

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

На правах рукописи

Геращенко Анастасия Дмитриевна

**АКТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ
КИСЛОТЫ И ФЛАВОНОИДОВ НА ФОНЕ ФИЗИЧЕСКИХ И
ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ ПЕРЕГРУЗОК ЖИВОТНЫХ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Воронков Андрей Владиславович

Пятигорск - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Снижение психо-физической работоспособности. Современное состояние проблемы и медико-социально-экономические аспекты.....	13
1.2. Патофизиологические особенности психо-физической дисфункции.....	14
1.3. Медикаментозная коррекция психо-физического утомления. Актопротекторы.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. Характеристика объектов исследования.....	31
2.2. Лабораторные животные.....	31
2.3. Этапы проведения исследования и дизайн исследования.....	35
2.3.1. Модели физических и психоэмоциональных перегрузок.....	37
2.3.2. Модель оценки психоэмоционального статуса.....	39
2.3.3. Метод оценки биохимических показателей.....	40
2.3.4. Метод оценки дыхательной функции эритроцитов и митохондрий мышечной ткани.....	40
2.3.5. Метод оценки антигипоксической активности.....	41
2.3.6. Метод оценки ноотропной активности.....	42
2.3.7. Методы оценки анксиолитической активности.....	43
2.3.8. Метод оценки эндотелиопротекторной активности.....	44
2.3.9. Метод оценки антиоксидантной активности.....	45
2.4. Методы иммуноферментных исследований.....	48
2.5. Методы статистической обработки результатов эксперимента.....	48
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ	

СТАТУС **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ** **ЖИВОТНЫХ**
(ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ).....49

3.1.1. Влияние изучаемых соединений на физическую работоспособность экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в холодной воде.....49

3.1.2. Влияние изучаемых соединений на изменение психоэмоционального статуса экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в тесте «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».....55

3.2. Изучение дозозависимого влияния соединений–лидеров на физическую работоспособность и психоэмоциональный статус животных в условиях истощающих нагрузок.....64

3.2.1. Влияние различных доз соединений-лидеров на уровень физической работоспособности животных в условиях истощающих нагрузок в холодной воде.....65

3.2.2. Влияние различных доз соединений-лидеров на изменение психоэмоционального статуса экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в тесте «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».....69

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....76

**ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-
БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА НА
РАБОТОСПОСОБНОСТЬ МЫШЕЙ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ ФОН
ЖИВОТНЫХ.....80**

4.1.1. Влияние изучаемых соединений на физическую работоспособность экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в различных аверсивных средах.....80

4.1.2. Оценка потребления кислорода эритроцитами и митохондриями поперечно-полосатых мышц на фоне теста «принудительного плавания» в различных аверсивных средах.....	84
4.2. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на физическую работоспособность животных на модели «бег на тредбане».....	87
4.3. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата физическую работоспособность животных на модели «челночное плавание без отягощения».....	88
4.4. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата психоэмоциональный статус в тесте «темно-светлая камера».....	91
4.5. Изменение некоторых биохимических показателей на фоне физической нагрузки.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
 ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА НА ФОНЕ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК.....	 99
5.1. Изучение антигипоксической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.....	99
5.1.1. Влияние исследуемых объектов на время жизни и выживаемость экспериментальных животных в условиях гипоксии различного генеза.....	100
5.2. Изучение ноотропной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.....	102
5.2.1. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса».....	102

5.2.2. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Экстраполяционного избегания».....	104
5.2.3. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания».....	106
5.3. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.....	107
5.3.1. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок в тесте «Конфликтной ситуации по Вогелю».....	108
5.3.2. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок в тесте «Четырех пластин».....	110
5.4. Изучение эндотелиопротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.....	112
5.4.1. Влияние изучаемых соединений-лидеров на изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс.....	113
5.4.2. Влияние изучаемых соединений-лидеров на изменение агрегационной активности тромбоцитов в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА.....	121

