

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

На правах рукописи

Шабанова Наталья Борисовна

Церебропротекторное действие производных пиримидин-4(1H)-она
при ишемии головного мозга

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Воронков Андрей Владиславович

Пятигорск, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1. Лабораторные животные.....	25
2.2. Характеристика исследуемых соединений.....	25
2.3. Дизайн исследования.....	27
2.4. Модели ишемии головного мозга.....	29
2.5. Методы оценки церебропротекторной активности.....	30
2.6. Методы оценки антиоксидантной и антирадикальной активности.....	37
2.7. Методы оценки антитромботической функции сосудистого эндотелия.....	40
2.8 Методы оценки скорости мозгового кровотока и вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия.....	41
2.9 Методы иммуноферментного анализа различных маркеров апоптоза.....	42
2.10 Методы статистической обработки результатов исследования.....	42
ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ.....	44
3.1.1 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на степень летальности и выраженность неврологического дефицита в условиях ишемии головного мозга.....	44
3.1.2 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности в тесте «Открытое поле» в условиях ишемии головного мозга.....	47
3.1.3 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на психо-эмоциональный статус в тесте «Открытое поле» в условиях ишемии головного мозга.....	49
3.1.4 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга.....	51

3.1.5 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на горизонтальную и вертикальную двигательную активность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга.....	53
3.1.6 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию молочной кислоты в плазме крови крыс и потребление глюкозы мозговой тканью в условиях ишемии головного мозга.....	55
3.2. Изучение дозозависимого эффекта соединений-лидеров на когнитивные и мнестические функции и некоторые показатели энергообмена на фоне ишемии головного мозга.....	58
3.2.1. Влияние профилактического введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения на когнитивные функции на фоне ишемии головного мозга.....	58
3.2.2. Влияние профилактического введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения на концентрацию молочной кислоты в плазме крови крыс и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне ишемии головного мозга.....	61
Заключение.....	63
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	65
4.1. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на выраженность неврологического дефицита на фоне фокальной ишемии головного мозга.....	65
4.2. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на сенсомоторный дефицит на фоне фокальной ишемии головного мозга.....	68
4.3. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на биоэлектрический потенциал на фоне фокальной ишемии головного мозга.....	72

4.4.	Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на степень гидратации на фоне фокальной ишемии головного мозга.....	75
4.5.	Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на размер зоны некроза на фоне фокальной ишемии головного мозга.....	76
4.6.	Патоморфоз ткани головного мозга при экспериментальной фокальной ишемии на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения.....	78
	Заключение.....	85
ГЛАВА 5.	ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ И ВАЗОДИЛАТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ НА ФОНЕ ПРИЕМА СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	88
5.1	Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на антитромботический потенциал сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга.....	88
5.2	Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга.....	96
	Заключение.....	99
ГЛАВА 6.	ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС.....	101
6.1	Влияние соединения-лидера и препарата сравнения на изменение про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной ишемии головного мозга и процессы генерации свободных радикалов на моделях <i>in vitro</i>	101
6.2	Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на изменение лактат/пируватного соотношения и кальций-опосредованного повреждения мозговых тканей в условиях фокальной ишемии головного мозга.....	106
6.3	Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на специфические маркеры апоптоза в условиях фокальной ишемии головного мозга.....	110

Заключение.....	114
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	116
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	130
Список сокращений.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Цереброваскулярные заболевания занимают одну из ключевых позиций среди причин ранней смертности, высокого уровня инвалидизации и потери трудоспособности населения, приобретая не только медицинскую, но и социально-экономическую значимость [30, 31]. С каждым годом число пациентов с сосудистыми поражениями неуклонно растет, так отмечается около 1 млн. случаев ишемического инсульта в экономически развитых странах ежегодно, а к 2030 году прогнозируется увеличение данного показателя до 3,4 млн. [234]. В Российской Федерации тенденция заболеваемости нарушениями мозгового кровообращения также неутешительна. По данным 2013 года в РФ регистрируется порядка 500000 случаев развития ишемического инсульта ежегодно [31], что, несомненно, делает проблему профилактики и лечения заболеваний ишемического генеза одной из актуальных на сегодняшний день [54, 79, 100].

С целью фармакотерапии нарушений церебральной гемодинамики применяется большое количество лекарственных средств, обладающих церебропротекторными свойствами. В то же время арсенал церебропротекторов не полностью удовлетворяет практикующих специалистов, вследствие чего перед экспериментальной фармакологией и медицинской химией встают новые задачи в области целенаправленного поиска и изучения новых средств, улучшающих мозговое кровообращение [88].

Степень разработанности темы

Исследования последних лет показали, что на фармацевтическом рынке существует обширный ряд препаратов, применяемых при нарушениях мозгового кровообращения, однако их церебропротекторное действие недостаточно эффективно и не удовлетворяет клинических специалистов [215, 37, 88]. В результате чего, очевидной является потребность в новых средствах, обладающих церебропротекторным эффектом, способных предотвращать развитие нейродеструктивных процессов и улучшающих прогноз заболевания.

С этой точки зрения представляет интерес класс производных пиримидинов, на основе которых в настоящее время создаются новые высокоэффективные биологически активные вещества [173, 47, 90]. Исходя из опубликованных результатов экспериментальных исследований, производные пиримидина проявляют антигипоксическую [146], антиагрегационную [20], антиоксидантную [154, 222] виды активностей. Вследствие этого становится целесообразным поиск среди производных пиримидина фармакологически активных соединений, оказывающих благоприятное влияние при терапии цереброваскулярной патологии, с целью дальнейшего их внедрения в практическую деятельность.

Цель исследования

Оценить наличие церебропротекторной активности у производных пиримидин-4(1H)-она и возможность их дальнейшего применения для лечения цереброваскулярных заболеваний.

Задачи исследования

1. Провести фармакологический скрининг в ряду производных пиримидин-4(1H)-она с целью выявления потенциального церебропротекторного действия в условиях ишемии мозга крыс. У выбранного соединения-лидера провести оценку зависимости «доза-эффект».
2. Оценить влияние соединения-лидера на возникающие неврологические нарушения, изменения биоэлектрического потенциала, степень гидратации и некротизации мозговой ткани, провести гистологические и морфометрические исследования мозга крыс в условиях экспериментальной фокальной церебральной ишемии.
3. Изучить эндотелиотропное действие соединения-лидера среди производных пиримидин-4(1H)-она, посредством влияния его на некоторые показатели антитромботической и вазодилатирующей функции эндотелия сосудов.

4. Изучить потенциально возможные механизмы церебропротекторного действия соединения-лидера в условиях экспериментальной фокальной ишемии головного мозга крыс.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование церебропротекторного действия новых производных пиримидин-4(1H)-она в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Впервые изучено влияние профилактического введения производных пиримидин-4(1H)-она на выживаемость, неврологический дефицит, изменение когнитивных и мнестических функций, содержание лактата и глюкозы в плазме крови крыс на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий. У выбранного соединения-лидера проведена оценка зависимости «доза-эффект». Проанализировано курсовое влияние производного пиримидин-4(1H)-она в эффективной дозе на сенсомоторный дефицит, изменение биоэлектрического потенциала, гистоморфометрических показателей, степени гидратации и зоны некроза мозговой ткани, а также на состояние антитромботической и вазодилатирующей функции эндотелия сосудов при экспериментально смоделированной фокальной ишемии головного мозга. Изучено влияние соединения-лидера на процессы ПОЛ и состояние ферментов АОЗ, лактат/пируватный коэффициент, уровень внутриклеточного кальция и специфические маркеры апоптоза, что позволило выделить перспективное соединение для разработки на его основе лекарственного средства с целью терапии поражений ишемического генеза.

Реализация и научно-практическая ценность работы

Результаты, полученные в ходе экспериментального исследования, свидетельствуют о наличии церебропротекторного действия у производного пиримидин-4(1H)-она под лабораторным шифром PIR-9, и делают данное соединение перспективным для дальнейшего изучения и создания на его основе церебропротекторного средства с эндотелиотропным эффектом для лечения заболеваний ишемического генеза. Результаты работы используются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ -

филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, а также при целенаправленном синтезе соединений, обладающих церебропротекторными свойствами.

Методология исследования

В проведённой экспериментальной работе использовался комплексный подход к оценке цереброваскулярной патологии. В ходе исследования соблюдались этические нормы работы с лабораторными животными. Все эксперименты проведены при помощи современного оборудования и методов, на достаточном количестве биологических моделей, адекватных поставленным задачам экспериментального исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди изучаемых производных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений) наиболее выраженным церебропротекторным действием при ишемии мозга крыс обладает вещество под лабораторным шифром PIR-9. Данное соединение корректирует неврологические и поведенческие нарушения в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.
2. Экспериментальное соединение PIR-9 способствует восстановлению сенсомоторного дефицита, биоэлектрической активности, уменьшает отек и зону некроза на фоне фокальной церебральной ишемии, что также подтверждается гистоморфометрическими исследованиями тканей головного мозга.
3. Вещество PIR-9 сохраняет антитромботическую и вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия при фокальной ишемии головного мозга.
4. Механизм церебропротекторного действия соединения-лидера из ряда производных пиримидин-4(1H)-она опосредован его антирадикальными свойствами, восстановлением лактат/пируватного равновесия, снижением содержания внутриклеточного кальция. Наряду с этим, соединение-лидер уменьшает процессы клеточной гибели, на что указывает снижение концентрации $\text{TNF}\alpha$, AIF, PUMA и увеличение содержания JNK.

Личный вклад автора

Автор активно участвовал во всех этапах экспериментальной работы. По теме исследования проведён анализ данных литературы, на основании которого были разработаны протоколы экспериментов, проведены необходимые исследования и дальнейшая обработка полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе использованы высокотехнологичное оборудование и современные подходы, в соответствие с методическими рекомендациями по доклиническому исследованию. В ходе проведения исследования был получен достаточный объем экспериментальных данных, обработанных статистически, что позволяет судить о степени достоверности полученных результатов. Основные положения диссертационной работы были доложены на научных конференциях и симпозиумах: 75-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2017; III Международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», Пятигорск, 2017; VI международной научно-практической конференции «Беликовские чтения»; 71-ой Международной научно-практической конференции «Во имя жизни и здоровья», Пятигорск, 2018; XXXVI Международной научно-практической конференции «Вопросы современных научных исследований», г. Омск, 2018; Объединенном международном конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии», г. Санкт-Петербург, 2018; V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств», г. Ярославль, 2018; XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», г. Москва, 2018. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 рецензируемых в журналах

рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья, индексируемая в базе данных Web of Science, 1 статья находится в печати.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, 4 главы собственных исследований, обсуждение результатов, общие выводы, научно-практические рекомендации и библиографический список, состоящий из 287 источников, из них 101 отечественный и 186 зарубежных. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 36 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Цереброваскулярные заболевания ишемического генеза. Медико-социальные аспекты

Ишемический инсульт является основной причиной инвалидности трудоспособного населения, а также занимает лидирующие позиции среди ведущих причин смертности населения. В экономически развитых странах ежегодно регистрируется порядка 1 млн. случаев ишемического инсульта, а к 2030 году прогнозируется увеличение данного показателя до 3,4 млн. случаев ежегодно [234]. В развивающихся странах заболеваемость ишемическим инсультом в разы выше по сравнению с экономически развитыми государствами и достигает порядка 6,8 млн. случаев в год [129].

Несмотря на существенное снижение уровня летальности в развитых странах (порядка 42%) по настоящему угрожающим становится риск инвалидности и связанная с этим потеря трудоспособности у лиц, перенесших ишемический инсульт [160]. Не вызывает сомнений, что инвалидизация лиц социально активного возраста негативно сказывается на экономической составляющей жизни общества, а кроме того влечет за собой увеличение прямых и косвенных затрат на обеспечение должного медицинского сопровождения данной категории граждан [169].

В Российской Федерации тенденция заболеваемости ишемическим инсультом во многом схожа с общемировой. Ежегодно в РФ регистрируется порядка 500 000 случаев (по данным 2013 года) развития ишемического инсульта, при этом по приблизительным подсчетам 35% пациентов, умирают в остром периоде заболевания, а совокупный уровень смертности увеличивается на 12-15% к концу первого года реабилитационного периода [31]. Степень инвалидизации после перенесенного ишемического инсульта составляет порядка 3,4 случая на 10 тыс. человек, что является лидирующим показателем среди всех возможных причин потери трудоспособности, превосходя бытовой и трудовой травматизм [77]. Немаловажно, что после достаточно длительного периода реабилитации

(порядка 3-х лет) приблизительно 55% человек, перенесших ишемический инсульт, заявляют о существенном ухудшении качества жизни, и всего 20% из них способны возобновить трудовую деятельность [63]. Таким образом, на сегодняшний день проблема лечения и профилактики ишемического инсульта вышла за рамки ответственности медицины и фармакологии, и приобрела значительно большие масштабы, охватывающие практически все сферы социально-экономической деятельности человека.

Основные патогенетические механизмы повреждения головного мозга в условиях ишемии

Ишемический инсульт, возникает при окклюзии сосуда в головном мозге, и в результате формируется комплекс изменений, определяемых как ишемия [214]. Ткань головного мозга чрезвычайно чувствительна к гипоксии, даже незначительные колебания уровня мозгового кровотока, провоцирующие короткие приступы нейрональной ишемии, могут являться пусковым механизмом сложной последовательности патогенетических реакций («ишемический каскад»), что, в конечном счете, может привести к инфаркту мозга и формированию некротического очага [210].

Патофизиологический каскад повреждения мозговой ткани, формирующийся в условиях недостаточности мозговой гемодинамики, сложен и объединяет в себя многочисленные процессы: недостаток макроэргов, нарушение ионного гомеостаза, ацидоз, повышение уровня внутриклеточного кальция, эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспаление/нарушение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), нарушение функций митохондрий/апоптоз, дисфункция сосудистого эндотелия (рис. 1) [191].

Глутаматная эксайтотоксичность

Значительная часть ишемического повреждения нейронов опосредуется избыточным накоплением возбуждающих аминокислот, что приводит к увеличению внутриклеточного кальция до токсического уровня [212]. Ионы кальция (Ca^{2+}) поступают в клетку через потенциал-зависимые и лиганд-управляемые ионные каналы. Рост концентрации внутриклеточного кальция

сопряжен с активацией целого ряда протеаз, киназ, липаз и эндонуклеаз, а также запуском программы апоптоза. (рис. 1) [209], что негативно сказывается на способности нейронов к «выживанию» в условиях ишемии, особенно в ранние моменты после ишемического события [265].

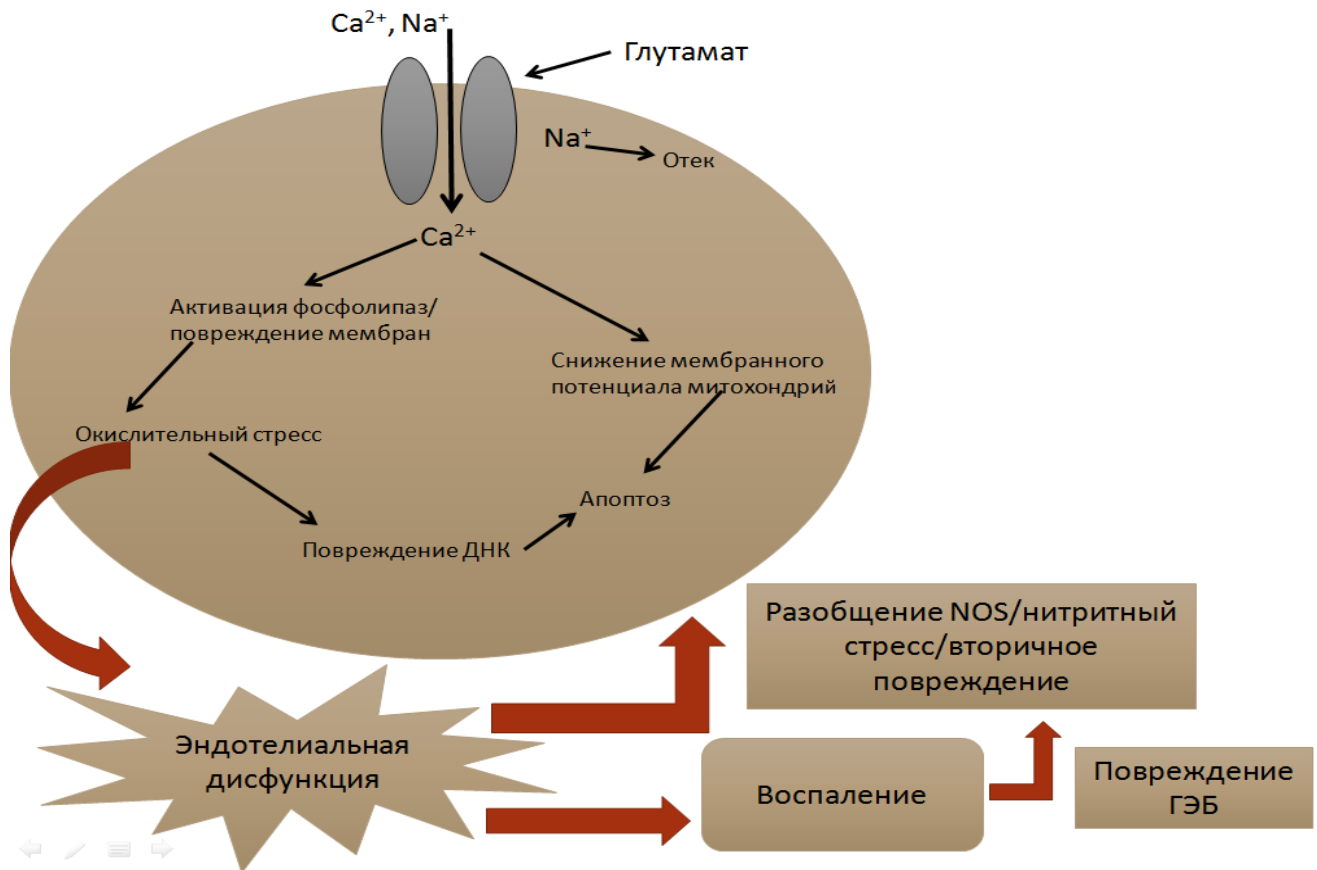


Рисунок 1. Схематическое отображение основных патофизиологических процессов повреждения головного мозга в условиях ишемии

Воспаление/повреждение ГЭБ

Пусковым механизмом воспаления является нарушение ионного гомеостаза, которое создает условия для активации факторов транскрипции, что в свою очередь приводит к увеличению концентрации цитокинов/хемокинов и повышенной экспрессии в эндотелиальных клетках молекул адгезии [219, 251].

Важную роль в прогрессировании воспаления ткани головного мозга в условиях ишемии отводится клеткам глии [167]. Активированные клетки глии вырабатывают многочисленные провоспалительные цитокины, а также токсичные метаболиты [151].

Кроме глиальных клеток, важную роль в поддержании воспаления головного мозга, вызванного инсультом, также играют астроциты. Эти клетки могут вырабатывать не только провоспалительные цитокины, но и нейропротекторные факторы, такие как эритропоэтин, металлотионеин-2, и TGF β 1 [240]. Ранняя активация глиальных клеток и астроцитов приводит к повреждению ГЭБ. В свою очередь это приводит к следующим деструктивным процессам в мозговой ткани [184]:

- ❖ нарушение микроциркуляции
- ❖ активация процесса адгезии циркулирующих клеток крови к эндотелию
- ❖ повышение тромбогенности крови
- ❖ усиление лейкоцитарной миграции

Окислительный стресс

Значительное число экспериментальных работ показывают, что окислительный стресс играет существенную роль в патофизиологии ишемического инсульта. В условиях недостаточного кровоснабжения мозговой ткани отмечается нарушение редокс-сигналикации нейронов и сопряженное с этим увеличение продукции свободных радикалов (СР) [281].

СР могут реагировать с ДНК, белками и липидами, вызывая повреждения структур клетки различной степени выраженности [245]. СР, участвующие в нейрональном повреждении в условиях ишемического инсульта, представлены: супероксид-анион радикалом, гидроксил-радикалом и реактивными формами азота [107]. Основным источником СР во время ишемического инсульта являются митохондрии, которые вырабатывают супероксид анион-радикал в ходе окислительно-восстановительных реакций митохондриальной дыхательной цепи [139]. Еще одним потенциально важным источником супероксида в пост-ишемических нейронах являются реакции метаболизма арахидоновой кислоты по циклооксигеназному и липооксигеназному пути [183]. Свободные радикалы

кислорода также могут генерироваться активированными клетками микроглии и лейкоцитами периферической крови через НАДФН-оксидазные системы [272].

Эндотелиальная дисфункция

Деструкции эндотелия сосудов так же отводят существенную роль в инициации и прогрессировании ишемического повреждения головного мозга [158]. Негативные изменения в эндотелии в условиях ишемии способствуют прогрессированию окислительного стресса, воспаления, повышению сосудистого тонуса, потере целостности ГЭБ, атеросклерозу и тромбозу [149].

Известно, что эндотелиальную дисфункцию ассоциируют с недостатком оксида азота (NO) – ключевого метаболита, опосредующего все функции эндотелия сосудов: вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную и антипролиферативную [255]. В свою очередь оксид азота вырабатывается в реакции разложения L-аргинина, катализируемой NO-синтазами. Существует 3 основные изоформы NO-синтазы: эндотелиальная – eNOS, индуцибельная – iNOS и нейрональная – nNOS [162].

Регуляция функции eNOS достаточно сложная и объединяет в себя множество сигнальных путей и реализуется на уровнях: транскрипции генов, пост-трансляционной модификации активности фермента, а также за счет воздействия ряда eNOS – регуляторных систем (рис. 2)

Значительная роль в регуляции функции eNOS отводится свободным радикалам кислорода. Обширный ряд экспериментальных работ свидетельствует о возрастающей роли изменения редокс-механизмов и гиперпродукции свободных радикалов кислорода в *down*-регуляции NO-опосредованной клеточной сигнализации [127, 150].

Так же отрицательное действие на каталитические свойства eNOS может оказывать накопление метилированных аналогов субстрата eNOS - L-аргинина и в первую очередь ассиметричного диметиларгинина (ADMA) – ингибитора eNOS [148].

Эндотелиальные эффекты ADMA, его воздействие на сосудистую стенку во многом зависит от степени его гидролитического расщепления

диметиламиногидролазой, взаимодействия с НАДФН-оксидазами. Кроме того повышенная плазменная концентрация ADMA прямо коррелирует со степенью атеросклеротического поражения сосудов головного мозга, что в свою очередь свидетельствует о выраженности эндотелиальной дисфункции [207].

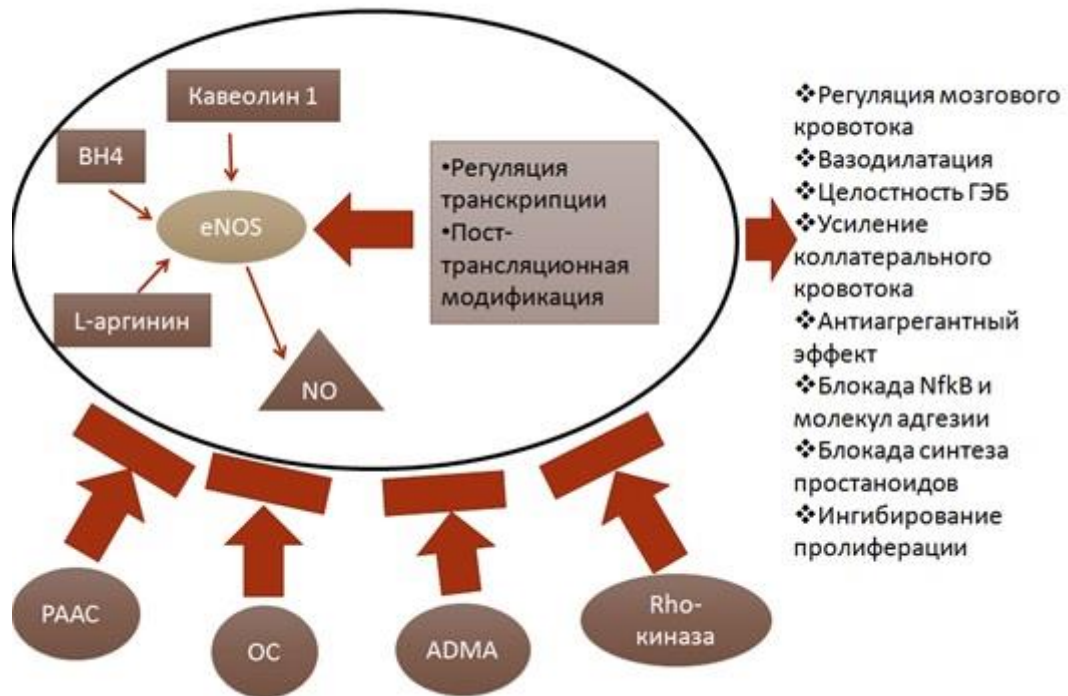


Рисунок 2. Регуляция функции и основные эффекты активации eNOS

Активация Rho-киназы также может негативно сказываться на эндотелиальной функции. Гиперфункция Rho-киназы способствует инактивации eNOS, прогрессированию ангиотензин II и эндотелин-1 индуцированной эндотелиальной дисфункции, снижению числа жизнеспособных эндотелиоцитов [159]. Также каталитическую функцию эндотелиальной синтазы оксида азота ухудшает активация протеинкиназы C [22].

Недавние экспериментальные исследования показали, что некоторые новые патогенетические механизмы также играют определенную роль в ишемическом повреждении головного мозга. К ним относятся сигнальные проапоптотические пути, инициируемые активацией пикторина-2, белком WAVE-1, JNK-киназой и адипонектином, а также TLRs-рецепторами [249]. Активация данных сигнальных путей сопровождается повреждением митохондрий, уменьшением интенсивности

аэробного метаболизма глюкозы и, как следствие, повышением уровня молочной кислоты, а также микротробоу и нейрональному апоптозу [140].

Вышеперечисленные патогенетические пути повреждения ткани головного мозга в условиях ишемии способствуют формированию некротического очага, который возникает в сильно ишемизированной ткани с уровнем церебрального кровотока ниже критического значения. Некротический очаг окружен зоной ишемизированной, но менее пораженной, функционально и метаболически активной («спящей») ткани – ишемической пенумбры (ишемической полутени). Область ишемической полутени представляет собой зону непосредственного терапевтического воздействия постинсультной церебропротекторной терапии [133].

Однако, в области пенумбры при прогрессировании ишемии и без отсутствия должной терапии, наблюдается активация проапоптотических генов, в результате чего отмечается интенсификация нейрональной гибели по типу апоптоза и дальнейшее, ускоренное формирование зоны инфаркта мозга [285].

Последние исследования показали, что многие нейроны в ишемической полутени, могут подвергаться апоптозу только через несколько часов или дней после развития инсульта, и, таким образом, они потенциально могут быть восстановлены. В отличие от некроза, апоптоз, по-видимому, является относительно упорядоченным процессом энергозависимой запрограммированной гибели клеток и может быть скорректирован фармакологически [131]. Таким образом, на основании вышеизложенного можно предполагать несколько вероятных путей церебротекторной фармакотерапии, направленной на устранение либо отдельных звеньев патогенеза ишемического повреждения головного мозга, либо носящей мультитаргентный характер, затрагивающей сразу несколько элементов «ишемического каскада». Также поскольку основным механизмом нейрональной гибели в зоне ишемической полутени является апоптоз, то фармакологическая коррекция данного процесса может представлять собой новое перспективное направление постинсультной терапии.

Фармакологическая коррекция ишемии головного мозга.

Церебропротекторы

В настоящее время общепризнанным методом терапии ишемического инсульта является тромболитическая терапия. Единственный лекарственный препарат, одобренный для данной цели - рекомбинантный тканевой активатор плазминогена применяется все реже в виду ограниченного «терапевтического окна» и значительного количества сопутствующих осложнений фармакотерапии [223].

Другие фармакотерапевтические подходы церебропротекции в условиях ишемии головного мозга направлены на отдельные звенья «ишемического каскада» (рис. 3) и, таким образом, церебропротекторная терапия носит патогенетический характер.

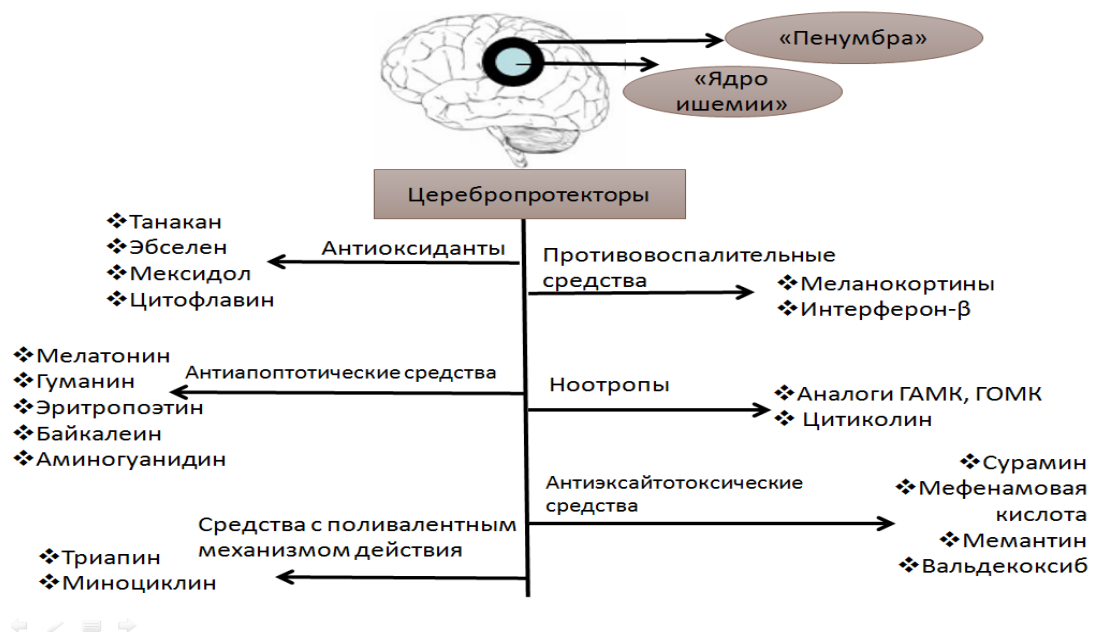


Рисунок 3. Лекарственные препараты, обладающие церебропротекторными свойствами

Антиоксиданты

Существует значительное количество средств, которые блокируют генерацию свободных радикалов, либо активируют ферменты эндогенной антиоксидантной защиты, т.е. обладают антиоксидантными свойствами.

Известным антиоксидантом с церебротропным действием является EGB-761 (Танакан[®]), полученный из концентрированного экстракта Гинкго Билоба [201].

Эбселен - органическое соединение селена. Церебропротекторный эффект эбселена реализуется через систему глутатиона. Препарат действует подобно глутатионпероксидазе [270].

Кроме того широко известны антиоксидантные свойства мексидола, цитофлавина, янтарной кислоты, милдроната [2].

Для мексидола описано активирующее действие на супероксиддисмутазу, каталазу, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу – основных ферментов антиоксидантной защиты клетки [4]. Аналогичной антиокислительной активностью обладает известный кардиопротектор – милдронат, для которого установлены свойства *up*-регулятора функции СОД и глутатионпероксидазы [32]

Цитофлавин в условиях эксперимента также проявляет высокую антиоксидантную активность, выражаемую в повышении активности антирадикальных металлопротеидов и СОД [101].

Антиапоптотические средства

Мелатонин, вырабатываемый шишковидной железой, представляет собой амфифильную молекулу с антиапоптотическим эффектом и антиоксидантной активностью [260]. Мелатонин активирует PI3K/Akt и JNK антиапоптотические сигнальные пути [195], а также ингибирует каспазы-1 и 3. Мелатонин стабилизирует мембраны митохондрий [261].

Эритропоэтин (ЭПО) оказывает антиапоптотическое действие за счет уменьшения фосфорилирования Akt, GSK-3 β и Ser9, как показано в исследовании [121].

Флавоноид Шлемника байкальского байкалеин влияет на сигнальные пути PI3K/Akt и PTEN. Путь PI3K/Akt, через фосфорилирование проапоптотических белков включая bcl-2/Bcl-XL и каспазу-9 усиливает нейрональный апоптоз. PTEN-путь, напротив, оказывает антиапоптотическое действие. Байкалеин снижает активность каспазы-3 и каспазы-9, подавляет PI3K/Akt активирует PTEN в области ишемической полутени [205].

Антиэксайтотоксические средства

Сурамин является известным антигельминтным и анти-неопластическим средством. Стимуляция P_{2x} ионотропных лиганд-управляемых ионных каналов пуринаргических рецепторов приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция и эксайтотоксического повреждения нейронов. Антагонизм сурамина с P_{2x} пуринаргическими рецепторами лежит в основе его церебропротекторного эффекта [193].

Мефенамовая кислота – противовоспалительное, анальгетическое и жаропонижающее средство, оказывает церебропротекторный эффект косвенно уменьшая глутамат-эргическую иннервацию. Показано, что мефенамовая кислота блокирует циклооксигеназу, а также потенцирует эффекты ГАМК и калиевую проводимость [263].

Мемантин является неконкурентным антагонистом глутамата по отношению к NMDA рецепторам, что обеспечивает церебропротекторные свойства данного соединения. Кроме того мемантин увеличивает в нейронах активность Na^+/K^+ -АТФазы, содержание глутатиона в ишемизированной области, но не влияет на энергопродукцию и метаболический статус нейронов [116].

Валдекоксиб – селективный ингибитор ЦОГ-2 тормозит выработку простагландина E_2 , его взаимодействие с EP1 рецепторами, оказывающих нейротоксическое действие посредством увеличения внутриклеточной концентрации кальция [105].

Средства, подавляющие реакции воспаления

Меланокортины – эндогенные пептиды, оказывающие церебропротекторное действие посредством активации МК4 рецепторов. МК4 рецепторы широко представлены в стриатуме и гиппокампе, т.е. структурах головного мозга наиболее подверженных ишемическому изменению. Стимуляция МК4 рецепторов в данных структурах ведет к снижению демиелинизации нервного волокна, улучшению межнейронального контакта, уменьшению фагоцитарной активности в глии [137].

Интерферон- β (IFN- β) является цитокином с противовоспалительными свойствами. IFN- β уменьшает инфильтрацию лейкоцитов в ишемической области, особенно нейтрофилов, и в меньшей степени моноцитов. Угнетает экспрессию молекул адгезии, таких как сосудистый CAM-1. IFN- β уменьшает зону ишемического повреждения в коре головного мозга и сохраняет целостность ГЭБ в коре стриатуме [168].

Средства с поливалентным механизмом действия

PAN-811, также известное как Триапин поливалентное цитопротекторное средство, эффективно уменьшающее нейродегенерацию в ходе инсульта. Механизм действия препарата имеет несколько точек приложения: антагонизм с ионами кальция (хелатирующие свойства); подавление продукции активных форм кислорода и антиапоптотические свойства (повышает активность антиапоптотических белков) [188].

Миноциклин - антибиотик второго поколения тетрациклинового ряда широкого спектра действия. Препарат оказывает противовоспалительное и антиапоптотическое действие, тормозит активацию микроглии, предотвращает высвобождение цитокинов посредством фосфорилирования белка p38 и подавления активности 5-липооксигеназы [244].

Помимо перечисленных церебропротекторов в комплексной терапии ишемического инсульта целесообразно применение ноотропных средств (аналоги ГАМК и ГОМК, цитиколин, нейротрофические факторы, холина альфосцерат), средств, улучшающих мозговое кровообращение (винпоцетин) и (с осторожностью) антитромбоцитарных препаратов [273, 36].

Как видно, существует достаточное количество средств, способных оказать церебропротекторное действие в условиях ишемического инсульта, обладающих как моно-, так и поливалентным механизмом действия. Однако, для большинства существующих церебропротекторных средств существует ряд ограничений к использованию в виду либо значительной токсичности применения (антиапоптотические и антиэксцитотоксические средства), либо малой величины терапевтического окна и скорости наступления эффекта (отсрочен во времени).

Таким образом, поиск новых церебротропных свойств, для терапии ишемического инсульта не теряет своей актуальности, а стратегии целенаправленного поиска церебропротекторов можно считать одним из основных направлений современной экспериментальной и клинической фармакологии [138, 239, 55].

Производные пириимидин-4(1H)-она как потенциальные церебропротекторы

Комплексные исследования последних лет показывают, что гетероциклические соединения обладают значительным терапевтическим потенциалом. Ядро пириимидина, являющееся важным компонентом дезоксирибонуклеиновой кислоты используется в качестве базиса для создания фармакологически активных субстанций со значительным спектром фармакологической активности (рис. 4), включающей: противоопухолевую [229], противовирусную [213], антимикробную [111], противовоспалительную [81], анальгетическую [112], антиоксидантную [125].

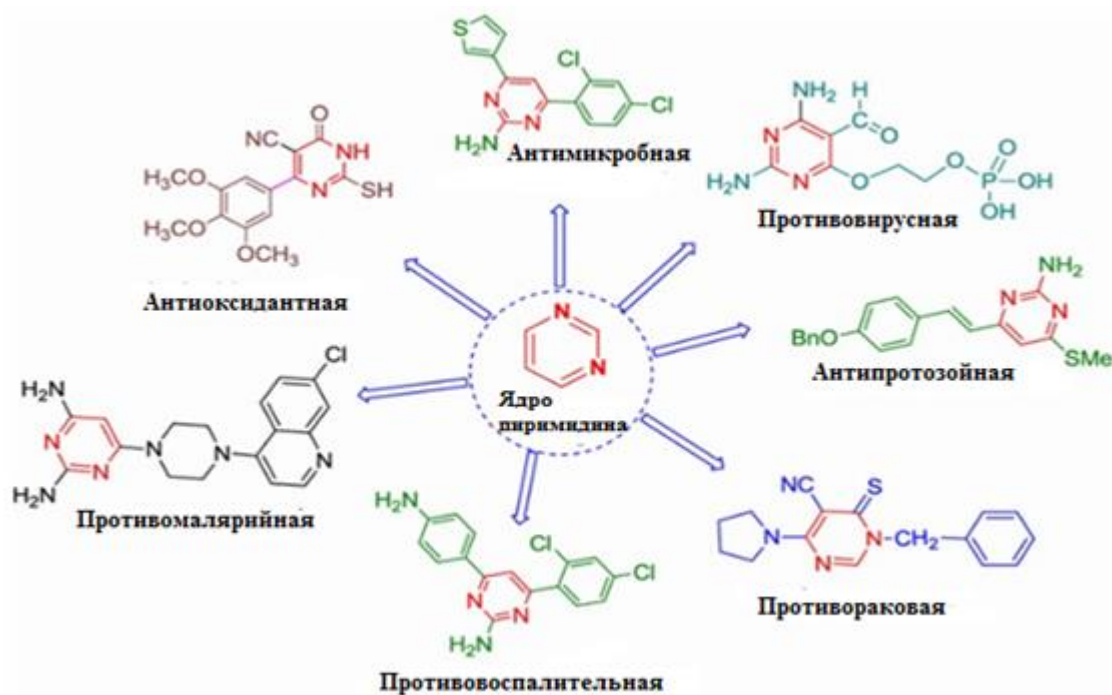


Рисунок 4. Виды фармакологической активности производных пириимидина

Для реализации церебропротекторного эффекта наибольшее значение имеют антиоксидантные, противовоспалительные и антиапоптотические свойства производных пириимидина.

Противовоспалительная активность производных пиримидина связана со способностью данных соединений блокировать активность ЦОГ-2, подавлять генерацию провоспалительных цитокинов, а также хемотаксических факторов [80].

Антиапоптотические свойства производных пиримидина реализуются через стабилизацию митохондриальной функции и в частности мембранного потенциала митохондрий. Сохранение структурной целостности митохондриальной мембраны препятствует релизingu цитохрома c и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF), запускающих каспаза-независимый путь апоптоза [194]. Однако, не исключается возможность наличия и других «мишеней» для реализации антиапоптотического действия пиримидинов, например воздействие на белки mTOR и PUMA [119].

Общеизвестно, что в качестве антиоксидантов могут выступать доноры водорода: амины, тиолы (аминотиолы) или фенолы (растительные фенолы и полифенолы, а также синтетические фенолы). Данный эффект в первую очередь опосредуется за счет ингибирования реакций окисления различных химических мишеней/субстратов. Аналогичным образом, в зависимости от конкретной химической структуры, действуют и производные пиримидина [254]. Кроме того дериваты пиримидина способны повышать активность ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза и каталаза [1].

Немаловажным является тот факт, что производные пиримидина обладают оптимальным профилем безопасности применения и относятся к малотоксичным или практически не токсичным веществам [82], что в сочетании с высокой и разноплановой фармакологической активностью делает данные соединения перспективными объектами для изучения на предмет наличия церебропротекторной активности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Лабораторные животные

Эксперимент реализован на 442 крысах-самцах линии Wistar, $m = 170-190$ грамм (на модели необратимой окклюзии общих сонных артерий), $m = 220-240$ грамм (на модели окклюзии средней мозговой артерии), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Всеволожский район, Ленинградская область). Лабораторных животных содержали в контролируемых условиях вивария при влажности $65 \pm 5\%$, температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и естественной смене свето/темнового режима со свободным доступом к воде и еде. Все манипуляции, проводимые над животными, не противоречили требованиям Международной Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998.), Приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и ГОСТу 33044-2014. Экспериментальные особи были размещены в макролоновых клетках с решетчатыми стальными крышками и углублением для корма. В качестве подстилочного материала были использованы сухие нехвойные автоклавированные опилки. Ежедневно менялись клетки, поилки и подстил для крыс. Протокол заседания научного этического комитета ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России №17 от 10.12.2016 г.

2.2. Характеристика исследуемых соединений

В процессе экспериментального исследования было проведено изучение церебропротекторного действия производных пиримидин-4(1H)-она, синтезированных на кафедре органической химии ПМФИ-филиала ВолгГМУ МЗ РФ под руководством профессора Кодониди И.П., за что выражаем ему и коллективу кафедры искреннюю благодарность. Все 10 исследуемых соединений (лабораторные шифры: PIR-4, PIR-5, PIR-6, PIR-7, PIR-8, PIR-9, PIR-10, PIR-14, PIR-20, PIR-23) вводились внутрибрюшинно. В качестве растворителя данных соединений использовали воду очищенную с твином-80 в эквивалентной дозе (0,1

грамм твина-80 на 1 грамм вещества, Приказ МЗ РФ ОТ 26.10.2015 г. №751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность»).

