyon, M.J. Quiñones // Am. J. Med. – 2004. – Vol. 117, № 2. – P.109-117.
217. Hwang M.H. Type 2 Diabetes: Endothelial dysfunction and Exercise. / M.H. Hwang S. Kim / J. Exerc. Biochem. – 2014. – Vol. 18, № 3. – P.239-247.
218. Johnstone M.T. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus / M.T. Johnstone, S.L. Creager, K.M. Scales et al. // Circulation. – 1993. – Vol. 88. – P.2510-2516.
219. Kearney D. The anti-thrombotic effects of statins / D. Kearney, D. Fitzgerald // J Am Coll Cardiol. – 1999. – Vol. 33. – P.1305-1307.

220. Kishi T. Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release / T. Kishi, Y. Hirooka, K. Sakai // *Hypertension*. – 2001. – Vol. 38, № 4. – P. 896-901.
221. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. I. 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, G. Ooneda // *Jpn. J. Stroke*. – 1986. – Vol. 8. – P. 1–8.
222. Lai T.W. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection / T.W. Lai, S. Zhang, Y.T. Wang et al. // *Prog. Neurobiol.* – 2014. – Vol. 115. – P. 157-188.
223. Lai T.W. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond / T.W. Lai, W.C. Shyu, Y.T. Wang // *Trends Mol. Med.* – 2011. – №17. – P.266-275.
224. Lammert E. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels / E., Lammert O. Cleaver, D. Melton // *Science*. – 2001. – Vol. 294. – P.564-567.
225. Laurent S. The arterial wall: a new pharmacological and therapeutic target. / S. Laurent, P. Vanhoutte, I. Caverio et al. // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 10, № 3. – P.243-257.
226. Li Y.H. Mechanisms of protection against diabetes-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation by Tanshinone IIA. / Y.H. Li, Q. Xu, W.H. Xu // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1850, № 4. – P. 813-823.
227. Lundblad C. Effects of L-arginine on cerebral blood flow, microvascular permeability, number of perfused capillaries, and brain water content in the traumatized mouse brain / C. Lundblad, P. Bentzer // *Microvasc. Res.* – 2007. – Vol. 74. – P.1-8.
228. Madden J.A. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke / J.A. Madden // *Neurology*. – 2012. – Vol. 79, suppl 1. – P. 58- 62.
229. Maltais S. The bone marrow-cardiac axis: role of endothelial progenitor cells in heart failure / S. Maltais, L.P. Perrault, H.Q. Ly// *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2011. – Vol. 39, № 3. – P.368-374.

230. Matsumoto K. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function / K. Matsumoto, H. Yoshitomi, J. Rossant, K.S. Zaret // Science. – 2001. – Vol. 294. – P.559-563.
231. Monnier L. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes / L. Monnier, E. Mas, C. Ginet // J. of the American Medical Association. – 2006. – Vol. 295, №14. – P.1681-1687.
232. Montoya C.P. The "staircase test" a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats / C.P. Montoya, L.J. Campbell-Hope, K.D. Pemberton, S.B. Dunnett // Journal of Neuroscience Methods. – 1991. – Vol. 36, № 2-3. – P.219-228.
233. Mudau M. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis / M. Mudau, A. Genis, A. Lochner, H. Strijdom // Cardiovasc. J. Afr. – 2012. – Vol. 23, № 4. – P. 222-231.
234. Münzel T. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction / T. Münzel, C. Sinning, F. Post et al. //Ann. Med. – 2008. – Vol. 40, № 3. – P.180-96.
235. Napoli C. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights / C. Napoli, G. Paolisso, A. Casamassimi // J. Am. Coll. Cardiol. – 2013 – Vol. 9, № 62(2). – P. 89-95.
236. Ocmар B.S. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis / B.S. Ocmар, M.R. Tschudi, N. Godoy et al. // Circulation. – 1998. – Vol. 97, № 35. – P.2494-2498.
237. Palluy O. Hypoxia / reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion / O. Palluy, L. Morliere, J.C. Gris et al. // Free Radic. Biol. Med. – 1992. – Vol. 13, № 1. – P.21-30.
238. Palmieri D. Estrogen receptor activation protects against TNF- α -induced endothelial dysfunction / D. Palmieri, P. Perego, D. Palombo // Angiology. – 2014. – Vol. 65, №. 1. – P. 17-21.