6.1.1. Оценка антирадикальных свойств 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.....	121
6.1.2 Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях истощающих физических перегрузок	123
6.2. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на концентрацию изоферментов монооксида азота (NO) в условиях истощающих физических перегрузок	128
6.3. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на концентрацию JNK, AIF и PPAR в условиях истощающих физических перегрузок	129
6.3.1. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию JNK в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.....	130
6.3.2. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию AIF в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.....	131
6.3.3. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию PPAR в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.....	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	136
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	146
Список сокращений.....	149
Список литературы.....	150

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день проблема повышения резистентности организма, а также профессиональной работоспособности (физической, психической), в условиях экстремальных физических и психоэмоциональных нагрузок [70,40,30], остается чрезвычайно актуальной. Постепенно фармакологические лекарственные средства стали обширно использоваться здоровым человеком для повышения устойчивости в тяжелых жизненных ситуациях и экстремальных условиях [3,93,51,52]. Особенно широкое распространение это получило в XX-XI веке, в связи с резким усложнением условий жизни человека. Помимо этого, очень часто действию дезадаптирующих факторов подвержены лица опасных профессий - ликвидаторы аварий ЧС, космонавты, летчики, водолазы, подводники и т.д. [93,34,3,76], а также профессиональные спортсмены.

Стоит отметить, что в современных реалиях спорт высоких достижений требует от высококвалифицированных атлетов, различных видов спорта, экстремальных затрат сил и энергии для достижения высоких спортивных результатов. Учитывая данный факт, организму приходится работать «до предела», что, в конечном итоге, отражается на его психо-физическом состоянии [91,141,26,44]. При этом стоит отметить, что спортивные травмы, которые возникают, затрагивают не только костно-мышечный аппарат, но и нервную систему [123,61].

Все вышеизложенное создает необходимость поиска и внедрения дополнительных средств повышения устойчивости и сопротивляемости организма в экстремальных условиях, предупреждения перенапряжения и нервных срывов, ускорения восстановления и повышения работоспособности. Другими словами, встает вопрос целенаправленного поиска веществ, обладающих актопротекторным видом активности, с возможным их применением в различных направлениях медицины: экстремальной, спортивной, военной, авиационной, космической.

На сегодняшний день существует множество групп препаратов, обладающих полифункциональным механизмом действия, и относящихся к различным фармакотерапевтическим группам: антигипоксанты, ноотропы, антиоксиданты, биогенные стимуляторы, адаптогены и т.д [2,33,63]. Но особый интерес в последнее время представляет относительно новый фармакологический класс, получивший название «актопротекторы» [25,33]. Однако данная фармакотерапевтическая группа изучена недостаточно и представлена ограниченным количеством лекарственных препаратов.

Учитывая вышеизложенное, целесообразным является поиск фармакологических средств с мультитаргетным механизмом действия, в частности, природного происхождения, преимуществом которых является: обширный спектр биологически активных веществ; низкая токсичность, присутствие нескольких видов фармакологической активности; быстрое нарастание фармакологического эффекта. [122,145].

Степень разработанности проблемы

Согласно анализу литературных данных, актопротекторы это класс веществ, которые повышают физическую работоспособность в экстремальных условиях без увеличения потребления кислорода [152,153]. Идея создания данных препаратов возникла на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии в 70-х годах [152,32]. Под руководством профессора М. В. Виноградова был синтезирован и выпущен на фармацевтический рынок, где в дальнейшем широко стал использоваться во всех клинических областях, спорте - препарат «Бемитил». Стоит отметить, что на протяжении долгих лет изучением данного соединения занимался ряд отечественных ученых: И. С. Морозов [146] , П. Д. Шабанов [60], С. В. Оковитый [42]. Известно, что Бемитил относится к производным 2-этилтиобензимидазола. Было отмечено, что препарат, помимо повышения физической работоспособности, способен проявлять следующие виды фармакологической активности: антиоксидантную, антигипоксическую,

транквилизирующую, антиастеническую и ноотропную [68]. В дальнейшем, в результате больших изменений (распад СССР, ликвидация некоторых ЛП) произошло прекращение производства Бемитила. Несмотря на это, уже с 2009 года ЗАО «Антивирал» (г. Санкт-Петербург) стали выпускать препарат под названием «Метапрот» [68,69].