Таблица 1

Характеристика исследуемых веществ

Лабораторный шифр (химическое название)	Структурная формула	Лабораторный шифр (химическое название)	Структурная формула
PIR-4 (4-{2-[2-(4-гидрокси-3-метокси-фенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бутановая кислота)		PIR-9 (4-{2-[2-(3-гидрокси-4-метокси-фенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бутановая кислота)	
PIR-5 ((2-{2-[2-(3-гидрокси-4-метокси-фенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-ацетиламино)-этановая кислота)		PIR-10 (4-{2-[2-(2-гидрокси-3-метокси-фенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-бутановая кислота)	
PIR-6 (2-бензоиламино-N-(4-гидроксифенил)-бензамид)		PIR-14 ((2{2-[2-(2-гидроксифенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил}-ацетиламино)-этановая кислота)	
PIR-7 (4-этил-1,2-диметокси-4-нитробензил-N-(4-оксо-2-фенил-4Н-хиназолин-3-ил)Форамида)		PIR-20 (2-[2-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-ацетиламино]-4-метил-пентановая кислота)	
PIR-8 ((2-[2-[2-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил]-ацетиламино)-этановая кислота)		PIR-23 (2-[2-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-ацетиламино]-3-фенил-пропионовая кислота)	

2.3. Дизайн исследования

Изучение церебропротекторной активности производных пиримидин-4(1H)-она условно можно разделить на 3 блока (табл. 2):

1. Скрининговое исследование на модели глобальной ишемии головного мозга с целью поиска наиболее активного вещества для дальнейшего изучения.
2. Углубленное изучение церебропротекторного действия выбранного соединения-лидера на модели фокальной ишемии головного мозга.
3. Изучение потенциальных механизмов реализации церебропротекторного действия соединения-лидера из ряда производных пиримидин-4(1H)-она.

При проведении скринингового этапа работы и все исследуемые соединения (доза 50 мг/кг) [19, 41] и препараты сравнения вводились внутривенно в течение десяти дней до моделирования ишемии головного мозга.

Углубленное изучение церебропротекторного действия соединения-лидера проводилось на модели фокальной церебральной ишемии, экспериментальная субстанция и препараты сравнения вводились сразу после операции и ежедневно в течение 3-х суток. В данном блоке оценивали влияние изучаемых объектов на неврологический, поведенческий, сенсомоторный дефицит, влияние на антитромботическую и вазодилатирующую функцию, степень отека и некроза тканей головного мозга, а также проводили гистологический и морфометрический анализ. В качестве препаратов сравнения на данном этапе и в ходе скрининговых исследований были использованы кавинтон (3,2 мг/кг) [35], так как он является препаратом первой линии при цереброваскулярных нарушениях [172] и оказывает положительное влияние на когнитивный дисбаланс [247], а также циннаризин (5,6 мг/кг) [61] исходя из схожести структуры, и как следствие возможности однонаправленного механизма действия.

Третий этап исследований построен на моделировании фокальной церебральной ишемии, введении изучаемых объектов сразу после операции и ежедневно 3-е суток и оценке потенциально возможных механизмов действия, таких как антиоксидантная и антирадикальная активность, влияние на кальций-

опосредованное повреждение головного мозга, концентрацию лактата и потребление глюкозы, а также изменение содержания маркеров апоптоза.

Таблица 2

Дизайн исследования

Блок		ЛО- группа	НК-группа	Группа, получавшая производные пиримидин- 4(1H)-она	Группа, получавшая препараты сравнения
1	Скрининг		10-ти дневное введение воды с твином-80	10-ти дневное введение	10-ти дневное введение
			Моделирование глобальной ишемии головного мозга		
		Через 24 часа оценка выживаемости, неврологического и поведенческого дефицита, некоторых биохимических показателей.			
2	Углубленное изучение церебропротекторной активности		Моделирование фокальной ишемии головного мозга		
			введение воды с твином-80 сразу и 3-е суток ежедневно	введение сразу и 3-е суток ежедневно	введение сразу и 3-е суток ежедневно
		Оценка неврологического и поведенческого дефицита, отека и некроза головного мозга, биоэлектрической активности, патоморфоза ткани головного мозга, антитромботической и вазодилатирующей функции			
3	Механизмы действия		Моделирование фокальной ишемии головного мозга		
			введение воды с твином-80 сразу и 3-е суток ежедневно	введение сразу и 3-е суток ежедневно	введение сразу и 3-е суток ежедневно
		Оценка: 1. Антиоксидантных и антирадикальных свойств 2. Содержания внутриклеточного Ca ²⁺ , лактата, пирувата и лактат/пируватный коэффициент 3. Влияния на маркеры апоптоза			

Препаратом сравнения при исследовании антиоксидантной активности выступал мексидол (50 мг/кг) [45, 85]. При оценке вазодилатирующей и антитромботической функции в качестве сравнения выступал препарат сулодексид в дозе 30 ЕВЛ/кг (комбинация гепариноида с дерматан сульфатом), так как по литературным данным на сегодняшний день он считается эталонным препаратом, обладающим эндотелиопротекторной активностью [40]. При определении изменения концентрации маркеров клеточной гибели препаратами сравнения были выбраны кавинтон (3,2 мг/кг), как вещество, препятствующее апоптозу [165, 258, 269] и глиатилин (60 мг/кг) из-за его способности к ускорению восстановления тканей головного мозга и непосредственном участии в передаче нервных импульсов [250, 38, 57].

2.4. Модели ишемии головного мозга

Моделью глобальной церебральной ишемии выступила билатеральная окклюзия общих сонных артерий. Под наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг) удаляли шерстяной покров с помощью депиляционного крема, проводили антисептическую обработку, затем по средней линии шеи производили небольшой надрез мягких тканей. После чего выделяли левую и правую общую артерии и перевязывали лигатурой, рану ушивали и обрабатывали операционное поле антисептическим раствором (5% раствор йода). После необратимой окклюзии сонных артерий животные помещались под согревающую лампу до выхода из наркоза [271, 78].

В качестве модели фокальной церебральной ишемии была выбрана коагуляция левой средней мозговой артерии. У животных под наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг) выстригали участок 1,5 см² ниже глаза, делали кожный надрез, разделяли мышцы и удаляли отросток скуловой кости. Высверливали трепанационное отверстие специальным бором над зоной пересечения средней мозговой артерии и обонятельного тракта. Проводили коагуляцию средней мозговой артерии, послойно зашивали мягкие ткани, рану обрабатывали антисептическим раствором (5% раствор йода). После пережигания левой средней

мозговой артерии животные помещались под согревающую лампу до выхода из наркоза [122, 61, 74].

2.5. Методы оценки церебропротекторной активности

2.5.1. Методы определения неврологического дефицита

Степень неврологического дефицита возникшего на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий фиксировали при помощи бальной шкалы McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной [211, 27], кроме того неврологический индекс в условиях фокальной церебральной ишемии определяли также с использованием шкал Garcia [166] и Combs и D'Alecy [142].

Бальная шкала McGraw позволяет определить степень неврологических изменений легкого (0,5-2,5) , среднего (2,5-5,5) и сильного (5,5-10) уровней тяжести. При наличии нескольких симптомов баллы суммируются (табл. 3).

Таблица 3

Шкала McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной [211, 27]

Симптомы	Index (баллы)
вялость	0,5
тремор	1,0
односторонний полуптоз	1,0
двухсторонний полуптоз	1,5
слабость конечности	1,5
односторонний птоз	1,5
двусторонний птоз	1,5
маневные движения	2,0
парез 1-4 конечности	2-5
паралич 1-4 конечности	3-6
кома	7,0
летальный исход	10,0

Шкала Garcia используется для определения реакции и асимметрических нарушений животного (табл. 4). Общий балл формируется при прохождении

шести тестов, при этом 18 баллов соответствует отсутствию асимметрических нарушений, 0 баллов свидетельствует о максимально выраженных нарушениях.

Таблица 4

Шкала оценки неврологических нарушений Garcia [166]

Тест	Баллы			
	0	1	2	3
Тест спонтанной активности (5 мин в клетке)	Отсутствие движений	Не достигает края клетки и едва двигается	Движения затруднены, не приближается к 3-м сторонам клетки	Свободно передвигается и приближается к 3-м сторонам клетки
Симметрия при движении 4-х конечности	Нет движения конечностей	Минимальные вытягивания конечностей с одной стороны	Конечности с одной стороны вытягиваются медленнее	Симметричные вытягивания
Симметричность вытягивания передних лап (крысу держат за хвост у края стола)	Отсутствует вытягивания одной конечности	Слабая попытка вытянуть конечность с одной стороны	С одной стороны пытается вытянуть конечность меньше, чем с другой стороны	Симметричные вытягивания
Залезание по сетке	-	Не удается забраться	Одна сторона слабая	Забирается легко и крепко держится
Реакция на прикосновение к стороне тела	-	Отсутствие реакции с одной стороны	Медленная реакция с одной стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение к вибриссам	-	Отсутствие реакции с одной стороны	Медленная реакция с одной стороны	Симметричный ответ

В таблице 5 представлена шкала оценки тяжести неврологического дефицита Combs и D'Alecy, направленная на определение равновесия, цепкости и мышечной силы. Итоговый балл формируется по сумме баллов в трех тестах, 0 баллов говорит о максимальных нарушениях, 9 – об отсутствии.

Таблица 5

Шкала оценки неврологических нарушений Combs и D'Alecy [142]

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

2.5.2. Методы определения поведенческого и сенсомоторного дефицита

Изменение поведенческого статуса при билатеральной окклюзии сонных артерий определяли в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», когнитивные и мнестические нарушения в тестах условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) и экстраполяционного избавления аверсивной среды (ТЭИ), кроме того сенсомоторный дефицит на модели коагуляции левой средней мозговой артерии оценивали с использованием тестов «Сужающаяся дорожка» и «Цилиндр».

Тест «Открытое поле» (ОП) (НПК «Открытая наука», Россия) предназначен для изучения поведения грызунов, в том числе моторной и ориентировочно-исследовательской активности крыс. Установка представлена серой круглой ареной диаметром 97 см, разделенной на сектора, с высотой бортов 42 см и отверстиями для заглядывания (диаметр 2 см). Животного помещали в центр установки, визуальный контроль осуществлялся в течение трёх минут, показателем двигательной активности являлось количество пересеченных секторов, ориентировочно-исследовательской – число стоек и заглядываний [7, 18].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (НПК «Открытая наука», Россия) используется для оценки вертикальной, горизонтальной активности грызунов, а также степени тревожности. Установка состоит из 4-х крестообразных рукавов, расходящихся под прямым углом от центральной площадки. ПКЛ приподнят на 80 см, два противоположных рукава открыты, оставшиеся – закрытые. Животное помещают в центральную зону установки головой к открытому рукаву и в течение 3-х минут проводят регистрацию времени пребывания в открытых, закрытых рукавах, центральной площадке, число свешиваний, стоек, а также количество актов груминга [238, 257].

Тест условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) (НПК «Открытая наука», Россия) направлен на проверку формирования, сохранения и воспроизведения памятного следа. Установка УРПИ состоит из открытой секции, освещенной лампой 60 Вт и темного отсека с черными стенками и электродным полом. Обучение животных основано на стремлении пребывания в темном пространстве. Крыс помещали центр освещенного отсека хвостом к отверстию с электродным полом, фиксировали время захода в темный отсек, через электрический пол которого подавался ток 40 Ватт. За животными наблюдали две минуты, если посещения темной камеры не отмечалось, крыса исключалась из эксперимента. Затем через сутки осуществляли контроль выработки условного рефлекса, животное не должно было повторно посещать темный отсек, в противном случае оно исключалось из дальнейшего эксперимента. После моделирования ишемии головного мозга через 24 часа осуществляли проверку сохранения памятного следа, вновь помещая животного в установку УРПИ и регистрируя время посещения темной камеры или его отсутствие [238, 18].

Тест экстраполяционного избавления аверсивной среды (ТЭИ) (НПК «Открытая наука», Россия) представляет собой методику, позволяющую изучить когнитивные функции крыс во время пребывания в аверсивной среде (вода). Конструкция представлена цилиндром высотой 40 см, диаметром 35 см, наполненного водой ($t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$). В центре цилиндра укреплен прозрачный сосуд ($d = 9,2\text{ см}$, $h = 23\text{ см}$), нижний край которого погружен в воду на 2,5 см. На

протяжении двух минут наблюдают за поведением крыс, помещенных в воду хвостом вниз. Не поднырнувших, в процессе обучения, животных исключали из эксперимента. Повторное воспроизведение теста осуществляли через 24 часа, и также исключали животных, не справившихся с задачей. Спустя сутки после воспроизведения необратимой окклюзии сонных артерий крыс вновь подвергали экстаполяционному тесту и фиксировали время решения, либо его отсутствие [130, 6].

Тест «Сужающаяся дорожка» (Beam walking test) (НПК «Открытая наука», Россия) помогает выявить недостаточность координации и моторный дефицит, в данном случае возникающий при коагуляции СМА. Установка представлена равномерно сужающимся лучом (дорожкой) от 6 до 1,5 см длиной 165 см с темной камерой на конце. По обеим сторонам планки располагаются выступы, находящиеся на 2 см ниже и позволяющие животным поставить соскальзывающую с дорожки или ослабшую конечность. Для того чтобы полностью визуально фиксировать всю дорожку по одну сторону установки помещалось длинное узкое зеркало. Животные предварительно проходили курс обучения в установке Beam walking, после операции (фокальная церебральная ишемия) через 72 часа фиксировалось количество шагов и соскальзываний крыс во время прохождения сужающейся дорожки [236, 67].

Тест «Цилиндр» (НПК «Открытая наука», Россия). Как известно, окклюзия СМА приводит к повреждению сенсомоторной функции конечности, расположенной противоположно (коллатерально) поврежденной стороне, в результате чего у животных в качестве компенсаторной реакции начинает преобладать использование ипсилатеральной повреждению конечности [Castro, 1972; Napieralski et al., 1998; Hatinen et al., 2008]. Тест «Цилиндр» позволяет оценить неравномерность использования передних конечностей в момент исследования стенок сосуда. Установка состоит из полого сосуда диаметром 20, высотой 30 см с прозрачным основанием с зеркалом, размещенным снизу. Животное помещают в установку, ввиду того, что основание цилиндра относительно невелико, крысы проявляют вертикальную исследовательскую

активность, используя для этого одну или обе передние конечности. При одностороннем повреждении головного мозга животные, как правило, используют одну здоровую лапу, тогда как особи без повреждения пользуются двумя конечностями. В тесте анализируют 3 варианта использования передних конечностей: независимое использование левой или правой лапы; одновременное использование обеих лап. Частоту использования поврежденной конечности вычисляют по формуле: $(K_{\text{л}} + 1/2 O_{\text{л}}) / (I_{\text{л}} + K_{\text{л}} + O_{\text{л}})$, где $K_{\text{л}}$ – использование противоположной (контралатеральной) передней лапы повреждению головного мозга, $O_{\text{л}}$ – использование обеих конечностей, $I_{\text{л}}$ – использование передней лапы на той же стороне (ипсилатеральной) от повреждения головного мозга [144, 67].

2.5.3. Метод определения количества ионов кальция в тканях головного мозга

Определение ионов кальция в гомогенате головного мозга осуществляли с помощью стандартного набора «Ольвекс Диагностикум» (Серия: 2401). Принцип метода определения ионов кальция основан на образовании окрашенного комплекса с о-крезолофталейном. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации кальция в пробе. Измерение проводили фотометрически (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия) при длине волны $\lambda = 570$ нм, затем вычисляли концентрацию по формуле по формуле: $C = 2,5 * \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}}$ (ммоль/мг белка). [135, 44]. Гомогенат мозга центрифугировали 3 минуты при 1400g, затем отделяли надосадочную жидкость и повторно центрифугировали 10 минут при 13000g [224].

2.5.4. Метод определения биоэлектрической активности головного мозга

Биоэлектрическую активность головного мозга крыс измеряли методом электроэнцефалографии (ЭЭГ) с помощью энцефалографа «Нейрон-спектр 1» (Нейрософт, Россия). Оценивали модификацию амплитуды альфа-(α -), бета-(β -), тета-(θ -) и дельта-(Δ -) ритмов в отведениях FP1-A1 и C3-A1, характеризующих изменения в лобной и теменной части левого полушария головного мозга [199].

2.5.5. Метод определения степени гидратации головного мозга

Для определения процента влаги в головном мозге, после декапитации животного, вскрывали черепную коробку, аккуратно извлекали головной мозг, взвешивали и помещали в термостат ТС-80М-2 («ДельтаРезерв», Россия) на 24 часа при температуре 100 °С. Затем извлекали высушенную массу и взвешивали. Процент влаги вычисляли по формуле $\frac{\text{Влажная масса} - \text{Сухая масса}}{\text{Влажная масса}} * 100$ [179].

2.5.6. Метод определения зоны некроза головного мозга

Степень зоны некроза оценивали трифенилтетразолиевым методом. После декапитации животных извлекали головной мозг, отсекали мозжечок, разделяли полушария, взвешивали, отдельно гомогенизировали и помещали в бюксы, содержащие фосфатный буферный раствор рН 7,4 и 1% трифенилтетразолия хлорид (10 мл). На 20 минут бюксы помещали в водяную баню НН-S2 (Armed, Россия, температура 37 °С). Неповрежденная ткань окрашивалась в малиновый, благодаря образуемому формазану, некротизированная ткань не меняла цвет. Полученную смесь центрифугировали 10 минут в режиме 5000 об/мин (Hettich, Германия). Затем надосадочную жидкость отделяли, в осадок вносили 3 мл охлажденного хлороформа и встряхивали 2 минуты. В течение 15 минут при 4 °С проводили экстракцию формазана хлороформом, встряхивая пробирки 30 секунд каждые 5 минут. Центрифугированием в том же режиме отделяли окрашенный хлороформ и против чистого хлороформа измеряли оптическую плотность (Спектрофотометр С-56, "ЛОМО-Спектр", Россия, при длине волны 492 нм). Степень зоны некроза вычисляли в процентах при помощи формулы:

$$x = 100 - \frac{\alpha_1 m_1 + \alpha_2 m_2}{\alpha_1 (m_1 + m_2)} * 100,$$

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

α_1 – экстинкция пробы неповрежденного полушария;

α_2 – экстинкция пробы поврежденного полушария;

m_1 – масса неповрежденного полушария;

m_2 – масса поврежденного полушария [124, 78].

2.5.7. Методы определения содержания лактата, пирувата и глюкозы в плазме крови

Содержание молочной кислоты в плазме крови определяли при помощи стандартного набора «Абрис+» (Серия: 021) энзиматическим колориметрическим методом (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия).

Концентрацию пировиноградной кислоты оценивали энзиматическим UV-методом с использованием набора реактивов «Абрис +» (Серия: 024) (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия).

Определение потребления глюкозы головным мозгом проводили по разнице концентраций в артериальной и венозной крови. Забор артериальной крови осуществлялся из базилярной артерии, венозной – из сагиттального синуса крыс. Ферментативным фотометрическим методом с помощью набора «DiaSys» на биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) определяли содержание глюкозы в сыворотке крови.

2.5.8. Метод гистологического исследования

Для гистологического исследования проводили забор головного мозга крыс, фиксировали в течение 48 часов в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4), затем промывали в проточной воде, с целью обезвоживания проводили через спирты с возрастающей концентрацией, затем заливали в парафин. Из парафиновых блоков на микротоме (Slide 2003, Германия) готовили срезы (толщина 5мкм), которые окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы просматривали под микроскопом Leica DM 3000 (Leica Microsystems, Германия). С помощью компьютерной программы LAS (Германия) проводили анализ морфометрических показателей.

2.6. Методы оценки антиоксидантной и антирадикальной активности

2.6.1. Определение содержания малонового диальдегида

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия, длина волны 532 нм) в гомогенате головного мозга крыс. Способ основан на реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой и образовании окрашенного

триметинового комплекса. Коэффициент экстинкции этого комплекса $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$. Полученные результаты пересчитывали в нмоль/мг белка* [87].

2.6.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Уровень диеновых конъюгатов (ДК) оценивали в гомогенате головного мозга спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56, длина волны 233 нм). Смесью изопропано-гептан (1:1) извлекали ДК, встряхивали (1 час), добавляли соляную кислоту (0,5 мл рН = 2), 1мл гептана и взбалтывали 15 минут. Отделяли верхнюю фазу и проводили спектрофотометрию (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия), результаты выражали в нмоль/мг белка*. Молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon = 2,2 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ [26].

2.6.3. Определение содержания супероксиддисмутазы

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в супернатанте головного мозга основано на выявлении степени торможения ферментом реакции восстановления супероксидными анион-радикалами нитросинего тетразолия (НСТ) в окрашенные соединения (формазаны). Для генерации $\text{O}_2^{\cdot -}$ использовали следующую систему: раствор рибофлавина ($2,8 \cdot 10^{-5} \text{ М}$), раствор тетраметилэтилендиамина ($1 \cdot 10^{-2} \text{ М}$) в 0,05 М К-фосфатном буфере (рН 7,8) при дневном свете на расстоянии 20 см 5 мин. Супероксиддисмутазу извлекали из клеточных органелл при помощи 0,5% раствора дезоксихолата. Для терминирования реакции добавляли 20% раствор трихлоруксусной кислоты и ацетон. Оптическую плотность измеряли на КФК-3 (Россия) (длина волны 440 нм). Активность СОД выражали в ед.акт/мг белка* [96].

2.6.4. Определение содержания каталазы

Активность каталазы определяют основываясь на скорости разложения пероксида водорода и способности образовывать окрашенный комплекс с 4% раствором аммония молибдата. Активность каталазы регистрировали в супернатанте головного мозга спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия) при длине волны 410 нм. При коэффициенте молярной экстинкции $\varepsilon = 22,2 \cdot 10^3 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$, активность фермента выражали в нмоль/мин/мг белка* [48].

* - Определение концентрации белка проводили по методу Фолина (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия) [51]. Супернатант головного мозга получали центрифугированием гомогената в режиме - 1000g/10 мин.

2.6.6. Определение хелатирующей и антирадикальной активности

Fe²⁺-хелатирующую активность определяли по образующемуся о-фенантролиновому комплексу с железом (II) и его разрушению хелатирующими агентами. В течение 10 мин при комнатной температуре инкубировали реакционную смесь, представляющую собой 2 мл раствора исследуемого соединения, 2 мл хлорида железа и 1 мл 0,05% о-фенантролина в метаноле. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 510$ нм (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия). Процент ингибирования рассчитывали по формуле $Fe^{2+} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} * 100$, где A_0 - экстинкция контрольной пробы, A_1 - экстинкция опытной пробы [110].

Супероскид-антирадикальная активность

Реакционная смесь состояла из 0,1 мл раствора нитросинего тетразолия (1,5 мМ), 0,2 мл ЭДТА (0,1 М), 0,05 мл рибофлавина (0,12 мМ) и 2,55 мл фосфатного буфера (рН 7,4). В течение 5 минут при температуре 25°C инкубировали смесь, после чего измеряли оптическую плотность при длине волны 560 нм (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия). Процент ингибирования рассчитывали по формуле $O^{2-*} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} * 100$, где A_0 - экстинкция контрольной пробы, A_1 - экстинкция опытной пробы [264].

Нитрозил-антирадикальная активность.

С помощью реактива Грисса можно определить нитрат и нитрит, образующиеся в результате реакции NO^* с кислородом. Раствор исследуемого соединения (0,5 мл) смешивали с 2 мл нитропруссидом натрия (10 мМ) в 0,5 мл фосфатного буфера (рН 7,4). Реакционную смесь инкубировали при $t = 25^\circ C$. После 15 мин инкубации 0,5 мл смешивали с 0,5 мл реактива Грисса. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность полученного раствора (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-

Спектр", Россия, длина волны 546 нм). Расчет процента ингибирования синтеза NO* производили по формуле: $NO^* = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} * 100$, где A_0 - экстинкция до реакции, A_1 экстинкция после реакции с реактивом Грисса [208].

2.7. Методы оценки антитромботической функции сосудистого эндотелия

2.7.1. Метод определения тромбоцитов крови

Количество тромбоцитов в крови оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии ВС 2800Vet (Mindray, Китай).

2.7.2. Определение агрегации тромбоцитов

Исследование агрегации тромбоцитов проводили на двухканальном лазерном агрегометре «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», Россия, г. Москва) по методике G.Born в модификации Габбасова [132, 65]. В качестве индуктора процесса агрегации выступала динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) в концентрации 5 мкМ (НПО «РЕНАМ», набор «АГРЕНАМ», Серия: 1115). Метод основан на изменении светопропускания при прохождении луча через плазму, богатую тромбоцитами, во время добавления индукторов агрегации. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием в режиме 1200 об/мин/10 мин (Центрифуга 80-2S, Armed, Россия). В кювету анализатора вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали 3 минуты при $t=37^{\circ}\text{C}$, затем добавляли индуктор – АДФ (5 мкМ). Регистрацию процесса агрегации проводили в течение пяти минут. Степень и скорость агрегации кровяных пластинок оценивали по величине максимальной амплитуды и наклону агрегатограммы. Для удобства интерпретации полученных результатов был введен поправочный коэффициент равный 0,1.

2.7.3. Оценка плазменного звена гемостаза

Определение показателей коагуляционного звена гемостаза проводилось при помощи программируемого оптико-механического коагулометра АПГ 2-01 «МИНИЛАБ 701» («ЭМКО», Россия). Регистрируемыми показателями выступали активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, Серия: 2915), протромбиновое время (ПВ, Серия: 3516), тромбиновое время (ТВ, Серия: 3915),

концентрация фибриногена (Серия: 3815) (наборы реактивов НПО «РЕНАМ»). Бедную тромбоцитами плазму для проведения анализа получали центрифугированием 3000 об/мин в течение 15 минут (Центрифуга 80-2S, Armed, Россия). Анализ проводился строго в соответствии с инструкцией для каждого набора.

2.7.4. Оценка активности фактора фон Виллебранда

Активность фактора фон Виллебранда (VWF) определяли агглютинационным методом с помощью «набора для определения фактора Виллебранда» (НПО «РЕНАМ», Серия: 6515). 50 мкл плазмы разводили имидазоловым буфером (1:5) и добавляли 50 мкл Виллибранд-реагента. При постоянном перемешивании на темном фоне в проходящем свете фиксировали время от момента добавления реагента до образования агглютинатов. Активность VWF в % вычисляли по калибровочному графику.

2.7.5. Оценка активности системы антиромбина-III

Активность антитромбина-III (АТ-III) определяли спектрофотометрическим методом с использованием набора НПО «РЕНАМ» (Серия: 0316). В пробирку, содержащую 100 мкл исследуемой плазмы (или плазмы калибратора), вносили 100 мкл рабочего раствора тромбина. После 3-х минутной инкубации при температуре 37 °С к полученной смеси добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата и вновь термостатировали. Смесь переносили в кювету, добавляли раствор уксусной кислоты (1 мл 50%) и измеряли оптическую плотность (спектрофотометр СФ-56, "ЛОМО-Спектр", Россия). В завершении определяли активность АТ-III по калибровочному графику.

2.8 Методы оценки скорости мозгового кровотока и вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия

Скорость локального мозгового кровотока (Ск) регистрировали с использованием ультразвукового доплерографа УЗОП-010-01 (рабочая частота 25 МГц) и прикладного программного комплекса ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.7. (Россия, Санкт-Петербург). В проекции средней мозговой артерии в левой теменной кости животных высверливали бором трепанационное окно (охлаждая

при этом 0,9% раствором NaCl) с целью оценки изменения церебральной гемодинамики. Контактной средой служил «Униагель» (Гельтек-Медика, Россия). Вазодилатирующую активность сосудов мозга оценивали, используя эндотелийспецифичные анализаторы, являющиеся модификаторами синтеза оксида азота (NO): ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich, Серия: A11040712), L-аргинин в дозе 150 мг/кг (Panreac, Серия: 143464.1208), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 15 мг/кг (Sigma-Aldrich, Серия: 1413116). О функциональном состоянии сосудистого эндотелия судили по изменению скорости кровотока после введения модификаторов синтеза NO, каждое последующее введение анализатора осуществляли после восстановления исходной Ск. Все проводимые над животными манипуляции осуществлялись под наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг), далее крыс декапитировали [5, 89].

2.9. Методы иммуноферментного анализа различных маркеров апоптоза

Методом твердофазного иммуноферментного анализа в гомогенате головного мозга животных определяли концентрацию маркеров клеточной гибели: фактора некроза опухоли (TNF α , Номер: SEA133Ra), апоптоз-индуцирующего фактора (AIF, Номер: SEB064Ra), Jun-N-концевой киназы (JNK, Номер: SEL638Ra), p53-зависимого модулятора апоптоза (PUMA, Номер: SEB909Ra), а также переносчика глюкозы (GLUT1, Номер: SEB185Ra). В работе были использованы наборы реактивов производства компании Cloud Clone Corp. (США). Ход анализа строго соответствовал прилагаемой производителем инструкции к каждому набору реактивов. С помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F50 (Австрия) производили считывание результатов эксперимента.

2.10. Методы статистической обработки результатов исследования

Для статистического анализа результатов, полученных в ходе проведенной работы, использовали пакет прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010 [56, 64]. Вычисляли среднее значение и его стандартную ошибку ($M \pm m$). Нормальность распределения данных оценивали с использованием критерия Шапиро Уилка. В скрининговом исследовании для сравнения средних в случае подчинения данных

законам нормального распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента, в противном случае - U-критерий Манна-Уитни. При углубленном изучении соединения-лидера использовали метод множественных сравнений: параметрический критерий – Ньюмана-Кейлса, непараметрический – Краскела-Уоллиса [28, 69, 73].

ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ

Фармакологический скрининг в ряду производных пиримидин-4(1H)-она с целью определения потенциального церебропротекторного действия был проведен на модели билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Перед началом эксперимента животные были рандомизированы по поведенческой активности в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Так как при ишемическом поражении головного мозга в первую очередь возникают функциональные нарушения, в качестве исследуемых параметров были выбраны выживаемость, неврологический дефицит, изменения поведенческой активности, когнитивных и мнестических функций [175, 178, 242, 266, 86]. Кроме того при цереброваскулярных поражениях наблюдаются нарушения энергообмена, поэтому, также оценивалось количество потребляемой глюкозы тканями мозга и содержание молочной кислоты [252, 50]. Доза 50 мг/кг для скрининга была выбрана исходя из литературных данных, представляющих различные виды активности пиримидинов [23, 39, 71, 92, 95].

3.1.1 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на степень летальности и выраженность неврологического дефицита в условиях ишемии головного мозга

Необратимая окклюзия общих сонных артерий привела к гибели 70% крыс группы негативного контроля (НК), тогда как у ложнооперированных животных (ЛО) летальности не наблюдалось (рис. 5). У выживших особей группы НК, не получавших фармакологическую поддержку, степень неврологических нарушений достигла $7,33 \pm 0,17$ баллов (рис. 6), что проявлялось в вялости, замедленности и манежности движений, одно- и двусторонних птозах век, парезах конечностей, а в некоторых случаях и параличей.

На фоне профилактического введения кавинтона летальность животных достигла 50%, а неврологический дефицит по шкале McGraw составил $2,40 \pm 0,25$ баллов, что меньше аналогичного показателя НК группы крыс на 67,3% ($p < 0,001$). При применении циннаризина выживаемость крыс составила 60%, а тяжесть

неврологических нарушений, относительно животных негативного контроля, была меньше на 68,2% ($2,33 \pm 0,28$ баллов) ($p < 0,001$).

В условиях церебральной ишемии степень летальности крыс, получавших внутрибрюшинно соединение PIR-4, сократилась до 40%, неврологический индекс при этом составил $2,42 \pm 0,15$ баллов, что на 67% ($p < 0,001$) ниже значения группы крыс негативного контроля.

Уровень смертности животных, которым вводили PIR-5, достиг 60%, неврологический статус составил $3,63 \pm 0,37$ баллов, что на 50,5% ($p < 0,01$) было меньше данного показателя крыс, не получавших фармакологическую поддержку.

Наибольшая степень летальности крыс в условиях ишемии головного мозга наблюдалась на фоне получения экспериментальных соединений под лабораторными шифрами PIR-6, PIR-7, PIR-8 и составила 80%, 70% и 80%, соответственно. Вследствие этого было решено исключить данные вещества из дальнейшего эксперимента.

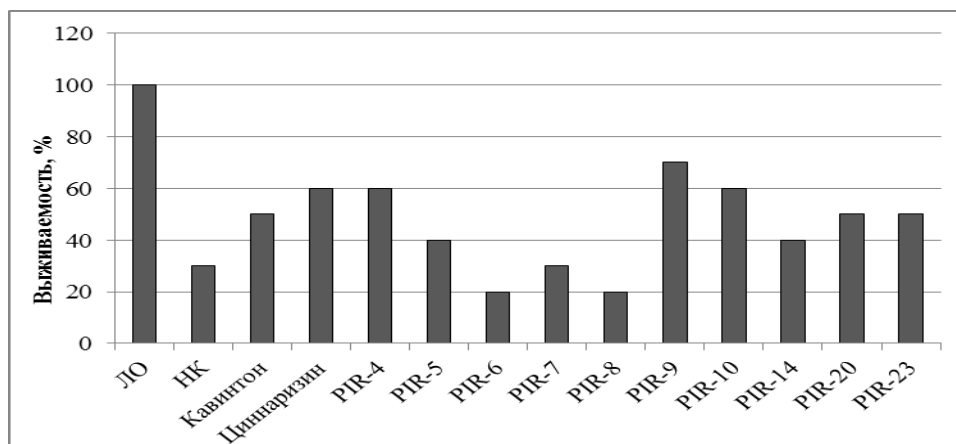


Рисунок 5. Уровень выживаемости крыс на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Обозначение: ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=20$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=10$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=10$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-6 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-6 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-7 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-7 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-8 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-8 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг) ($n=10$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50 мг/кг, $n=10$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50 мг/кг, $n=10$).

У группы крыс, получавших исследуемое соединение PIR-9, отмечена наилучшая выживаемость (70%), а степень неврологических нарушений снизилась до $2,21 \pm 0,26$, что на 69,8% ($p < 0,001$) ниже группы животных негативного контроля.

Летальность крыс на фоне профилактического применения PIR-10 сократилась до 40%, при этом показатели неврологического дефицита максимально снизились относительно нелеченых крыс на 71,6% ($p < 0,001$).

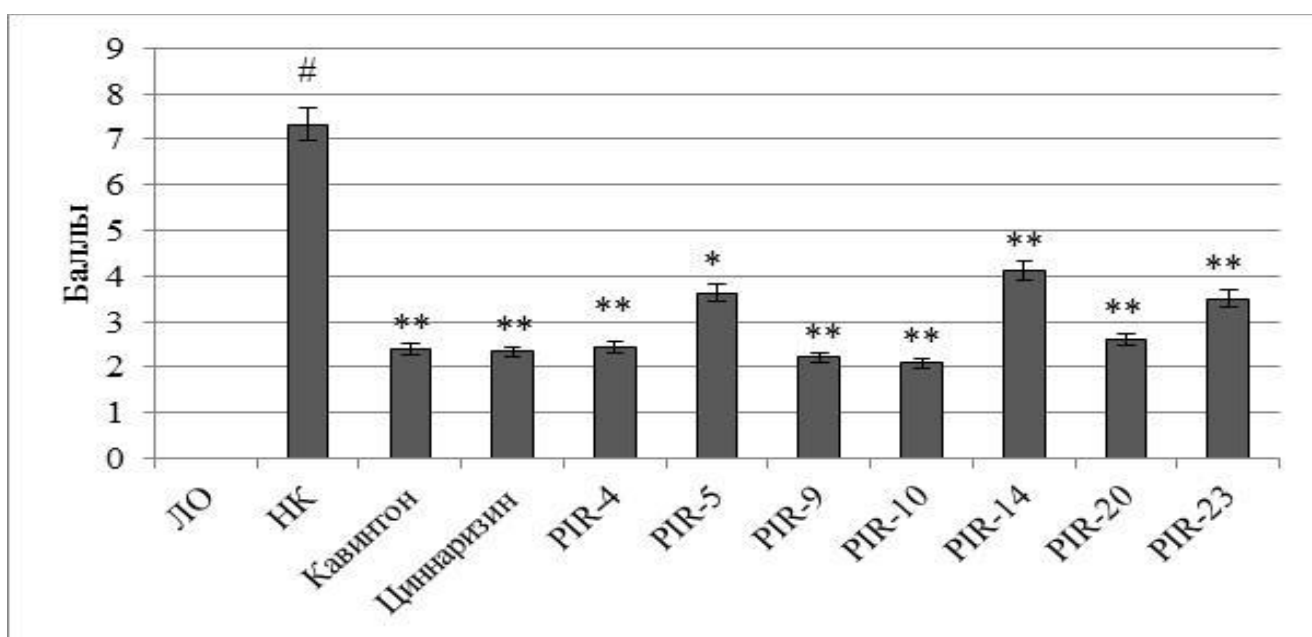


Рисунок 6. Выраженность неврологического дефицита на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50мг/кг, $n=6$).

Степень летальности крыс, получавших исследуемые вещества PIR-20 и PIR-23, достигла 50%, в обеих группах. Однако наименьший неврологический

статус наблюдался у группы животных, которым вводили PIR-20 – $2,60 \pm 0,19$ баллов, у крыс, которые получали PIR-23, аналогичный показатель достиг $3,50 \pm 0,35$ баллов. При этом изменение неврологического индекса было статистически значимо в сравнении с животными группы НК на 64,5% ($p < 0,001$) и 52,3% ($p < 0,001$) у крыс, на фоне приема PIR-20 и PIR-23, соответственно.

3.1.2 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности в тесте «Открытое поле» в условиях ишемии головного мозга

Для более достоверной оценки при проведении дальнейших тестов, в группах животных, у которых осталось менее 6 особей, формирование групп осуществляли методом добора. Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей у группы крыс, не получавших фармакологическую поддержку, в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий, были значительно ниже данных ложнооперированных животных (пройденные квадраты на 73,7% ($p < 0,001$), стойки+заглядывания на 86,3% ($p < 0,001$)) (рис . 7).

На фоне получения препаратов сравнения кавинтона и циннаризина количество пройденных крысами квадратов достоверно превышало аналогичные значения группы животных НК на 75,3% ($p < 0,01$) и 155,7% ($p < 0,001$), соответственно. Число заглядываний группы крыс, получавших кавинтон, незначительно отличалось от крыс группы НК, у животных группы циннаризина число заглядываний в 5,5 раз ($p < 0,001$) превышало аналогичный показатель крыс, которым не оказывали фармакологическую поддержку.

Локомоторная активность крыс на фоне профилактического введения PIR-4 была выше показателя животных негативного контроля на 78,8% ($p < 0,001$). Ориентировочно-исследовательская активность группы крыс, получавших PIR-4, в 2,3 ($p < 0,05$) раза достоверно превышала аналогичные данные группы крыс НК. Так же, количество стоек, группы крыс, получавших PIR-4, на 166,7% ($p < 0,01$) превысило показатель группы препарата сравнения кавинтон.

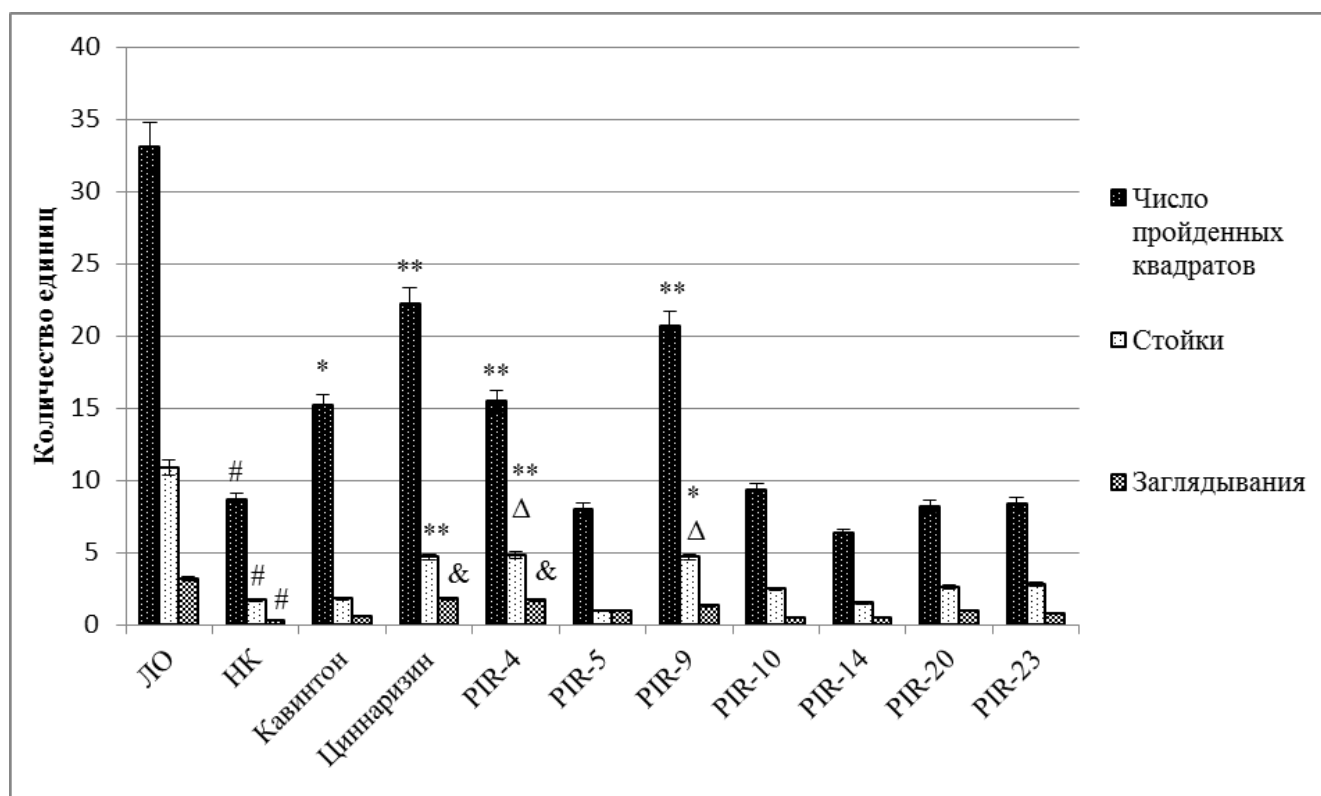


Рисунок 7. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей в тесте «Открытое поле» на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), * - ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$); Δ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,01$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50мг/кг, $n=6$).

Наименьшее изменение показателей двигательной активности (на 35,5% ($p < 0,001$)) отмечалось у животных, которым вводили исследуемое соединение PIR-9. В сравнении с группой негативного контроля число пройденных крысами квадратов было выше на 138,9% ($p < 0,001$), а ориентировочно-исследовательская активность – на 200% ($p < 0,001$).

На фоне профилактического введения исследуемых соединений под лабораторными шифрами PIR-10, PIR-14, PIR-20, PIR-23 в условиях необратимой окклюзии сонных артерий статистически значимых отличий по показателям двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей не наблюдалось.

3.1.3 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на психо-эмоциональный статус в тесте «Открытое поле» в условиях ишемии головного мозга

У группы животных негативного контроля, после воспроизведения ишемии головного мозга, наблюдалось увеличение психо-эмоционального напряжения, о котором можно судить по уменьшению времени нахождения на центральной площадке и увеличению груминга и дефекации. Так, время в центре на 68,2% ($p < 0,01$) было ниже аналогичного значения группы ЛО животных (рис. 8). Количество актов груминга у нелеченых крыс возросло до $7,7 \pm 1,2$ раз, что на 165,5% ($p < 0,01$) превысило данные ложнооперированных особей. Число болюсов у группы животных НК достоверно было выше значения группы ЛО крыс на 117,4% ($p < 0,01$).