239. Park J. The effects of different exercise modes for preventing endothelial dysfunction of arteries and bone loss in ovariectomized rats / J. Park, N. Omi // *J Exerc Nutrition Biochem.* – 2014. – Vol. 18, № 2. – P.133-139.
240. Pascual F. Glutamate, Glutamine, and GABA as Substrates for the Neuronal and Glial Compartments After Focal Cerebral Ischemia in Rats / J.M. Pascual, F. Carceller, J.M. Roda, S. Cerdán // *Stroke.* – 1998. – Vol. 29, № 5. – P.1048-1057.
241. Patel A. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial / A. Patel, S. MacMahon, J. Chalmers et al. // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370. – P.829-840.
242. Patel R.P. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow / R.P. Patel, N. Hogg, D.B. Kim-Shapiro // *Cardiovasc Res.* – 2011. – Vol. 89, № 3. – P. 507-515.
243. Pitocco D. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes / D. Pitocco, F. Zaccardi, E. Di Stasio // *Rev. Diabet. Stud.* – 2010. – Vol. 7, №1. – P.15-25.
244. Quinn N. Drug Treatment of Parkinson's disease / N. Quinn // *BMJ.* – 1995. – Vol. 310. – P. 575-579.
245. Regueiro A. Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events: time-course after acute myocardial infarction and stroke / A. Regueiro, E. Cuadrado-Godia, C. Bueno-Beti, et al. // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2015. – Vol. 80. – P. 146-155.
246. Robinson T. Thrombolysis in acute ischaemic stroke: an update / T. Robinson, Z. Zaheer, A.K. Mistri // *Ther Adv Chronic Dis.* – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 119-131.
247. Rubanyi G.M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases / G.M. Rubanyi // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 22, Suppl. 4. – P.S1-S4.
248. Rubbo H. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: Termination of radical chain propagation, reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives / H.

- Rubbo, S. Parthasarathy, S. Barnes et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 324. – P.15-25.
249. Schallert T. Disentangling multiple types of recovery from brain injury / T. Schallert, M.T. Woodlee, S.M. Fleming // Pharmacology of cerebral ischemia. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 2002. – 216 p.
250. Schmidt H. No.NO from NO synthase / H. Schmidt, H. Hofmann, U. Schindler et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93, № 25. – P.14492-14497.
251. Secomb T.W. The microcirculation: physiology at the mesoscale / T.W. Secomb, A.R. Pries // J Physiol. – 2011. – Vol. 589(Pt 5). – P. 1047-1052.
252. Shaw F.Z. 7-12 Hz High-Voltage Rhythmic Spike Discharges in Rats Evaluated by Antiepileptic Drugs and Flicker Stimulation / F.Z. Shaw // J. Neurophysiol. – 2007. – Vol. 97, № 1. – P.238-247.
253. Smith W.S. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a Therapeutic Perspective / W.S. Smith // J. Vase. Interv. Radiol. – 2004. – Vol. 15. – P.3-12.
254. Sobrino T. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome / T. Sobrino, O. Hurtado, M.Á. Moro et al. // Stroke. – 2007. – Vol. 38, № 10. – P. 2759-2764.
255. Sousa J.B. Endothelial dysfunction impairs vascular neurotransmission in tail arteries. / J.B. Sousa, P. Fresco // Neurochem. Int. – 2015. – Vol. 80. – P. 7-13.
256. Statsenko M.E. Correction of endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus during combined antihypertensive therapy / M.E. Statsenko, M.V. Derevianchenko // Ter Arkh. – 2014. – Vol. 86, № 8. – P.90-93.
257. Szydlowska K. Calcium, ischemia and excitotoxicity / K. Szydlowska, M. Tymianski // Cell Calcium. – 2010. – Vol. 47, № 2. -P.122-129.
258. Taddei S. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications / S. Taddei // Drugs. – 2002. – Vol. 62. – P.265-284.