Особенность данного препарата заключается в том, что на фоне повышения физической работоспособности он обладает выраженным антиастеническим действием, тем самым ускоряя процессы восстановления после экстремальных воздействий [68]. Стоит сказать, что Метапрот относится к синтетическим препаратам и обладает рядом побочных эффектов [19]. Однако, в настоящее время препарат лишен регистрации для применения в Российской Федерации [19].

Поэтому, ввиду отсутствия истинных актопротекторов на фармацевтическом рынке, перспективным, на наш взгляд, будет направление поиска соединений, обладающих актопротекторным видом активности, преимущественно природного происхождения.

Цель исследования: экспериментально доказать наличие у производных коричной кислоты и флавоноидов актопротекторных свойств, и обосновать возможность применения данных соединений для фармакотерапии психофизической утомляемости.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **Задачи:**

1. Провести фармакологический скрининг в ряду производных коричных кислот и флавоноидов, с целью установления потенциального актопротекторного эффекта, с последующей оценкой психоэмоционального статуса животных.
2. Изучить влияние соединения-лидера на следующие виды активности: антигипоксическую, антиоксидантную, ноотропную, анксиолитическую, эндотелиопротекторную на фоне перенесенных физических и психоэмоциональных перегрузок.

3. Изучить возможные механизмы актопротекторного действия природного соединения-лидера.

Научная новизна исследования

1. Впервые проведен поиск веществ для улучшения и коррекции умственной и физической работоспособности в ряду коричных кислот и флавоноидов в условиях, которые моделируют истощающие физические нагрузки.
2. Впервые на фоне физической нагрузки изучена совокупность следующих видов фармакологической активности: антигипоксической, антиоксидантной, ноотропной, анксиолитической, эндотелиопротекторной.
3. Впервые изучены некоторые механизмы актопротекторного действия соединения-лидера.

Научно-практическая ценность работы:

Результаты полученных исследований позволяют говорить об актопротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата. Что, несомненно, делает их наиболее перспективными, для дальнейшего изучения с целью создания средств, для повышения, поддержания или восстановления, как умственной, так и физической работоспособности при истощающих физических нагрузках. (Военнослужащие, силовые подразделения, ликвидаторы ЧС, космонавты, летчики, спортсмены, и т. д).

Результаты работы включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», на кафедре фармакологии Астраханского государственного медицинского университета и Северо-Осетинской государственной медицинской академии. Методики, а также результаты работы можно использовать для дальнейшего поиска соединений, обладающих актопротекторным видом активности и расширить возможности целенаправленного синтеза данных соединений.

Положения, выносимые на защиту:

1. На фоне истощающих физических нагрузок в ряду коричных кислот и флавоноидов наиболее выраженной актопротекторной активностью обладают АТАСЛ и катехин гидрат;
2. В условиях истощающих физических нагрузок соединения АТАСЛ и катехин гидрат повышают физическую работоспособность животных в холодной воде без увеличения потребления кислорода;
3. Вещества АТАСЛ и катехин гидрат проявляют антигипоксическую, ноотропную, анксиолитическую, эндотелиопротекторную виды фармакологической активности, а также их введение на фоне истощающих физических нагрузок способствует повышению выносливости животных;
4. Механизм актопротекторного действия изучаемых веществ может быть опосредован с антиоксидантными свойствами АТАСЛ и катехин гидрата, а также регулированием процессов апоптоза, проявляющееся в снижении концентрации JNK, AIF, повышением уровня PPAR, и влиянием на изоформы NO.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов. Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на следующих конференциях: «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» 15.11.16, V международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск, 2016; г. Пятигорск; 75-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов

«Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» 11-12 мая, г. Пятигорск; III Международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», Пятигорск, 2017. XXV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Участие в XXXVI Международной научно-практической конференции «Вопросы современных научных исследований» 27.10. 2018.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, в том числе 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 2 статьи в журнале, индексируемом в Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация включает в себя: введение, обзор литературы, материалы и методы, 6 глав собственных исследований, обсуждения результатов, общие выводы, библиографический список, включающий 205 источников, из них - 129 зарубежных авторов. Диссертационная работа изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 14, рисунков – 30.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Снижение психо-физической работоспособности. Современное состояние проблемы и медико-социально-экономические аспекты.