Время нахождения в центральном квадрате на фоне терапии кавинтоном и циннаризином достоверно превысило значение группы нелеченых крыс на 142,1% ($p < 0,05$) и 157,1% ($p < 0,05$). Показатели груминга групп крыс, получавших кавинтон и циннаризин, были ниже идентичных данных НК группы животных в 2,6 ($p < 0,01$) и 2,4 раза ($p < 0,01$), соответственно. Количество актов дефекации у животных, которым вводили референтные препараты кавинтон и циннаризин, в 2,5 ($p < 0,01$) и 2,3 ($p < 0,05$) было ниже значения группы крыс, не подверженных фармакотерапии.

Аналогичная тенденция изменений наблюдалась на фоне введения экспериментальных соединений PIR-4 и PIR-10: время в центре было выше на 157,1% ($p < 0,01$) и 169,2% ($p < 0,05$), груминг – ниже в 2,9 ($p < 0,01$) раз у обеих групп, акты дефекации – меньше в 2,3 ($p < 0,05$) и 3,3 ($p < 0,05$) раза, соответственно, в сравнении с животными, не подверженными терапии.

Наибольшее изменение времени нахождения в центральном квадрате отмечено на фоне введения субстанции PIR-9, так данный показатель значимо превысил значение группы животных НК на 194% ($p<0,001$). Число актов груминга у группы животных, получавших PIR-9, было ниже в 3 раза ($p<0,001$) по сравнению с нелечеными особями, количество болюсов – в 3,1 раз ($p<0,001$).

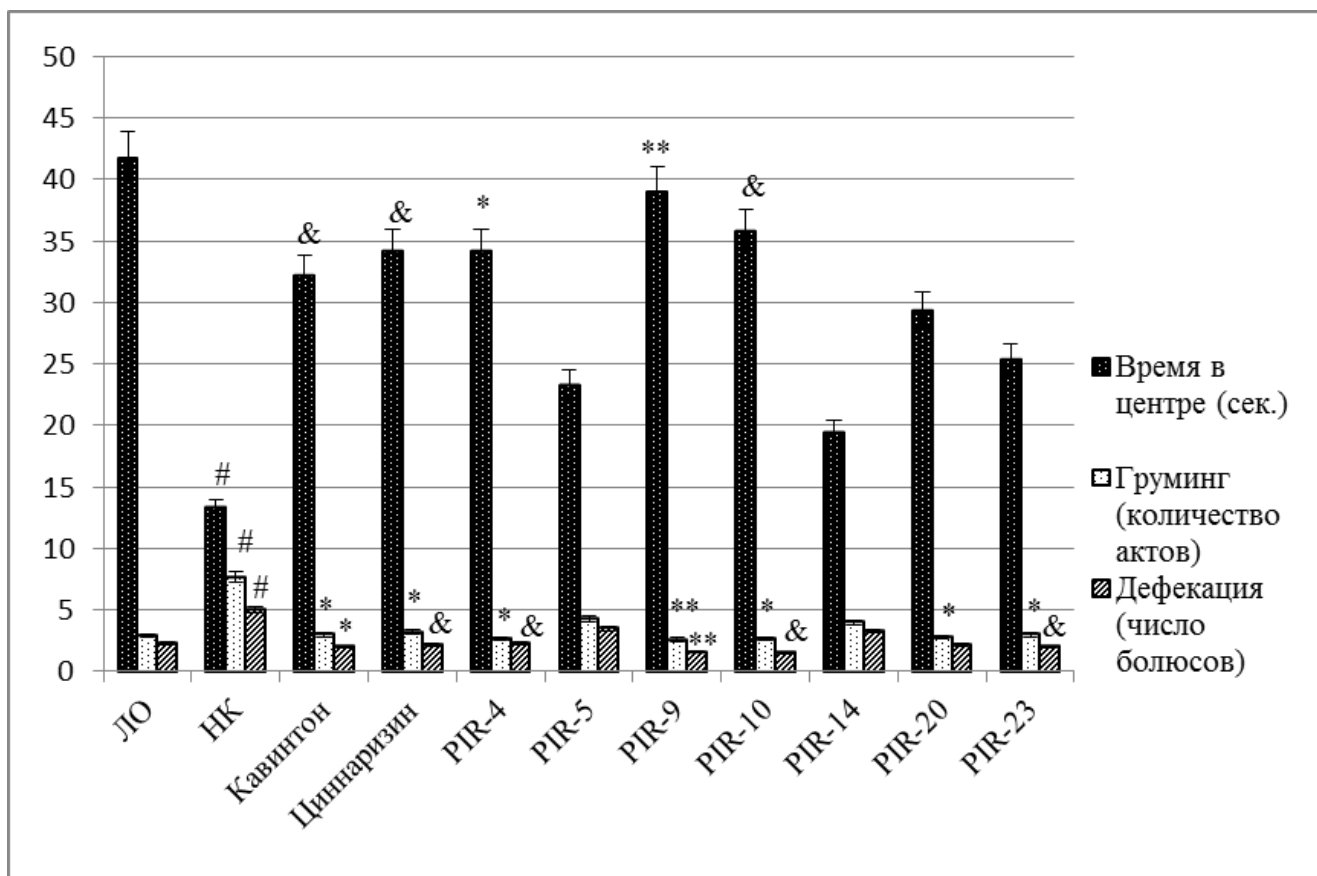


Рисунок 8. Оценка изменения психо-эмоционального статуса в тесте «Открытое поле» на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), * - ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$). ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50 мг/кг, $n=6$).

На фоне профилактического введения соединения под лабораторным шифром PIR-23 количество актов груминга и дефекации было ниже аналогичных значений группы НК в 2,6 ($p<0,01$) и 2,5 ($p<0,05$) раз, однако достоверных изменению по показателю «время нахождения в центральном квадрате» не наблюдалось.

Введение остальных экспериментальных веществ (PIR-5, PIR-14, PIR-20, PIR-23) не способствовало улучшению психо-эмоционального состояния крыс на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий.

3.1.4 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга

У ишемизированных крыс без фармакотерапии время в центре (ВЦ) и в открытых рукавах (ВО) было достоверно ниже на 75,4% ($p<0,001$) и 68,5% ($p<0,001$), время в закрытых рукавах (ВЗ) и число актов груминга на 56,9% ($p<0,001$) и в 2,4 раз ($p<0,001$), соответственно, относительно группы ЛО животных (рис. 9).

На фоне фармакотерапии кавинтоном время на центральной площадке на 137,1% ($p<0,05$) было выше, время в закрытых рукавах и акты груминга на 14,4% ($p<0,05$) и в 2,9 раз ($p<0,01$) соответственно были ниже по отношению к аналогичным данным группы животных НК, что может свидетельствовать о снижении уровня тревожности особей. Внутривентрикулярное введение циннаризина также привело к аналогичной тенденции изменения перечисленных выше показателей (ВЦ – выше на 118,6% ($p<0,01$), ВЗ – ниже на 17,2% ($p<0,001$), груминг ниже в 2,2 раза ($p<0,01$)), кроме того, время нахождения в открытых рукавах лабиринта также значительно превышало аналогичное значение нелеченых крыс на 113,5% ($p<0,001$).

На фоне внутривентрикулярного введения субстанции PIR-4 время в центре и в открытых рукавах было выше на 145,7% ($p<0,05$) и 134,4% ($p<0,001$), а в закрытых рукавах и число актов груминга ниже на 20,4% ($p<0,01$) и в 4 раза ($p<0,001$) соответственно по сравнению с крысами группы негативного контроля.

Наибольшее изменение ВЦ и ВО наблюдалось при введении соединения под лабораторным шифром PIR-9, так данные показатели были выше аналогичных группы крыс НК на 220% ($p<0,001$) и 178,5% ($p<0,001$). Кроме того, время нахождения на центральной площадке животных, которым вводили PIR-9, статистически значимо превышало показатель крыс, получавших циннаризин на 46,4% ($p<0,001$), а время в открытых рукавах – значение группы крыс, которым вводили кавинтон на 55,5% ($p<0,01$).

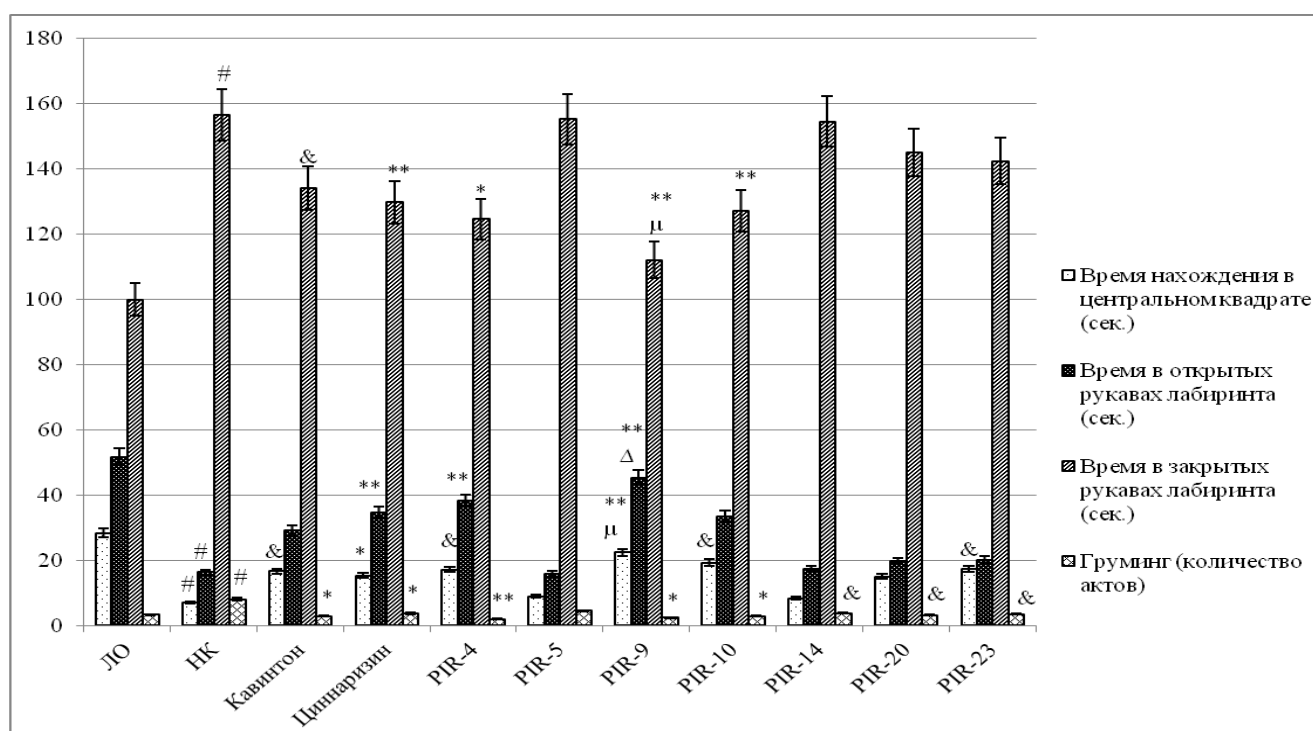


Рисунок 9. Оценка изменения уровня тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), * - ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); Δ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,01$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50 мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50 мг/кг, $n=6$).

На фоне получения крысами соединения PIR-10 время в центре было выше на 175,7% ($p<0,05$), а показатели «время в закрытых рукавах лабиринта» и «груминг» были ниже на 18,8% ($p<0,001$) и в 2,9 раз ($p<0,01$) по отношению к особям, не подверженным фармакотерапии.

Экспериментальные вещества PIR-5, PIR-14, PIR-20 и PIR-23 способствовали достоверному изменению количества актов груминга, так данное значение было выше аналогичного группы нелеченых крыс в 1,8 ($p<0,05$), 2,1 ($p<0,05$), 2,5 ($p<0,05$) и 2,4 ($p<0,05$) раз соответственно, достоверных отличий по остальным изучаемым показателям не отмечалось.

3.1.5 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на горизонтальную и вертикальную двигательную активность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга

Помимо изменения степени тревожности в условиях глобальной ишемии головного мозга у животных группы НК отмечалось снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности. У ишемизированных животных относительно ложнооперированных крыс количество переходов между рукавами лабиринта было достоверно ниже на 63,5% ($p<0,001$), свешиваний - на 90,3% ($p<0,001$), стоек - на 90,6% ($p<0,001$) (рис. 10).

На фоне получения крысами препарата сравнения кавинтон по сравнению с нелечеными особями достоверно изменилось число свешиваний (было выше в 4,9 раз ($p<0,05$)), по остальным показателям значимых отличий не было. Напротив, профилактическое введение циннаризина способствовало росту горизонтальной (число переходов) и вертикальной (свешивания+стойки) двигательной активности на 139,1% ($p<0,05$) и в 3,5 раза ($p<0,05$) соответственно в сравнении с животными, не подверженными терапии.

Профилактическое введение исследуемого вещества PIR-4 привело к увеличению горизонтальной двигательной активности, так количество свешиваний было выше в 5,3 раза ($p<0,05$), а число стоек – выше в 3,8 раз ($p<0,05$) по отношению к нелечеными крысам.

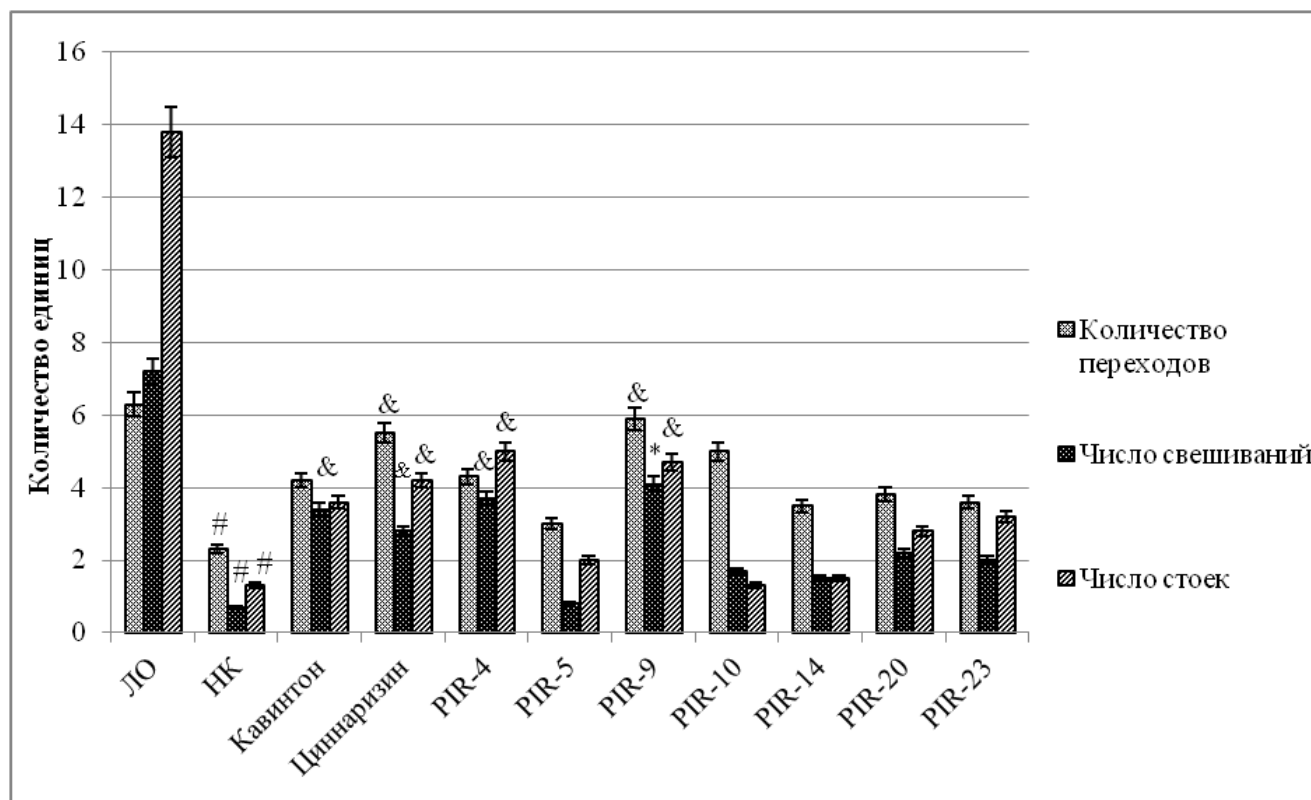


Рисунок 10. Оценка изменения вертикальной и горизонтальной двигательной активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,01$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), * - ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$). ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50мг/кг, $n=6$).

На фоне внутрибрюшинного введения соединения PIR-9 наблюдался рост как горизонтальной, так и вертикальной двигательной активности. Количество переходов между рукавами ПКЛ было выше на 156,5% ($p < 0,05$), число свешиваний и стоек в 5,9 ($p < 0,01$) и 3,6 ($p < 0,05$) раз соответственно (относительно крыс группы НК).

Остальные экспериментальные производные пиримидина (PIR-5, PIR-10, PIR-14, PIR-20, PIR-23) не привели к значительным изменениям горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте ПКЛ.

3.1.6 Влияние профилактического введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию молочной кислоты в плазме крови крыс и потребление глюкозы мозговой тканью в условиях ишемии головного мозга

При остром нарушении мозгового кровообращения содержание молочной кислоты в плазме крови крыс, не получавших фармакологическую поддержку, крайне превышало показатель ложнооперированных животных (в 5,5 раз) ($p < 0,001$), что говорит о выраженной гиперлактатемии и, как следствие, нарушении процессов энергообмена [10, 11] (табл. 6). Профилактический прием кавинтона вызвал снижение концентрации лактата 57,19% ($p < 0,001$) относительно группы крыс негативного контроля, на фоне приема циннаризина этот показатель снизился на 62,11% ($p < 0,001$).

Все экспериментальные соединения значимо снижали уровень молочной кислоты в плазме крови крыс. Однако стоит отметить, что профилактическое введение экспериментального соединения PIR-4 привело к снижению концентрации молочной кислоты в плазме крови крыс на 68,07% ($p < 0,001$) в сравнении с животными негативного контроля. При этом уровень лактата был достоверно меньше аналогичного показателя группы крыс препаратов сравнения (кавинтона – на 25,4% ($p < 0,05$), циннаризина на 15,74% ($p < 0,05$)).

На фоне введения субстанции PIR-9 содержание молочной кислоты уменьшилось на 69,04% ($p < 0,001$) относительно группы крыс НК и на 27,67% ($p < 0,05$) - в сравнении с кавинтоном, 18,29% ($p < 0,05$) - в сравнении с циннаризином.

Уровень лактата у животных, получавших внутривентрикулярно PIR-10, уменьшился на 65,09% ($p < 0,001$) в сравнении с нелечеными крысами, также значимое снижение данного показателя отмечено и относительно крыс, которым вводили препарат сравнения кавинтон (на 18,44% ($p < 0,05$)).

Несмотря на выраженное снижение концентрации молочной кислоты в плазме крови крыс на фоне приема экспериментальных веществ PIR-5, PIR-14, PIR-20, PIR-23 относительно животных группы негативного контроля на 52,72% ($p<0,001$), 55,53% ($p<0,001$), 47,46% ($p<0,001$), 40,53% ($p<0,001$), соответственно, значимых отличий от групп крыс, получавших препараты сравнения, не установлено.

Одним из параметров, изменяющихся на фоне церебральной ишемии, является потребление глюкозы тканями мозга [34, 88]. Как видно из таблицы 6 данный показатель уменьшается на 67,11% ($p<0,001$) в сравнении с не ишемизированными крысами и составляет 4,75%, несмотря на то, что содержание глюкозы в артериальной крови крыс при моделировании данной патологии значительно повышается, тогда как аналогичное значение ложнооперированных крыс равно 22,78%.

Внутрибрюшинное введение кавинтона способствовало улучшению утилизации глюкозы до 12,76% ($p<0,001$), что значимо отличалось от данных группы крыс, не подверженных фармакотерапии.

У животных, которым вводили циннаризин, потребление глюкозы тканями мозга возросло до 9,97% ($p<0,001$), что достоверно превышало показатель крыс группы негативного контроля.

При профилактическом введении субстанции PIR-4 артериовенозная разница на 153,06% ($p<0,001$) превысила значение нелеченых крыс, потребление глюкозы составило 15,33%.

На фоне получения крысами экспериментального соединения PIR-5 значительного увеличения потребления глюкозы тканями мозга не наблюдалось. То же самое можно сказать и о введении исследуемых веществ PIR-14, PIR-20, PIR-23.

У крыс, которые получали внутрибрюшинно субстанцию PIR-9, разница между артериальной и венозной кровью на 179,59% ($p<0,001$) превысила аналогичный показатель животных, не подверженных фармакотерапии, и на 31,73% ($p<0,05$) - циннаризина, при этом утилизация глюкозы составила 14,56%.

Таблица 6

Концентрация молочной кислоты в плазме крови и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Группа	Лактат, ммоль/л	Потребление глюкозы, ммоль/л
ЛО	2,06±0,08	1,49±0,04
НК	11,4±0,03#	0,49±0,07#
Кавинтон	4,88±0,07**	1,37±0,07**
Циннаризин	4,32±0,06**	1,04±0,04**
PIR-4	3,64±0,19**/Δ/λ	1,24±0,11Δ/λ
PIR-5	5,39±0,4**	0,75±0,09
PIR-9	3,53±0,15**/Δ/λ	1,37±0,03**/λ
PIR-10	3,98±0,18**/Δ	1,2±0,06**/λ
PIR-14	5,07±0,12**	0,65±0,04
PIR-20	5,99±0,17**	0,94±0,08*
PIR-23	6,78±0,4**	0,83±0,03*

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), ** - ($p<0,001$); Δ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), λ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-4 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-4 (50мг/кг, $n=6$); PIR-5 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-5 (50мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=7$); PIR-10 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50мг/кг, $n=6$); PIR-14 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-14 (50мг/кг, $n=6$); PIR-20 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-20 (50мг/кг, $n=6$); PIR-23 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-23 (50мг/кг, $n=6$).

Потребление глюкозы мозговой тканью на фоне профилактического внутрибрюшинного введения исследуемой субстанции PIR-10 было равно 10,5%, артериовенозная разница превышала показатель группы НК на 144,9% ($p<0,001$) и на 15,38% ($p<0,05$) значительно отличалась от группы крыс, которые получали препарат сравнения циннаризин.

Сопоставляя данные, полученные на первом этапе скринингового исследования, лидером с потенциальной церебропротекторной активностью было выбрано экспериментальное соединение под лабораторным шифром PIR-9.

3.2. Изучение дозозависимого эффекта соединений-лидеров на когнитивные и мнестические функции и некоторые показатели энергообмена на фоне ишемии головного мозга

Второй этап скрининговых исследований был посвящен дозозависимому изучению выбранного соединения-лидера PIR-9 на когнитивные и мнестические функции, а также на изменения энергообмена в условиях церебральной ишемии головного мозга крыс. Так как дозировка 50 мг/кг для первоначального скрининга была выбрана исходя из литературных данных, представляющих различные виды активности пиримидинов [23, 39, 71, 92, 95], то для определения зависимости «доза-эффект» решено было использовать данное соединение в дозах 25, 50 и 100 мг/кг.

3.2.1. Влияние профилактического введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения на когнитивные функции на фоне ишемии головного мозга

В условиях острого нарушения мозгового кровообращения количество животных группы негативного контроля справившихся с тестом условного рефлекса пассивного избегания сократилось до 33,3%, время захода в темную камеру увеличилось лишь на 30,7% в сравнении с данными до моделирования ишемии ($28,7 \pm 2,6$ секунд) (рис. 11).

Число крыс, получавших препараты сравнения кавинтон и циннаризин, повторно посетивших темный отсек УРПИ, составило 50% и 43%, соответственно. Время захода группы крыс, получавших кавинтон, превысило значение группы НК на 46,7% ($p < 0,01$), а получавших циннаризин – на 103,5% ($p < 0,001$). При этом у животных, которым вводили кавинтон время посещения темной камеры на 27,9% ($p < 0,05$) было значимо меньше показателя крыс, на фоне приема циннаризина.

У животных, получавших внутривенно PIR-9 25, 50 и 100 мг/кг количество особей вновь посетивших темный отсек составило 40%, 12,5% и 33%, соответственно. Введение всех дозировок соединения PIR-9 привело к достоверному увеличению времени посещения темной камеры, в сравнении и животными, не получавшими фармакологическую поддержку. Так, в условиях получения PIR-9 25 мг/кг время увеличилось на 29,3% ($p<0,05$), на фоне приема 100 мг/кг вещества – на 66,7% ($p<0,01$). Наибольшее увеличение времени посещения темного отсека наблюдалось на фоне приема PIR-9 в дозе 50 мг/кг (на 110,7% ($p<0,01$) в сравнении с группой крыс НК).

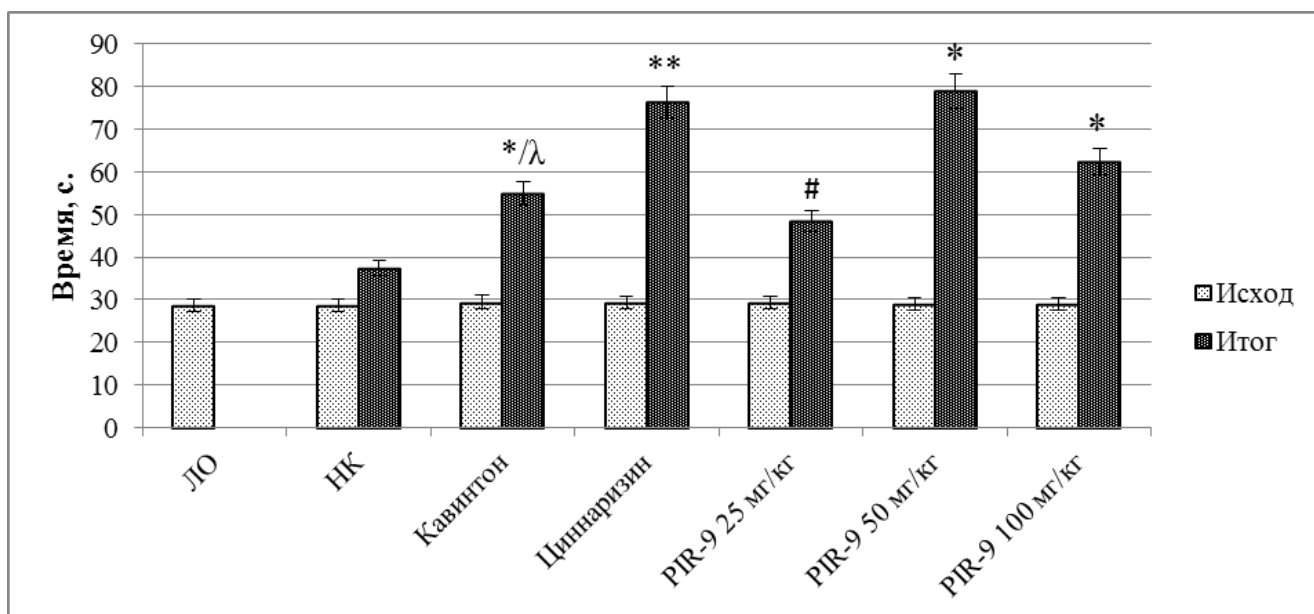


Рисунок 11. Оценка изменения латентного периода захода крыс в темный отсек в тесте УРПИ на фоне введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,05$), * - ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); λ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=7$); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25 ($n=6$), 50 ($n=8$), 100 ($n=6$) мг/кг, соответственно.

При необратимой окклюзии общих сонных артерий 66,7% крыс негативного контроля не справились с тестом экстраполяционного извлечения, время

подныривания у животных, выполнивших задачу, на 3,7% незначительно снизилось относительно данных до операции ($57,1 \pm 4,3$ сек.) (рис. 12).

На фоне введения кавинтона и циннаризина количество животных, выполняющих экстраполяционный тест, увеличилось до 50% и 43%, соответственно. Время на решение задачи у крыс, которым вводили кавинтон, незначительно снизилось как в сравнении с исходными значениями (на 16,73%), так и относительно группы крыс НК (на 14,8%). Латентный период подныривания особей, получавших циннаризин, значимо сократился на 73,9% ($p < 0,001$), относительно нелеченых крыс, период решения задачи на 69,3% ($p < 0,001$) также достоверно превышал такой показатель крыс группы кавинтона.

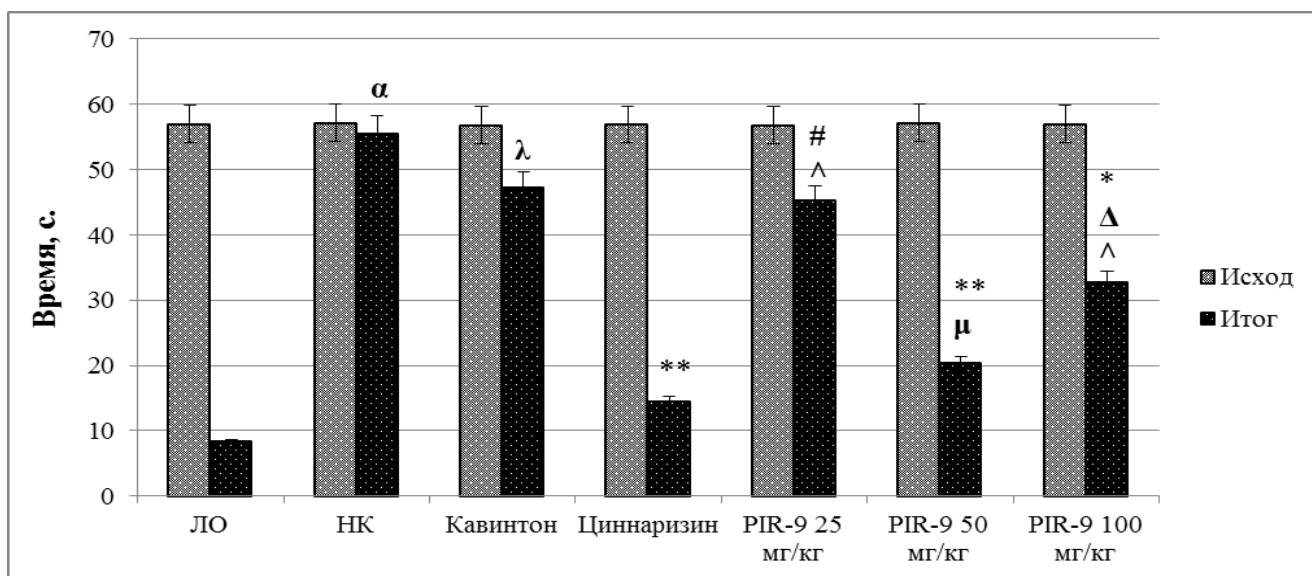


Рисунок 12. Оценка изменения латентного периода подныривания крыс в тесте экстраполяционного избавления на фоне введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Обозначение: α - статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); # - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), * - ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$); Δ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,01$), μ - ($p < 0,001$); λ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p < 0,001$); ^ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших PIR-9 50 мг/кг ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=10$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25 ($n=6$), 50 ($n=8$), 100 ($n=6$) мг/кг, соответственно.

Минимальное количество крыс, не решивших ТЭИ, на фоне введения PIR-9 в различных дозировках отмечено при введении данного соединения в дозе 50 мг/кг и составило 25%. Число животных, не справившихся с экстраполяционной задачей, при введении PIR-9 25 и 100 мг/кг составило 40% и 33%, соответственно. Период выполнения задачи у особей, получавших PIR-9 50 мг/кг, отличался как от группы крыс НК на 63,42% ($p<0,001$) и кавинтона на 57,1% ($p<0,001$), так и от животных, которым вводили PIR-9 25 мг/кг (на 55,2% ($p<0,001$)) и PIR-9 100 мг/кг (на 40,9% ($p<0,001$)).

3.2.2. Влияние профилактического введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения на концентрацию молочной кислоты в плазме крови крыс и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне ишемии головного мозга

Из таблицы 7 видно, что у нелеченых животных на фоне церебральной ишемии головного мозга наблюдалось выраженное увеличение лактата ($11,35\pm0,08$ ммоль/л), что в 5,6 раз ($p<0,001$) превышало показатель ложнооперированных особей.

У животных, которым вводили препарат сравнения кавинтон, концентрация молочной кислоты на 57,5% ($p<0,001$) была ниже, а у особей, получавших циннаризин - на 62,7% ($p<0,001$) ниже идентичного показателя крыс, не получавших фармакологическую поддержку.

Введение соединения PIR-9 в дозе 25 мг/кг привело к снижению лактата на 54,1% ($p<0,001$) относительно крыс НК, в дозах 50 и 100 мг/кг на 68,8% ($p<0,001$) и 56,4% ($p<0,001$), соответственно. Введение вещества PIR-9 50 мг/кг привело к достоверному уменьшению концентрации молочной кислоты на 26,6% ($p<0,001$) в сравнении с кавинтоном и на 16,3 ($p<0,01$) относительно группы крыс циннаризина.

Потребление глюкозы тканями мозга ложнооперированных животных составило 23,51%, у группы нелеченых крыс на фоне острого нарушения мозгового кровообращения аналогичный показатель был в 3,3 раза ($p<0,001$) меньше и составил 4,3% (табл. 7).

Профилактическое введение кавинтона и циннаризина способствовало улучшению утилизации глюкозы до 12,5% и 10,19%, соответственно, что достоверно ($p<0,001$) отличалось от животных, не получавших фармакологическую поддержку. При этом значимые отличия наблюдались и между самими группами препаратов сравнения, так потребление глюкозы крысами, получавшими кавинтон, было на 20,6% ($p<0,01$) было выше идентичного показателя крыс, которым вводили циннаризин.

Таблица 7

Концентрация молочной кислоты в плазме крови и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения различных доз соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях ишемии головного мозга

Группа	Лактат, ммоль/л	Потребление глюкозы, ммоль/л
ЛО	2,02±0,08	1,46±0,05
НК	11,35±0,08&	0,44±0,08&
Кавинтон	4,82±0,2**	1,23±0,07**/α
Циннаризин	4,23±0,09**	1,02±0,03**
PIR-9 25 мг/кг	5,21±0,15**/λ	0,66±0,08λ
PIR-9 50мг/кг	3,54±0,16**/μ/α	1,37±0,05**/λ
PIR-9 100мг/кг	4,95±0,14**/λ	0,82±0,03**/λ

Примечание: & - статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); μ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); α – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,01$), λ - ($p<0,001$); λ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших PIR-9 50 мг/кг ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=10); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=7); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25 (n=6), 50 (n=8), 100 (n=6) мг/кг, соответственно.

Введение соединения PIR-9 привело к наиболее значимому увеличению артериовенозной разницы до 15,07% в дозировке 50 мг/кг. Этот показатель на 34,3% превосходил данные группы крыс, получавших циннаризин. Нельзя не отметить, что потребление глюкозы на 107,6% ($p<0,001$) и 67,1% ($p<0,001$) было выше у группы особей, которым вводили PIR-9 50 мг/кг относительно крыс, получавших дозировки 25 и 100 мг/кг соответственно.

Заключение

В результате проведенного фармакологического исследования установлено, что ишемия головного мозга, вызванная билатеральной окклюзией общих сонных артерий, приводит высокой летальности животных, а у выживших – к неврологическим нарушениям и изменению поведенческой активности. Так, у животных группы негативного контроля выживаемость составила 30%, неврологический дефицит $7,33 \pm 0,17$ баллов, двигательная активность снизилась на 74,3% ($p < 0,001$), ориентировочно-исследовательская на 86,5% ($p < 0,001$), относительно исходных показателей данной группы. Кроме того, повысился уровень тревожности, как можно судить по уменьшению нахождения животных в центре и в открытых рукавах, увеличению времени в закрытых рукавах и количества актов груминга в ПКЛ, что сопоставимо с результатами, полученными в тесте «Открытое поле». Помимо нарушений поведенческой структуры, наблюдаются и изменения со стороны энергообмена, что проявляется в увеличении уровня молочной кислоты у НК группы крыс ($11,4 \pm 0,03$ ммоль/л), а также уменьшению потребления глюкозы мозговыми тканями (4,75% у группы крыс НК), несмотря на завышенное её значение в артериальной крови крыс.

Профилактическое введение препаратов сравнения кавинтона и циннаризина позволило частично скорректировать данные нарушения. При этом на фоне получения крысами циннаризина отмечены наименьшие неврологические нарушения ($2,33 \pm 0,28$ баллов), снижение локомоторной и ориентировочно-исследовательской активностей (квадраты – на 60,8%, заглядывания на 41% относительно исхода), уменьшение степени тревожности. У группы крыс, которым вводили другой препарат сравнения - кавинтон, наблюдалось увеличение потребления глюкозы мозговой тканью до 12,76%, что может говорить об улучшении энергетического метаболизма головного мозга.

Профилактическое введение исследуемых соединений оказало неоднозначное влияние на изучаемые показатели, подтверждающие ишемию головного мозга. Сопоставляя все полученные данные, лидером с потенциальной

церебропротекторной активностью было выбрано исследуемое соединение под лабораторным шифром PIR-9.

Изучение дозозависимого эффекта соединения-лидера позволило установить, что профилактический прием препаратов сравнения кавинтона и циннаризина, а также экспериментального соединения PIR-9 позволил в той или иной мере скорректировать поведенческие и энергетические нарушения, возникающие при церебральной ишемии мозга крыс. Стоит отметить, что выбранное нами соединение-лидер показало свою наибольшую эффективность при их приеме в дозировке 50 мг/кг, что согласуется с литературными данными [20, 39, 71, 92, 95].

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В ходе исследования церебропротекторных свойств соединения-лидера (PIR-9) проведено три серии экспериментов: первая была направлена на оценку влияния соединения-лидера (PIR-9) на степень неврологического дефицита, сенсомоторных изменений, а также уровень отека головного мозга; вторая – на определение влияния соединения-лидера (PIR-9) на изменение биоэлектрического потенциала и размер зоны некроза; третья – на гистоморфологическое исследование ткани мозга экспериментальных животных. В качестве модели исследования на данном этапе проведения эксперимента была выбрана фокальная церебральная ишемия, воспроизводимая путем коагуляции левой средней мозговой артерии, поскольку она наиболее полно отражает клиническую ситуацию поражения ишемического генеза [58, 98].

4.1. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на выраженность неврологического дефицита на фоне фокальной ишемии головного мозга

Как видно из таблицы 8, окклюзия левой средней мозговой артерии (ОЛСМА) у крыс, не подверженных фармакотерапии, привела к вялости, гиподинамии животных, птозам и полуптозам век, парезам и параличам конечностей, в большинстве случаев стороны контралатеральной повреждению. Неврологический индекс группы животных НК составил $3,75 \pm 0,21$ баллов, что соответствует дефициту средней степени тяжести по бальной шкале McGraw в модификации Ганнушкиной. Введение препаратов сравнения кавинтона и циннаризина способствовало значимому снижению неврологического статуса на 60% ($p < 0,001$) и 53,3% ($p < 0,001$), соответственно, в сравнении с ложнооперированными крысами, у животных данных групп отмечены редкие случаи парезов, параличей конечностей не наблюдалось. Получение крысами субстанции PIR-9 привело к достоверному снижению индекса McGraw по

сравнению с нелечеными животными на 75,5% ($p < 0,001$). Введение субстанции PIR-9 способствовало статистически достоверному снижению индекса McGraw относительно обоих препаратов сравнения: на 38,7% ($p < 0,05$) ниже группы крыс получавших кавинтон, и на 47,4% ($p < 0,05$) ниже группы животных, которым вводили циннаризин.

Оценка неврологического дефицита с помощью шкалы Combs и D'Alecy позволяет определить цепкость, равновесие и мышечную силу в двигательных тестах, что говорит о функциональном состоянии экстрапирамидной системы. Коагуляция левой средней мозговой артерии привела к нарушениям моторики и равновесия животных, что проявлялось в неспособности удержания большинства особей на нейлоновой веревке, стержне и экране-сетке. У группы нелеченых крыс наблюдалось значительное уменьшение баллов по шкале Combs до $1,55 \pm 0,22$ ($p < 0,001$) в сравнении с ложнооперированными животными (табл. 8).

На фоне введения кавинтона и циннаризина моторный дефицит был менее выражен, что проявлялось в увеличении индекса Combs на 76,3% ($p < 0,001$) и 77,5% ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с группой крыс НК. Однако при этом полного восстановления нарушений моторики не наблюдалось, о чем может свидетельствовать статистически значимое отличие данного показателя обеих групп препаратов сравнения в отношении к ложнооперированным животным: на 19,2% ($p < 0,001$) у группы крыс, получавших кавинтон и на 14,8% ($p < 0,01$) у крыс, которым вводили циннаризин. У группы животных, которым вводили вещество PIR-9, были наиболее выражены моторные навыки, неврологический индекс по шкале Combs и D'Alecy на 79,5% ($p < 0,001$) превышал таковой группы крыс НК. Достоверных отличий между группами животных PIR-9 и ложнооперированными крысами не отмечено, что может говорить о максимальном улучшении моторных функций на фоне приема данных субстанций.

Для оценки реакции животных и асимметрии их движений использовали бальную шкалу неврологического дефицита Garsia. Как видно из таблицы 8 фокальная церебральная ишемия привела к выраженным нарушениям асимметрии, моторики и проприорецепции, проявляющихся в достоверном

снижении неврологического статуса у крыс, не подверженных терапии, по шкале Garsia на 2,6 раз ($p<0,001$) ($6,67\pm0,42$ баллов) относительно ложнооперированных особей.

На фоне введения кавинтона и циннаризина отмечено улучшение моторных функций на 32,14% ($p<0,001$) и 37,49% ($p<0,001$) соответственно, в сравнении с крысами группы негативного контроля. Нельзя не отметить, что данный показатель обеих групп также значимо отличался от значения ложнооперированных крыс (кавинтон – ниже на 44,37% ($p<0,001$), циннаризин – ниже на 39,62% ($p<0,001$)), что говорит о неполном восстановлении реакции, асимметрии и моторных функций при терапии данными препаратами.

У группы крыс, которые получали соединение под лабораторным шифром PIR-9, неврологический индекс Garsia значимо превышал аналогичный показатель группы животных НК на 49,35% ($p<0,001$) и составил $13,17\pm0,7$ баллов. При этом введение PIR-9 способствовало значимому уменьшению моторного дефицита на 25,36% ($p<0,01$) относительно животных, получавших кавинтон, и на 18,98% ($p<0,05$) в сравнении с крысами, которым вводили циннаризин.

Таблица 8

Неврологический дефицит по шкалам McGraw, Combs и D'Alecy, Garsia на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа \ Тест	Шкала McGraw	Шкала Combs и D'Alecy	Шкала Garsia
ЛО	0	$7,83\pm0,31$	$17,67\pm0,21$
НК	$3,75\pm0,21$	$1,5\pm0,22^{**}$	$6,67\pm0,42^{**}$
Кавинтон	$1,5\pm0,18\#$	$6,33\pm0,33^{**}/\#$	$9,83\pm0,48^{**}/\#$
Циннаризин	$1,75\pm0,21\#$	$6,67\pm0,33^{*}/\#$	$10,67\pm0,61^{**}/\#$
PIR-9	$0,92\pm0,15\#/\kappa/\beta$	$7,33\pm0,42\#$	$13,17\pm0,7^{**}/\#/\mu/\beta$

Примечание: * - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); # - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,001$); κ – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон - ($p<0,05$), μ - ($p<0,01$); β – статистически значимо относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

4.2. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на сенсомоторный дефицит на фоне фокальной ишемии головного мозга

Тест «Сужающаяся дорожка» направлен на изучение опорно-двигательных нарушений передних и задних конечностей животных. Оклюзия левой СМА способствовала увеличению числа ошибок, совершенных передними лапами в 2,34 раза ($p<0,001$), задними – в 4,75 раз ($p<0,001$), у группы нелеченых животных, относительно ложнооперированных крыс (рис. 13). Терапия кавинтоном привела к уменьшению процента соскальзываний с дорожки передних лап в 1,55 раз ($p<0,001$), задних – в 1,77 раз ($p<0,001$) в сравнении с крысами группы НК. Введение циннаризина также значительно уменьшило сенсомоторный дефицит, количество ошибок относительно животных, не получавших фармакологическую поддержку, передними и задними лапами значительно снизилось в 1,51 ($p<0,001$) и 1,54 раза ($p<0,001$).