259. Tamargo J. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide / J. Tamargo, R. Caballero, R. Gómez, E. Delpón // *Cardiovasc Res.* – 2010. – Vol. 87. – P.593-600.
260. Tamura A. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion / A. Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, G.M. Teasdale. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1981. – №1. – P.61-69.
261. Tawfik H.E. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction / H.E. Tawfik // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 319, № 1. – P.386-395.
262. Thrift A.G. Global stroke statistics / A.G. Thrift, D.A. Cadilhac, T. Thayabaranathan et al. // *International Journal of Stroke.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 6-18.
263. Tuzgen S. Nitric oxide levels in rat cortex, hippocampus, cerebellum, and brainstem after impact acceleration head injury / S. Tuzgen, N. Tanriover, M. Uzan // *Neurol. Res.* – 2003. – Vol. 25. – P.31-34.
264. Vakili A. Pentoxifylline attenuates TNF- α protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats / A. Vakili, S. Mojarad, M.M. Akhavan, A. Rashidy-Pour // *Brain Res.* – 2011. – Vol. 1377. – P. 119-25.
265. Venditti P. Oxidative stress in cold-induced hyperthyroid state / P. Venditti, L. Di Stefano, S. Di Meo // *J. Exp. Biol., Sep.* – 2010. – Vol. 213. – P.2899-2911.
266. Versari D. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease / D. Versari, E. Daghini, A. Viridis et al // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P.314-321.
267. Viridis A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women/ A. Viridis, L. Ghiadoni, S. Pinto et al. // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101. – P.2258-2263.
268. Vita J. Endothelial dysfunction: a barometer for cardiovascular risk / J. Vita, J Keaney. // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P.640-643.

269. Vita J.A. Control of shear stress in the epicardial coronary arteries of humans: impairment by atherosclerosis/ J.A. Vita, C.B. Treasure, P. Ganz et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1989. – Vol. 14. – P.1193-9.
270. Walker R.W. Case - fatality and disability in the Tanzanian Stroke Incidence Project cohort / R.W. Walker, K. Wakefield, W.K. Gray et al. // Acta Neurologica Scandinavica. - 2016. - Vol. 133. - No. 1. - P. 49-54.
271. Wever R. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? / R. Wever, E. Stoes, T.J. Rabelink // Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 137 (Suppl.). – P.51S-60S.
272. Wever R.M. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase / R.M. Wever, T.F. Lüscher, F. Cosentino, T.J. Rabelink// Circulation. – 1998. – Vol. 97, № 1. – P. 108-112.
273. Widmer R.J. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease / R.J. Widmer, A. Lerman // Glob. Cardiol.Sci. Pract. – 2014. – Vol. 2014, № 3. – P.291-308.
274. Yamamoto M. A possible role of a lipid peroxidation in cellular damage, caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration / M. Yamamoto, T. Shina, T. Vozumi et al. // Stroke. – 1983. – №14. – P. 977-982.
275. Yu Q. Insulin says NO to cardiovascular disease / Q. Yu, F. Gao, X.L. Ma // Cardiovasc. Res. – 2011. – Vol. 89, № 3. – P. 516-524.
276. Yuan L. Long Non-coding RNAs Mediate Cerebrovascular Endothelial Pathologies in Ischemic Stroke / L. Yuan, J. Zhang, Y. E. Chen et al. // Stroke. – 2015. – Vol. 46. – P. A72.
277. Zeiher A.M. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function / A.M. Zeiher, V. Schachinger, J Minners. // Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P.1094-1100.
278. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction / C. Zhang // Basic Res Cardiol. – 2008. – Vol. 103, № 5. – P.398-406.

279. Zhao Y.X. High fat diet exacerbates vascular endothelial dysfunction in rats exposed to continuous hypobaric hypoxia. / Y.X. Zhao, F. Tang, Q. Ga / Biochem Biophys. Res. Commun. – 2015. – Vol. 457, № 3. – P.456-459.