На сегодняшний день, несмотря на наличие обширной теоретической базы в области профилактики, фармакотерапии и диагностики психо-физической дисфункции (усталости), практическая реализация имеющейся информации представляет собой существенную проблему. Деятельность человека в современном мире зачастую осуществляется в условиях экстремальных неблагоприятных нагрузок [146,35,52]. Такие факторы внешней среды, как: высокие и низкие температуры, десинхронозы, повышение и понижение парциального давления, недостаток солнечного света, вибрации, запыленность, изменение характера питания, отдаленность от постоянного места жизни, а также высокие физические нагрузки, приводят к формированию состояния дезадаптации человека. Негативные факторы могут сопровождать ряд хронических заболеваний, либо являться непосредственной причиной их возникновения [111,4,32].

Немаловажно, что для некоторых категорий лиц оптимальный уровень психо-физической активности имеет определяющее значение для их специализированной деятельности. В первую очередь, стоит отметить представителей экстремальных профессий: военные, спасатели, космонавты, альпинисты, ликвидаторы аварий ЧС и т.д [3,76,52]. Известно, что помимо чрезмерного физического перенапряжения, проявляющегося в виде скелетно-мышечной и эндокринной дисфункции, у данной категории лиц отмечается повышенный риск развития психического стресса, вторично ухудшающего соматовегетативные функции [21]. В настоящем описано, что у ранговых военных, пожарных и спасателей часто возникает нервно-психическое напряжение, а также ухудшение когнитивных функций, что является существенной проблемой современного общества и препятствует социальной адаптации лиц, перенесших травматический стресс [198].

К другой, наиболее важной социо-профессиональной группе можно отнести высококвалифицированных спортсменов [91]. Нынешняя «беспощадная» эра спорта, где второй призер рассматривается как «первый проигравший», а олимпийский принцип «главное участие» полностью теряет свой смысл, ставит перед профессиональными спортсменами, зачастую, невыполнимые задачи. Выигрыш в соревнованиях различного уровня в современных реалиях спорта высоких достижений включает в себя не только завоевание медали и сопутствующего признания мирового спортивного сообщества, но и заключение многомиллионных контрактов. Учитывая вновь возникшие обстоятельства, спортсмены готовы работать «на износ», что без сомнения отражается на их психо-физическом состоянии [91]. Возникающие при этом спортивные травмы носят, как правило, комбинированный характер, затрагивают костно-мышечный аппарат и нервную систему [123].

Таким образом, на основании высокой эпидемиологической роли психо-физической дисфункции не только в повседневной, но и в профессиональной сферах деятельности человека, можно предположить, что коррекция данного патологического состояния представляет собой одну из актуальных проблем современной медицины и фармакологии.

1.2. Патопфизиологические особенности психо-физической дисфункции

Современные представления о патогенезе психо-физического утомления базируются на постулатах, предложенных *Mosso A (1904г.)*, так называемой дихотомией Моссо, дополненной *Kluger et al (2013г.)*.

Данная теория базируется на двух постулатах:

1. Утомляемость есть объективное снижение производительности деятельности в течение определенного дискретного временного промежутка.
2. Утомляемость объединяет в себе психо-ментальные и скелетно-мышечные симптомы [130].

В данном контексте под психической и ментальной симптоматикой понимается состояние психоэмоционального статуса индивида, подверженного чрезмерным психо-физическим перегрузкам, и включает в себя такие факторы как: тревожность, агрессивность, депрессия, ажитация, трудности выбора/принятия решения, уменьшение объема и мощности кратковременной памяти [92].

Скелетно-мышечная симптоматика усталости объединяет в себя факторы, лимитирующие активность поперечно-полосатой мускулатуры: уровень кровотока в скелетных мышцах, кинетика ионов кальция, генерация свободных радикалов и интенсивность метаболических процессов в мышечной ткани (рис.1) [1].



Рисунок.1 Ведущие симптомы психо-физического утомления.

Стоит отметить, что психо-ментальные симптомы тесно связаны с дисфункцией нейромедиаторных систем, которые контролируют процессы возбуждения и торможения (холин-; дофамин- и ГАМК-эргическая), а также мотивационный компонент деятельности (дофамин-эргическая система) [173].