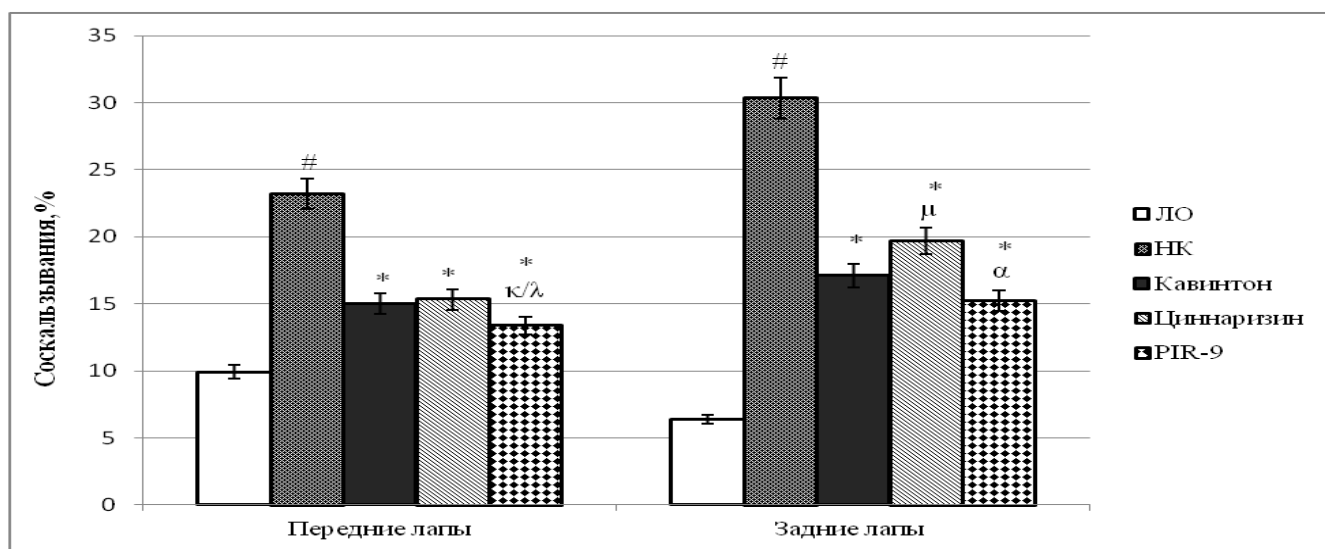


Рисунок 13. Сенсомоторный дефицит в тесте «Сужающаяся дорожка» на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон - ($p<0,05$), μ - ($p<0,01$); λ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,01$), α - ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

На фоне введения вещества, под лабораторным шифром PIR-9, моторно-координационный дефицит передних лап уменьшился до 13,36%, задних – до 15,7%, что статистически значимо ниже показателей крыс, лишенных фармакологической поддержки. При этом процент ошибок передних конечностей, группы крыс, получавших PIR-9, был достоверно меньше в сравнении с крысами, получавшими кавинтон и циннаризин, а задними – относительно животных, получавших внутривентриально циннаризин.

В тесте «Цилиндр» изучали асимметрию передних конечностей крыс при спонтанном исследовании стенок цилиндра. Как можно наблюдать из рисунка 14 фокальная церебральная ишемия привела к уменьшению использования лапы, контралатеральной повреждению (правой) на 43,5% ($p<0,001$) и совместному использованию обеих лап на 40,9% ($p<0,001$) у нелеченых крыс в сравнении с ложнооперированными животными. В то же время наблюдалось компенсаторное увеличение касаний стенок цилиндра ипсилатеральной (левой) лапой особой группы негативного контроля на 60,3% ($p<0,001$) относительно ЛО крыс.

Введение препаратов сравнения кавинтона и циннаризина в равной мере способствовало уменьшению возникшей асимметрии, что проявлялось в увеличении касаний лапой, контралатеральной повреждению на 25,4% ($p<0,05$) и 24,6% ($p<0,05$) и уменьшении использования ипсилатеральной конечности на 18% ($p<0,01$) и 18,6% ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с крысами, не получавшими фармакологическую поддержку.

Введение экспериментального соединения PIR-9 также способствовало значимому увеличению использования правой конечности и уменьшению нагрузки на левую как в сравнении с нелечеными крысами, так и относительно препаратов сравнения кавинтона и циннаризина. Так, использование левой лапы на фоне получения соединения PIR-9 уменьшилось на 23% ($p<0,001$) и 22,4% ($p<0,001$) относительно групп крыс, которым вводили кавинтон и циннаризин, соответственно.

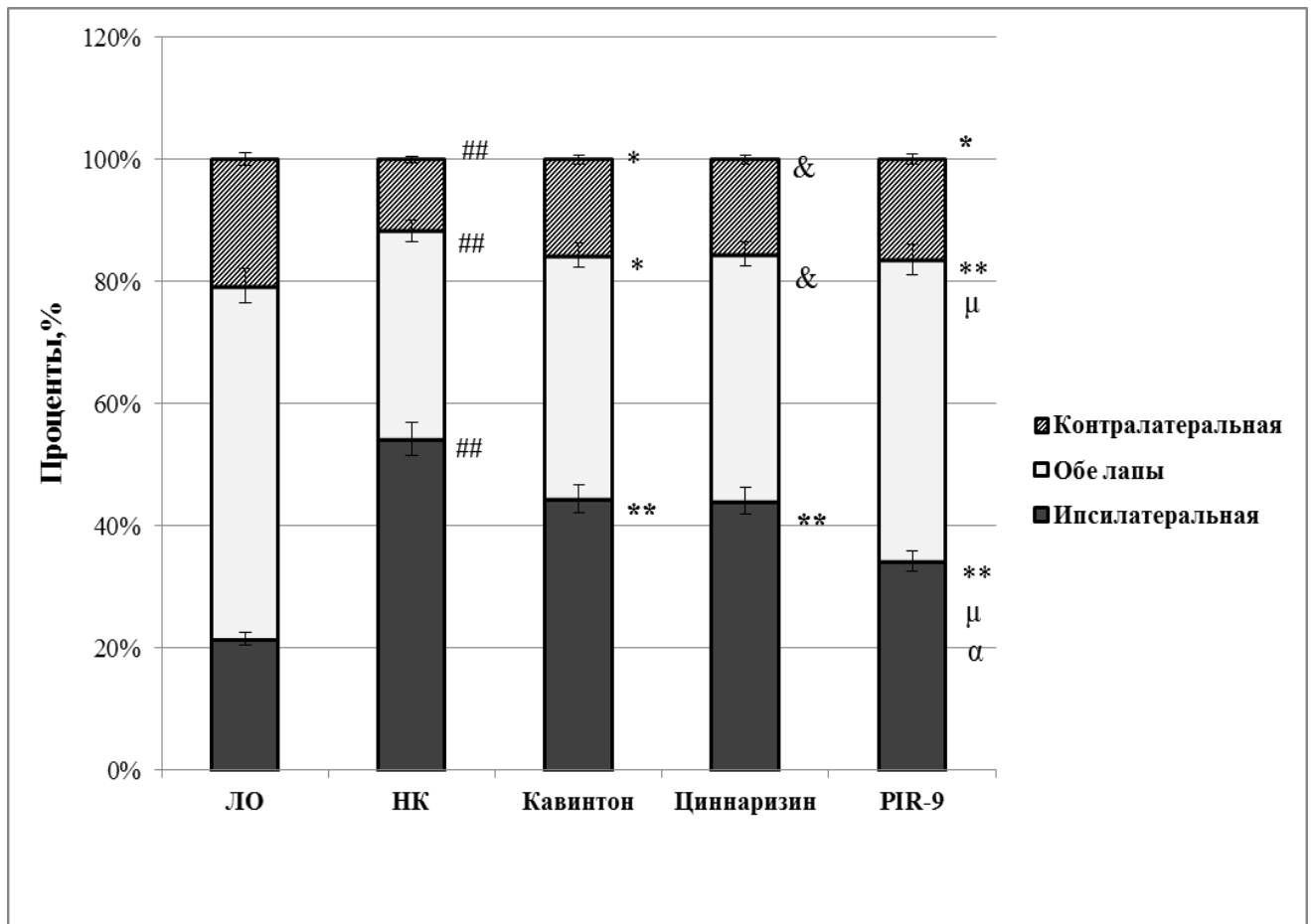


Рисунок 14. Влияние на асимметрию передних лап в тесте «Цилиндр» на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: ## - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); & - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), * - ($p < 0,01$), ** - ($p < 0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

На рисунке 15 представлен расчет использования поврежденной конечности по специальной формуле (см. главу «Материалы и методы»), из которого видно, что у нелеченых особей с фокальной церебральной ишемией частота касаний стенок цилиндра правой лапой на 41,9% ($p < 0,001$) значимо снизилась относительно ЛО группы крыс. Внутривенное введение кавинтона и циннаризина достоверно увеличило частоту использования поврежденной

конечности до 35,66% и 35,74% соответственно. На фоне получения крысами исследуемого вещества PIR-9 также наблюдалось увеличение касаний цилиндра поврежденной конечностью значимое не только относительно крыс, не подверженных терапии, но и относительно обоих препаратов сравнения.

Таким образом, можно сделать вывод, что расчет показателей, полученных в тесте «Цилиндр» различными способами доказывает уменьшение асимметрии на фоне получения субстанции PIR-9 и референтных препаратов (кавинтон, циннаризин).

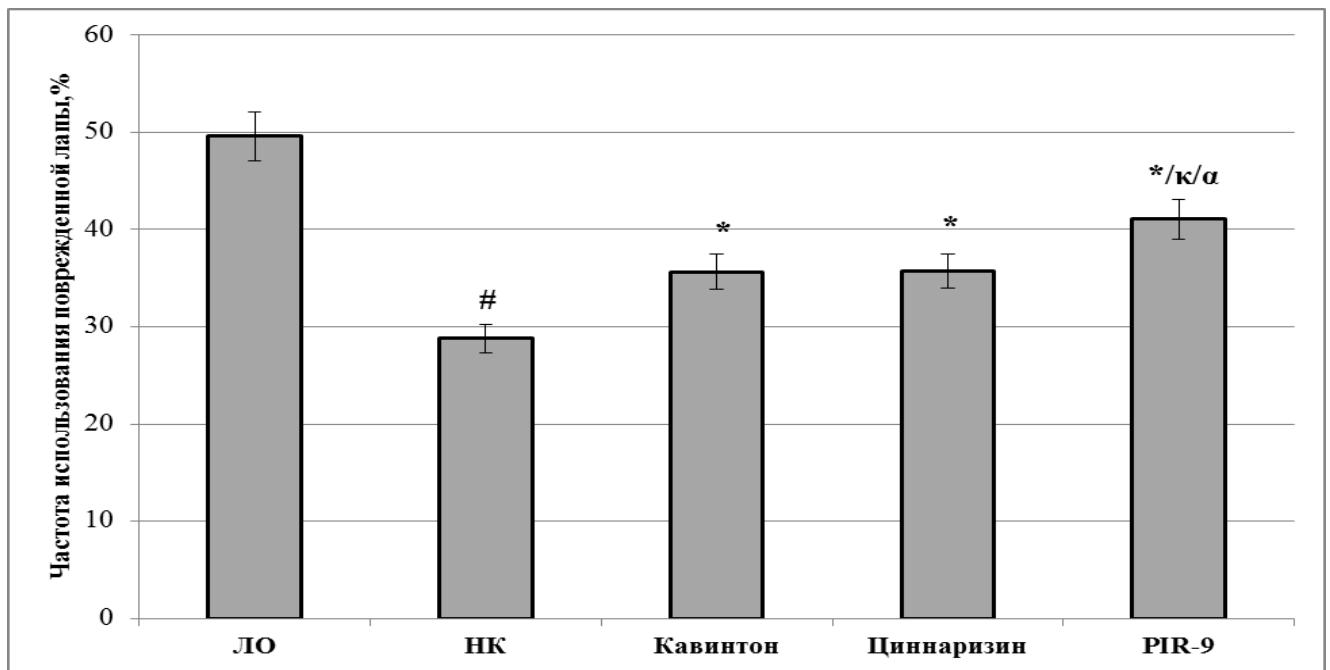


Рисунок 15. Частота использования поврежденной конечности в тесте «Цилиндр» на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); к- статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,01$); α - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин - ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

4.3. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на биоэлектрический потенциал на фоне фокальной ишемии головного мозга

В условиях окклюзии средней мозговой артерии у крыс группы негативного контроля наблюдалось изменение биоэлектрической активности, что проявлялось в повышении амплитуды дельта- (Δ -) и тета- ритмов (θ -), а также в снижении средней амплитуды альфа- (α -) и высокочастотных бета-ритмов (β -) (табл. 8; рис. 16(б)) относительно ложнооперированных животных. У нелеченых особей отмечены наиболее значимые отклонения биоэлектрического потенциала в лобной и теменной областях левого полушария головного мозга, что проявлялось в росте средней амплитуды Δ -ритма в отведении FP1-A1 и C3-A1 в 3,54 ($p < 0,001$) и 5,41 ($p < 0,001$) раз, а также в повышении амплитуды θ -ритма в 1,89 ($p < 0,001$) и 2,94 ($p < 0,001$) раз соответственно (в сравнении с группой ЛО крыс). Кроме того, межполушарная асимметрия дельта- и тета-ритмов группы крыс НК составила 75,37% и 47,16%. Амплитуда альфа-ритма нелеченых крыс уменьшилась относительно ложнооперированных особей на 49% ($p < 0,001$) в отведении FP1-A1 и на 63,7% ($p < 0,001$) в C3-A1, межполушарная асимметрия достигла 57,8%. Высокочастотный β -ритм группы НК снизился в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 55,5% ($p < 0,001$) и 62,3% ($p < 0,001$) в сравнении с ЛО животными, асимметрия бета-ритма между полушариями составила 47,3%. Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях ЭЭГ на фоне локальной ишемии головного мозга, что согласуется с данными литературы [192, 199].

Как видно из таблицы 9 на фоне терапии кавинтоном наблюдалось снижение дельта- и тета-ритмов в большей степени в отведениях FP1-A1 и C3-A1. Так средняя мощность Δ -ритма снизилось на 41,4% ($p < 0,001$) и 57,6% ($p < 0,001$) в отведениях FP1-A1 и C3-A1 соответственно (относительно НК группы крыс). Амплитуда θ -ритма при применении кавинтона была ниже показателя крыс, не получавших фармакологическую поддержку, в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 25,6% ($p < 0,05$) и 38% ($p < 0,001$). Также, внутрибрюшинное введение кавинтона способствовало росту альфа- и высокочастотного бета-ритмов. Отмечено повышение альфа-ритма у животных, получавших кавинтон на 62,1% ($p < 0,05$)

(отведение FP1-A1) и 85,7% ($p<0,05$) (отведение C3-A1) по отношению к нелеченым особям. Мощность бета ВЧ-ритма животных, которым вводили кавинтон, была выше значения крыс группы негативного контроля в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 52,4% ($p<0,01$) и 56,1% ($p<0,05$) соответственно.

Внутрибрюшинное введение циннаризина способствовало снижению Δ - и θ - в отведениях FP1-A1 и C3-A1, росту α -ритма (отведение C3-A1), при этом статистически достоверных отличий по показателям высокочастотного β -ритма по отношению к нелеченым животным не отмечалось (табл. 8; рис 16(г)). Мощность дельта-ритма у крыс, получавших циннаризин, снизилась на 29,3% ($p<0,001$) (FP1-A1) и 51,6% ($p<0,001$) (C3-A1) в сравнении с животными группы НК. Тета-ритм у особей группы циннаризина уменьшился на 23,1% ($p<0,05$) и 40,8% ($p<0,001$) в отведениях FP1-A1 и C3-A1 соответственно (в сравнении с нелечеными крысами). Средняя амплитуда α -ритма в крыс, которым вводили циннаризин, в отведении C3-A1 повысилась на 84,4% ($p<0,05$) относительно НК группы крыс.

На рисунке 16(д) представлено картирование спектров ЭЭГ группы крыс, получавших внутрибрюшинно экспериментальное соединение PIR-9. Как видно из таблицы 8 введение субстанции PIR-9 способствовало снижению средней амплитуды Δ -ритма на 40,8% ($p<0,001$) (отведение FP1-A1) и 57,9% ($p<0,001$) (отведение C3-A1) относительно особей без фармакотерапии. Также у данной группы животных наблюдалось уменьшение мощности θ -ритма в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 26,8% ($p<0,05$) и 39,9% ($p<0,001$) соответственно (по сравнению с НК группой). Амплитуда альфа-ритма, у крыс, получавших PIR-9, напротив, имела тенденцию к увеличению на 66% ($p<0,05$) в отведении FP1-A1 и на 88,3% ($p<0,05$) в отведении C3-A1 по сравнению с крысами, лишенными фармакотерапии. Мощность высокочастотного β -ритма у группы животных, которым вводили PIR-9, выросла по сравнению с крысами негативного контроля на 42,3% ($p<0,05$) (FP1-A1) и 47,8% ($p<0,05$) (C3-A1).

Таблица 9

Изменение параметров ЭЭГ у крыс на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

ЛО					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	1,94±0,07	3,13±0,08	2,02±0,12	2,17±0,14	4,25±0,20
FP2-A2	1,98±0,09	3,09±0,12	2,07±0,12	2,22±0,15	3,97±0,36
C3-A1	1,96±0,13	3,07±0,32	2,12±0,10	2,16±0,19	4,16±0,29
C4-A2	1,92±0,13	3,08±0,13	1,99±0,12	2,37±0,19	4,02±0,37
НК					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	6,86±0,33##	5,93±0,48##	1,03±0,16##	2,15±0,18	1,89±0,15##
FP2-A2	2,26±0,19	3,32±0,30	2,13±0,30	2,06±0,15	3,30±0,47
C3-A1	10,60±0,49##	9,02±0,32##	0,77±0,07##	2,31±0,26	1,57±0,25##
C4-A2	2,04±0,16	4,58±0,63&	2,14±0,23	2,13±0,31	3,26±0,49
Кавинтон					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,02±0,12**	4,41±0,28Δ	1,67±0,24Δ	2,27±0,16	2,88±0,19*
FP2-A2	2,64±0,16	3,49±0,18	1,98±0,12	2,12±0,14	3,70±0,19
C3-A1	4,49±0,14**	5,59±0,43**	1,43±0,23Δ	2,23±0,10	2,45±0,20Δ
C4-A2	2,62±0,23	3,68±0,27	1,97±0,07	2,08±0,09	3,37±0,21
Циннаризин					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,85±0,24**	4,56±0,27Δ	1,45±0,16	2,15±0,09	2,22±0,10
FP2-A2	2,72±0,16	3,36±0,13	2,04±0,09	2,10±0,16	3,23±0,11
C3-A1	5,13±0,44**	5,34±0,22**	1,42±0,21Δ	2,02±0,13	2,17±0,11
C4-A2	2,74±0,18	3,48±0,17	2,06±0,09	2,24±0,14	3,41±0,29
PIR-9					
Отведение	Дельта ритм, мкВ ²	Тета ритм, мкВ ²	Альфа ритм, мкВ ²	Бета НЧ ритм, мкВ ²	Бета ВЧ ритм, мкВ ²
FP1-A1	4,06±0,13**	4,34±0,29Δ	1,71±0,21Δ	2,17±0,08	2,69±0,20Δ
FP2-A2	2,57±0,16	3,44±0,17	2,04±0,10	2,12±0,08	3,69±0,19
C3-A1	4,46±0,18**	5,42±0,37**	1,45±0,24Δ	2,04±0,13	2,32±0,21Δ
C4-A2	2,69±0,20	3,60±0,23	2,02±0,07	2,26±0,14	3,57±0,22

Примечание: & - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО (p<0,05), ## - (p<0,001); Δ - статистически достоверно относительно группы крыс НК (p<0,05); * - (p<0,01), ** - (p<0,001);

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

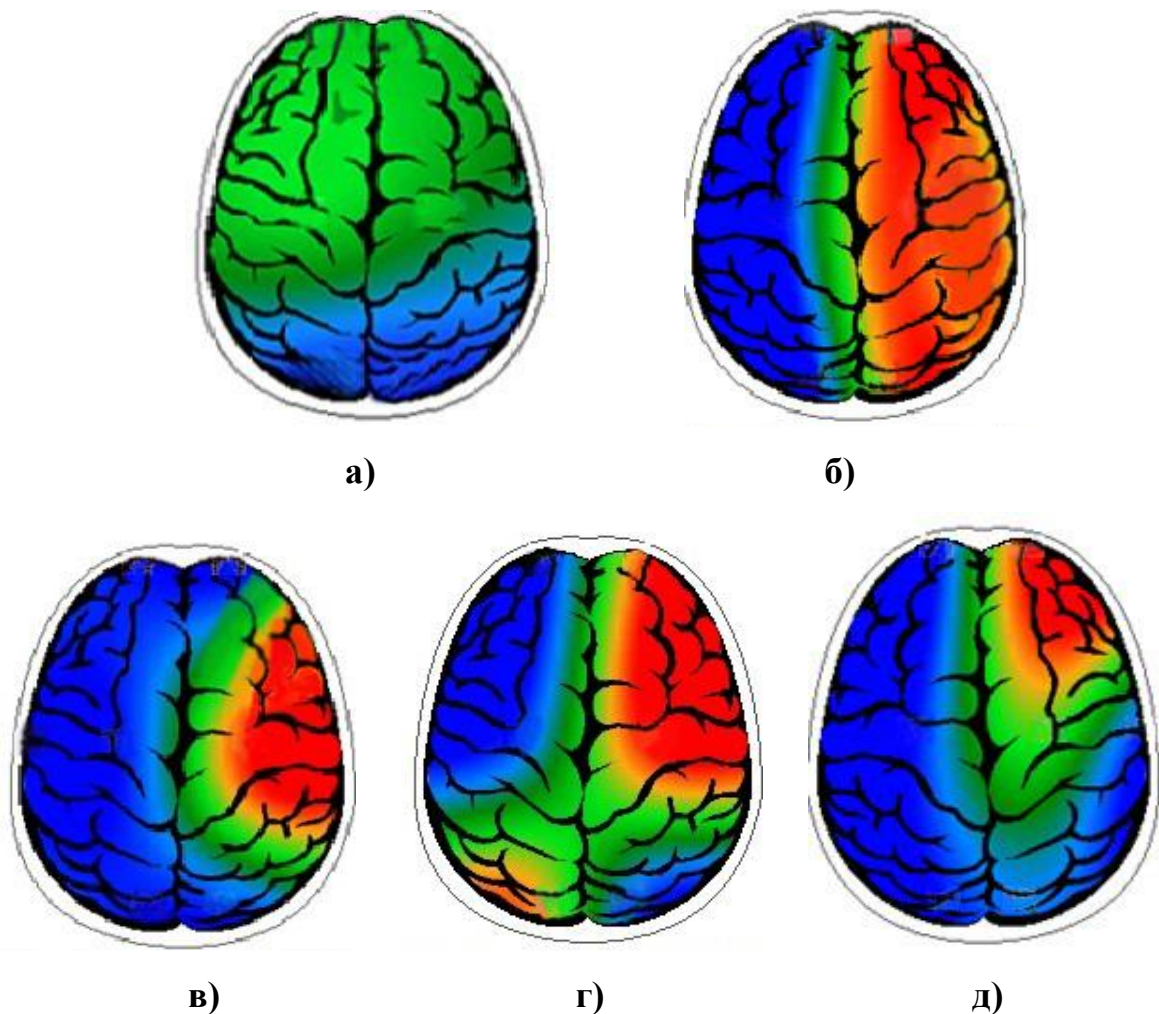


Рисунок 16. Картирование спектров ЭЭГ препаратов сравнения и соединения-лидера на фоне фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: а) группа ложнооперированных крыс; б) группа крыс негативного контроля; в) группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг); г) группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); д) группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг).

4.4. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на степень гидратации на фоне фокальной ишемии головного мозга

На рисунке 17 представлены показатели содержания воды в головном мозге крыс в постишемическом периоде. Оклюзия СМА способствует формированию отека головного мозга, как можно заметить по увеличению степени гидратации у нелеченых крыс на 10,64% ($p < 0,05$) в сравнении с ложнооперированными животными ($72,46 \pm 0,45\%$). У группы крыс, которые получали кавинтон, количество содержания воды уменьшилось на 7% ($p < 0,05$) относительно особей негативного контроля. Содержание воды в мозговой ткани животных, которым

вводили внутривенно циннаризин, снизилось на 9,45% ($p<0,05$) по сравнению с крысами, не получавшими фармакологической поддержки.

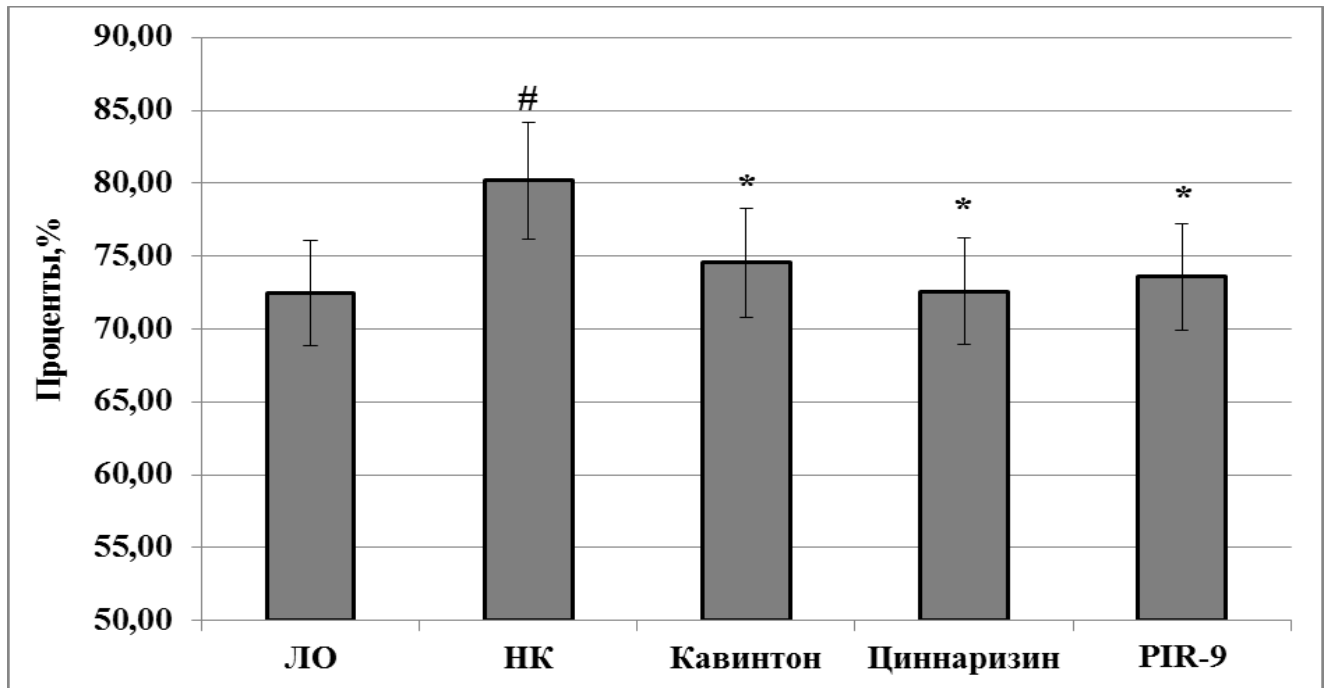


Рисунок 17. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на степень гидратации головного мозга в условиях фокальной ишемии

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$)/

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Терапия соединением PIR-9 способствовала достоверному снижению отека головного мозга в сравнении с крысами негативного контроля на 8,23% ($p<0,05$). Однако нельзя не отметить, что значимых отличий между особями групп, получавших PIR-9 и референтные препараты, не наблюдалось.

4.5. Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на размер зоны некроза на фоне фокальной ишемии головного мозга

Фокальная ишемия головного мозга привела к некротизации $25,92 \pm 0,58\%$ мозговой ткани у группы животных негативного контроля (рис. 18). На фоне приема кавинтона зона некроза составила $14,5 \pm 0,54\%$, что на 44,06% ($p<0,001$) ниже значения группы нелеченых крыс. Процент некротизированной мозговой

ткани при терапии циннаризином на 34,84% ($p<0,001$) был меньше показателя группы крыс НК, но на 16,48% ($p<0,01$) выше значения животных, которые получали кавинтон.

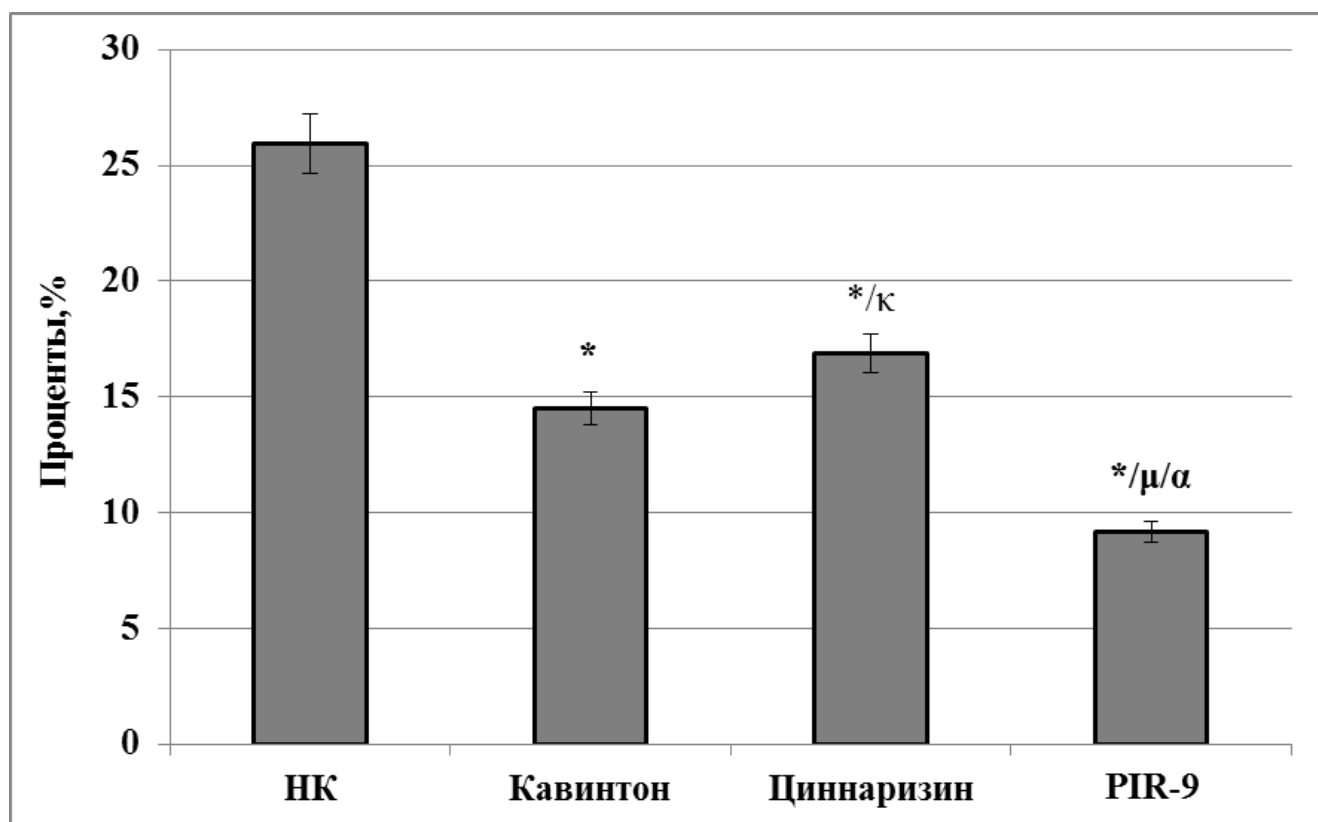


Рисунок 18. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на зону некроза головного мозга в условиях фокальной ишемии

Обозначение: *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,01$), μ – ($p<0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Наименьший размер зоны некроза наблюдался на фоне терапии экспериментальной субстанцией под лабораторным шифром PIR-9 и составил $9,17\pm 0,47\%$ (на 64,62% ниже показателя группы крыс НК ($p<0,001$)). Данное значение было также достоверно ниже аналогичного крыс групп обоих препаратов сравнения: кавинтона – на 36,76% ($p<0,01$) и циннаризина – на 45,71% ($p<0,001$).

4.6. Патоморфоз ткани головного мозга при экспериментальной фокальной ишемии на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения

Гистологическое исследование ткани мозга крыс на фоне его фокальной ишемии.

Гистологические исследования выполнены на кафедре морфологии ПМФИ-филиала ВолгГМУ МЗ РФ под руководством профессора Калашниковой С.А., за что выражаем ей и коллективу кафедры искреннюю благодарность. Гистологическое строение ткани головного мозга ложнооперированных крыс характеризовалось наличием мультиполярных нейронов и клеток макро- и микроглии (рис. 19 а).

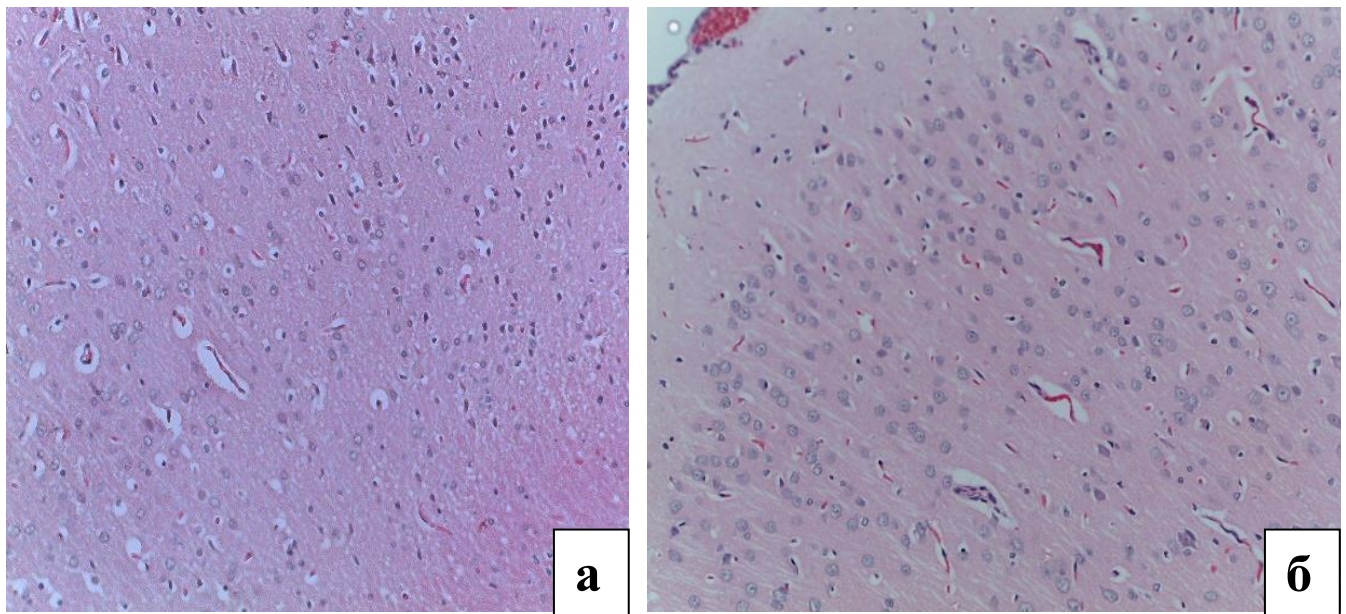


Рисунок 19. Ткань головного мозга группы ложнооперированных крыс

Обозначение: а) Кора головного мозга ложнооперированной крысы. Гистологическое строение соответствует норме, наличие мультиполярных нейронов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200. б) Клетки макроглии были представлены астроцитами и олигодендроцитами типичного строения. Клетки микроглии были небольших размеров и имели округлую форму. Сосуды головного мозга были умеренного кровенаполнения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 20x100.

В коре головного мозга наблюдались хорошо дифференцированные нейроны, которые соответствовали слоям коры. Наиболее отчетливо просматривались большие и малые пирамидные нейроны. Остальные слои были представлены клетками звездчатой, вретенообразной, паукообразной формы. Клетки макроглии были представлены астроцитами и олигодендроцитами типичного строения. Клетки микроглии были небольших размеров и имели

округлую форму. Сосуды головного мозга были умеренного кровенаполнения (рис. 19 б).

При гистологическом исследовании ткани мозга крыс группы негативного контроля определялся очаг энцефалолизиса без четких границ с наличием диффузной полиморфно-ядерной лейкоцитарной инфильтрации. По периферии определялся выраженный сетчатый отек и выраженная глиальная реакция. Отмечалась деструкция нейронов с явлениями кариолизиса образованием клеточ-теней. Сосуды микроциркуляторного русла были умеренного кровенаполнения (рис.20-а).

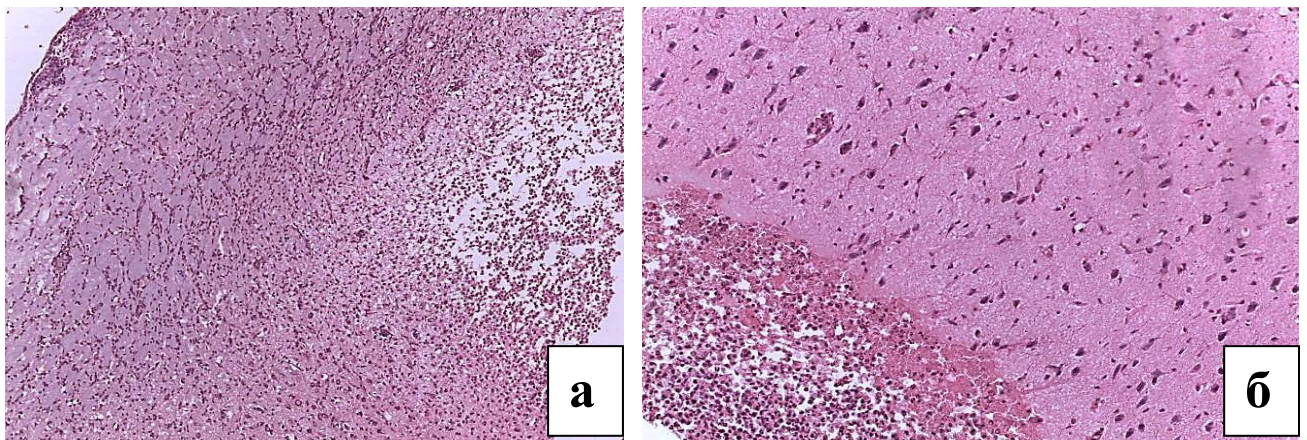


Рисунок 20. Ткань головного мозга крыс группы НК в условиях фокальной ишемии

Обозначение: а) Деструкция вещества мозга крыс с диффузной лейкоцитарной инфильтрацией. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х100. б) Мелкоочаговые кровоизлияния и выраженная лейкоцитарная инфильтрация оболочек головного мозга крыс группы негативного контроля. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х200.

Также отмечалось вовлечение в патологический процесс мозговых оболочек, где определялось выраженное полнокровие сосудов паутинной оболочки, диффузная лейкоцитарная инфильтрация. Кроме того, наблюдались мелкоочаговые кровоизлияния, что свидетельствовало о геморрагической трансформации (рис.20-б).

При использовании препарата кавинтон, зона некроза характеризовалась достаточно четкими границами, где определялась зона деструкции нервной ткани с наличием гомогенных бесструктурных масс в центре, пропитанными

нейтрофилами, которые формировали вал по периферии зоны энцефалолизиса (рис.21-а). По периферии отмечался спонгиозный отек ткани с выраженной глиальной реакцией, что проявлялось в скоплении клеток глии вокруг погибших нейронов, выполняющих фагоцитарную функцию (нейрофаги). Погибшие нейроны были на различных стадиях клеточной гибели как с явлениями кариорексиса, кариолизиса, набуханием перикариона, а также образованием клеток-теней (рис.22-б). Сосуды микроциркуляторного русла были несколько расширены, просвет которых был пустым. Отмечались единичные капилляры умеренного кровенаполнения.

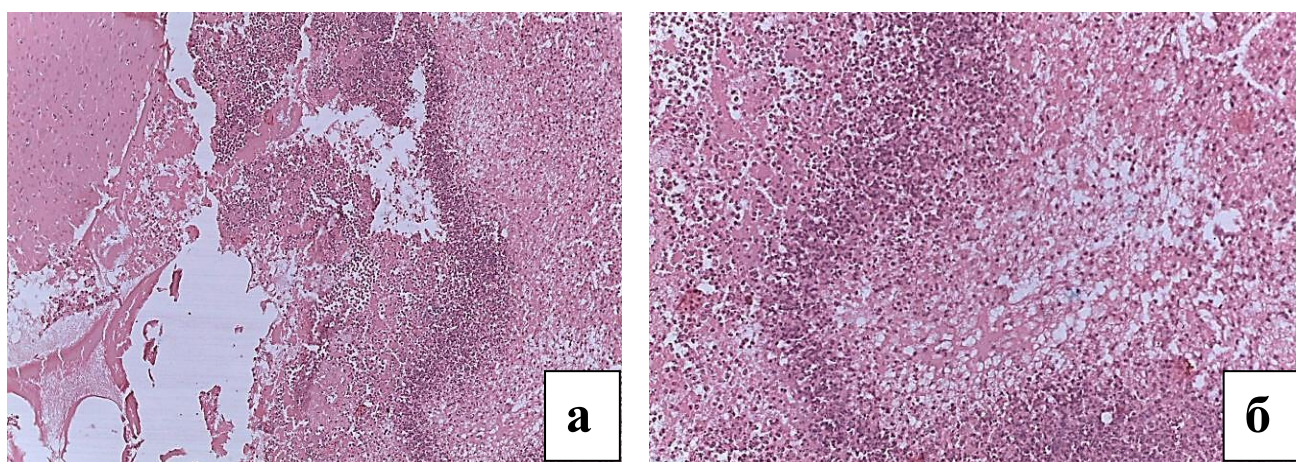


Рисунок 21. Ткань головного мозга крыс, получавших кавинтон в условиях фокальной ишемии

Обозначение: а) Отграниченный очаг деструкции нервной ткани с выраженной демаркационной зоной головного мозга крыс. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х100. б) Спонгиозный отек, перифокальная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х200.

При гистологическом исследовании ткани мозга крыс на фоне введения референтного препарата циннаризин, было установлено, что зона энцефалолизиса также была достаточно четко отграничена (рис. 22-а).

Невозможно не отметить, что, несмотря на четкую границу между участком зоны инфаркта и относительно сохранной тканью головного мозга инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами была менее выражена и не затрагивала окружающие ткани. В зоне некроза отмечались единичные гомогенные массы, пропитанные экссудатом, содержащим нейтрофилы. Также по периферии был

незначительный спонгиозный отек, который просматривался в виде узкой зоны, окружающей зону нейтрофильной инфильтрации. В зоне отечной ткани отмечались сосуды с несколько отечной стенкой и умеренным кровенаполнением. Глиальная реакция была незначительной, где группы клеток окружали погибшие нейроны (рис. 22-б).

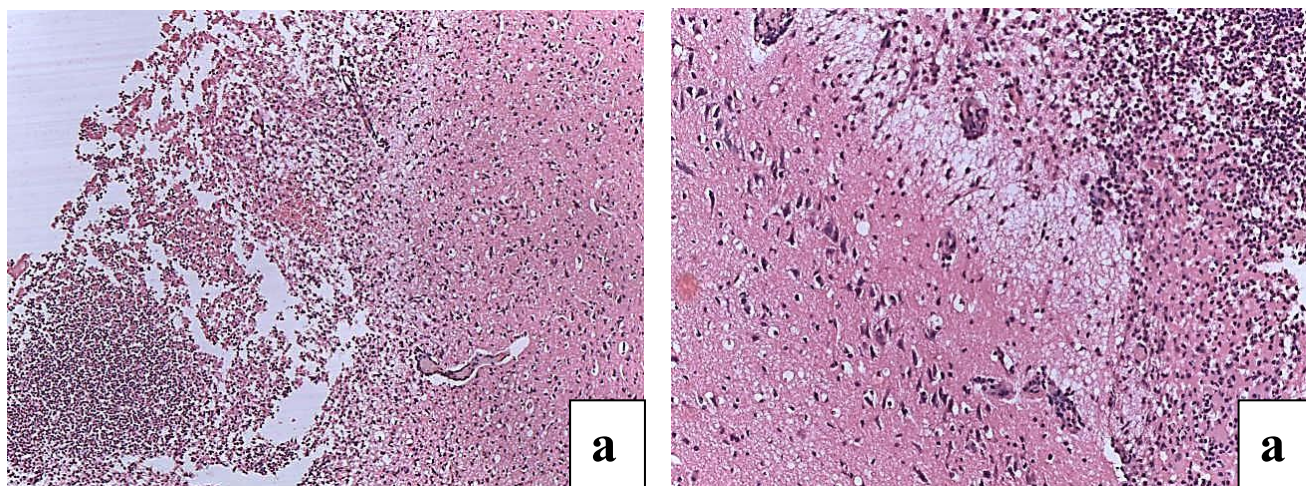


Рисунок 22. Ткань головного мозга крыс, получавших циннаризин в условиях фокальной ишемии

Обозначение: а) Зона энцефалолизиса. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х100. б) Незначительный спонгиозный отек на границе зоны инфаркта головного мозга крыс с инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х200.

При гистологическом исследовании ткани мозга животных экспериментальной группы, получавших субстанцию PIR-9, было установлено, что зона инфаркта была также достаточно четко отграничена от окружающих тканей за счет зоны спонгиозного отека и лейкоцитарной инфильтрации (рис. 23-а). Морфологически зона ишемического инфаркта характеризовалась наличием воспалительного экссудата, который пропитывал некротические массы и по составу был представлен полиморфно-ядерными лейкоцитами. По периферии просматривалась зона спонгиозного отека, где оптически «пустые» пространства были небольшого размера и незначительной степени выраженности (рис. 23-б).

По периферии отмечалось присутствие клеток-теней, что свидетельствовало о гибели нейронов, а также умеренная глиальная реакция, которая проявлялась в виде скопления клеток глии вокруг погибших нейронов. Сосуды микроциркуляторного русла были умеренного кровенаполнения, где отмечалось

краевое стояние нейтрофилов. Следует отметить, что в зоне повреждения сосудистые оболочки были полнокровны с умеренной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 23-в).

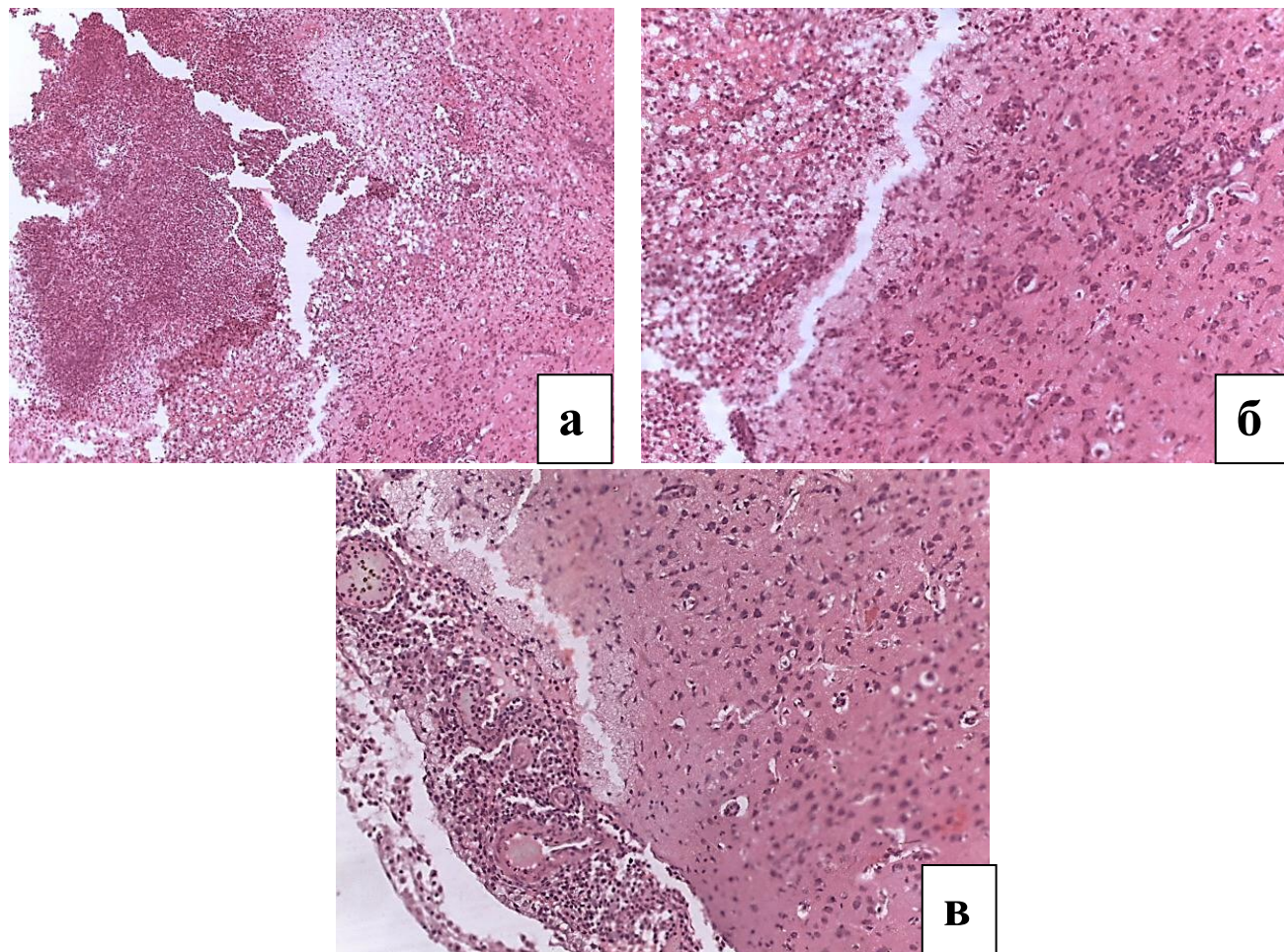


Рисунок 23. Ткань головного мозга крыс, получавших исследуемое соединение PIR-9 в условиях фокальной ишемии

Обозначение: а) Ишемический инфаркт головного мозга крыс отграниченный от окружающих тканей. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х100. б) Граница спонгиозного отека ткани мозга и периферических тканей вокруг зоны инфаркта. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х200. в) Нейтрофильная инфильтрация и полнокровие оболочек головного мозга крыс. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.х200.

Таким образом, при сравнительном анализе гистологических изменений оценивалась выраженность инфильтрации полиморфно-ядерными лейкоцитами, распространенность спонгиозного отека, реакция сосудистого русла, наличие мелкоочаговых кровоизлияний, степень глиальной реакции, а также

вовлеченность сосудистых оболочек. По результатам исследования установлено, что соединением-лидером для коррекции данного патологического процесса являлось PIR-9, при применении которого морфологические изменения в головном мозге были сопоставимы с таковыми групп крыс, получавших препараты сравнения кавинтон и циннаризин, и характеризовались умеренным отеком, четкой демаркационной зоной и сохранностью нейронов по периферии очага повреждения.

Морфометрический анализ ткани мозга крыс на фоне его фокальной ишемии.

Результаты морфометрического анализа показателей тканей головного мозга у крыс при ишемическом инфаркте головного мозга под действием исследуемого соединения-лидера и препаратов сравнения представлены в табл. 10.

Установлено, что степень выраженности спонгиозного отека, оцениваемые путем определения объемной доли оптически пустых пространств была достоверно ниже, чем в группе негативного контроля при применении экспериментального соединения и препаратов сравнения ($p < 0,05$), наиболее эффективными из которых являлись циннаризин и PIR-9.

Количество нейронов в поле зрения в периферической зоне было достоверно выше, чем в группе негативного контроля на фоне применения всех препаратов, при этом наиболее эффективным проявил себя PIR-9 ($p < 0,05$). При этом обращал на себя факт наличия измененных нейронов, наибольшее количество которых обнаружено в группе негативного контроля, в то время как при применении соединения PIR-9 $1,1 \pm 0,1\%$ ($p < 0,05$).

Микроглиальная реакция, оцениваемая по количеству микроглиоцитов в поле зрения, была максимальной при применении кавинтона ($36,0 \pm 1,8\%$) и PIR-9 ($31,0 \pm 1,1\%$) и достоверно отличилась от группы негативного контроля ($p < 0,05$). Количество нейтрофогов, являющихся резидентными представителями макрофагального звена в головном мозге было наибольшим в группе негативного

контроля, что представляется нам вполне логичным и напрямую коррелирует с количеством измененных нейронов.

Таблица 10

Морфометрические показатели тканей головного мозга на фоне приема соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга ($M \pm m$)

Показатели	ЛО	НК	Кавинтон	Циннаризин	PIR-9
Толщина эндотелия в периферической зоне, мкм	2,2±0,1	3,1±0,6	2,6±0,4	3,2±0,5	2,5±0,3
Площадь ядер эндотелиоцитов, мкм ²	7,1±0,2	10,1±0,2	8,9±0,9	8,4±1,5	7,6±0,5
Степень выраженности спонгиозного отека (ОД оптически пустых пространств,%)	0,3±0,1	57,3±2,8#	12,1±0,6*	7,4±0,4*	18,5±0,9*
Количество нейронов в п/зр в периферической зоне ($N_{\text{нейр}}$), %	29,1±1,9	4,1±0,3#	10,6±0,5*	9,1±0,4*	23,3±1,2*
Число патологически измененных нейронов ($N_{\text{п}}$) в п/зр, %	0,0±0,0	5,5±1,1#	2,5±0,9	2,1±0,9	1,1±0,1*
Количество микроглиоцитов клеток в п/зр ($N_{\text{гл}}$), %	48,8±3,9	21,8±1,2#	36,0±1,8*	32,2±1,5*	31,0±1,1*
Нейронофаги, %	0,0±0,0	33,5±0,7#	13,4±0,7*	20,5±0,9*	11,6±0,5*
Клетки сателлиты, %	22,1±1,9	35,1±1,3#	37,5±2,1	36,1±1,5	33,0±1,7
Демаркационная зона, мкм	0,0±0,0	129,3±25,7#	95,6±35,7	75,6±9,8*	49,5±5,8*

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,05$), * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг).

Одним из наиболее значимых, на наш взгляд, показателей является размер демаркационной зоны, отграничивающий патологический очаг ишемического некроза от здоровой ткани головного мозга, имеющий минимальный размер при

применении соединения PIR-9 ($49,5 \pm 5,8$ мкм) соответственно ($p < 0,05$). Более размытой и широкой была демаркационная зона при применении циннаризина, при использовании кавинтона данный показатель не имел достоверных различий, по сравнению с негативным контролем ($p > 0,05$).

Количество клеток-сателлитов, толщина эндотелия в периферической зоне и площадь ядер эндотелиоцитов не имела достоверных отличий при применении всех исследуемых препаратов ($p > 0,05$).

Таким образом, результаты морфометрического анализа совпадают с гистологическим исследованием и дают возможность утверждать, что эффективность применяемых при экспериментальном ишемическом инфаркте головного мозга препаратов увеличивается в ряду: циннаризин – кавинтон – PIR-9.

Заключение

Анализ полученных данных позволил установить, что фокальная церебральная ишемия, вызванная путем коагуляции левой средней мозговой артерии, приводит к ухудшению неврологического статуса, моторики, координации и проприорецепции животных, не получавших фармакологическую поддержку. Кроме того цереброваскулярное поражение приводит к нарушению биоэлектрической активности головного мозга, проявляющееся в увеличении амплитуды дельта - (отведение FP1-A1 – в 3,54 ($p < 0,05$), отведение C3-A1 – в 5,41 ($p < 0,05$)) и тета- ритмов (отведение FP1-A1 – 1,89 ($p < 0,05$), отведение C3-A1 – в 2,94 ($p < 0,05$)), а также уменьшении мощности альфа- (отведение FP1-A1 – на 49% ($p < 0,05$), отведение C3-A1 – на 63,7% ($p < 0,05$)) и высокочастотных бета-ритмов (отведение FP1-A1 – на 55,5% ($p < 0,05$), отведение C3-A1 – 62,3% ($p < 0,05$)) у группы животных негативного контроля, относительно ложнооперированных крыс. Помимо координационных и ЭЭГ-нарушений у группы крыс НК наблюдались выраженная гипергидратация и некротизация мозговой ткани, так уровень отека у нелеченых животных составил $72,46 \pm 0,45\%$, а зона некроза – $25,92 \pm 0,58\%$, что подтверждается гистологическими и морфометрическими данными и сопровождается большим количеством экспериментальных

исследований, проведенных ранее [106, 114, 117, 156, 171, 176, 206, 256, 268, 274, 279, 287].

Терапия препаратами сравнения кавинтоном и циннаризином способствовала уменьшению неврологического, сенсомоторного, асимметрического дефицита, восстановлению биоэлектрической активности нейронов головного мозга крыс. Введение референтного препарата кавинтон на 7% ($p < 0,001$) снижало уровень отека и на 44,06% ($p < 0,001$) – размер зоны некроза относительно животных, не подверженных фармакотерапии, что также подтверждается показателями морфометрического анализа. На фоне применения циннаризина степень гидратации уменьшалась на 9,45% ($p < 0,001$), а некротизации ткани головного мозга на 34,84% ($p < 0,001$). Кроме того невозможно не отметить, что при морфометрической оценке степени выраженности спонгиозного отека, у животных, получавших циннаризин, данный показатель оказался наименьшим, относительно нелеченых крыс. Полученные нами результаты подтверждаются литературными источниками [145, 225, 241, 269, 13, 17, 61, 62, 97].

Исследуемое соединение PIR-9 позволило частично скорректировать возникающий неврологический, сенсомоторный, асимметрический дефицит животных, по эффекту сопоставимо с препаратами сравнения, а в некоторых случаях и превосходя их. Соединение PIR-9 и способствовало восстановлению электрической активности мозга, о чем свидетельствуют достоверное снижение дельта- и тета-ритмов в лобной и теменной областях левого полушария головного мозга в сравнении с животными без фармакотерапии (Δ -ритм- на 40,8% ($p < 0,001$) (отведение FP1-A1) и 57,9% ($p < 0,001$) (отведение C3-A1); θ -ритм - в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 26,8% ($p < 0,05$) и 39,9% ($p < 0,001$)), а также повышение средней амплитуды альфа- и высокочастотных бета-ритмов (α -ритма- на 66% ($p < 0,05$) и 88,3% ($p < 0,05$) в отведении FP1-A1 и C3-A1 соответственно; высокочастотный β -ритм - на 42,3% ($p < 0,05$) (FP1-A1) и 47,8% ($p < 0,05$) (C3-A1)), что сопоставимо с полученными показателями групп крыс, которым вводили препараты сравнения кавинтон и циннаризин. Исследуемая субстанция PIR-9 оказала значительное

влияние на уменьшение степени отека и размера зоны некроза ткани мозга, а также гистологические и морфометрические показатели. Стоит отметить, что на фоне применения экспериментального вещества PIR-9, наблюдалось наиболее сильное уменьшение содержания воды (на 8,23% ($p < 0,001$)) и некротизации мозговой ткани (на 64,62% ($p < 0,001$)) в сравнении с крысами, не получавшими фармакологическую поддержку.

Таким образом, суммируя все полученные экспериментальные данные, можно сделать вывод, что выбранное нами соединение-лидер PIR-9 проявляет выраженное церебропротекторное действие на фоне экспериментально смоделированной церебральной фокальной ишемии, по своему действию не уступающее препаратам сравнения кавинтону и циннаризину.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ И ВАЗОДИЛАТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ НА ФОНЕ ПРИЕМА СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Следующая экспериментальная глава направлена на оценку влияния соединения-лидера PIR-9 на изменение вазодилатирующей и антитромботической функции сосудистого эндотелия, играющих одну из ключевых ролей при повреждениях ишемического характера [33, 68, 99]. Экспериментальной моделью выступала фокальная церебральная ишемия, воспроизводимая путем коагуляции левой средней мозговой артерии.

5.1 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на антитромботический потенциал сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга

В развитии нарушений мозгового кровообращения одну из ключевых ролей занимает возникающая дисфункция сосудистого эндотелия. При срыве механизмов эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса наблюдается смещение равновесия в системах вазоконстрикция/вазодилатация и агрегация/проагрегация в сторону вазоконстрикции и роста тромбогенного потенциала, что, несомненно, усугубляет течение повреждений церебральной гемодинамики [15, 33]. Вследствие этого, данный этап исследований построен на выявлении потенциального эндотелиотропного действия соединения-лидера при ишемии головного мозга, путем влияния их на звенья первичного и вторичного гемостаза, а также вазодилатирующую способность эндотелия сосудов.

5.1.1 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на агрегационную способность тромбоцитов в условиях фокальной ишемии головного мозга

В таблице 11 представлены результаты анализа количества тромбоцитов, полученные с помощью гематологического анализатора. Как можно понять из данной таблицы уровень тромбоцитов во всех исследуемых группах

статистически достоверно не отличался между собой, что говорит об отсутствии влияния фокальной церебральной ишемии на процесс образования тромбоцитов.

Таблица 11

Содержание тромбоцитов в крови на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	ЛО	НК	Кавинтон	Сулодексид	PIR-9
PLT*10 ⁹ /л	434,83±15,77	441,83±17,08	436,5±17,31	430,17±13,73	443,83±14,4

Примечание: PLT – количество тромбоцитов; ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, n=6); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

Анализ агрегационной активности тромбоцитов крыс проводился посредством изучения влияния исследуемых соединений на показатели первичного звена сосудисто-тромбоцитарного гемостаза – степени и скорости агрегации тромбоцитов при введении проагреганта АДФ.

У ЛО группы крыс степень агрегации составила $1,5 \pm 0,08$ усл.ед, а скорость $1,35 \pm 0,07$ усл.ед. (рис. 24). Коагуляция левой средней мозговой артерии способствовала увеличению степени и скорости агрегации нелеченых особей на 138,67% ($p < 0,001$) и 237,78% ($p < 0,001$) относительно ложнооперированных животных. Таким образом, фокальная ишемия, вызванная коагуляцией СМА, усиливает АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов [24]. На фоне применения препарата сравнения кавинтон отмечено достоверно снижение изучаемых показателей на 40,5% (степень агрегации) и 55,26% (скорость агрегации) в сравнении с группой крыс негативного контроля. Аналогичная тенденция наблюдалась и при введении второго препарата сравнения – сулодексида: степень агрегации понизилась на 49,72% ($p < 0,001$) в сравнении с группой крыс НК, а скорость – на 58,55% ($p < 0,001$). Также стоит отметить достоверное снижение скорости агрегации у группы крыс получавших сулодексид на 15,49% ($p < 0,01$) в отношении к животным, которым вводили кавинтон.

Наибольшее позитивное влияние на анализируемые показатели оказало экспериментально вещество PIR-9, на фоне его введения отмечено снижение степени и скорости агрегации на 56,7% ($p<0,001$) и 62,28% ($p<0,001$) соответственно в сравнении с крысами группы негативного контроля. При этом степень агрегации у животных, получавших PIR-9, была достоверно ниже относительно обоих препаратов сравнения: кавинтона – на 27,23% ($p<0,001$), сулодексида – на 13,89% ($p<0,01$). Также у данной группы отмечалось уменьшение скорости АДФ-индуцированной агрегации на 15,69% ($p<0,05$) в сравнении с группой крыс, которым вводили внутривенно кавинтон.

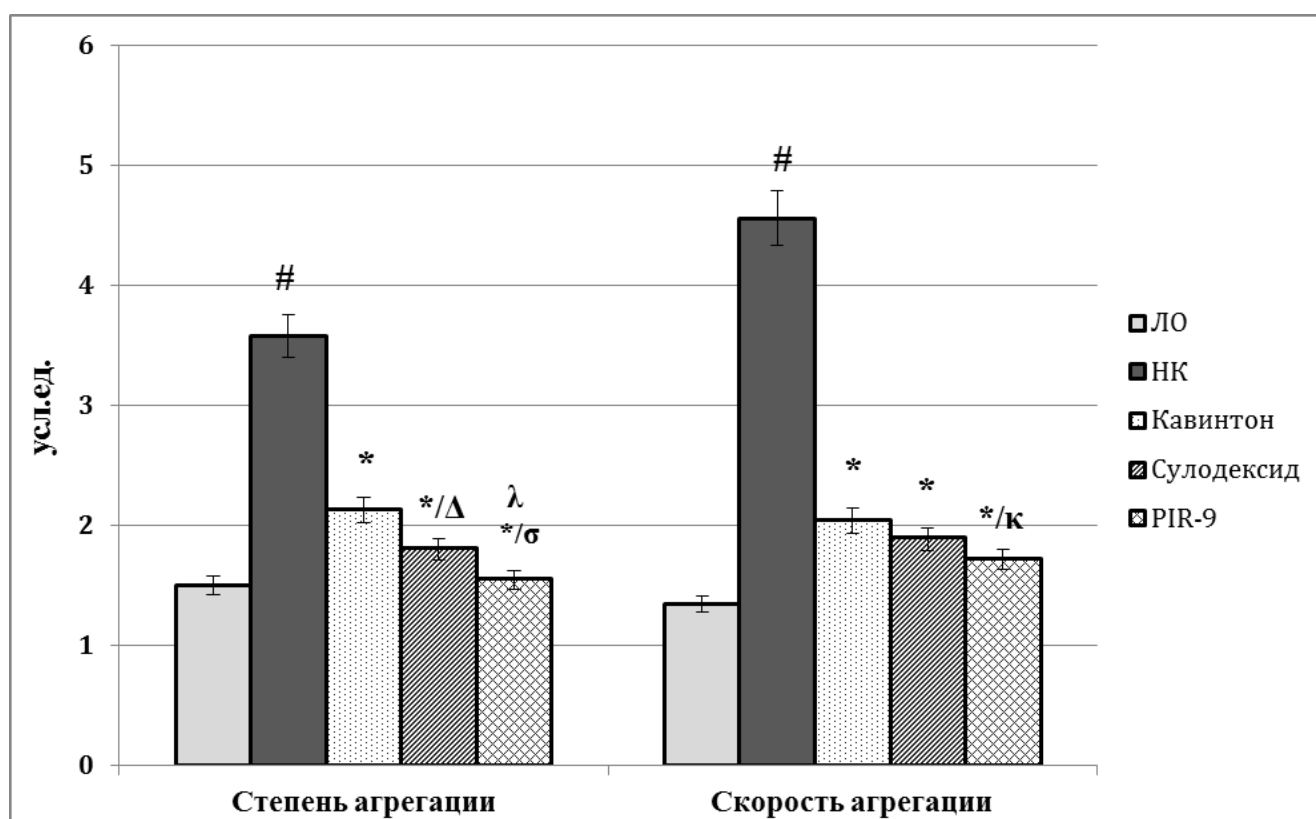


Рисунок 24. Влияние на агрегационную способность тромбоцитов на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); κ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), Δ - ($p<0,01$), σ - ($p<0,001$); λ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших сулодексид ($p<0,01$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

5.1.2 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на показатели коагуляционного гемостаза в условиях фокальной ишемии головного мозга

Вторичным звеном гемостаза является коагуляционный или плазменный, представляющий собой каскад последовательных реакций с вовлечением в них факторов свертывания и образованием в конечном итоге нерастворимого фибрина. Условно данный процесс можно разделить на три стадии: 1) внутренняя или внешняя активация протромбиназного комплекса, 2) образование тромбина из тромбиногена, 3) образование фибрина из фибриногена.

Изучение компонентов плазменного гемостаза производится с помощью активированного частичного тромбинового времени (АЧТВ), протромбинового (ПВ) и тромбинового (ТВ) времени, а также количества фибриногена. Перечисленные выше показатели позволяют оценить три основных механизма вторичного гемостаза.

Активированное частичное тромбопластиновое время характеризует эффективность эндогенного пути образования протромбиназы (факторы свертывания XII, XI, VIII), у группы ЛО крыс этот показатель составил $37,47 \pm 1,43$ секунд (табл. 12). Фокальная церебральная ишемия привела к укорочению периода АЧТВ на 64,72% ($p < 0,001$) у животных, не подверженных терапии, по отношению к ложнооперированным особям, что свидетельствует о повышении активности внутреннего пути свертывания крови. Терапия кавинтоном способствовала увеличению АЧТВ на 45,46% ($p < 0,001$), в то время как сулодексид увеличивал данный период на 153,18% ($p < 0,001$) в сравнении с крысами группы НК. При этом на фоне введения сулодексида отмечалось значимое повышение АЧТВ в отношении крыс, которым вводили кавинтон (на 74,05% ($p < 0,001$)). Экспериментальное соединение PIR-9 способствовало удлинению АЧТВ по сравнению с нелечеными крысами на 134,27% ($p < 0,001$). Невозможно не отметить, что при приеме данного исследуемого вещества PIR-9 активированное частичное тромбопластиновое время увеличивалось также относительно группы животных, получавших внутрибрюшинно препарат сравнения кавинтона 61,05% ($p < 0,001$).

Для оценки внешнего пути свертывания используется такой показатель как протромбиновое время. Как видно из таблицы 12 в условиях фокальной ишемии головного мозга, этот показатель у нелеченых крыс был равен $13,57 \pm 0,5$ секунд, что в свою очередь на 43,69% ($p < 0,001$) значимо отличалось от идентичного значения ложнооперированных особей ($24,1 \pm 0,74$ сек.), полученные результаты позволяют предположить активацию экзогенного пути коагуляционного гемостаза. Внутривентрикулярное введение кавинтона не способствовало увеличению протромбинового времени относительно крыс группы НК, тогда как на фоне применения сулодексида аналогичное значение на 63,38% ($p < 0,001$) и 51,12% ($p < 0,001$) было выше показателей групп крыс не подверженных терапии и получавших кавинтон, соответственно. При терапии исследуемой субстанцией PIR-9 ПВ увеличилось на 64,55% ($p < 0,001$), относительно крыс без фармакологической поддержки. Также достоверное удлинение периода ПВ при введении соединения PIR-9 отмечено и в сравнении с особями, которым вводили препарат сравнения кавинтон (на 52,22% ($p < 0,001$)).

Изучение третьей стадии плазменного гемостаза проводят с помощью определения тромбинового времени. Тест направлен на измерение скорости превращения фибриногена в фибрин, так как скорость образования фибринового сгустка зависит от количества фибриногена, измерение концентрации фибриногена является еще одним из важнейших показателей конечного свертывания крови. У ложнооперированных животных тромбиновое время составило $20,38 \pm 0,86$ секунд, а концентрация фибриногена – $1,65 \pm 0,1$ г/л (табл. 12). Изучаемые показатели группы крыс негативного контроля достоверно отличались от данных ЛО особей. Так, в условиях пережигания левой средней мозговой артерии ТВ сократилось на 67,86% ($p < 0,001$), количество фибриногена увеличилось на 254,55% ($p < 0,001$), что указывает на снижение антикоагулянтной активности крови и усиление процессов фибринообразования. Применение кавинтона и сулодексида привело к статистически достоверному увеличению как тромбинового времени в сравнении и животными группы НК на 77,86% ($p < 0,001$) и 118,63% ($p < 0,001$) соответственно, так и снижению уровня фибриногена на

32,14% ($p<0,001$) и 47,18% ($p<0,001$). В то же время данные группы крыс, которым вводили препарат сравнения сулодексид, значимо отличались от показателей животных группы кавинтона: ТВ – на 22,92% ($p<0,05$), фибриноген – на 22,17% ($p<0,001$). Введение соединения PIR-9 по эффекту сопоставимо со значениями группы сулодексида. Тромбиновое время при получении крысами PIR-9 превысило значение нелеченых особей на 108,7% ($p<0,001$). На фоне введения PIR-9 уровень фибриногена снизился как в сравнении с особями без фармакологической поддержки на 44,62% ($p<0,001$), так и относительно крыс, которым вводили кавинтон, на 18,39% ($p<0,001$).

Таблица 12

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на показатели плазменного гемостаза в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	АЧТВ, с	ПВ, с	ТВ, с	Фибриноген, г/л
ЛО	37,47±1,43	24,1±0,74	20,38±0,86	1,65±0,1
НК	13,22±1,14#	13,57±0,5#	6,55±0,51#	5,85±0,39#
Кавинтон	19,23±0,61*	14,67±0,44	11,65±0,66*	3,97±0,1*
Сулодексид	33,47±1,35*/σ	22,17±0,73*/σ	14,32±0,88*/κ	3,09±0,16*/σ
PIR-9	30,97±0,96*/σ	22,33±0,59*/σ	13,67±0,98*	3,24±0,13*/σ

Примечание: #- статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); κ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,05$), σ - ($p<0,001$).

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время (в секундах); ПВ – протромбиновое время (в секундах); ТВ – тромбиновое время (в секундах); Фибриноген – концентрация фибриногена (г/л); ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Таким образом, установлено, что фокальная церебральная ишемия приводит к гиперкоагуляционному сдвигу (снижается АЧТВ, ПВ, ТВ, увеличивается количество фибриногена), а введение экспериментального соединения PIR-9 в равной степени с сулодексидом и, превосходя показатели препарата сравнения кавинтон, нивелирует возникшую патологию.

5.1.3 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на уровень фактора фон Виллебранда в условиях фокальной ишемии головного мозга

Для подтверждения результатов, полученных при оценке первичного и вторичного звеньев гемостаза, было проведено изучение концентрации фактора фон Виллебранда (VWF), так как он является одним из гликопротеинов плазмы крови, играющим важную роль в прикреплении тромбоцитов к поврежденному участку сосуда.

Как видно из рисунка 25 у группы животных с моделируемой патологией, не подверженных терапии, концентрация VWF составила $133,5 \pm 2,32\%$, что на 37,87% ($p < 0,001$) достоверно превысило показатель ложнооперированных крыс ($96,83 \pm 2,46\%$).

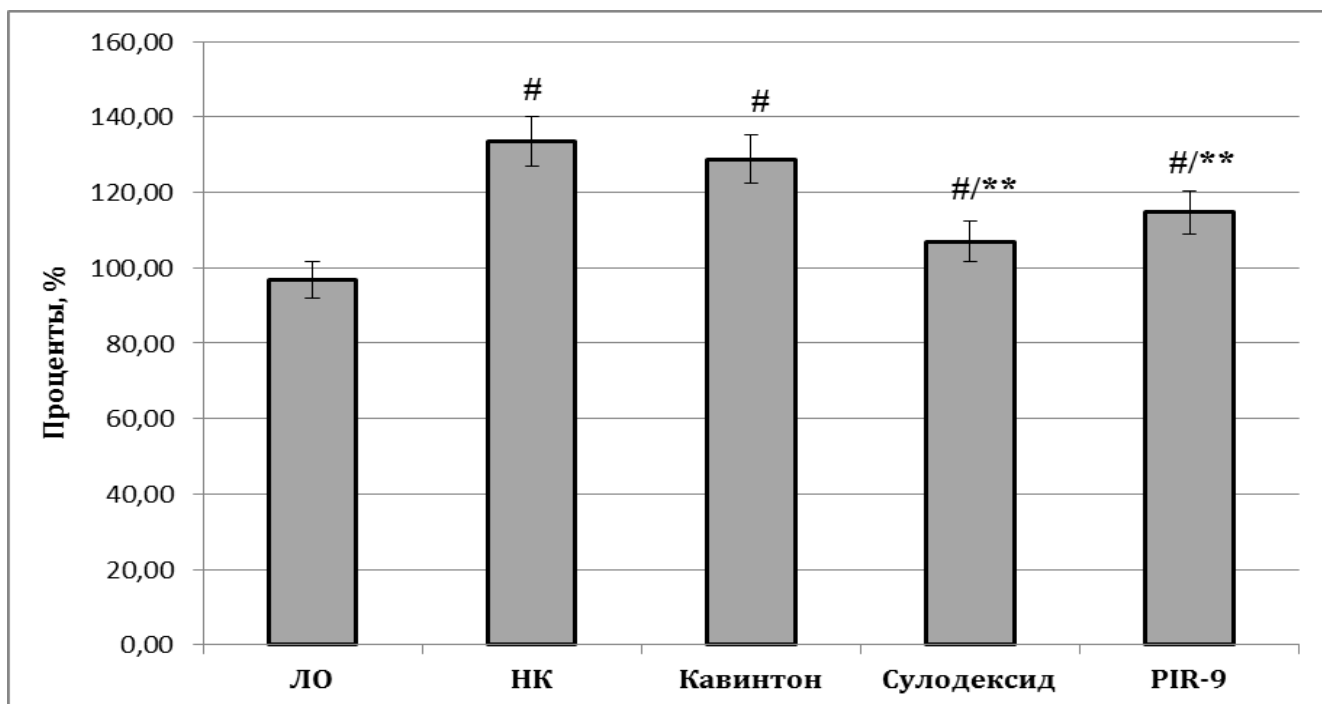


Рисунок 25. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на уровень фактора фон Виллебранда в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); ** - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,01$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Введение кавинтона не способствовало значимому снижению уровня фактора Виллебранда относительно нелеченых крыс, при этом другой препарат

сравнения – сулодексид приводил к уменьшению изучаемого показателя на 19,85% ($p<0,01$) (в то же время достоверно выше значения ЛО группы крыс).

На фоне терапии веществом PIR-9 также наблюдалось уменьшение VWF, так данный показатель составил $114,67\pm 2,8$ %, что в свою очередь на 14,1% ($p<0,01$) отличалось от идентичного значения группы крыс, не получавших фармакологическую поддержку. Статистически значимых отличий между группами, получавшими экспериментальное вещество PIR-9 и препарат сравнения сулодексид, не обнаружено.

5.1.4 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на активность противосвертывающей системы в условиях фокальной ишемии головного мозга

О работе противосвертывающей системы можно судить по количеству антитромбина III (АТ-III), так как он оказывает основное угнетающее действие на процессы свертывания крови.

У крыс с окклюзией СМА уровень АТ-III был ниже на 34,04% ($p<0,001$) в сравнении с ложнооперированными особями (табл. 13). На фоне получения крысами кавинтона изучаемый показатель вырос на 11,66% ($p<0,01$) по отношению к нелеченым крысам, однако данное значение также достоверно отличалось от группы крыс ЛО (ниже на 26,35% ($p<0,01$)). Введение сулодексида оказало положительное влияние на концентрацию антитромбина III, как видно из таблицы 16 этот показатель составил $93\pm 3,24$ %, что на 38,45% ($p<0,001$) превысило данные группы крыс НК и на 24% ($p<0,01$) животных, получавших кавинтон. Аналогичная тенденция увеличения концентрации АТ-III отмечена на фоне получения вещества PIR-9. Содержание АТ-III у группы животных, получавших соединение под шифром PIR-9, на 27,04% ($p<0,001$) и 13,77% ($p<0,01$) превысило аналогичные значения групп крыс НК и кавинтона, соответственно.

Таблица 13

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на уровень антитромбина-III в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	ЛО	НК	Кавинтон	Сулодексид	PIR-9
АТ-III, %	101,83±3,07	67,17±1,74##	75±1,86##/*	93±3,24**/к	85,33±2,43#/**/к

Примечание: #- статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,01$), ## - ($p<0,001$); *- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); к – статистически значимо относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,01$).

АТ-III– антитромбин-III (в процентах); ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

5.2 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга

Изучение вазодилатирующей функции эндотелия при экспериментально смоделированной фокальной ишемии головного мозга проводили с помощью определения изменения скорости локального кровотока после введения эндотелиоспецифических анализаторов: ацетилхолина (АЦХ), L-аргинина и L-аргинин метилового эфира (L-NAME).

Таблица 14

Изменение скорости мозгового кровотока на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	ЛО	НК	Кавинтон	Сулодексид	PIR-9
Ск, см/с	4,11±0,16#	2,17±0,14	3,14±0,13#	3,65±0,11#	3,59±0,17#

Примечание: #- статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$).

Ск – скорость мозгового кровотока (см/с); ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

У ЛО группы животных начальная скорость кровотока (Ск) составила $4,11 \pm 0,16$ см/с (табл. 14). Как видно из рисунка 25 после введения АЦХ показатель скорости кровотока возрос на 39,45% ($p < 0,001$), при введении L-аргинина не происходило значительных изменений церебральной гемодинамики, L-NAME способствовал уменьшению локального мозгового кровотока на 27,1% ($p < 0,01$).

Скорость мозгового кровотока у крыс с изучаемой патологией упала в 1,89 ($p < 0,001$) в сравнении с ложнооперированными особями. Сосудистый ответ на введение АЦХ и L-NAME у крыс негативного контроля оказался незначительным, что подтверждает наличие эндотелиальной дисфункции в условиях моделирования фокальной церебральной ишемии. Так, увеличение (АЦХ) и уменьшение (L-NAME) локального кровотока от первоначального уровня составили 12,65% и 10,9%, что в свою очередь отличалось от показателей ЛО крыс на 67,93% ($p < 0,001$) и 59,78% ($p < 0,001$), соответственно. При введении L-аргинина животным без фармакологической поддержки Ск увеличилась на 35,22% ($p < 0,001$) от исходной, что свидетельствует о проявлении феномена «L-аргининового парадокса». Относительно животных группы ЛО аналогичный показатель значимо отличался в 18,4 раза ($p < 0,001$).

Статистически достоверных отличий между группами нелеченых животных и крысами, получавшими кавинтон, при введении эндотелиоспецифического анализатора АЦХ не обнаружено. У особей, которые получали кавинтон, также наблюдалось развитие «L-аргининового парадокса» (Ск увеличилась на 22,2%), при этом в сравнении с крысами НК данное значение уменьшилось в 1,6 раз ($p < 0,001$). Снижение мозгового кровотока при введении L-NAME на фоне терапии кавинтоном составило 15,08%, что на 36,84% ($p < 0,001$) больше показателя группы особей, не подверженных терапии.

Терапия сулодексидом привела к увеличению Ск при введении АЦХ на 26,94% ($p < 0,001$) и уменьшению его при введении L-NAME на 23,71% ($p < 0,001$) от исходных значений. Эти же показатели на 97,15% ($p < 0,001$) и 117,5% ($p < 0,001$) достоверно отличались от таковых группы крыс НК. При введении L-аргинина у

группы крыс, получавших сулодексид, феномен «L-аргининового парадокса» проявился в меньшей степени: Ск увеличилась на 16,47% от первоначальной.

Применение соединения PIR-9 способствовало увеличению скорости локального кровотока на фоне введения АЦХ на 24,34% ($p < 0,01$) в сравнении с исходными показателями. В свою очередь, перечисленное выше значения достоверно превышало аналогичное как группы НК, так и группы животных, которые получали кавинтон (см. рис. 26). «L-аргининовый парадокс» на фоне применения субстанции под шифром PIR-9 отмечался в наименьшей степени (Ск незначимо повысилась на 12,51% от изначальных данных).

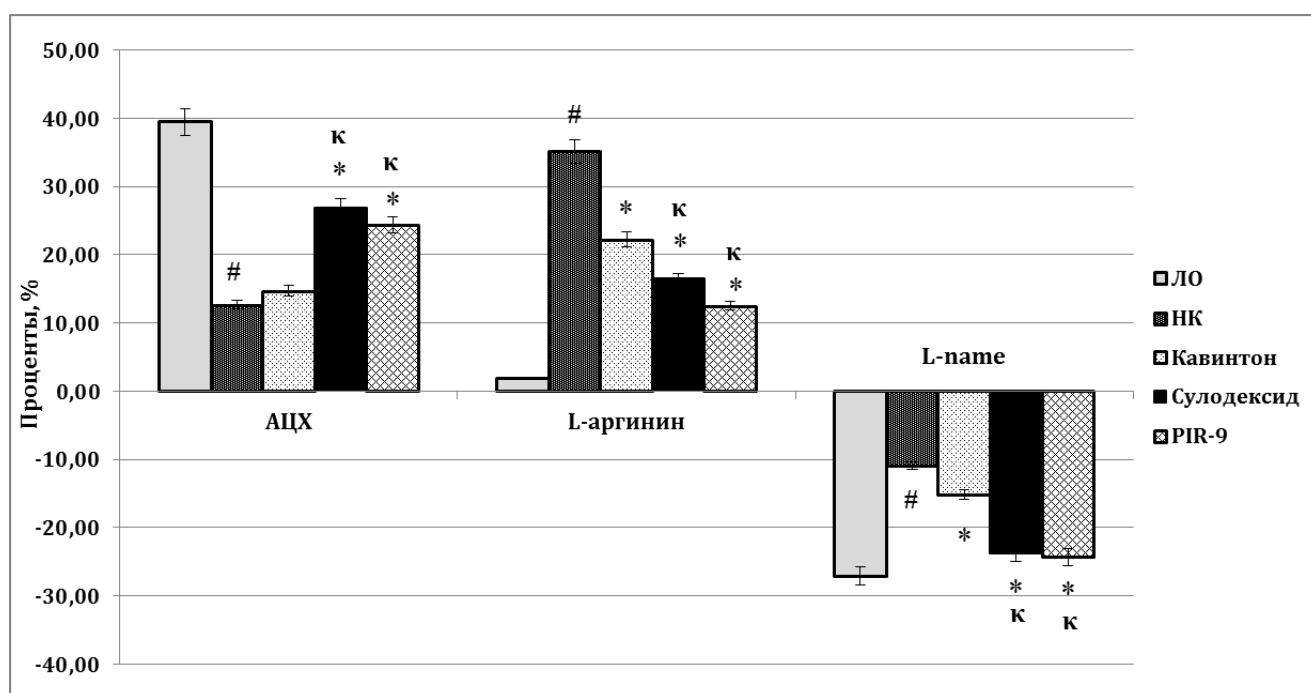


Рисунок 26. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # – статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * – статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p < 0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Сулодексид – группа крыс, получавших сулодексид (30 ЕВЛ/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

В то же время в условиях блокады NO-синтезирующей системы, путем внутривенного введения L-аргинин метилового эфира у групп животных, получавших исследуемую субстанцию PIR-9, наблюдалось значительное падение мозгового кровотока от первоначального: на 24,29% ($p < 0,01$), при этом данные значения также достоверно отличались от показателей группы особей негативного контроля на 122,84% ($p < 0,001$) и крыс, получавших препарат сравнения кавинтон на 60,65% ($p < 0,001$). Необходимо отметить, что эффекты, вызванные приемом экспериментального соединения PIR-9, на фоне коагуляции СМА достоверно не отличались и по своей силе сопоставимы с препаратом сравнения сулодексидом.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что окклюзия СМА способствовала нарушению функции сосудистого эндотелия, о которой можно судить по росту степени и скорости агрегации у нелеченых животных относительно ЛО группы крыс (степень на 138,67% ($p < 0,001$), скорость на 237,78% ($p < 0,001$)), уменьшению показателей вторичного гемостаза (АЧТВ – на 64,72% ($p < 0,001$), ПВ – на 43,69% ($p < 0,001$), ТВ – на 67,86% ($p < 0,001$)), увеличению концентрации фибриногена (на 254,55% ($p < 0,001$)) и VWF (на 37,87% ($p < 0,001$)), падению скорости мозгового кровотока (в в 1,89 ($p < 0,05$)), и отсутствию реакции на введение эндотелиоспецифических анализаторов (АЦХ, L-аргинин, L-NAME), а также негативному влиянию на противосвертывающую систему. Наши экспериментальные результаты согласуются с большим количеством исследований, проведенных в области изучения ишемических инсультов [231, 232, 43, 91].