Существенную роль в патогенезе психо-физической дисфункции отводится восходящей системе возбуждения, являющейся одной из нейромедиаторных

систем головного мозга. Данный комплекс, включает в себя множество областей мозга, обеспечивающих проведение возбуждающих импульсов к таламусу и коре, и состоит из нескольких групп нейронов. Холинергические нейроны, проецирующие действие на таламус, латеральный гипоталамус и префронтальную кору. Моноаминергические группы клеток, проводящие возбуждение к передней доле гипоталамуса и нейронам голубого пятна [120]. Дисфункция в данных структурах головного мозга (чаще отмечается повышение концентрации ацетилхолина и дофамина) может лежать в основе снижения мотивационного компонента действий, ажитации, трудности в принятии решения, что в условиях эксперимента выражается в виде уменьшения локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности животных [132] (рис.1). В тоже время снижение активности ГАМК-эргической системы негативно отражается на нейропластических свойствах головного мозга, также ухудшается функция «информационного фильтра» (в данном случае отмечается прямая корреляция с активностью дофамин-эргических структур), что клинически проявляется в виде излишней агрессии, тревожности и снижения когнитивных функций [182]. Стоит отметить, что повышение концентрации дофамина и снижение содержания ГАМК в головном мозге ухудшает течение метаболических процессов в нейронах, приводящие, в свою очередь, к интенсификации процессов перекисного окисления липидов (оксидативный стресс) [142] и активации апоптотического каскада [114].

Скелетно-мышечные симптомы психо-физической дисфункции во многом связаны с функцией поперечно-полосатой мускулатуры (рис.1). При этом лимитирующим фактором активности скелетной мускулатуры является снижение уровня кровотока в мышечной ткани. Известно, что активно работающая мышечная ткань может потреблять около 85-90% кислорода, аккумулируемого артериальной кровью при одном сердечном цикле [126]. При снижении данного показателя до 50% в скелетной мышце происходят необратимые изменения, связанные с расстройством метаболических путей, активацией оксидативного

стресса и апоптоза, что предполагает значительную роль оптимального кровоснабжения скелетной мускулатуры, в патогенезе мышечного утомления [117]. При этом ведущая роль в поддержании должного уровня мышечного кровотока отводится эндотелию сосудов [110]. Эндотелий сосудов - тонкий монослой специализированных клеток, выстилающих просвет кровеносных сосудов, который является ключевым регуляторным связующим звеном между кровью и тканями. В условиях интенсивной работы мышц, турбулентный ток крови, создаваемый за счет увеличения сердечного выброса и частоты сердечных сокращений, повреждает эндотелиальную выстилку, особенно в местах бифуркации артерий, формируя, тем самым, патологический процесс, называемый эндотелиальной дисфункцией [177]. В свою очередь, эндотелиальная дисфункция определяется, как сдвиг функциональной активности эндотелия в сторону образования вазоконстрикторных, проагрегантных, провоспалительных и пролиферативных агентов (табл.1) [73,103,163].

Таблица -1

Регуляторные факторы эндотелиальной функции

Вазоконстрикторы	Проагреганты	Провоспалительные агенты	Пролиферативные агенты
Эндотелин Ангиотензин I Тромбоксан 20-Гидрокси- эйкозатетраеновая кислот	Фактор активации тромбоцитов Фактор фон Виллебранда (VWF) Фибронектин Аденозиндифосфат (АДФ) Тромбоксан A2 Ингибитор активатора плазминогена Коллаген и эластин	P-селектин, E-селектин Молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM- 1) Белок хемотаксиса моноцитов Колонiestимулирующий фактор моноцитов Гранулоцитарно- макрофагальный колонiestимулирующий фактор (GM-CSF) Фактор некроза опухоли (TNF) α C-реактивный белок	Эндотелиальный фактор роста Факторы роста фибробластов

Известно, что эндотелиальная дисфункция связана со снижением каталитической активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) – одного из ключевых эндотелиальных ферментов, обеспечивающего физиологическую секрецию оксида азота (NO) [82].