Применение референтных препаратов кавинтона и сулодексида позволило скорректировать возникший дисбаланс, при этом наиболее выраженный эффект отмечен на фоне введения сулодексида. Так, терапия сулодексидом способствовала восстановлению антитромботического потенциала и вазодилатирующей функции эндотелия, что подтверждается нормализацией всех

изучаемых показателей (относительно крыс группы НК). Полученные нами результаты согласуются с литературными источниками [8, 9, 16, 21, 24, 54].

Исследуемое вещество PIR-9 скорректировало эндотелиальную дисфункцию, возникающую на фоне фокальной церебральной ишемии, превосходя препарат сравнения кавинтон и сопоставимо с сулодексидом. Так, при анализе агрегационной активности отмечено снижение скорости и степени агрегации на фоне получения крысами PIR-9 не только относительно нелеченых животных, но и в сравнении с крысами, которым вводили референтные препараты. Так, на фоне его введения степень и скорость агрегации уменьшились на 56,7% ($p < 0,001$) и 62,28% ($p < 0,001$) (в сравнении с НК группой крыс). В то же время степень АДФ-индуцированной агрегации у особей, которым вводили PIR-9, была достоверно ниже относительно обоих препаратов сравнения: кавинтона – на 27,23% ($p < 0,001$), сулодексида – на 13,89% ($p < 0,01$). Также у данной группы отмечалось снижение скорости агрегации на 15,69% ($p < 0,05$) относительно группы крыс, которые получали референтный препарат кавинтон. Кроме того, все исследуемое соединение-лидер способствовало устранению гиперкоагуляционного сдвига, улучшению сосудистой реакции при введении эндотелиоспецифических анализаторов (АЦХ, L-аргинина, L-NAME) на фоне окклюзии левой СМА не уступая по силе своего эффекта сулодексиду и превосходя референтный препарат кавинтон, что, несомненно, указывает на эндотелиотропное действие изучаемого нами производного пиримидина.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС

Серия экспериментов, направленная на изучение потенциальных механизмов церебропротекторной активности, была разделена на три блока исследований. Первый блок ориентирован на изучение антиоксидантной и антирадикальной активности, во втором определяли влияние исследуемого соединения-лидера PIR-9 и препаратов сравнения на лактат/пируватное соотношение и кальций-опосредованное повреждение в головном мозге крыс, заключающий (третий) блок был нацелен на оценку влияния исследуемой субстанции на различные маркеры клеточной гибели (TNF α , AIF, JNK, PUMA), а также на транспортер глюкозы 1 (GLUT1) при экспериментально смоделированной фокальной ишемии мозга крыс.

6.1. Влияние соединения-лидера и препарата сравнения изменение про/антиоксидантного равновесия в условиях фокальной ишемии головного мозга и процессы генерации свободных радикалов на моделях *in vitro*

В развитии поражений головного мозга ишемического генеза особую роль играет активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) и резкий рост интенсивности свободнорадикального окисления, с возрастанием антиоксидантной защиты и последующей ее декомпенсацией [198, 233, 53, 60]. Нарушение про/антиоксидантного равновесия повышает риск развития и усугубляет течение церебральной ишемии, благодаря гиперпродукции свободных радикалов ухудшается метаболизм глюкозы, возрастает уровень лактата, что приводит к повреждению клеточных мембран и, как следствие, к гибели клетки [75]. В связи с этим представляется актуальным изучение антиоксидантного действия исследуемых соединений, как одного из компонентов реализации церебропротекторной активности.

6.1.1 Антиоксидантная активность соединения-лидера и препарата сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

В ходе проведенного исследования установлено, что фокальная церебральная ишемия вызывает нарушение про/антиоксидантного равновесия, что подтверждается увеличением продуктов перекисного окисления липидов: диеновых конъюгатов и малонового диальдегида у крыс, не подверженных терапии относительно ложнооперированных животных на 280,56% ($p < 0,001$) и 106,83% ($p < 0,001$) соответственно (рис. 27). В то же время у особей группы негативного контроля наблюдалось снижение фермента эндогенной антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы на 25,2% ($p < 0,001$) (рис. 28), и повышение уровня каталазы на 151,61% ($p < 0,05$) (рис. 29) по сравнению с ложнооперированными крысами [280, 93].

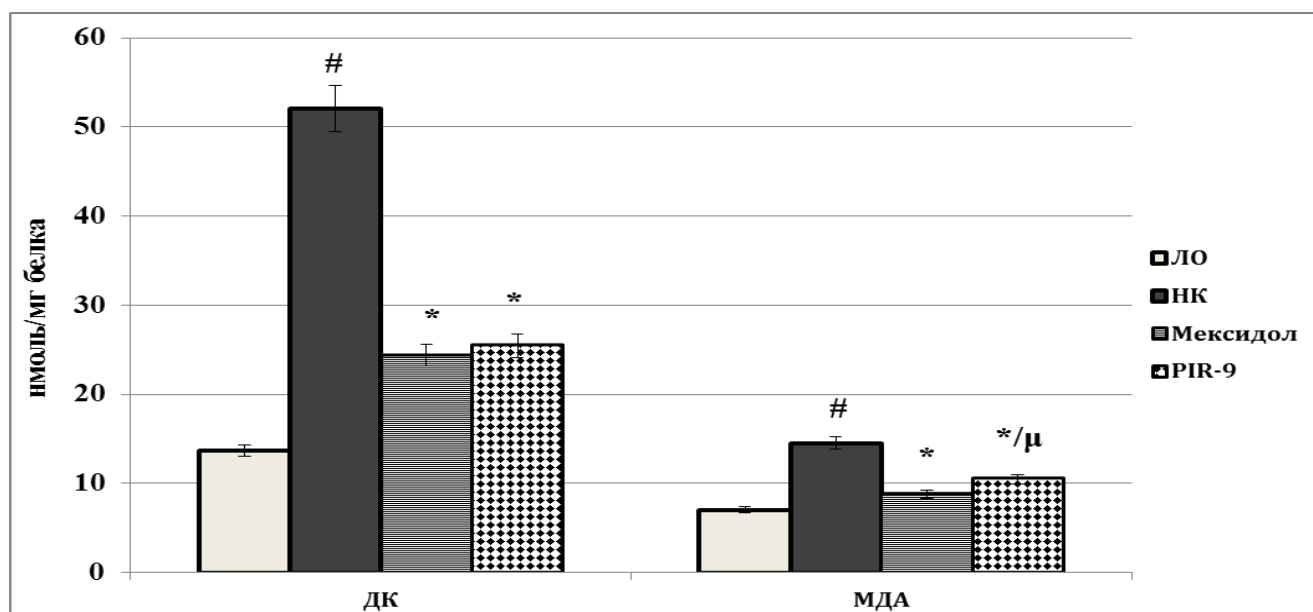


Рисунок 27. Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида на фоне введения соединения-лидера и препарата сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших мексидол ($p < 0,01$).

ДК – диеновые конъюгаты; МДА – малоновый диальдегид; ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Мексидол – группа крыс, получавших мексидол (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

Внутрибрюшинное введение мексидола в постишемическом периоде способствовало уменьшению диеновых конъюгатов на 53,21% ($p<0,001$) и малонового диальдегида на 39,55% ($p<0,001$) относительно группы нелеченых крыс. Уровень СОД у крыс, получавших мексидол, увеличился на 20,4% ($p<0,05$) в сравнении с крысами группы НК, однако, данный показатель был статистически достоверно ниже значений группы ложнооперированных особей. Концентрация каталазы у животных, которым вводили препарат сравнения мексидол, составила $1,07\pm0,13$ нмоль/мин/мг белка, что на 37,2% превысило идентичный показатель крыс группы НК. Полученные результаты подтверждаются литературными источниками [14, 49, 70].

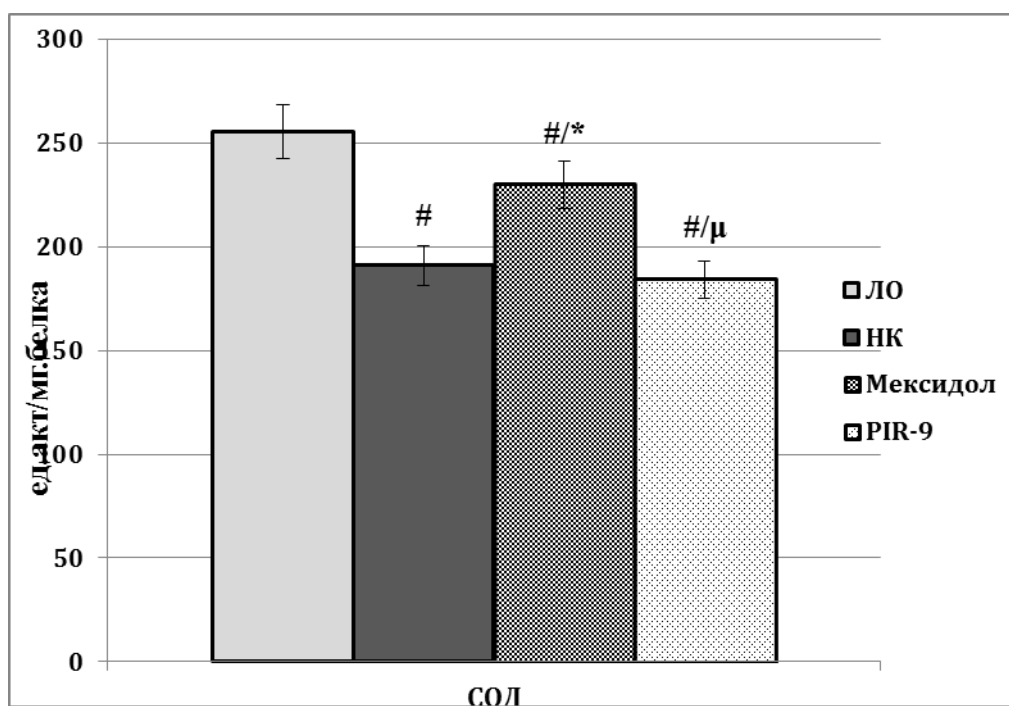


Рисунок 28. Содержание супероксиддисмутазы на фоне введения соединения-лидера и препарата сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$), ** - ($p<0,001$); μ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших мексидол ($p<0,001$).

СОД – супероксиддисмутаза; ГП – глутатионпероксидаза; ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Мексидол – группа крыс, получавших мексидол (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

На фоне введения исследуемого соединения-лидера PIR-9 отмечалось снижение содержания ДК в сравнении с нелечеными особями на 51,13% ($p<0,001$). Уровень малонового диальдегида у вышеперечисленной группы животных уменьшился в сравнении с нелечеными животными на 28,2% ($p<0,001$).

При получении крысами PIR-9 не выявлено статистически значимых отличий по показателю содержания супероксиддисмутазы в отношении группы крыс, не подверженных фармакотерапии (рис. 28).

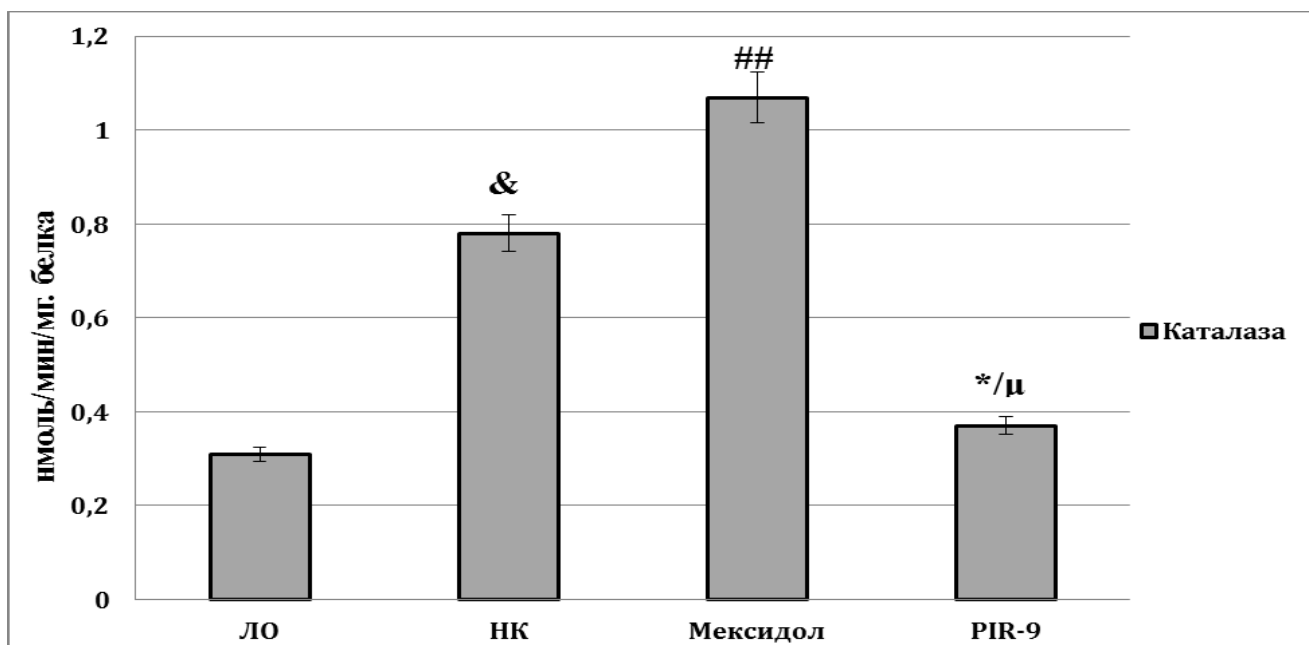


Рисунок 29. Содержание каталазы на фоне введения соединения-лидера и препарата сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: & - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$), ## - ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,05$); μ - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших мексидол ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Мексидол – группа крыс, получавших мексидол (50 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

На фоне введения вещества PIR-9 уровень каталазы снизился на 52,56% ($p<0,05$) в сравнении с животными группы НК и на 65,42% ($p<0,001$) был ниже идентичного показателя крыс, которым вводили препарат сравнения мексидол. При этом статистически достоверных отличий по данному показателю между группой крыс, получавших PIR-9, и группой ложнооперированных крыс не отмечено.

Полученные экспериментальные данные могут свидетельствовать о том что, несмотря на отсутствие роста ферментов эндогенной АОЗ на фоне получения крысами экспериментального соединения PIR-9, данное вещество влияет на продукцию свободных радикалов, тем самым уменьшая продукты перекисного окисления липидов (МДА и ДК) и таким образом оказывает свое действие на антиоксидантную систему.

6.1.2 Антирадикальная активность соединения-лидера и препарата сравнения на моделях *in vitro*

Следующая часть исследований направлена на изучение антирадикальных и хелатирующих свойств, выбранного нами соединения-лидера, в сравнении с мексидолом. Так как данные субстанции проявляют активность в отношении прооксидантов (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) целесообразно предположить наличие у них способности к торможению нитрозил и супероксид анион-радикалов, а также комплексообразованию с ионами железа (II).

Установлено, что мексидол подавляет образование супероксид и нитрозил радикалов на $30,61 \pm 0,47\%$ и $35,05 \pm 0,31\%$ соответственно. У мексидола также обнаружены хелатирующие свойства, проявляющиеся в образовании стойкого комплекса с ионами Fe^{2+} (рис. 30) [3, 83]. Соединение PIR-9 проявило себя как вещество, подавляющее генерацию супероксид анион-радикала на $30,27 \pm 0,57\%$, данное значение сопоставимо с таковым группы мексидола. Несмотря на то, что подавление генерации нитрозил-радикалов субстанцией PIR-9 было достоверно ниже показателя группы мексидола, у данного соединения также выявлены анти-NO –радикальные свойства ($31 \pm 0,15\%$). По способности образования комплексов с двухвалентным железом вещество под шифром PIR-9 превысило показатель мексидола на $13,7\%$ ($p < 0,001$).

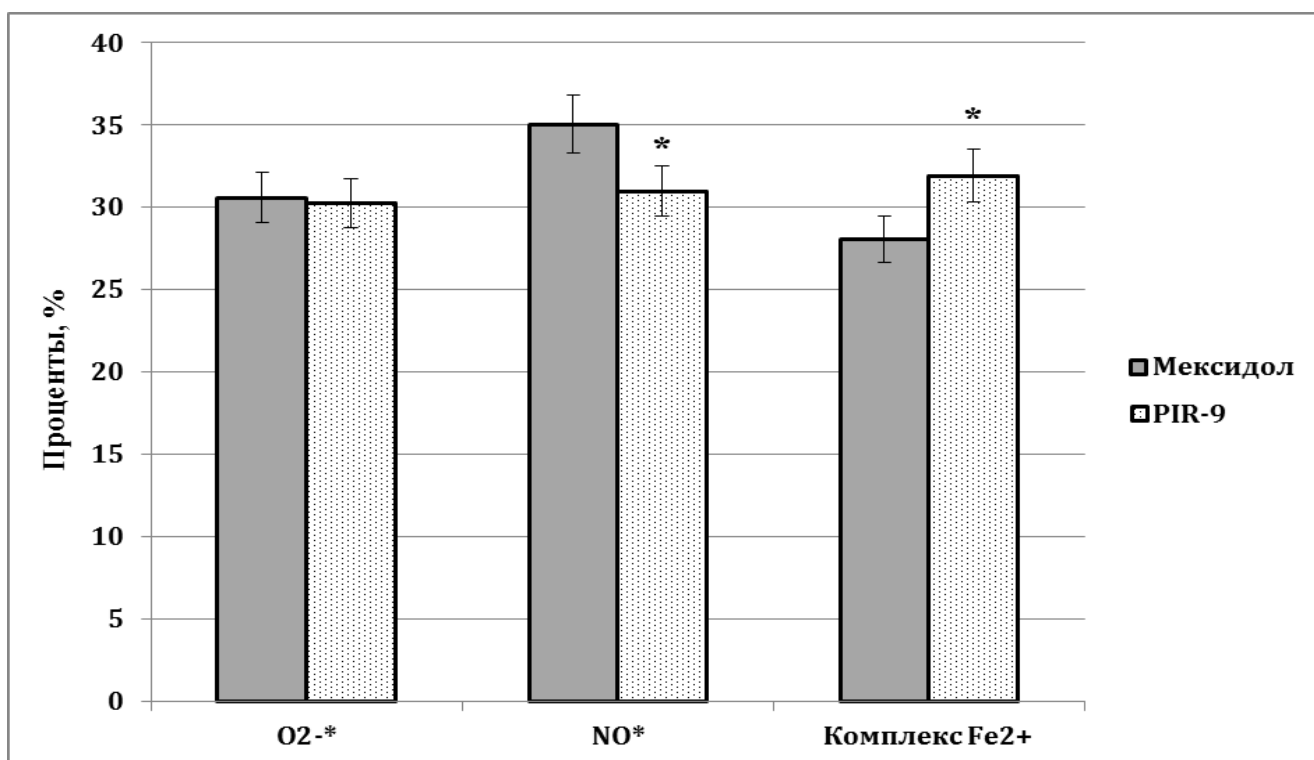


Рисунок 30. Антирадикальные и хелатирующие свойства соединения-лидера и препарата сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: *- статистически достоверно относительно мексидола ($p < 0,001$).

6.2. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на изменение лактат/пируватного соотношения и кальций-опосредованного повреждения мозговых тканей в условиях фокальной ишемии головного мозга

В условиях недостатка церебральной гемодинамики формируется целый каскад патобиохимических реакций, основными из которых являются: нарушение тканевого дыхания и энергетического обмена, лактатацидоз, глутаматно-кальциевая эксайтотоксичность [181]. Эти патогенетические механизмы в дальнейшем приводят к отеку головного мозга, усугубляющему течение ишемического инсульта. При нарушении энергетического обмена наблюдается перестройка метаболизма по пути анаэробного гликолиза, что приводит к избыточному накоплению ионов водорода, снижению pH среды и, следовательно, к увеличению содержания молочной кислоты [29]. Внутриклеточное накопление ионов кальция в нейронах также усугубляет гиперлактатемию и возможный лактатацидоз, стимулирующий развитие цитотоксического отека, переходящего

при длительной окклюзии в вазогенный [52]. Таким образом, изучение влияния соединения-лидера на метаболические нарушения и содержание внутриклеточного кальция является еще одним важным звеном церебропротекции ишемического инсульта.

6.2.1 Влияние введения соединений-лидеров и препаратов сравнения на соотношение лактат/пируват на фоне фокальной ишемии головного мозга

Коагуляция левой средней мозговой артерии привела к выраженным нарушениям энергетического обмена, проявившимся в увеличении содержания молочной кислоты в 6,38 раз ($p < 0,001$), при снижении уровня пирувата в 4,67 раз ($p < 0,001$) у нелеченых крыс по отношению к ложнооперированным животным (табл. 15). Отношение лактат/пируват у особей негативного контроля возросло в 30,54 раз ($p < 0,001$) относительно ложнооперированных крыс, что свидетельствует об интенсификации процессов образования энергии анаэробным путем в условиях фокальной ишемии головного мозга [76, 94]. Применение кавинтона способствовало снижению уровня лактата в 4,46 раз ($p < 0,001$) по отношению к группе нелеченых крыс, содержание пирувата увеличилось в 3,44 раза ($p < 0,001$), в результате этого лактат/пируватный коэффициент снизился до $21,73 \pm 1,53$, что в 15,94 раза отличалось от идентичного показателя крыс негативного контроля. Аналогичная тенденция изменений наблюдалась и на фоне применения циннаризина. Так, концентрация лактата достоверно уменьшалась, а содержание пирувата увеличивалось, соотношение лактат/пируват в 10,67 раз ($p < 0,001$) снизилось по сравнению с животными, не получавшими фармакологическую поддержку. Однако данный показатель превышал аналогичный группы крыс, получавших кавинтон, в 1,49 раз ($p < 0,001$).

Наименьший уровень лактата отмечен при внутрибрюшинном введении соединения PIR-9 и составил $1,22 \pm 0,11$ ммоль/л, что в 4,97 раз ($p < 0,001$) ниже значения крыс, не подверженных терапии. Концентрация молочной кислоты на фоне приема PIR-9 также значимо снизилась относительно крыс, которым вводили циннаризин (в 1,6 раз ($p < 0,01$)).

Таблица 15

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на уровень лактата и пирувата в плазме крови крыс в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	Лактат, ммоль/л	Пируват, ммоль/л	Лактат/пируват
ЛО	0,95±0,04	0,084±0,002	11,34±0,5
НК	6,06±0,17#	0,018±0,001#	346,28±15,61#
Кавинтон	1,36±0,11*	0,062±0,001*	21,73±1,53*
Циннаризин	1,97±0,11*	0,060±0,001*	32,46±1,39*/μ
PIR-9	1,22±0,11*/α	0,060±0,001*	20,32±1,52*/α

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); α – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

Соединение PIR-9 способствовало увеличению содержания пировиноградной кислоты в 3,3 раза ($p<0,001$) в сравнении с нелечеными животными. Отношение лактат/пируват сократилось до 20,32±1,52, что в 17,04 ($p<0,001$) раз было ниже соотношения группы животных, которые не получали фармакологическую поддержку и в 1,6 ($p<0,001$) было ниже значения группы крыс, получавших циннаризин.

6.2.2 Влияние введения соединения-лидера и препаратов сравнения на содержание внутриклеточного кальция на фоне фокальной ишемии головного мозга

Перегрузка клеток мозговой ткани ионами кальция в условиях ишемического повреждения является одним из показателей, усугубляющих течение оксидативного стресса [52]. О дополнительной секвестрации ионов Ca^{2+} в клетку можно судить по увеличению их содержания на фоне фокальной

церебральной ишемии у крыс, не подверженных терапии, на 115,64% ($p<0,001$) сравнительно с группой ложнооперированных особей (рис. 31). Введение препарата сравнения кавинтон не привело к достоверному уменьшению концентрации внутриклеточного кальция, тогда как циннаризин способствовал значимому уменьшению аналогичного показателя на 20,91% ($p<0,001$) по отношению к группе животных негативного контроля и на 16,84% ($p<0,001$) достоверно отличалось от крыс, которым вводили кавинтон. Соединение PIR-9 снизило содержание ионов Ca^{2+} на 39,97% ($p<0,001$), в сравнении с нелечеными крысами. Относительно препаратов сравнения данный показатель группы крыс, которые получали PIR-9, был достоверно ниже по сравнению с кавинтоном на 36,88% ($p<0,001$), с циннаризином – на 24,09% ($p<0,05$).

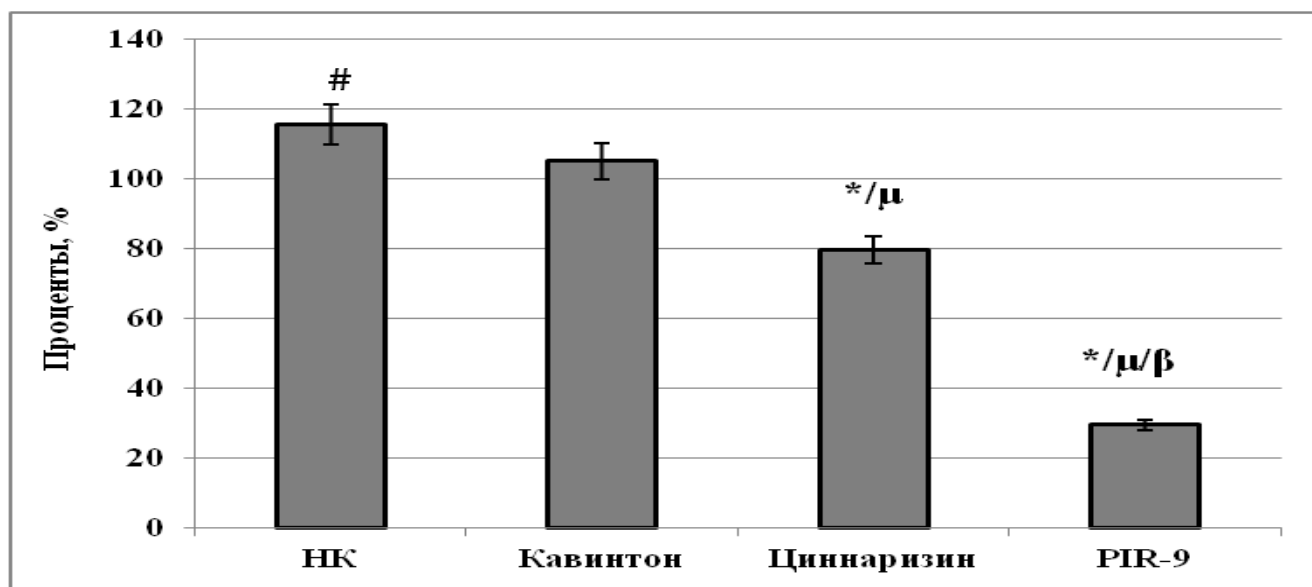


Рисунок 31. Изменение содержания кальция в гомогенате мозговой ткани относительно ложнооперированных крыс на фоне введения соединения-лидера и препаратов сравнения в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); μ – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$); β – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин - ($p<0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг, $n=6$); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50мг/кг, $n=6$).

6.3. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на специфические маркеры апоптоза в условиях фокальной ишемии головного мозга

Известно, что ишемия головного мозга запускает апоптоз – регулируемый процесс гибели нейронов, механизмы действия которого в настоящее время хорошо изучены [59]. С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) были определены концентрации маркеров апоптоза, таких как TNF α (фактор некроза опухоли), AIF (апоптоз-индуцирующий фактор), JNK (Jun-N-концевая киназа), PUMA (p53-зависимый модулятор апоптоза) и GLUT1 (транспортер глюкозы 1) на модели левосторонней окклюзии средней мозговой артерии.

У ложнооперированных животных концентрация TNF α составила $19,62 \pm 0,51$ пг/мл (табл. 15), в то время как у крыс с моделируемой патологией не подверженных фармакотерапии этот показатель достиг $67,13 \pm 1,70$ пг/мл, что, в свою очередь, превысило значение группы ЛО в 3,42 раза ($p < 0,001$) и согласуется с данными литературы [267]. При применении кавинтона уровень TNF α достоверно снизился на 45,11% ($p < 0,001$), а на фоне же внутрибрюшинного введения глиатилина идентичное значение было меньше на 57,47% ($p < 0,001$) группы крыс негативного контроля. В то же время отмечены статистически значимые отличия по данному показателю между группами крыс получавшими кавинтон и глиатилин. Тенденция к снижению концентрации фактора некроза опухоли также наблюдалась на фоне получения экспериментального производного пиримидина PIR-9. Содержание TNF α у группы животных, получавших PIR-9, составило $24,19 \pm 1,22$ пг/мл, что на 63,97% ($p < 0,001$) и 34,36% ($p < 0,001$) было меньше значений крыс не подверженных терапии и получавших кавинтон, соответственно.

Как известно AIF – протеин, запускающий каспаза-независимый путь апоптоза, у группы крыс ЛО содержание данного белка составило $4,08 \pm 0,24$ нг/мл. Окклюзия левой средней мозговой артерии способствовала увеличению концентрации AIF в 1,98 раз ($p < 0,001$) (табл. 16) в сравнении с ложнооперированными животными и как следствие активировала AIF-опосредованный путь клеточной гибели [182]. Внутрибрюшинное введение

препаратов сравнения кавинтона и глиатилина привело к уменьшению концентрации фактора, индуцирующего апоптоз относительно нелеченых животных на 35,19% ($p < 0,001$) и 38,41% ($p < 0,001$). Аналогичное положительное изменение отмечено при приеме экспериментальной субстанции, так введение PIR-9 способствовало уменьшению содержания AIF на 29,99% ($p < 0,001$).

Неоднозначная роль в процессах клеточной гибели отводится Jun-N-концевой киназе (JNK), согласно одним литературным источникам активация JNK оказывает антиапоптотическое действие [161, 174, 227] есть данные о том, что JNK способствует дестабилизации белка p53 и таким образом препятствует процессам апоптоза [163, 164], также по некоторым данным JNK1-сигнальный путь способствует аксональной регенерации при окклюзии средней мозговой артерии [284]. Другие источники, напротив, свидетельствуют об активации TNF α JNK-опосредованным путем [180, 202, 217]. Как видно из таблицы 15, в условиях фокальной церебральной ишемии концентрация JNK составила $29,44 \pm 1,96$ нг/мл, что на 56,07% ($p < 0,001$) было ниже значения ложнооперированных особей ($67,01 \pm 0,75$ нг/мл). При сравнении показателей группы крыс кавинтона и глиатилина со значением группы животных НК наблюдалось выраженное повышение уровня JNK на 37,6% ($p < 0,01$) и 72,28% ($p < 0,001$). Исследуемое вещество PIR-9 достоверно увеличивало содержание маркера апоптоза JNK относительно нелеченых крыс на 48,06% ($p < 0,01$), что вероятно свидетельствует о подавлении апоптоза, опосредованного TNF-рецепторами [259].

Содержание PUMA у ложнооперированных крыс составило $447,99 \pm 17,64$ пг/мл, у особей без фармакотерапии по сравнению с животными группы ЛО концентрация p53-зависимого модулятора апоптоза возросла на 53,04% ($p < 0,001$) (табл. 15). На фоне применения кавинтона уровень PUMA уменьшился относительно нелеченых крыс на 18,35% ($p < 0,001$), терапия глиатилином способствовала достоверному уменьшению изучаемого показателя на 28,14% ($p < 0,001$). Стоит отметить, что содержание PUMA у животных, которым вводили глиатилин, также статистически значимо было меньше значения группы крыс кавинтона на 11,99% ($p < 0,001$). Положительная динамика изменений наблюдалась

на фоне внутрибрюшинного получения PIR-9. Так, фиксировалось снижение концентрации PUMA у животных, которым вводили соединение под шифром PIR-9 (на 27,27% ($p<0,001$) относительно НК группы крыс, на 10,93% ($p<0,001$) в сравнении с крысами, получавшими кавинтон). Полученные результаты подтверждают теорию дестабилизации белка p53, уменьшение p53-зависимого образования PUMA, и как следствие снижение клеточной гибели [283].

Таблица 16

Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на специфические маркеры апоптоза в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группа	TNF α , пг/мл	AIF, нг/мл	JNK, нг/мл	PUMA, пг/мл
ЛО	19,62 $\pm$ 0,51	4,08 $\pm$ 0,24	67,01 $\pm$ 0,75	447,99 $\pm$ 17,64
НК	67,13 $\pm$ 1,70#	8,07 $\pm$ 0,45#	29,44 $\pm$ 1,96#	685,59 $\pm$ 21,12#
Кавинтон	36,85 $\pm$ 1,91**	5,23 $\pm$ 0,30**	40,51 $\pm$ 2,26*	559,78 $\pm$ 10,07**
Глиатилин	28,55 $\pm$ 1,62**/к	4,97 $\pm$ 0,22**	50,72 $\pm$ 2,82**	492,67 $\pm$ 8,69**/а
PIR-9	24,19 $\pm$ 1,22**/а	5,65 $\pm$ 0,28**	43,59 $\pm$ 3,55*	498,61 $\pm$ 6,92**/а

Примечание: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,01$), ** - ($p<0,001$); к - статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,01$), а - ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс (n=6); НК – группа крыс негативного контроля (n=6); Глиатилин – группа крыс, получавших глиатилин (60 мг/кг, n=6); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, n=6).

Особое значение в ходе ишемического повреждения отводится транспортеру глюкозы 1 (GLUT1), обеспечивающему поступление глюкозы в эндотелиоциты и глию [275]. На рисунке 32 представлено содержание GLUT1: у ложнооперированных особей - 76,61 нг/мл, у животных с моделируемой патологией этот показатель был снижен на 65,33% ($p<0,001$) в отношении ЛО группы крыс, что не противоречит литературным источникам [185]. Терапия кавинтоном способствовала значимому увеличению экспрессии GLUT1 на 47,17% ($p<0,001$) в сравнении и особями, не подверженными фармакотерапии. Другой препарат сравнения глиатилин увеличивал концентрацию глюкозо-транспортера

не только относительно нелеченых крыс (на 93,07% ($p<0,001$)), но и в сравнении с животными, получавшими кавинтон (на 31,18% ($p<0,001$)).

Аналогичная тенденция увеличения экспрессии GLUT1 отмечалась на фоне получения крысами соединения PIR-9. Исследуемое вещество PIR-9 увеличивало концентрацию транспортера глюкозы на 103,5% ($p<0,001$) относительно крыс без фармакологической поддержки, в сравнении же с группой крыс, которым вводили кавинтон на 38,27% ($p<0,001$). Интересно отметить, что вещество PIR-9 усиливало экспрессию GLUT1 на 5,4% относительно крыс, получавших в качестве фармакотерапии глиатилин, однако, данное различие не являлось статистически достоверным. Полученные результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями оценки потребления глюкозы в постишемическом периоде при приеме деривата пиримидина PIR-9.

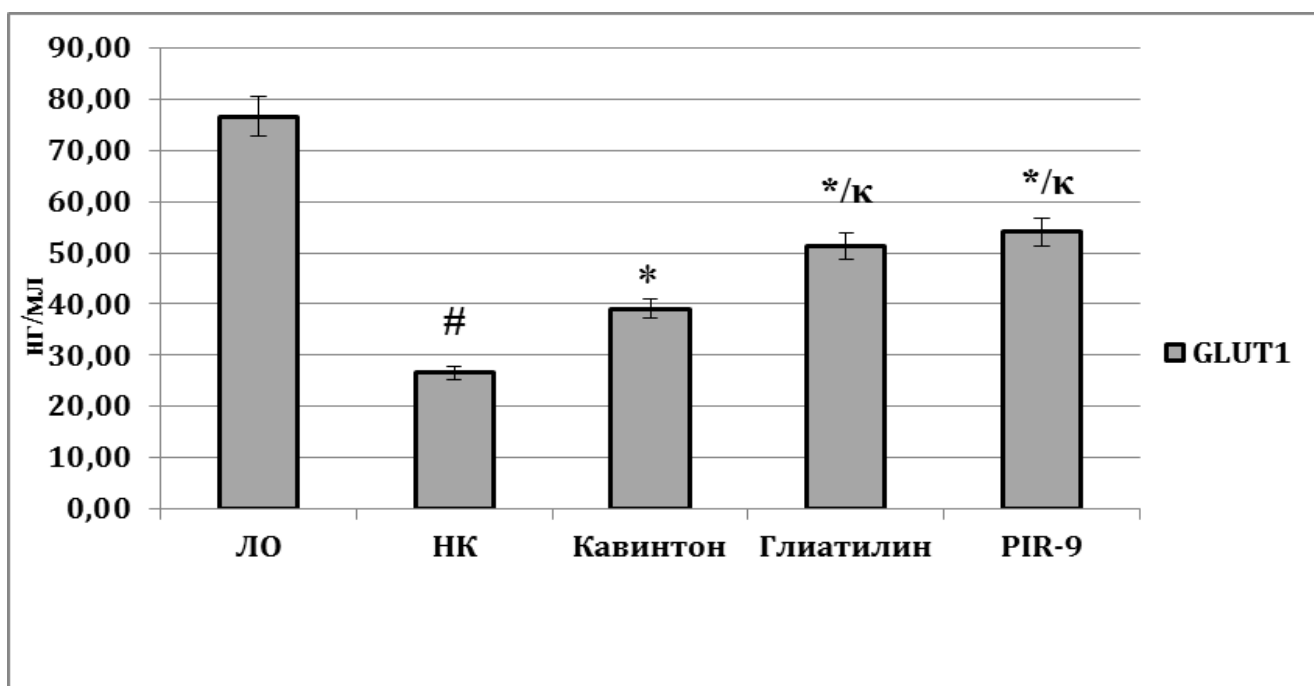


Рисунок 32. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на содержание транспортера глюкозы в условиях фокальной ишемии головного мозга

Обозначение: # - статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p<0,001$); * - статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p<0,001$); к – статистически достоверно относительно группы крыс, получавших кавинтон ($p<0,001$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс ($n=6$); НК – группа крыс негативного контроля ($n=6$); Глиатилин – группа крыс, получавших глиатилин (60 мг/кг, $n=6$); PIR-9 – группа крыс, получавших субстанцию PIR-9 (50 мг/кг, $n=6$).

Заключение

Оценивая потенциально возможные механизмы реализации церебропротекторного действия производных пиримидин-4(1H)-она установлено нарушение про/антиоксидантного равновесия, проявляющееся в увеличении содержания продуктов перекисного окисления липидов (у НК крыс МДА на 106,83% ($p < 0,001$), ДК на 280,56% ($p < 0,001$) относительно ЛО крыс) и уменьшении ферментов эндогенной системы АОЗ в условиях экспериментально смоделированной фокальной церебральной ишемии. В то же время окклюзия СМА способствовала значительным изменениям энергообмена, проявляющиеся в увеличении содержания молочной кислоты и уменьшении концентрации пировиноградной у нелеченых крыс в 6,38 раз ($p < 0,001$) и в 4,67 раз ($p < 0,001$) по сравнению с ложнооперированными особями. Так же отмечалось кальций-опосредованное повреждение клеток мозга в постишемическом периоде у крыс негативного контроля, данный показатель превысил значение ЛО группы крыс на 115,64% ($p < 0,001$). Кроме того, смоделированная патология приводила к запуску каскада реакций, способствующих апоптотической гибели клеток (увеличение образования $\text{TNF}\alpha$ в 3,42 раза ($p < 0,001$), AIF в 1,98 раз ($p < 0,001$), PUMA на 53,04% ($p < 0,001$), уменьшению экспрессии JNK на 56,07% ($p < 0,001$)) и уменьшению индукции концентрации транспортера глюкозы (на 65,33% ($p < 0,001$)). Все наши экспериментальные результаты сопоставимы с большим количеством литературных данных в области изучения ишемических инсультов [113, 115, 136, 182, 221, 246, 253, 12, 66].

На фоне приема мексидола наблюдалось достоверное снижение диеновых конъюгатов (53,21% ($p < 0,001$)) и малонового диальдегида (39,55% ($p < 0,001$)) в сравнении с крысами без фармакотерапии и увеличении активности ферментов антиоксидантной защиты. Мексидол также проявлял антирадикальные и хелатирующие свойства, что вкупе подтверждает антиоксидантный эффект данного соединения, доказанный ранее [1, 46, 84]. Введение экспериментального вещества PIR-9 в равной степени с препаратом сравнения способствовало уменьшению продуктов ПОЛ, при этом, не влияя на систему АОЗ, тем не менее,

данное соединение проявляло антирадикальную активность, не уступающую по своей силе мексидолу.

Уровень содержания молочной кислоты снизился на фоне введения соединения-лидера, при этом вещество PIR-9 способствовало снижению лактата до $1,22 \pm 0,11$ ммоль/л, а лактат/пируватный коэффициент уменьшился до $20,32 \pm 1,52$, что достоверно отличалось от идентичных показателей групп крыс, получавших циннаризин. Стоит отметить, что на фоне применения экспериментального вещества PIR-9, секвестрация ионов кальция в клетку была меньше на 39,97% ($p < 0,001$), в сравнении с нелечеными крысами и также достоверно отличалась от обоих референтных препаратов.

При изучении процессов гибели нейронов на фоне фокальной ишемии мозга крыс выявлено, что препараты сравнения кавинтон и глиатилин способствовали достоверному снижению концентрации фактора некроза опухоли, апоптоз-индуцирующего фактора, p53-зависимого модулятора апоптоза, а также к увеличению уровня Jun-N-концевой киназы, что подтверждается многочисленными экспериментальными исследованиями [258, 165, 269, 72, 109, 177]. Кроме того, на фоне введения крысам кавинтона и глиатилина увеличивалось содержание транспортера глюкозы 1, при этом, интересно, отметить рост концентрации GLUT1 у группы крыс, получавших глиатилин, относительно животных, которым вводили кавинтон на 31,18% ($p < 0,001$).