В условиях интенсивной работы мышц, в силу интенсификации азотистого обмена и непосредственном участии в метаболических процессах «резервного» аминокислотного пула, отмечается истощение запасов кофакторов реакции синтеза NO (тетрагидробиоптерин и НАДФ), при этом стоит отметить, что в данных условиях снижение синтеза NO сопряжено с прогрессирующей инактивацией eNOS метилированными производными L-аргинина (ADMA) [179]. Уменьшение продукции NO вызывает сбой паракринной регуляции мышечного кровотока, в результате чего компенсаторно активируется индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), которая продуцирует NO в значительно большей концентрации (мкмоли, против нмолей, генерируемых eNOS). В результате при участии множества ферментов, генерирующие O_2^- -анион-радикал, происходит инактивация избытка образующегося оксида азота [184]. В процессе реакционного взаимодействия NO и супероксидного радикала образуется цитотоксичный пероксонитрит, который инициируют клеточное повреждение по типу свободно-радикальных реакций окисления, запуская новый патогенетический механизм повреждения скелетной мускулатуры – окислительный стресс [200,106]. При этом образующиеся продукты липопероксидации – малонилдальдегид и другие ацилгидроперекиси, инициируют вторичное повреждение миоцитов поперечно-полосатой мускулатуры, посредством метилирования и образования аддуктов ДНК, что в свою очередь ведет к усиленной деструкции мышечной ткани [132].

Стоит отметить, что развивающийся окислительный стресс напрямую сопряжен с дисфункцией митохондрий и усилением генерации митохондриями активных форм кислорода, инактивирующих NO [93,87]. Функциональный дисбаланс митохондрий возникает при снижении уровня мышечного кровотока до

критического уровня. При этом недостаточное кровоснабжение скелетной мускулатуры ведет к формированию двух субпопуляций митохондрий: SSM и IFM (рис.2), которые играют различную роль в патогенезе повреждения мышечной ткани [102].

Митохондрии типа SSM являются основным внутриклеточным источником активных форм кислорода. Установлено, что в митохондриях семейства SSM, в отличие от субпопуляции IFM, наблюдается более быстрое окисление субстратов в комплексах I, II и III, без изменения оксигенации в комплексе IV, что ведет к терминации окислительно-восстановительных реакций митохондриальной дыхательной цепи, перенаправляя поток кислорода в сторону образования АФК на уровне комплекса II, уменьшая тем самым сопряжение окисления и фосфорилирования, и синтез АТФ.

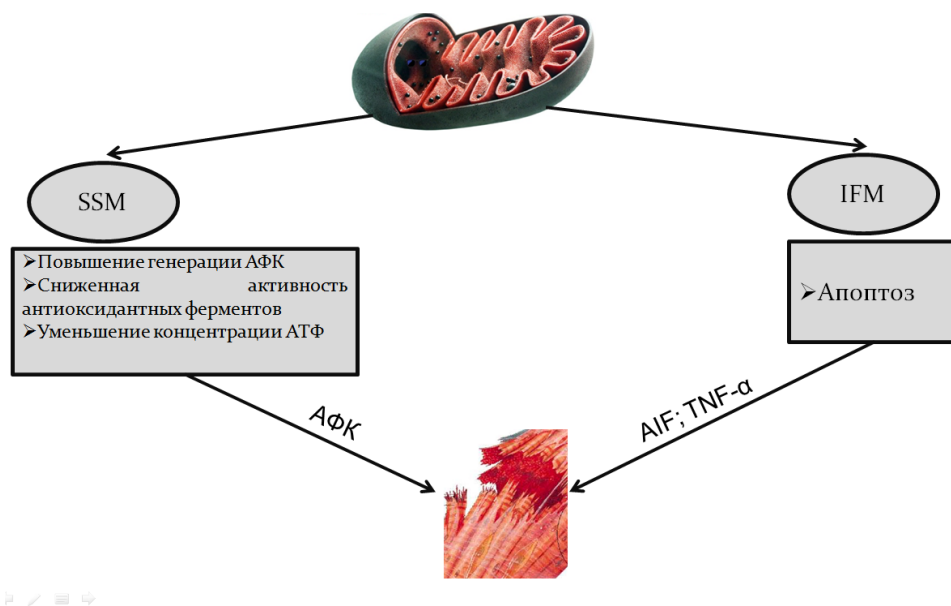


Рисунок 2. Структурно-функциональные особенности митохондрий в условиях интенсивной работы скелетной мускулатуры