В результате оценки влияния исследуемого вещества на маркеры апоптоза (TNF α , AIF, JNK, PUMA) доказано антиапоптотическое действие производного пиримидина PIR-9 за счет экспрессии Jun-N-концевой киназы и ингибирования фактора некроза опухоли, апоптоз-индуцирующего фактора и p53-зависимого модулятора апоптоза и увеличение индукции GLUT1, способствующего переносу глюкозы.

Таким образом, проведенное исследование способствовало определению наличия у изучаемого деривата пиримидина поливалентного механизма церебропротекторной активности.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день, несмотря на существенные успехи ангионеврологии, рациональная фармакотерапия ишемического инсульта является одной из существенных проблем системы здравоохранения, как экономически развитых, так и развивающихся стран [187]. Значительное число случаев летального исхода и постишемической инвалидизации, в особенности трудоспособного населения ложится тяжким социально-экономическим бременем не только на систему медицинского обеспечения населения, но, что, также является существенным фактом, затрагивает личную сферу деятельности человека [123].

Опубликованные статистические выкладки ВОЗ наглядно демонстрируют эпидемиологическую значимость ишемического инсульта:

- ❖ Инсульт занимает пятое место среди всех общемировых причин смертности населения, находясь позади таких нозологий, как: ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания, хронические респираторные инфекции и непреднамеренные травмы/несчастные случаи [104].

- ❖ В 2013 году зарегистрировано 6,8 миллионов случаев гибели от инсульта в экономически развивающихся странах и 3,5 миллиона случаев летального исхода в экономически развитых государствах [189].

- ❖ Приблизительно 60% случаев смерти от инсульта отмечаются в остром периоде нарушения мозгового кровообращения в отделениях неотложной помощи [103].

- ❖ Последствия инсульта, в том числе и немедицинские, существенно влияют на качество жизни населения, уменьшают возможность трудовой адаптации и последующее полноценное интегрирование человека в социально-экономическую жизнь общества [218].

Учитывая высокую эпидемиологическую роль ишемического инсульта и постишемических последствий, ассоциированных с данным состоянием, актуальной задачей современной медицины и фармакологии является разработка новых и совершенствование уже имеющихся путей коррекции ишемии головного мозга [200]. В настоящее время «золотым стандартом» для терапии ишемического

инсульта является тромболизис, посредством введения препаратов рекомбинантного плазминогена, а также эндоваскулярное вмешательство - механическая тромбоэктомия. Однако, данные медицинские процедуры имеют существенный спектр ограничительных факторов к использованию и малое «терапевтическое окно», что в свою снижает эффективность проводимой терапии [235]. В связи с этим научное сообщество и практические специалисты все больше обращают внимание в сторону церебропротективной терапии, направленной на сохранение функциональной активности нейронов в условиях ишемии, а поиск средств, обладающих церебропротекторным эффектом, становится перспективной областью научных изысканий экспериментальной и клинической фармакологии [126]. В настоящем установлен достаточно обширный спектр препаратов, для которых характерно наличие церебропротекторной активности, однако, зачастую данные средства обладают незначительной эффективностью или высокой системной токсичностью использования, что предопределяет необходимость целенаправленного поиска новых, высокоактивных и безопасных церебротропных средств [262].

Проведенный анализ литературных источников показал, что необходимым сочетанием эффективности и оптимального профиля безопасности использования могут обладать производные пириимидина [23], на основании чего данный ряд соединений был включен в настоящее исследование.

На первом этапе экспериментальной работы был осуществлен фармакологический скрининг в ряду изучаемых производных пириимидин-4(1H)-она, где из 10 соединений на модели необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий, посредством оценки влияния изучаемых объектов на степень развития неврологического и когнитивного дефицита, изменения поведенческой активности животных, уровень потребления глюкозы головным мозгом и концентрацию молочной кислоты, по совокупности полученных данных, было отобрано 1 соединение, обладающее максимальным (в ряду исследуемых объектов) фармакологическим эффектом, сопоставимым с таковым у референтного препарата циннаризина и превосходящим действие кавинтона.

Так введение вещества под шифром PIR-9 способствовало снижению выраженности неврологического дефицита, по отношению к группе крыс, не получавших фармакологическую поддержку 69,8% ($p < 0,001$) соответственно. Кроме того применение данного соединения в условиях ишемии головного мозга способствовало восстановлению локомоторной и поведенческой активности экспериментальных животных, а также стабилизации ментальной функции крыс. Концентрация лактата на фоне получения крысами исследуемого соединения-лидера PIR-9 уменьшилась относительно группы животных НК на 69,04% ($p < 0,001$), в тоже время уровень утилизации глюкозы головным мозгом, на фоне введения вещества-лидера имел тенденцию к увеличению.

Проведенная оценка зависимости «доза-эффект» для соединения-лидера позволила установить «параболический» характер действия исследуемого вещества. В ходе данного блока исследований установлено, что в диапазоне доз 25 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг, изучаемое соединение-лидер оказывало наиболее существенное снижение когнитивного дефицита, а также на изменение концентрации лактата и уровень потребления глюкозы головным мозгом в условиях его ишемии в дозе 50 мг/кг. При этом следует отметить, что выраженность позитивного влияния соединения-лидера на изучаемые показатели превосходило таковое у референтных препаратов. Наблюдаемый характер зависимости «доза-эффект» для вещества PIR-9, вероятно, может быть связан с особенностями химического строения исследуемого объекта. Наличие в структуре соединения-лидера сопряженной кратной связи, ароматического ядра и гетероциклической молекулы (рис.33) пиримидина может обуславливать значительную вариабельность лигандного взаимодействия с фармакотерапевтической «мишенью».

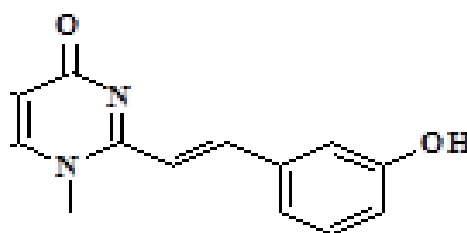


Рисунок 33. Особенности структуры изучаемого соединения

Так в работе *KumarR. et.al, 2009* описано, что для дериватов пиримидина характерно стереоспецифическое взаимодействие «лиганд-мишень» с образованием комплекса стабилизируемого пептидными связями, которое (степень взаимодействия) зависит от количества заместителей в молекуле производного пиримидина, где с ростом числа замещенных радикалов в гетероцикле пиримидина, отмечается снижение величины фармакологического ответа [197]. В то же время в исследовании *SongJ. et.al., 2015*, приводятся данные показывающие, что с увеличением концентрации фармакологически активного производного пиримидина отмечается экранирование «мишени» в результате чего увеличение вводимой дозы вещества приводит к уменьшению терапевтического эффекта [142]. Как видно из химико-структурной формулы соединения-лидера (рис. 34) наличие фенильного и метильного заместителей в ядре пиримидина, а также разветвленных радикалов в боковой цепи, может способствовать уменьшению степени связывания вещества с фармакотерапевтической мишенью при увеличении вводимой дозы вещества-лидера, что согласуется с представленными ранее литературными данными.

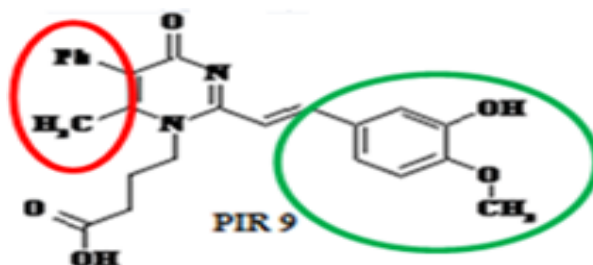


Рисунок 34. Структура заместителей в молекуле исследуемого вещества-лидера

Обозначение: выделены функциональные группы, которые могут обуславливать характер дозозависимого действия соединения PIR-9

Дальнейшее углубленное изучение церебропротекторного действия соединения-лидера проводилось в условиях необратимой окклюзии средней мозговой артерии, как экспериментальной модели наиболее полно отражающей комплекс патологических изменений структуры и функций головного мозга при ишемии [147]. На данном этапе исследования установлено, что применение

исследуемого соединения-лидера способствовало уменьшению неврологического дефицита (оцениваемого по методам McGraw, Combs и D'Alecy, Garsia) и сенсомоторных нарушений у крыс в условиях фокальной церебральной ишемии в сопоставимой степени с референтными препаратами. Также применение соединения PIR-9 способствовало статистически значимому снижению степени гидратации головного мозга в сравнении с крысами группы негативного контроля на 8,23% ($p < 0,001$). Кроме того, на фоне применения исследуемого соединения-лидера PIR-9, зона ишемического некроза в условиях фокальной ишемии уменьшилась по отношению к животным, не получавшим терапию на 64,42% ($p < 0,001$) соответственно. Немаловажно, что степень редукции некротических изменений в структурах головного мозга у крыс, получавших изучаемое соединение-лидер, была выше, нежели у животных, которым вводили препарат сравнения циннаризин, и статистически значимо не отличалась от показателей группы крыс, получавших кавинтон.

Немаловажно, что полученные результаты, отражающие течение некротических процессов в головном мозге в условиях ишемии, подтверждались данными гистоморфологического исследования. Так при гистологическом исследовании ткани мозга крыс НК группы определялся очаг энцефалолизиса без четких границ с наличием диффузной полиморфно-ядерной лейкоцитарной инфильтрации, воспаления и сетчатого отека, отмечалась деструкция нейронов с явлениями кариолизиса и образованием клеток-теней, с вовлечением в патологический процесс мозговых оболочек. Следует отметить, что в условиях введения референтных препаратов и исследуемых соединений деструктивные процессы в мозговой ткани, выявляемые в ходе гистологического исследования, носили менее выраженный характер в сравнении с НК группой крыс. Кроме того, в ходе морфометрического анализа было установлено, что у животных, получавших соединение PIR-9, по отношению к нелеченым животным, отмечалось увеличение числа жизнеспособных нейронов, снижение числа патологически измененных клеток головного мозга и количество нейрофагов. При

этом, данные морфометрии мозговой ткани крыс, которым вводили соединение PIR-9 и препараты сравнения, статистически значимо не отличались.

Также учитывая существенную роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе ишемии головного мозга, нами было исследовано влияние изучаемых соединений-лидеров на структурно-функциональную целостность эндотелия сосудов в условиях ишемии головного мозга. Известно, что эндотелий сосудов обеспечивает регуляцию уровня локального органного (в том числе и мозгового) кровотока посредством секреции ряда биологически активных субстанций, среди которых ведущая роль отводится монооксиду азота (NO) [204]. NO опосредует все функции эндотелия сосудов: вазодилатирующую, антитромботическую, противовоспалительную и антипролиферативную [25]. Повреждение эндотелия сосудов и сопряженное с этим снижение продукции NO играет одну из иницирующих ролей в патофизиологическом каскаде ишемического повреждения головного мозга. Описано, что нарушение структуры эндотелиоцитов способствует повышенной генерации протромбогенных, вазоконстрикторных и провоспалительных факторов, таких как тромбоксан A₂, эндотелин 1, АДФ, ИЛ-6, ФНО- α , что в свою очередь интенсифицирует вторичные механизмы повреждения головного мозга: дисфункция ГЭБ и воспаление, нарушение кальциевого гомеостаза, увеличение гидратации мозговой ткани [248]. Также существенна взаимосвязь эндотелиальной дисфункции с окислительным стрессом. В условиях сбоя функционирования эндотелия наблюдается не только недостаточный синтез NO, но и его ускоренная окислительная биodeградация, посредством реакции с супероксидным анион-радикалом и образованием цитотоксичного пероксонитрита (ONOO⁻) [282]. ONOO⁻ оказывает повреждающее действие на макромолекулы посредством ряда механизмов: прямое окисление ультраструктур клетки, нитрование тирозина и инактивация ряда ферментов, взаимодействие с железосерными белками, интенсификация внешнего пути апоптоза (TNF- α -зависимый каскад) [134]. Таким образом, сохранение эндотелиальной функции в условиях ишемии головного

мозга может являться существенной составляющей церебропротекторной активности фармакологически активных соединений.

В ходе проведения исследования установлено, что применение изучаемого соединения-лидера способствовало восстановлению антитромботической и вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях церебральной ишемии. Так на фоне введения вещества PIR-9 отмечено снижение степени и скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, нормализации коагуляционного компонента гемостаза, что выражалось в увеличении показателей АЧТВ, ТВ и ПВ, а также снижении концентрации фибриногена у животных, получавших исследуемое соединение, по отношению к группе крыс НК. Стоит отметить, что согласно данным литературных источников, производные пиримидина могут оказывать антитромбогенное действие не только за счет улучшения эндотелиальной функции, но и прямого воздействия на функцию тромбоцитов [143]. Описано, что циклическая структура производных пиримидина имеет определенную степень сродства к АДФ-рецепторам тромбоцитов, и вещества подобного химического строения проявляют свойства антагонистов рецепторов подтипа P_2Y_{12} , что снижает АДФ-стимулированную агрегацию кровяных пластинок [155].

Кроме того, применение изучаемого вещества-лидера способствовало восстановлению вазодилатационного потенциала эндотелия сосудов, что отражалось в нормализации стимулированной АЦХ вазодилатации, меньшем по сравнению с НК группой крыс, проявлением феномена «L-аргининового парадокса», а также восстановлении базального уровня секреции NO, о чем свидетельствует восстановление сосудистой реакции в ответ на введение L-NAME. При этом по силе эндотелиопротекторного действия исследуемое соединение-лидер не уступало препарату сравнения сулодексид и превосходило эффект кавинтона.

На сегодняшний день новым методом диагностики структурно-функционального состояний нейрональной ткани в условиях ишемии, а также

прогнозирования течения ишемического инсульта и пост-инсультных осложнений является электроэнцефалографическое исследование [170].

Известно, что электрическая активность нейронов во многом связана с оптимальным кровоснабжением головного мозга и интенсивностью пластических процессов в мозговой ткани. В основе негативных ЭЭГ-изменений во время ишемии головного мозга лежит снижение уровня церебральной гемодинамики и сопряженный с этим дефицит субстратов окисления (глюкоза) с последующей активацией гликолиза, снижением синтеза АТФ, интенсификацией лактоацидоза и окислительного стресса. Вышеперечисленные элементы «ишемического каскада» способствуют сбою электрофизиологического функционирования нейронов [196]. Манифестация негативных ЭЭГ-изменений отмечается при снижении уровня церебрального кровотока ниже критической отметки в 25-30 мл /100 г/мин и носит прогрессирующий характер. Первоначально в ЭЭГ-исследовании в условиях ишемии головного мозга отмечается редукция высокочастотного β -ритма, что может свидетельствовать о метаболическом нейрональном сдвиге в пользу лактоацидоза и релизинга глутамата, в дальнейшем наблюдается увеличение амплитуд Δ -ритма и θ -ритма, характеризующих стадии повреждения головного мозга по типу цитотоксического отека и снижении ион-транспортных мембранных систем [228].

В этой связи нами было проведен блок исследований, посвященный оценке влияния исследуемых соединений на показатели ЭЭГ у животных в условиях церебральной ишемии, в ходе которого было установлено, что у группы крыс, лишенных фармакологической поддержки отмечаются характерные для церебральной ишемии ЭЭГ-изменения в особенности в лобной и теменной областях головного мозга крыс: увеличение средней амплитуды Δ -ритма в отведении FP1-A1 и C3-A1 в 3,54 ($p<0,001$) и 5,41 ($p<0,001$) раз, а также в повышение амплитуды θ -ритма в 1,89 ($p<0,001$) и 2,94 ($p<0,001$) раз, снижение амплитуды высокочастотного β -ритма в отведениях FP1-A1 и C3-A1 на 55,5% ($p<0,001$) и 62,3% ($p<0,001$), уменьшение амплитуды альфа-ритма на 49% ($p<0,001$) в отведении FP1-A1 и на 63,7% ($p<0,001$) в C3-A1 соответственно в

сравнении с ЛО группой животных. Изменения ЭЭГ у НК группы крыс согласуются с литературными источниками [190].

Применение препаратов сравнения кавинтона и циннаризина способствовало восстановлению биоэлектрического потенциала нейронов головного мозга в условиях ишемии. При этом наиболее существенные ЭЭГ-изменения отмечены при применении кавинтона (снижение дельта- и тета-ритмов, увеличение альфа- и высокочастотного бета-ритмов). На фоне введения исследуемого соединения PIR-9 отмечены ЭЭГ-изменения во многом схожие с таковыми при применении рефрентного препарата кавинтона, что отражалось в снижении амплитуд дельта и тета-ритмов и увеличении мощности альфа и высокочастотного бета-ритмов в отведениях левого полушария и может свидетельствовать о высоком церебротропном потенциале соединения PIR-9.

Таким образом, установленное в ходе комплексного исследования церебропротекторное действие изучаемых соединений-лидеров, а также особенности их химической структуры, послужили поводом для проведения серии экспериментов, посвященных оценке потенциально возможных аспектов механизма реализации церебротропного эффекта изучаемых производных - пиримидин-4(1H)-она. На данном этапе работы было установлено, что исследуемое вещество-лидер обладает активирующим действием на систему мозгоспецифического транспортера глюкозы GLUT 1. Известно, что в условиях физиологической нормы транспорт глюкозы через эндотелиальную выстилку ГЭБ в головной мозг не является лимитирующей стадией синтеза макроэргов [128], однако в условиях ишемии в силу структурного дефекта ГЭБ и сопряженного с этим уменьшения количества и функциональной активности системы GLUT 1 процесс активного эндоцитоза глюкозы в нейроны подавляется, что может привести к существенному энергодефициту [152]. По всей видимости, сохранение должных функциональных свойств транспортера GLUT 1, отмечаемое при применении исследуемого соединения-лидера, приводит к увеличению поступления глюкозы в нейрональную ткань. Также стоит отметить, что снижение концентрации молочной кислоты по отношению к НК группе крыс на

фоне введения исследуемого соединения PIR-9 в 5 раз ($p < 0,001$), а также восстановление лактат/пируватного коэффициента, может свидетельствовать о стабилизации синтеза АТФ, сопряжения окисления и фосфорилирования, утилизируя вновь поступающую в головной мозг глюкозу, нивелируя тем самым «энергетический голод» нейронов в условиях ишемии [237]. В свою очередь сохранение запаса энергии в нейрональной ткани в условиях коррекции церебральной ишемии исследуемым соединением PIR-9 может являться косвенным признаком оптимизации функций митохондрий [230]. В этой связи было проведено изучение влияния вещества-лидера на изменение концентрации маркеров митохондриальной дисфункции. Согласно литературным данным наиболее полное представление о функциональной активности митохондрий дает изменение концентрации проапоптотических сигнальных молекул, таких как AIF и PUMA [276]. Известно, что AIF является специфичным для митохондрий проапоптотическим белком, высвобождение которого отмечается при формировании митохондриальной поры переходной проницаемости – процесса, зависящего от клеточного инфлюкса ионов кальция [216]. Наблюдаемое при применении изучаемых соединений-лидеров снижение концентрации ионов Ca^{2+} и AIF, по всей видимости свидетельствует о стабилизации структуры митохондриальной мембраны, уменьшению внутриклеточного проапоптотического сигнала, что в конечном итоге ведет к уменьшению степени нейрональной деструкции [118]. Аналогичным образом (при увеличении уровня внутриклеточного кальция) увеличивается активность PUMA. p53-зависимый регулятор апоптоза (PUMA), является представителем семейства Bcl2-ассоциированных белков, активность которых возрастает при дезорганизации мембраны митохондрий [108]. Кроме проапоптотической активности PUMA играет существенную роль в генерации активных форм кислорода и развитии окислительного стресса: в условиях повышения активности PUMA отмечается подавление функции ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза [157], а также увлечение активности NOX 1 и NOX 4, что в свою очередь ведет к перераспределению

потока электронов в митохондриальной дыхательной цепи на уровне комплекса II в сторону образования АФК. Таким образом, наблюдаемое в условиях применения изучаемого объекта снижение (на фоне введения соединений PIR-9 – на 27,27% ($p < 0,001$)) концентрации PUMA по отношению к животным, лишенным фармакологической поддержки, может являться не только составляющей его антиапоптотической активности, но и потенциальных антиоксидантных свойств. Однако стоит отметить, что в ходе проведения исследования по оценке возможных механизмов действия вещества-лидера, установлена антирадикальная и хелатирующая активность соединения PIR-9, выражаемая в подавлении образования в инкубационной среде нитрозил, супероксид-радикалов и образовании стабильных комплексов с ионами двухвалентного железа, а также способность данного вещества подавлять процессы ПОЛ (уменьшение концентрации МДА и ДК), что также может являться одним из компонентов антиоксидантной активности соединения-лидера. При этом данные эффекты, вероятно, опосредуются особенностями структуры изучаемого вещества PIR-9. Наличие сопряженной кратной связи и фенильного радикала может способствовать образованию стабильного и реакционно-неактивного феноксильного радикала («скэвенджерная» активность») [226], терминирующего ход свободно-радикальных реакций окисления липидов, что отражается в уменьшении образования ацилгидроперекисей, таких как МДА [286] (рис. 35). Кроме того наличие антиоксидантных свойств может положительно сказываться на функции эндотелия сосудов, за счет уменьшения степени окислительной инактивации NO пероксонитрита и устранение его негативного действия на клеточную функцию [120].

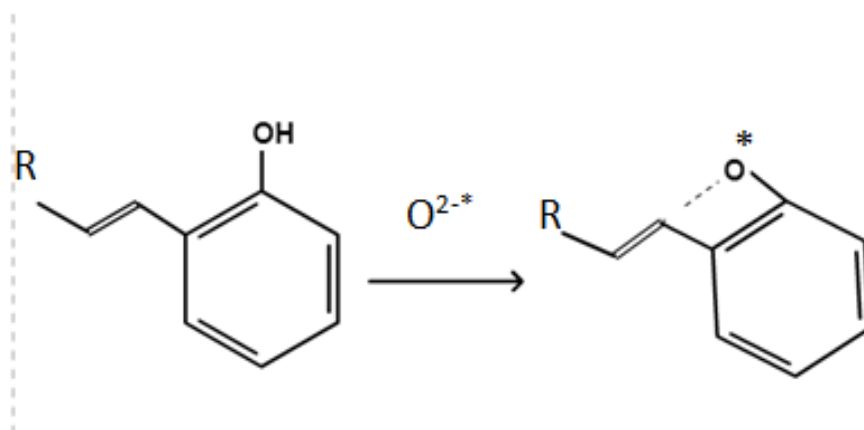


Рисунок 35. Образование феноксильного радикала

Как уже указывалось ранее, подавление образования AIF и инактивация комплекса PUMA, при коррекции церебральной ишемии изучаемым соединением-лидером, может препятствовать формированию каскада внутреннего (митохондриального) пути апоптоза. В тоже время в условиях ишемии головного мозга существенным является, не только внутренний, но и внешний путь программированной гибели клетки, активируемый TNF- α [186].

TNF- α известен, как провоспалительный цитокин, вырабатываемый в ответ на различного рода иммуно- и неиммуногенные стимулы [153]. В условиях ишемии головного мозга TNF- α , может вступать в «лиганд-рецепторное» взаимодействие с TNFR1 комплексом [153]. В результате активируется каспаза-зависимый каскад реакций апоптоза, в котором эффекторная каспаза-3 распознает специфические DxxD ядерные белки, секвенируя ДНК и интенсифицируя образование «ишемического ядра» [277]. В тоже время для данного апоптотического пути известен ряд регуляторов, среди которых ведущую роль играет JNK (c-Jun N-terminal kinases). JNK, является представителем суперсемейства ферментов типа митоген-активированной протеинкиназы (МАРК), которые регулируют адаптацию клеточной функции к широкому диапазону абиотических и биотических стрессовых воздействий [141]. JNK также регулирует важные физиологические процессы, включая нейрональную функцию, иммунологические реакции и эмбриогенез, посредством влияния на экспрессию генов, и динамику апоптотических реакций [278]. В условиях ишемии активация

JNK приводит к фосфорилированию Akt – регуляторного доменного белка, который экспрессирует гены фактора трансляции 4, в результате чего TNF- α – опосредованный каскад апоптотических реакций прерывается на этапе активации регуляторной каспазы-9 [220]. Таким образом, снижение концентрации TNF- α на фоне применения исследуемого соединения-лидера PIR-9 по отношению к НК группе крыс на 63,97% ($p < 0,001$), также увеличение активности JNK при применении вещества PIR-9 – на 48,06% ($p < 0,01$) может свидетельствовать о подавлении внешнего (каспаза зависимого) пути апоптоза, в условиях коррекции ишемии головного мозга изучаемым производным пиримидина PIR-9. Стоит отметить, что подавление образования TNF- α на фоне введения исследуемого соединения, может опосредовать снижение экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также ряда хемотаксических факторов (IFN, IL) на эндотелии сосудов, что уменьшает хемотаксис лейкоцитов и воспалительную реакцию в сосудистой стенке, восстанавливая тем самым, противовоспалительный потенциал сосудистого эндотелия [203].

Таким образом, в ходе проведения исследования установлено, что в ряду новых пептид-замещенных производных пиримидин-4(1H)-она, соединение под лабораторными шифром PIR-9, проявляет наиболее выраженное церебротропное действие, выражаемое в уменьшении неврологической симптоматики ишемического инсульта, стабилизации поисковой, моторной и ментальной функций у экспериментальных животных в условиях ишемии головного мозга, сохранении структурно-функциональной целостности эндотелия сосудов, уменьшении степени гидратации и некротических процессов в мозговой ткани. При этом, по всей видимости, соединение PIR-9 обладает комплексным механизмом действия, направленным на стабилизацию энергообеспечения нейронов, а также редукцию окислительного стресса и процессов апоптоза (рис. 36). Доказанная в ходе настоящего исследования высокая терапевтическая эффективность производного пиримидин-4(1H)-она - PIR-9, сопоставимая с таковой у препарата сравнения кавинтона и превосходящая эффекты референтного препарата циннаризина, а также комплексный характер механизма

действия, затрагивающий сразу несколько ветвей каскада ишемического повреждения головного мозга, делает данное соединение перспективным объектом для дальнейшего изучения с целью создания на его основе лекарственного средства, способного восстановить активность ткани головного мозга в условиях ишемического инсульта.

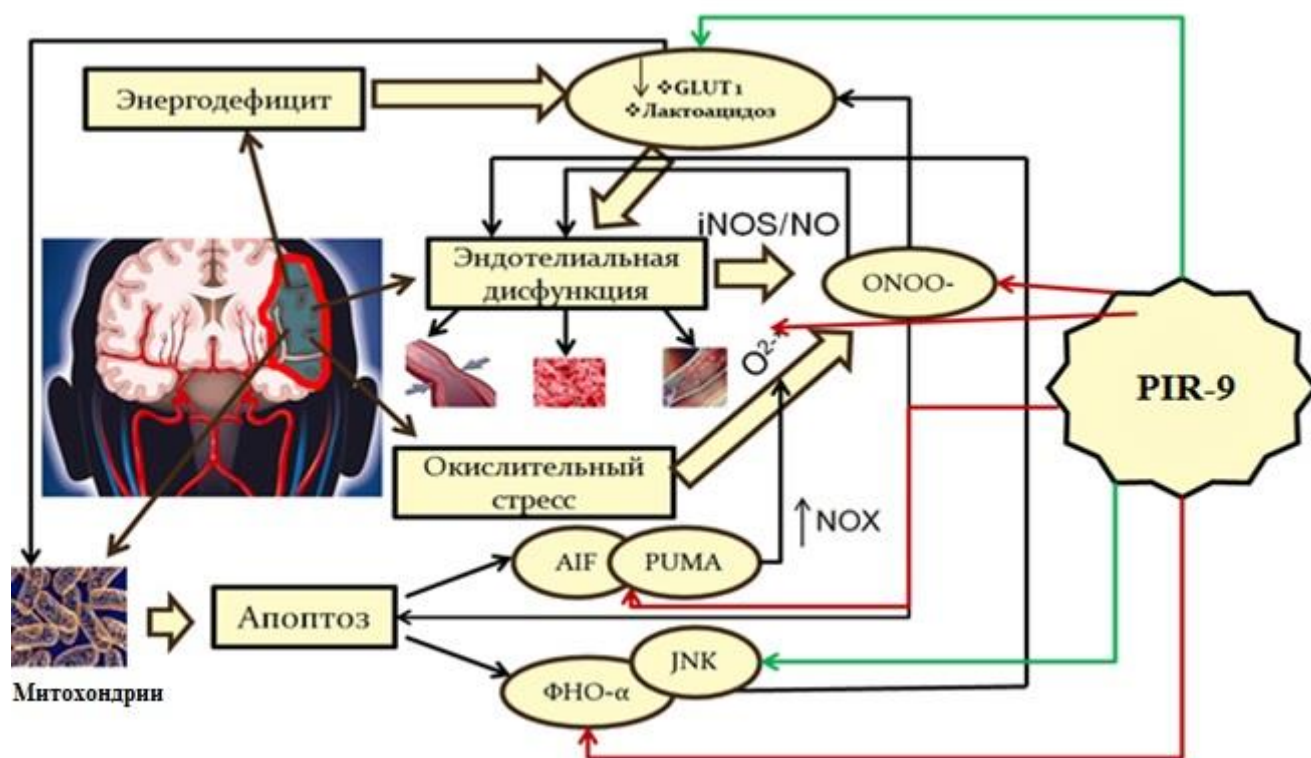


Рисунок 36. Возможные аспекты механизма церебропротекторного действия соединения PIR-9

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведенный фармакологический скрининг позволил установить, что в ряду производных пиримидин-4(1H)-она (10 соединений) наиболее выраженное снижение неврологического, поведенческого дефицита отмечается на фоне профилактического введения соединения под лабораторным шифром PIR-9. Наряду с вышесказанным выбранное нами соединение (PIR-9) увеличивает потребление энергетических субстратов (утилизацию глюкозы мозговой тканью на 179,59% ($p < 0,001$) в сравнении с крысами группы НК) и снижает количество продуктов анаэробного гликолиза (уменьшение уровня лактата на 69,04% ($p < 0,001$) относительно группы крыс НК).
2. Анализ зависимости «доза-эффект» для соединения PIR-9 позволил установить, что наиболее выраженное церебропротекторное действие данное соединение оказывает в дозе 50 мг/кг.
3. Соединение PIR-9 при фокальной церебральной ишемии крыс способствует восстановлению неврологических нарушений, биоэлектрической активности мозга, кроме того снижению отека и зоны некроза на 64,62% ($p < 0,001$) (в сравнении с нелечеными животными).
4. Соединение PIR-9 при фокальной церебральной ишемии крыс восстанавливает антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов, что можно оценить по снижению агрегационной способности тромбоцитов (степень и скорость агрегации на 56,7% ($p < 0,001$) и 62,28% ($p < 0,001$) соответственно была ниже в сравнении с крысами группы негативного контроля), устранению гиперкоагуляционного сдвига и коррекции функции противосвертывающей системы, по силе эффекта не уступая референтным препаратам.
5. Экспериментальное соединение PIR-9 сохраняет вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов, о чем можно судить по реакции на эндотелийспецифические анализаторы (АЦХ, L-аргинин, L-NAME) при фокальной церебральной ишемии крыс.
6. Механизм церебропротекторной активности соединения PIR-9 обусловлен снижением ПОЛ: уровень малонового диальдегида снизился на 28,2% ($p < 0,001$),

диеновых конъюгатов на 51,13% ($p < 0,001$) (в сравнении с крысами группы НК). Кроме того, указанное выше соединение частично восстанавливает нарушенное лактат/пируватное соотношение, снижает уровень внутриклеточного кальция, а также корректирует концентрацию ферментов апоптоза ($\text{TNF}\alpha$, AIF, JNK, PUMA) и увеличивало содержание транспортера глюкозы-1 на 103,5% ($p < 0,001$) (относительно нелеченых особей).

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о перспективности использования производного пиримидин-4(1H)-она под шифром PIR-9 как средства для коррекции цереброваскулярных нарушений, возникающих в результате острой недостаточности мозгового кровообращения.
2. Следует предложить дальнейшее изучение соединения PIR-9 с целью создания на его основе церебропротекторного средства для профилактики и лечения ишемических поражений головного мозга.

Список сокращений

AIF - апоптоз-индуцирующий фактор

eNOS - эндотелиальная синтаза оксида азота

GLUT1 – транспортер глюкозы 1

IFN- β - интерферон- β

IL - интерлейкин

iNOS - индуцибельная синтаза оксида азота

JNK - Jun-N-концевая киназа

L-NAME - нитро – L – аргинин метиловый эфир

MAPK - митоген–активируемая протеинкиназа

NMDA - N-метил-D-аспартат

nNOS - нейрональная синтаза оксида азота

NO - монооксид азота

PUMA - p53-зависимый модулятор апоптоза

TNF- α – фактор некроза опухоли α

VWF - фактора фон Виллебранда

АДФ - аденозиндифосфат

АТ – III - антитромбин – III

АТФ - аденозинтрифосфат

АЦХ - ацетилхолин

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

ГП - глутатионпероксидаза

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДК – диеновые конъюгаты

ЕВЛ – единицы высвобождения липотеидлипазы

ИФА - иммуноферментный анализ

ЛО – ложнооперированные животные

МДА – малоновый диальдегид

НАДФН – Никотинамид-адениндинуклеотидфосфат восстановленный

НК – крысы группы негативного контроля

ОП - тест «Открытое поле»

ПВ – протромбиновое время

ПКЛ - тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

ПОЛ – перекисное окисление липидов

Ск - скорость мозгового кровотока

СМА – средняя мозговая артерия

ТВ - тромбиновое время

ТЭИ - тест экстраполяционного избавления аверсивной среды

УРПИ - тест условного рефлекса пассивного избегания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантная активность сукцинатпиримидиновых комплексов, оксиметилурацила и мексидола в модельных системах перекисного окисления липидов при различной длительности окисления / В.А. Мышкин [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 145-146.
2. Антиоксидантная терапия последствий ишемических инсультов, с позиции доказательной медицины / С.А. Трофимова [и др.] // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2012. – Т. 2, № 9. – С. 646.
3. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина / Г.И. Клебанов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 288-300.
4. Антиоксидантные эффекты тонарола, мексидола, оксиметилурацила, тиазозола и атропина при острой интоксикации карбофосом / В.А. Мышкин, Ш.Ф. [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2008. – Т. 3, № 5. – С. 83-86.
5. Бокерия, Л. А. Новейшие инновационные методы сосудистой диагностики / Л.А. Бокерия, Н.Н. Петрищев, М.Б. Гирина // Поликлиника. – 2013. – № 3-1. – С. 64-65.
6. Бондаренко, Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстропольяционного избавления / Н.А. Бондаренко // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1990. – Т. 11. – С. 506-508.
7. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М.: Изд-во "Высшая школа", 1991. – С. 5-30.
8. Ваизова, О. Е. Влияние винпоцетина (кавинтона) на функцию эндотелия у больных с хронической ишемией головного мозга / О.Е. Ваизова, А.И. Венгеровский, В.М. Алифирова // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2006. – Т. 106, № 16. – С. 46-50.
9. Ваизова, О.Е. Эндотелийпротекторные эффекты винпоцетина, пентоксифиллина и эналаприла у больных хронической ишемией головного мозга

/ О.Е. Ваизова, А.И. Венгеровский, В.М. Алифирова //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 4. – С. 10-13.

10. Ветровой О. В., Рыбникова Е. А., Самойлов М. О. Церебральные механизмы гипоксического/ишемического посткондиционирования Обзор //Биохимия. – 2017. – Т. 82, № 3. – С. 542-551.

11. Влияние винпоцетина при терапии с комбинацией антигипертензивных средств на метаболизм мозга животных с артериальной гипертензией и гипертензией, осложненной ишемией мозга / Н.М. Митрохин [и др.] //Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2014. – Т. 26, № 11 (182). – С. 98-103.

12. Влияние некоторых бигуанидов на оксидативный статус тканей крыс при ишемии/реперфузии головного мозга / О.А. Сафонова [и др.] //Нейрохимия. – 2009. – Т. 26, № 4. – С. 328-332.

13. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга / И.Н. Тюренок [и др.] //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 115, № 8. – Р. 61-63.

14. Влияние различных режимов введения некоторых производных 3-гидроксипиридина в терапии острой ишемии головного мозга у белых крыс на фоне экспериментального сахарного диабета / В.И. Инчина, И.С. Рагинов, И.Н. Чаиркин [и др.] //Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. -2010. -Т. 152, № 1. – С. 155-165.

15. Влияние соединения АТАСЛ и препарата Б-40 на вазодилатирующую и антитромботическую функции эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях его фокальной ишемии / А.В. Воронков [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 2. – С. 16-20.

16. Влияние флавоноидов: гесперидина и патулетина на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга экспериментальных животных на фоне его фокальной ишемии / А.В. Воронков [и др.]//Научные ведомости

Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2017. – Т. 39, № 19 (268). – С. 186-194.

17. Влияние циннаризина и алвитила на мозговой кровоток и высшую нервную деятельность при хронической экспериментальной ишемии головного мозга / О.А. Громова [и др.] //Журн. неврол. и психиат. – 2004. – Т. 104, № 1. – С. 52-53.

18. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 153-161.

19. Воронков, А. В. Влияние новых производных пиримидин-4 (1H)-она на психоэмоциональный дисбаланс и некоторые нарушения энергетического обмена у крыс на фоне ишемии головного мозга / А.В. Воронков [и др.]//Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – С. 13.

20. Воронков, А. В. Изучение влияния 2-стирилпроизводных пиримидин-4 (1H)-она на состояние антитромботического потенциала, на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков, А.В. Мамлеев, Д.И. Поздняков //Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 2. – Режим доступа: https://clinical-journal.co.uk/gallery/print_2016-18-2_p.603-608.pdf

21. Воронков, А. В. Нарингин и апигенин улучшают вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга экспериментальных животных на фоне его фокальной ишемии / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, А.В. Мамлеев //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2 (58).

22. Воронков, А.В. Взаимосвязь развития эндотелиальной дисфункции и активности протеинкиназы с при ишемическом повреждении головного мозга / А.В. Воронков, А.В. Мамлеев //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, №. 4. – С. 134-142.

23. Воронков, А.В. Изучение влияния 2-стирилпроизводных пиримидин-4 (1H)-она на состояние антитромботического потенциала, на фоне экспериментально

- вызванной недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков, А.В. Мамлеев, Д.И. Поздняков //Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 2. – Режим доступа: https://clinical-journal.co.uk/gallery/print_2016-18-2_p.603-608.pdf
24. Воронков, А.В. Нарушение антитромботической функции сосудистого эндотелия и некоторых параметров плазменного гемостаза на фоне фокальной ишемии головного мозга и их коррекция 4-гидрокси-3, 5-дитретбутил коричной кислотой / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков //Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – № 2. – С. 73-78.
25. Воронков, А.В. Эндотелиопротекторные свойства флоридзина, 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты и соединения VMA-10-18 при экспериментально вызванной ишемии головного мозга / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, А.В. Мамлеев //Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 3. – Р. 58-64.
26. Гаврилов, В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная //Клиническая лабораторная диагностика. – 1983. – № 3. – С. 33-36.
27. Ганнушкина, И.В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга / И. В. Ганнушкина //Вестник РАМН. – 2000. – Т. 9. – С. 22-27.
28. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
29. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
30. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, М.Ю. Мартынов //Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С. 44-48.
31. Гусев, Е.И., Мартынов М. Ю., Камчатнов П. Р. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы/ Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов //Доктор. ру. – 2013. – № 5. – С. 7-12.

32. Дзугкоев, С.Г. Изменение активности пол, АОС и на, k-ato-a3bi почечной ткани под влиянием милдроната и витамина Е / С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева //Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 131-132.
33. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения / З.А. Суслина [и др.] //Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2008. – Т. 2, № 1. – С. 4-11.
34. Дунаева, И.В. Лечение хронических нарушений мозгового кровообращения препаратом «Солкосерил» в практике участкового врача / И.В. Дунаева, И.А. Лебедев, А.В. Шибает //Клиническая неврология. – 2010. – № 1. – С. 42-43.
35. Дьякова, И.Н. Экспериментальное исследование церебропротекторных свойств феруловой кислоты в условиях ишемии мозга: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.00.25 /Дьякова Ирина Николаевна – Пятигорск: ПятГФА, 2007. – 24 с.
36. Евтушенко, И. С. Ноотропы и нейропротекторы в современной клинической нейрофармакологии / И.С. Евтушенко //Международный неврологический журнал. – 2013. – № 3 (57). – С. 20-27.
37. Евтушенко, С.К., Филимонов Д. А. Роль гомоцистеина в развитии ишемических инсультов у лиц молодого возраста (обзор литературы и личные наблюдения) / С.К. Евтушенко, Д.А. Филимонов //Международный неврологический журнал. – 2013. – № 7 (61). – С. 44-48.
38. Ершова, А. К. К вопросу о лечебных свойствах дженериков и оригинальных препаратов на примере центральных холинергических веществ / А. К. Ершова //РМЖ. – 2011. – Т. 19, № 29. – С. 1824-1827.
39. Изучение взаимосвязи структура–противовоспалительная активность в ряду 2-винилзамещенных производных 4-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4h-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида / В.С. Сочнев [и др.] //Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2. – С. 480.
40. Изучение влияния сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / И.Н. Тюренков, [и др.] //Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 12-15.

41. Изучение дозозависимого церебротропного эффекта производного пиримидина под шифром PIR-9 на фоне экспериментальной ишемии головного мозга крыс / А.В. Воронков [и др.] // Фармация и фармакология. – 2018. Т. 6, № 6. – С. 548-567.
42. Исайкин, А. И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта / А.И. Исайкин // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 21-24.
43. Ишемический инсульт: оценка параметров сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в остром периоде заболевания / Л.А. Щепанкевич [и др.] // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2011. – № 1. – С. 42-46.
44. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике/ В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
45. Катунина, Н. П. Экспериментальное изучение антигипоксической активности новых физиологически совместимых антиоксидантов под шифром пдпа модели острой гипоксии с гиперкапнией / Н.П. Катунина, И.М. Гнеушев, Э.А. Парфенов // Вестник Брянского государственного университета. – 2012. – № 4 (2). – С. 142-145.
46. Клиническая эффективность и антиоксидантная активность мексидола при хронических цереброваскулярных заболеваниях / И.Н. Смирнова [и др.] // Нервные болезни. – 2006. – № 1. – С. 33-36.
47. Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование N-замещенных производных 1,3-диазинона-4 / И.П. Кодониди // Фармация. – 2010. – № 1. – С. 36-40.
48. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк // Лаб. дело. – 1988. - № 1. – С. 16 – 19.
49. Коррекция последствий окислительного стресса в условиях экспериментального дисбиоза с применением мексидола / Ю.А. Авдеева, П.В. Калущкий, В.А. Королев. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. – 2017. – № 4. – С.43-47.

50. Косенко, Ю.В. Энергетический обмен в мозге крыс с разным латеральным профилем при окклюзии сонных артерий / Ю.В. Косенко, Г.В. Карантыш, А.М. Менджерицкий //Фундаментальные исследования. – 2007. – № 4. – С. 64.
51. Лабораторные методы клинического исследования /под ред. М. Тульчинского. – Варшава, 1965. - 808 с.
52. Литвинов, А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимасляной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия: дис. ... канд. мед.наук: 14.03.06 / – Волгоград: ВолгГМУ, 2015. – 196 с.
53. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. – № 1. – С. 3-19.
54. Мазина, Н.В. Церебро- и эндотелиопротекторные свойства ароматических производных гамк и глутаминовой кислоты при моделировании ишемии головного мозга: автореф. дис. ... канд. медицинских наук: 14.03.06 / Мазина Наталья Валерьевна – Волгоград: ВолгГМУ, 2016. – 167 с.
55. Мельникова, Е. В. Нейропротекция при ишемии головного мозга / Е.В. Мельникова, А.А. Шмонин //Фарматека. – 2012. – № 9. – С. 36-42.
56. Методы статистической обработки медицинских данных: Методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / Кочетов А. Г. [и др.] – М.: РКНПК, 2012. – 42 с.
57. Многофакторная нейропротекция при ишемическом инсульте (клинико-экспериментальное исследование) / А. Скоромец [и др.]//Врач. – 2009. – № 2. – С. 26-30.
58. Моделирование церебральной ишемии посредством коагуляции средней мозговой артерии у крыс / А.И. Трофименко [и др.]//Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – Режим доступа: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29430>
59. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1/ Е.В. Шляхто, Е.Р. Баранцевич, Н.С. Щербак, М.М. Галагудза //Вестник РАМН. – 2012, № 6. – С. 42-50.

60. Мышкин, В.А., Гуляева И.Л., Ибатуллина Р.Б. Влияние актопротекторов на перекисное окисление липидов и состояние мембран эритроцитов у крыс при отравлении карбофосом / В.А. Мышкин, И.Л. Гуляева, Р.Б. Ибатуллина // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2004. – № 3. – С. 52-58.
61. Назарова, Л. Е Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии / Л. Е. Назарова, И.Н. Дьякова //Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – № 3. – С. 133-135.
62. Некоторые аспекты церебропротекторной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутиа коричной кислоты при ишемическом повреждении головного мозга в эксперименте / А.В. Воронков [и др.] //Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13, № 1.1 – С. 90-93.
63. Нечипуренко, Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко //Медицинские новости. – 2008. – Т. 1. – С. 7-13.
64. Новиков, Д.А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте / Д.А. Новиков, В.В. Новочадов. – Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.
65. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов [и др.] //Лабораторное дело. – 1989. – Т. 10. – С. 15-18.
66. Оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3, 5-дитретбутил коричной кислоты, мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга / А.В. Воронков [и др.] //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 48-52.
67. Оценка сенсомоторного дефицита в отдаленном периоде после ишемии/гипоксии головного мозга неонатальных крыс / Д.Н. Силачёв [и др.] //Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2013. – Т. 63, № 3. – С. 405.
68. Петрищев, Н.Н. Патогенетическое значение дисфункции эндотелия / Н.Н. Петрищев //Омский научный вестник. – 2005. – Т. 1. – С. 20-22.

69. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов – М.: Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
70. Поварова, О. В. Фармакологическая коррекция ишемического поражения головного мозга крыс при окклюзии средней мозговой артерии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Поварова Оксана Викторовна – М., 2003. – 26 с.
71. Поиск и изучение эндотелиопротекторной активности новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4 (1H)-она на фоне моделирования недостаточности половых гормонов / А.В. Воронков [и др.] //Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 285..
72. Пурас, Ю.В. Механизмы вторичного повреждения мозга и нейротрофическое действие церебролизина при черепно-мозговой травме / Ю.В. Пурас, А.Э. Талыпов, А.Ю. Кордонский //Нейрохирургия. – 2012. – № 4. – С. 94-102.
73. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – Т. 305. – 312 с.
74. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев [и др.] – М., 2005. – 832 с.
75. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при хронической ишемии мозга / Э.Ю. Соловьева, О.П. Миронова, О.А. Баранова [и др.]// Журн. Неврол. и псих. – 2008; – № 6. – С. 98-104.
76. Семененко, А.И. Состояние энергетического метаболизма головного мозга крыс на фоне введения некоторых инфузионных растворов при ишемии-реперфузии / А.И. Семененко //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 4 (58). – Р. 60-62.
77. Сергеева, Н. В. Анализ первичной инвалидности при цереброваскулярной патологии в Иркутской области за 2004-2008 гг / Н.В. Сергеева., В.В. Шпрах., В.С. Савков //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2010. – Т. 97, № 6. – С. 165-168.

78. Сернов Л.Н., Гацура В. В. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура – М., 2000. – 352 с.
79. 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.
80. Сочнев, В. С. Молекулярное моделирование и синтез новых НПВС в ряду производных 1Н-пиримидин-4-она / В.С. Сочнев //Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-25. – С. 5610-5613.
81. Сочнев, В. С. Поиск новых ингибиторов ЦОГ-2 в ряду сульфаниламидных производных 1Н-пиримидин-4-она / В.С. Сочнев //Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 11-5. – С. 694-695.
82. Сочнев, В.С. Синтез и изучение взаимосвязи "структура-активность" серосодержащих производных 1,3-диазинона-4: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Сочнев Вадим Сергеевич – Волгоград, 2016. – 166 с.
83. Спасенников Б.А. Оксипиридины в терапии острых цереброваскулярных расстройств / Б.А. Спасенников // Аллея науки. – 2018. – Т. 3, № 8 (24). – С. 7-10.
84. Сравнение антиоксидантной активности мексидола при повреждениях головного мозга различного генеза в эксперименте / А.В. Воронков [и др.] //Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 12.
85. Сравнительная оценка некоторых эффектов производных 3-оксипиридина и пиримидина в эксперименте / В.И. Инчина [и др.] //Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. 17, № 3. – С. 158-160.
86. Сравнительная церебропротекторная активность магния оксибутирата, магния сульфата и кавинтона при их профилактическом введении на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс / И.Н. Тюренков [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 3. – С. 3-8.
87. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили //Современные методы в биохимии.–М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

88. Султанов, В.С. Церебропротекторные и энергостабилизирующие эффекты полипренольного препарата ропрена при ишемии головного мозга у крыс / В.С. Султанов, П.Д. Шабанов, И.В. Зарубина //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2010. – Т. 8, № 3. – С. 31-47.
89. 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.
90. Фармакологическая активность производных пиримидинов / М.А. Самоутруева [и др.]// Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 10, № 1. – С. 12-29.
91. Фокальная ишемия головного мозга у крыс на фоне недостаточности эстрогенов и эндотелиальной дисфункции / А.А. Литвинов [и др.]//Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2017. – Т. 117, № 8. – С. 56-62.
92. Фуроксанопиримидины как экзогенные доноры оксида азота / Граник В. Г. [и др.] //Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 10. – С. 7-11.
93. Характеристика сдвигов в системе про-/антиоксиданты у крыс с моделью острой локальной церебральной ишемии / В.Д. Левичкин [и др.] //Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9-4. – С. 683-686.
94. Ходаковский, А. А. Влияние адемола на показатели энергетического обмена в головном мозге крыс с моделью острой церебральной ишемии / А.А. Ходаковский //Буковинский медицинский вестник. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 66.
95. Целенаправленный синтез n-пептидных производных пиримидин-4(1H)-она, обладающих церебропротекторными свойствами / И.С. Луговой [и др.] //Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 8. – Режим доступа: <https://clinical-journal.co.uk/gallery/195-199-19-8.pdf>
96. Чумаков, В.Н. Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // Вопр. мед.химии. – 1977. - № 5. – С. 712 – 716.

97. Шавловская, О.А. Кавинтон комфорте в коррекции когнитивных нарушений при хронической ишемии головного мозга / О.А. Шавловская, А.Б. Локшина, Д.А. Гришина //Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, № 8. – С. 61-65.
98. Экспериментальные модели сосудистых поражений головного мозга (обзор литературы) / И.А. Васильев [и др.]//Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1-3. – Режим доступа: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=34894>
99. Эндотелиопротекторы—новый класс фармакологических препаратов / И.Н. Тюренков [и др.] //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67, № 7. – С. 50-57.
100. Эпидемиология инсультов: ведущие факторы риска и направления профилактики / О.С. Ефимова [и др.]//Уральский медицинский журнал. – 2008. – № 8. – С. 43-46.
101. Эффективность цитофлавина в терапии энцефалопатий у больных нейроинфекциями / В.А. Исаков [и др.] //Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55, № 1-2. – С. 36-41.
102. Abdel Moty S.G., Hussein M.A., Abdel Aziz S.A., Abou-Salim M.A. Design and synthesis of some substituted thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives of potential biological activities //Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ. – 2016. – Vol. 24(2). – P. 119-132.
103. Abubakar I.I., Tillmann T., Banerjee A. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 //Lancet. – 2015. – Vol. 385, № 9963. – P. 117-171.
104. Agarwal S., Sud K., Shishehbor M.H. Nationwide trends of hospital admission and outcomes among critical limb ischemia patients: from 2003–2011 //Journal of the American College of Cardiology. – 2016. – Vol. 67, № 16. – P. 1901-1913.
105. Ahmad M., Zhang Y., Liu H. [et al.]. Prolonged opportunity for neuroprotection in experimental stroke with selective blockade of cyclooxygenase-2 activity //Brain Res. – 2009. – Vol. 1279. – P. 168–173.

106. Ahmed S., Meng H., Liu T. [et al.]. Ischemic stroke selectively inhibits REM sleep of rats //Experimental neurology. – 2011. – Vol. 232, № 2. – P. 168-175.
107. Allen C.L., Bayraktutan U.. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke //International Journal of Stroke. – 2009. – Vol. 4. – P. 461–470.
108. Alsina-Sanchis E., Figueras A., Lahiguera Á. [et al.]. The TGFβ pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation by increasing IGF1R levels //International journal of cancer. – 2016. – Vol. 139, №. 8. – P. 1894-1903.
109. Álvarez X.A., Lombardi V.R.M., Fernández-Novoa L. [et al.]. Cerebrolysin® reduces microglial activation in vivo and in vitro: a potential mechanism of neuroprotection //Advances in Dementia Research. – Springer, Vienna, 2000. – P. 281-292.
110. Amudha M., Rani S. Evaluation of in vitro antioxidant potential of Cordia retusa //Indian journal of pharmaceutical sciences. – 2016. – Vol. 78, № 1. – P. 80.
111. Anupama B., Dinda S.C., Prasad Y.R., Rao A.V. Synthesis and antimicrobial activity of some new 2,4,6-trisubstituted pyrimidines //Int. J. Res. Pharm. Chem. – 2012. – Vol. 2(2). – P. 231–236.
112. Ashour H.M., Shaaban O.G., Rizk O.H., El-Ashmawy I.M. Synthesis and biological evaluation of thieno [2',3':4,5]pyrimido[1,2-b][1,2,4]triazines and thieno[2,3-d] [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines as anti-inflammatory and analgesic agents //Eur. J. Med. Chem. – 2013. – Vol. 62. – P. 341–351.
113. Atochin D.N., Chernysheva G.A., Smolyakova V.I. [et al.]. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats //Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23, № 7. – P. 784-792.
114. Azar A.H., Oryan S., Bohlooli S. [et al.]. Alpha-tocopherol reduces brain edema and protects blood-brain barrier integrity following focal cerebral ischemia in rats //Medical Principles and Practice. – 2017. – Vol. 26, № 1. – P. 17-22.
115. Ba X.H., Cai L.P., Han W. Effect of cilostazol pretreatment on the PARP/AIF-mediated apoptotic pathway in rat cerebral ischemia-reperfusion models //Experimental and therapeutic medicine. – 2014. – Vol. 7, №. 5. – P. 1209-1214.

116. Babu C.S., Ramanathan M. Pre-ischemic treatment with memantine reversed the neurochemical and behavioural parameters but not energy metabolites in middle cerebral artery occluded rats //Pharmacol. Biochem. Behav. – 2009. – Vol. 92(3). – P. 424–432.
117. Bachour S. P., Hevesi M., Bachour O. [et al.]. Comparisons between Garcia, Modo, and Longa rodent stroke scales: Optimizing resource allocation in rat models of focal middle cerebral artery occlusion //Journal of the neurological sciences. – 2016. – Vol. 364. – P. 136-140.
118. Bano D., Prehn J.H.M. Apoptosis-inducing factor (AIF) in physiology and disease: the tale of a repented natural born killer //EBioMedicine. – 2018.
119. Bardeleben C., Sharma S., Reeve J.R. [et al.]. Metabolomics identifies pyrimidine starvation as the mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -ribose (AICAr) induced apoptosis in multiple myeloma cells //Molecular cancer therapeutics. – 2013. – Vol. 12(7). – P. 1310-1321.
120. Bauer G. Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells //Redox biology. – 2015. – Vol. 6. – P. 353-371.
121. Beck T., Lindholm D., Castren E., Wree A. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus //J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1994. – Vol. 14(4). – P. 689–692.
122. Bederson J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M. [et al.]. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination //Stroke. – 1986. – Vol. 17, № 3. – P. 472-476.
123. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E. [et al.]. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association //Circulation. – 2017. – Vol. 135, № 10. – P. e146.
124. Bernauer W. Inhibiting effect of dexamethasone on evolving myocardial necrosis in coronary-ligated rats, with and without reperfusion //Pharmacology. – 1985. – Vol. 31, № 6. – P. 328-336.

125. Bhalgat C.M., Ali M.I., Ramesh B., Ramu G. Novel pyrimidine and its triazole fused derivatives: synthesis and investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity //Arab J Chem. – 2014. – Vol. 7. – P. 986–993.
126. Bhaskar S., Stanwell P., Cordato D. [et al.]. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? //BMC neurology. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 8.
127. Bloch S., Obari D., Girouard H. Angiotensin and neurovascular coupling: Beyond hypertension //Microcirculation. – 2015. – Vol. 22. – P.159–167.
128. Blodgett D.M., Graybill C., Carruthers A. Analysis of glucose transporter topology and structural dynamics //Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 52. – P. 36416-36424.
129. Boehme A.K., Esenwa C., Elkind M. S. V. Stroke risk factors, genetics, and prevention //Circulation research. – 2017. – Vol. 120, № 3. – P. 472-495.
130. Bondarenko N.A. Anxiety and the Problem of “Inattentive” Animals in Water Maze Tests //The Russian Journal of Cognitive Science. – 2017. – Vol. 4, № 4. – P. 45-51.
131. Bonde C., Noraberg J., Zimmer J. Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures //Neuroscience Letters. – 2002. – Vol. 327. – P. 49–52.
132. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal //Nature. – 1962. – Vol. 194, № 4832. – P. 927-929.
133. Broughton B.R.S., Reutens D.C., Sobey C.G. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia //Stroke. – 2009. – Vol. 40. – P. E331–E339.
134. Brunelli L., Yermilov V., Beckman J.S. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide //Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 30, № 7. – P. 709-714.
135. Calcium Assay Kit (Colorimetric) (ab102505) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.abcam.com/ab102505
136. Caliskan M., Mogulkoc R., Baltaci A.K. [et al.]. The Effect of 3', 4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxidation in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury //Neurochemical research. – 2016. – Vol. 41, № 7. – P. 1732-1740.

137. Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation //Pharmacol. Rev. – 2004. – Vol. 56(1). – P. 1–29.
138. Cheng Y.D., Al-Khoury L., Zivin J.A. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure //NeuroRx. – 2004. – Vol. 1(1). – P. 36–45.
139. Cheng Y-C., Sheen J-M., Hu W.L., Hung Y-C. Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke //Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – Vol. 2017. – P. 8526438.
140. Choi Y.H., Gwon A.R., Jeong H.Y. [et al.]. Contribution of gamma-secretase to calcium-mediated cell death //Neuroscience Letters. – 2010. – Vol. 469. – P. 425–428.
141. Coffey E. T. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons //Nature Reviews Neuroscience. – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 285.
142. Combs D. J., D'alecy L. G. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1, 3-butanediol //Stroke. – 1987. – Vol. 18, № 2. – P. 503-511.
143. Crepaldi P., Cacciari B., Bonache M.C. [et al.]. 6-Amino-2-mercapto-3H-pyrimidin-4-one derivatives as new candidates for the antagonism at the P2Y₁₂ receptors //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2009. – Vol. 17, № 13. – P. 4612-4621.
144. Cui L., Golubczyk D., Jolkkonen J. Top 3 Behavioral Tests in Cell Therapy Studies After Stroke: Difficult to Stop a Moving Train //Stroke. – 2017. – Vol. 48, № 11. – P. 3165-3167.
145. Czarnecka E., Pietrzak B. The effect of ethanol and calcium channel antagonists on rabbit EEG //Alcohol. – 1996. – Vol. 13, № 3. – P. 221-226.
146. Сравнительная антиоксидантная и антигипоксическая активность нового производного 1,4-дигидро-4-оксопиримидина — соединения PDMPT · HCL и мексидола / Е.В. Петрова, Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди, Е.Н. Жогло // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 6. – С. 38-40.
147. Davis M.F., Lay C., Frostig R.D. Permanent cerebral vessel occlusion via double ligature and transection //Journal of visualized experiments: JoVE. – 2013. – № 77. – P. 50418.

148. Dayoub H., Rodionov R.N., Lynch C. [et al.]. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation //Stroke. – 2008. – Vol. 39. – P. 180–184.
149. De Silva T.M., Faraci F.M. Microvascular dysfunction and cognitive impairment //Cell Molec Neurobiol. – 2016. – Vol. 36. – P. 241–258.
150. De Silva T.M., Faraci F.M. Microvascular dysfunction and cognitive impairment //Cell Molec. Neurobiol. – 2016. – Vol.36. – P. 241–258.
151. del Zoppo G.J., Milner R., Mabuchi T. [et al.]. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia //Stroke. – 2007. – Vol. 38. – P. 646–651.
152. Devraj K., Klinger M.E., Myers R.L. [et al.]. GLUT-1 glucose transporters in the blood–brain barrier: Differential phosphorylation //Journal of neuroscience research. – 2011. – Vol. 89, № 12. – P. 1913-1925.
153. Dreschers S., Gille C., Haas M. [et al.]. Infection–induced Bystander-Apoptosis of Monocytes Is TNF-alpha-mediated //PloS one. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. e53589.
154. El-Mekabaty A., Habib O.M., Moawad E.B. [et al.]. Synthesis and Antioxidant Activity of New Pyrazolo[1,5-*a*]Pyrimidine Derivatives Incorporating a Thiazol-2-yl diazenyl Moiety //Journal of Heterocyclic Chemistry. – 2016. – Vol. 53, № 6. – P. 1820-1826.
155. Esfahanizadeh M., Mohebbi S., Bozorg B.D. [et al.]. Synthesis and Antiplatelet Aggregation Activity Evaluation of some 2-Aminopyrimidine and 2-Substituted-4, 6-diaminopyrimidine Derivatives //Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 417.
156. Fan C., Zhang L., He Z. [et al.]. Reduced Severity of Outcome of Recurrent Ipsilateral Transient Cerebral Ischemia Compared with Contralateral Transient Cerebral Ischemia in Rats //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2017. – Vol. 26, № 12. – P. 2915-2925.
157. Fandy T., Jiemjit A., Thakar M. [et al.]. Decitabine induces delayed reactive oxygen species (ROS) accumulation in leukemia cells and induces the expression of

- ROS generating enzymes //Clinical Cancer Research. – 2014. – Vol. 20, № 5. – P. 1249-1258.
158. Faraci F.M. Protecting against vascular disease in brain //American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2011. – Vol. 300(5). – P. H1566-H1582.
159. Faraco G., Moraga A., Moore J. [et al.]. Circulating endothelin-1 alters critical mechanisms regulating the cerebral microcirculation //Hypertension. – 2013. – Vol. 62(4). – P. 759-766.
160. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D. A., [et al.]. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review //The Lancet Neurology. – 2009. – Vol. 8, № 4. – P. 355-369.
161. Ferreira D.M.S., Afonso M. B., Rodrigues P.M. [et al.]. c-Jun N-terminal kinase 1/c-Jun activation of the p53/microRNA 34a/sirtuin 1 pathway contributes to apoptosis induced by deoxycholic acid in rat liver //Molecular and cellular biology. – 2014. – Vol. 34, № 6. – P. 1100-1120.
162. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function //European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33(7). – P. 829-837.
163. Fuchs S. Y., Adler V., Buschmann T. [et al.]. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells //Genes & development. – 1998. – Vol. 12, № 17. – P. 2658-2663.
164. Fuchs S. Y., Adler, V., Pincus M. R. [et al.]. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95, № 18. – P. 10541-10546.
165. Gabryel B., Adamek M., Pudełko A. [et al.]. Piracetam and vinpocetine exert cytoprotective activity and prevent apoptosis of astrocytes in vitro in hypoxia and reoxygenation //Neurotoxicology. – 2002. – Vol. 23, № 1. – P. 19-31.
166. Garcia J.H., Wagner S., Liu K.F. [et al.]. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation //Stroke. – 1995. – Vol. 26, № 4. – P. 627-635.

167. Gelderblom M., Leyboldt F., Steinbach K. [et al.]. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke //Stroke. – 2009. – Vol. 40. – P. 1849–1857.
168. Giuliani D., Ottani A, Mioni C. [et al.]. Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins //Eur. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 570(1-3). – P. 57–65.
169. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. [et al.]. Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update: A Report From the American Heart Association //Circulation. – 2014. – Vol. 129(3). – P. e28-e292.
170. Gorgoni M., D'Atri A., Lauri G. [et al.]. Is sleep essential for neural plasticity in humans, and how does it affect motor and cognitive recovery? //Neural plasticity. – 2013. – Vol. 2013.
171. Guan Y. Q., Lu B. X. Modified neurological tests for evaluating the severity of cerebral infarction and estimating the infarct area in rats //Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University. – 2009. – Vol. 29, № 1. – P. 114-117.
172. Gulyás B. Halldin, C., Karlsson, P. [et al.]. Brain uptake and plasma metabolism of [11C] vinpocetine: a preliminary PET study in a cynomolgus monkey //Journal of Neuroimaging. – 1999. – Vol. 9, № 4. – P. 217-222.
173. Gupta J. K., Chaudhary A., Dudhe R. [et al.]. A review on the synthesis and therapeutic potential of pyrimidine derivatives // International journal of pharmaceutical sciences and research. – 2010. № 1. – P. 34-49.
174. Gupta P., Dixit D., Sen E. Oncrasin targets the JNK-NF- κ B axis to sensitize glioma cells to TNF α -induced apoptosis //Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 34, № 2. – P. 388-396.
175. Hajipour S., Sarkaki A., Mohammad S. [et al.]. Motor and cognitive deficits due to permanent cerebral hypoperfusion/ischemia improve by pomegranate seed extract in rats //Pakistan journal of biological sciences: PJBS. – 2014. – Vol. 17, № 8. – P. 991-998.

176. Han D., Sun M., He P.P. [et al.]. Ischemic postconditioning alleviates brain edema after focal cerebral ischemia reperfusion in rats through down-regulation of aquaporin-4 //Journal of Molecular Neuroscience. – 2015. – Vol. 56, № 3. – P. 722-729.
177. Hartbauer M., Hutter-Paier B., Skofitsch G. [et al.]. Antiapoptotic effects of the peptidergic drug cerebrolysin on primary cultures of embryonic chick cortical neurons //Journal of neural transmission. – 2001. – Vol. 108, № 4. – P. 459-473.
178. Hattori Y., Kitamura A., Tsuji M. [et al.]. Motor and cognitive impairment in a mouse model of ischemic carotid artery disease //Neuroscience letters. – 2014. – Vol. 581. – P. 1-6.
179. Hayashi T., Itoyama Y., Abe K. Vascular Endothelial Growth Factor: Protection Against Ischemic Brain Damage with MCA Occlusion in Rats //Ischemic Blood Flow in the Brain. – Springer, Tokyo, 2001. – P. 120-127.
180. He J., Lu X., Wei T. [et al.]. Asperuloside and Asperulosidic Acid Exert an Anti-Inflammatory Effect via Suppression of the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages //International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, № 7. – P. 2027.
181. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective //Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 289-309.
182. Hu G., Wu Z., Yang F. [et al.]. Ginsenoside Rd blocks AIF mitochondrio-nuclear translocation and NF- κ B nuclear accumulation by inhibiting poly (ADP-ribose) polymerase-1 after focal cerebral ischemia in rats //Neurological Sciences. – 2013. – Vol. 34, № 12. – P. 2101-2106.
183. Im J.Y., Kim D., Paik S.G., Han P.L. Cyclooxygenase-2-dependent neuronal death proceeds via superoxide anion generation //Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – Vol. 41. – P. 960–972.
184. Ishikawa M., Zhang J.H., Nanda A. [et al.]. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation //Frontiers in Bioscience. – 2004. – Vol. 9. – P. 1339–1347.
185. Iwata N., Okazaki M., Xuan M. [et al.]. Orally administrated ascorbic acid suppresses neuronal damage and modifies expression of SVCT2 and GLUT1 in the

- brain of diabetic rats with cerebral ischemia-reperfusion //Nutrients. – 2014. – Vol. 6, № 4. – P. 1554-1577.
186. Jarrah A.A., Schwarskopf, M., Wang E.R. [et al.]. SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes //Apoptosis. – 2018. – Vol. 23, № 1. – P. 79-91.
187. Jiang S., Li T., Ji T. [et al.]. AMPK: potential therapeutic target for ischemic stroke //Theranostics. – 2018. – Vol. 8, № 16. – P. 4535.
188. Jiang Z.G., Lu X.C., Nelson V. [et al.]. A multifunctional cytoprotective agent that reduces neurodegeneration after ischemia //Proc. Natl. Acad Sci U S A. – 2006. – Vol. 103(5). – P. 1581–1586.
189. Joosten M.M., Pai J.K., Bertoia M.L. [et al.]. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men //Jama. – 2012. – Vol. 308, № 16. – P. 1660-1667.
190. Jordan K. G. Emergency EEG and continuous EEG monitoring in acute ischemic stroke //Journal of Clinical Neurophysiology. – 2004. – Vol. 21, № 5. – P. 341-352.
191. Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M. [et al.]. Ischemia/reperfusion //Comprehensive Physiology. – 2016. – Vol. 7(1). – P. 113-170.
192. Kelly K.M., Jukkola P.I., Kharlamov E.A. [et al.]. Long-term video-EEG recordings following transient unilateral middle cerebral and common carotid artery occlusion in Long–Evans rats //Experimental neurology. – 2006. – Vol. 201, № 2. – P. 495-506.
193. Kharlamov A., Jones S.C., Kim D.K. Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats //Exp. Brain Res. – 2002. – Vol. 147(3). – P. 353–359.
194. Khutornenko A.A., Roudko V.V., Chernyak B.V. [et al.]. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107(29). – P. 12828-12833.
195. Koh P.O. Melatonin prevents the injury-induced decline of Akt/forkhead transcription factors phosphorylation //J. Pineal. Res. – 2008. – Vol. 45(2). – P. 199–203.

196. Krnjević K. Electrophysiology of cerebral ischemia //Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 319-333.
197. Kumar R., Crouthamel M.C., Rominger D.H. [et al.]. Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase angiogenesis inhibitors //British journal of cancer. – 2009. – Vol. 101, № 10. – P. 1717.
198. Lang J.D. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury // Chest. – 2002. – Vol. 122, № 6. – P. 314-320.
199. Leemburg S., Gao B., Cam E. [et al.]. Power spectrum slope is related to motor function after focal cerebral ischemia in the rat //Sleep. – 2018. – Vol. 41, № 10. – P. zsy132.
200. Lees K.R., Bluhmki E., Von Kummer R. [et al.]. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials //The Lancet. – 2010. – Vol. 375, № 9727. – P. 1695-1703.
201. Legos J.J., Tuma R.F., Barone F.C. Pharmacological interventions for stroke: failures and future //Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2002. – Vol. 11. – P. 603–614.
202. Li M., Yang X., Wang S. PTEN enhances nasal epithelial cell resistance to TNF α -induced inflammatory injury by limiting mitophagy via repression of the TLR4-JNK-Bnip3 pathway //Molecular medicine reports. – 2018. – Vol. 18, № 3. – P. 2973-2986.
203. Li Q., Huth S., Adam D. [et al.]. Reinforcement of integrin-mediated T-Lymphocyte adhesion by TNF-induced Inside-out Signaling //Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 30452.
204. Li Y.F., Ren L.N., Guo G. [et al.]. Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: an exploration from hypothesis to therapy //Journal of hematology & oncology. – 2015. – Vol. 8, № 1. – P. 33.
205. Liu C., Wu J., Xu K. [et al.]. Neuroprotection by baicalein in ischemic brain injury involves PTEN/AKT pathway //J. Neurochem. – 2010. – Vol. 112(6). – P. 1500–1512.

206. Lopez M.S., Vemuganti R. Modeling Transient Focal Ischemic Stroke in Rodents by Intraluminal Filament Method of Middle Cerebral Artery Occlusion //Traumatic and Ischemic Injury. – Humana Press, New York, NY, 2018. – P. 101-113.
207. Lopez-Cancio E., Galan A., Dorado L. [et al.]. Biological signatures of asymptomatic extra- and intracranial atherosclerosis: The Barcelona-Asia study //Stroke. – 2012. – Vol. 43. – P. 2712–2719.
208. Marcocci L., Maguire J.J., Droy-Lefaix M.T. [et al.]. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761 //Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol. 201, № 2. – P. 748–755.
209. Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke //Cell and Tissue Research. – 2000. – Vol. 301. – P. 173–187.
210. Mattson M.P., Duan, W., Pedersen, W.A. [et al.]. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases //Apoptosis. – 2001. – Vol. 6, № 1-2. – P. 69-81.
211. McGraw C.P., Pashayan A.G., Wendel O.T. Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment //Stroke. – 1976. – Vol. 7, № 5. – P. 485-488.
212. Mehta S.L., Manhas N., Rahubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics //Brain Research Reviews. – 2007. – Vol. 54. – P. 34–66.
213. Meneghesso S., Vanderlinden E., Stevaert A. [et al.]. Synthesis and biological evaluation of pyrimidine nucleoside monophosphate prodrugs targeted against influenza virus //Antivir Res. – 2012. – Vol. 94. – P. 35–43.
214. Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A. [et al.]. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models //Metabolic brain disease. – 2004. – Vol. 19, № 3-4. – P. 151-167.
215. Meschia J.F., Bushnell C., Boden-Albala B. [et al.]. Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association //Stroke. – 2014 – Vol. 45(12) – P. 3754-3832.

216. Milasta S., Dillon C.P., Sturm O.E. [et al.]. Apoptosis-inducing-factor-dependent mitochondrial function is required for T cell but not B cell function //Immunity. – 2016. – Vol. 44, № 1. – P. 88-102.
217. Minero V. G., Khadjavi A., Costelli P. [et al.]. JNK activation is required for TNF α -induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells //International immunopharmacology. – 2013. – Vol. 17, № 1. – P. 92-98.
218. National Center for Health Statistics US et al. Health, United States, 2015: with special feature on racial and ethnic health disparities. – 2016.
219. Okun E., Griffioen K.J., Lathia J.D. [et al.]. Toll-like receptors in neurodegeneration //Brain Research Reviews. – 2009. – Vol. 59. – P. 278–292.
220. Ooi H.K., Ma L. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway //BMC systems biology. – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 65.
221. Ouyang Y.B., Xu L., Lu Y. [et al.]. Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia //Glia. – 2013. – Vol. 61, № 11. – P. 1784-1794.
222. Panda S. S., Chowdary P.V.R. Synthesis of novel indolyl-pyrimidine antiinflammatory, antioxidant and antibacterial agents //Indian journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – Vol. 70, № 2. – P. 208.
223. Pandya R.S., Mao L., Zhou H. [et al.]. Central Nervous System Agents for Ischemic Stroke: Neuroprotection Mechanisms //Central nervous system agents in medicinal chemistry. – 2011. – Vol. 11(2). – P. 81-97.
224. Patel S.P., Sullivan, P.G., Pandya, J.D. [et al.]. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma //Experimental neurology. – 2014. – Vol. 257. – P. 95-105.
225. Poignet H.E. Beaughard M., Lecoin G. [et al.]. Functional, behavioral, and histological changes induced by transient global cerebral ischemia in rats: effects of cinnarizine and flunarizine //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1989. – Vol. 9, № 5. – P. 646-654.

226. Porter T.R., Kaminsky W., Mayer J.M. Preparation, Structural Characterization, and Thermochemistry of an Isolable 4-Arylphenoxyl Radical //The Journal of organic chemistry. – 2014. – Vol. 79, № 20. – P. 9451-9454.
227. Qian Z., Li Y., Chen J. [et al.]. miR-4632 mediates PDGF-BB-induced proliferation and antiapoptosis of human pulmonary artery smooth muscle cells via targeting cJUN //American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2017. – Vol. 313, № 4. – P. C380-C391.
228. Rabiller G., He J.W., Nishijima Y. [et al.]. Perturbation of brain oscillations after ischemic stroke: a potential biomarker for post-stroke function and therapy //International journal of molecular sciences. – 2015. – Vol. 16, № 10. – P. 25605-25640.
229. Rani J., Kumar S., Saini M. [et al.]. Biological potential of pyrimidine derivatives in a new era //Res. Chem. Intermed. – 2016. – Vol. 42. – P. 6777–6804.
230. Rizzello C.G., Coda R., Macías D.S. [et al.]. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the functional features of Echinacea spp //Microbial cell factories. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 44.
231. Robinson A. A., Ikuta K., Soverow J. Anticoagulation for the acute management of ischemic stroke //The Yale journal of biology and medicine. – 2014. – Vol. 87, № 2. – P. 199.
232. Robinson T., Zaheer Z., Mistri A.K. Thrombolysis in acute ischaemic stroke: an update //Ther Adv Chronic Dis. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 119-131.
233. Rodrigo R., Fernández-Gajardo R., Gutiérrez R. [et al.]. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities // CNS NeurolDisord Drug Targets. – 2013. – Vol. 12. – P. 698–714.
234. Roger V.L., Alan S.G., Donald M. L. [et al.]. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association //Circulation. – 2011. – Vol. 123, № 4. – P. e18-e209.
235. Sandhu G.S., Sunshine J. L. Advanced neuroimaging to guide acute stroke therapy //Current cardiology reports. – 2012. – Vol. 14, № 6. – P. 741-753.

236. Schallert T., Woodlee M.T., Fleming S.M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury //Pharmacology of cerebral ischemia. – 2002. – Vol. 2002. – P. 201-216.
237. Schurr A. Cerebral glycolysis: a century of persistent misunderstanding and misconception //Frontiers in neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – P. 360.
238. Sestakova N., Puzserova, A., Kluknavsky, M. [et al.]. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide //Interdisciplinary toxicology. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 126-135.
239. Shrivastava S., Bera T., Singh S.K. [et al.]. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles //ACS Nano. – 2009. – Vol. 3(6). – P. 1357–1364.
240. Shukla V., Shakya A.K., Perez-Pinzon M.A. [et al.]. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective //Journal of Neuroinflammation. – 2017. – Vol. 14. – P. 21.
241. Sitges M., Aldana B. I., Reed R.C. Effect of the anti-depressant sertraline, the novel anti-seizure drug vinpocetine and several conventional antiepileptic drugs on the epileptiform EEG activity induced by 4-aminopyridine //Neurochemical research. – 2016. – Vol. 41, № 6. – P. 1365-1374.
242. Soares L.M., Schiavon A. P., Milani H. [et al.]. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice //Behavioural brain research. – 2013. – Vol. 249. – P. 28-37.
243. Song J., Yoo J., Kwon A. [et al.]. Structure-Activity Relationship of Indole-Tethered Pyrimidine Derivatives that Concurrently Inhibit Epidermal Growth Factor Receptor and Other Angiokinases //PloS one. – 2015. – Vol. 10, № 9. – P. e0138823.
244. Song Y., Wei E.Q., Zhang W.P. [et al.]. Minocycline protects PC12 cells from ischemic-like injury and inhibits 5-lipoxygenase activation //Neuroreport. – 2004. – Vol. 15(14). – P. 2181–2184.
245. Suh S.W., Shin B.S., Ma H.L. [et al.]. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke //Annals of Neurology. – 2008. – Vol. 64. – P. 654–663.

246. Sun W.H., He F., Zhang N.N. [et al.]. Time dependent neuroprotection of dexamethasone in experimental focal cerebral ischemia: The involvement of NF- κ B pathways //Brain research. – 2018. – Vol. 1701. – P. 237-245.
247. Szatmári S., Whitehouse P. Vinpocetine for cognitive impairment and dementia //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2003. – № 1.
248. Terasaki Y., Liu Y., Hayakawa K. [et al.]. Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain //Current medicinal chemistry. – 2014. – Vol. 21, № 18. – P. 2035-2042.
249. Thundyil J., Tang S.C., Okun E. [et al.]. Evidence that adiponectin receptor 1 activation exacerbates ischemic neuronal death //Exp. Transl. Stroke Med. – 2010. – Vol. 2. – P. 15.
250. Tókécs T., Varga, G., Garab, D. [et al.]. Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat //International journal of radiation biology. – 2014. – Vol. 90, № 1. – P. 1-6.
251. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., di Sciacca R. [et al.]. Inflammatory Cytokines in Acute Ischemic Stroke //Current Pharmaceutical Design. – 2008. – Vol. 14. – P. 3574–3589.
252. Tyson R., Peeling J., Sutherland G. Metabolic changes associated with altering blood glucose levels in short duration forebrain ischemia //Brain research. – 1993. – Vol. 608, № 2. – P. 288-298.
253. Vecino R., Burguete M. C., Jover-Mengual T. [et al.]. The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia //Scientific reports. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1610.
254. Velená A., Zarkovic N., Gall Troselj K. [et al.]. 1,4-Dihydropyridine Derivatives: Dihydronicotinamide Analogues—Model Compounds Targeting Oxidative Stress //Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – Vol. 2016.
255. Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I. Endothelotropic activity of 4-hydroxy-3, 5-di-tert-butylcinnamic acid in the conditions of experimental cerebral ischemia //Research Results in Pharmacology. – 2018. – Vol. 4. – P. 1.

256. Wakayama K., Shimamura M., Sata M. [et al.]. Quantitative measurement of neurological deficit after mild (30 min) transient middle cerebral artery occlusion in rats //Brain research. – 2007. – Vol. 1130. – P. 181-187.
257. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents //Nature protocols. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 322.
258. Wang H., Zhang K., Zhao L. [et al.]. Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia–reperfusion injury //Neuroscience letters. – 2014. – Vol. 566. – P. 247-251.
259. Wang J., Zhang Y. L., Zhuang N. Salidroside inhibits inflammatory factor release in BV-2 cells through p38 and JNK pathways //Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]. – 2018. – Vol. 70, № 3. – P. 245-252.
260. Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases //CNS Neurosci Ther. – 2009. – Vol. 15(4). – P. 345–357.
261. Wang X., Figueroa B.E., Stavrovskaya I.G. [et al.]. Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome C release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury //Stroke. – 2009. – Vol. 40(5). – P. 1877–1885.
262. Wei L., Wei Z.Z., Jiang M.Q. [et al.]. Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke //Progress in neurobiology. – 2017. – Vol. 157. – P. 49-78.
263. Wei L., Yu S.P., Gottron F. [et al.]. Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo //Stroke. – 2003. – Vol. 34(5). – P. 1281–1286.
264. Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M. [et al.]. The estimation of red cell superoxide dismutase activity //J. Lab. Clin. Med. – 1975. – Vol. 85, № 2. – P. 337–341.
265. Won S.J., Kim D.Y., Gwag B.J. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death //Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2002. – Vol. 35. – P. 67–86.

266. Wood E.R., Mumby D.G., Pinel J.P. [et al.]. Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus //Behavioral neuroscience. – 1993. – Vol. 107, № 1. – P. 51.
267. Wu H. Y., Wang Y., Han W. Effects of Acupuncture Stimulation on Dynamic Changes of Cerebral TNF- α and C-reaction Protein Levels in Cerebral Ischemia-reperfusion Rats //Zhen ci yan jiu= Acupuncture research. – 2015. – Vol. 40, № 3. – P. 215-218.
268. Wu L. F., Xing Y., Guan Y.L. [et al.]. Protective effect of jiedu tongluo injection on cerebral edema in rats with lesion of cerebral ischemia/reperfusion //Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica. – 2014. – Vol. 39, № 6. – P. 1088-1092.
269. Wu L.R. Liu L., Xiong X.Y. [et al.]. Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling //Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, № 46. – P. 80315.
270. Yamaguchi T., Sano K., Takakura K. [et al.]. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group //Stroke. – 1998. – Vol. 29(1). – P. 12–17.
271. Yamamoto M., Shima T., Uozumi T. [et al.]. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration //Stroke. – 1983. – Vol. 14, № 6. – P. 977-982.
272. Yang J-L., Mukda S., Chen S-D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke //Redox Biology. – 2018. – Vol. 16. – P. 263-275.
273. Yang Y., Li Q., Shuaib A. Enhanced neuroprotection and reduced hemorrhagic incidence in focal cerebral ischemia of rat by low dose combination therapy of urokinase and topiramate //Neuropharmacology. – 2000. – Vol. 39(5). – P. 881–888.
274. Yu J., Moon J., Jang J. [et al.]. Reliability of behavioral tests in the middle cerebral artery occlusion model of rat //Laboratory animals. – 2018. – P. 0023677218815210.
275. Yu S., Zhao T., Guo M. [et al.]. Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after

acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes //Brain research. – 2008. – Vol. 1211. – P. 22-29.

276. Yuan Z., Cao K., Lin C. [et al.]. The p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) chemosensitizes intrinsically resistant ovarian cancer cells to cisplatin by lowering the threshold set by Bcl-xL and Mcl-1 //Molecular Medicine. – 2011. – Vol. 17, № 11-12. – P. 1262.

277. Yun N., Lee Y.M., Kim C. [et al.]. Anamorsin, a novel caspase-3 substrate in neurodegeneration //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – P. jbc. M114. 552679.

278. Zeke A., Misheva M., Reményi A. [et al.]. JNK signaling: regulation and functions based on complex protein-protein partnerships //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2016. – Vol. 80, № 3. – P. 793-835.

279. Zhai Z., Feng J. Left-right asymmetry influenced the infarct volume and neurological dysfunction following focal middle cerebral artery occlusion in rats //Brain and behavior. – 2018. – Vol. 8, № 12. – P. e01166.

280. Zhang Y.B., Kan M.Y., Yang Z.H. [et al.]. Neuroprotective effects of N-stearoyltyrosine on transient global cerebral ischemia in gerbils //Brain research. – 2009. – Vol. 1287. – P. 146-156.

281. Zhao H., Han Z., Ji X., Luo Y. Epigenetic Regulation of Oxidative Stress in Ischemic Stroke //Aging and Disease. – 2016. – Vol. 7(3). – P. 295-306.

282. Zhao H., Joseph J., Fales H.M. [et al.]. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102, № 16. – P. 5727-5732.

283. Zhao Y., Coloff J.L., Ferguson E.C. [et al.]. Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation //Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 52. – P. 36344-36353.

284. Zheng M. [et al.]. Netrin-1 Promotes Synaptic Formation and Axonal Regeneration via JNK1/c-Jun Pathway after the Middle Cerebral Artery Occlusion //Frontiers in cellular neuroscience. – 2018. – Vol. 12. – P. 13.

285. Zheng Z., Yenari M.A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications //Neurological Research. – 2004. – Vol. 26 – P. 884–892.
286. Zimmerman M.C., Clemens D.L., Duryee M.J. [et al.]. Direct antioxidant properties of methotrexate: Inhibition of malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation and superoxide scavenging //Redox biology. – 2017. – Vol. 13. – P. 588-593.
287. Zvejniece L., Svalbe B., Liepinsh E. [et al.]. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90-and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery //Journal of neuroscience methods. – 2012. – Vol. 208, № 2. – P. 197-204.