Немало важно, что в митохондриях типа SSM отмечается снижение активности АТФ-синтазы (комплекс V) и повышение функциональных свойств НАДФ-оксидазы, что ведет к образованию интермедиатов реакций окисления глюкозы кислотной природы, например, молочной кислоты [124].

Таким образом, дисфункция SSM субпопуляции митохондрий, может опосредовать энергодефицит и ацидоз в клетках скелетной мускулатуры. Однако описан ряд регуляторных механизмов, способных препятствовать данным негативным изменениям. К числу таких потенциально возможных путей коррекции расстройства SSM функции относится воздействие на рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR) [183].

PPAR являются одними из основных регуляторов гомеостаза липидов, глюкозы и регенеративных процессов в мышечной ткани [161,134]. Данный тип рецепторов относится к суперфамильным ядерным гликопротеинам, активируемых лиганд-транскрипционными факторами, синтетического или эндогенного происхождения, к которым относятся ряд гормонов, арахидоновая кислота и эйкозаноиды. Синтетические лиганды PPAR успешно применяются для терапии инсулинрезистентного сахарного диабета и дислипидемии. Тиазолидиндионы, такие, как: пиоглитазон и роксиглитазон являются специфическими активаторами PPAR γ и используются в качестве сенситайзеров инсулина у пациентов с сахарным диабетом II типа [186].

В мышечной ткани рецепторы PPAR являются регуляторами процессов деструкции мышечных волокон и миогенеза. Регенерация скелетных мышц начинается вскоре после травмы и состоит из трех основных скоординированных фаз: некротического лизиса, репарации и ремоделирования. При травме и разрыве миофибры миоциты вначале подвергаются некрозу, который вызывает воспалительную реакцию. Затем путем фагоцитоза [127] поврежденная ткань, очищается инфильтрированными иммунными клетками. Проникновение иммунных клеток, а также активация в дальнейшем способствует активизации резерва мышечных прогениторных клеток, которые затем пролиферируют и дифференцируются, образуя новые мышечные волокна, обеспечивающих регенеративный процесс [201]. После травмы мышц, активация прогениторных клеток оказывает незаменимую роль в регенерации мышц. Данные клетки и их дифференцированный вариант - миогенные клетки-предшественники, чаще всего

подвергаются терминальной дифференцировке и включаются в состав существующих миофибрилл, восстанавливая функциональный резерв мышечного волокна [164]. Однако незначительное количество миогенных клеток-предшественников, которые не подвержены терминальной дифференцировке, могут вернуться в состояние покоя, обеспечивая пул клеток-сателлитов, необходимый для поддержания мышечной емкости и дальнейшей способности мышц к росту и увеличению объема выполняемой работы [203]. Установлено, что активация рецепторов PPAR β/δ необходима для оптимальной дифференциации прогениторных клеток в клетку-предшественницу поперечно-полосатого миоцита и дальнейшего миогенеза мышцы. Так в исследовании *Chandrashekar P et.al (2015г.)* было показано, что рецепторы PPAR обильно экспрессированы в мышечной ткани, а подавление активности данных гликопротеинов в условиях кардиотоксин-индуцированной мышечной деструкции на 40% от их фонового уровня функциональных свойств, уменьшает кинетику пролиферации мышечного волокна [98].

Аналогичные результаты были получены в работе *Angione A.R, et.al (2011г.)* В данном исследовании применялся эквивалентный методологический подход – кардиотоксин-индуцированная миопатия, однако в качестве биологической модели были использованы заведомо нокаутные по рецепторам PPAR β/δ мыши. В результате было установлено, что у данных животных отмечается значительное снижение регенеративной способности скелетной мускулатуры, сопровождаемое развитием метаболического синдрома и экспрессией транскрипционного фактора FOXO1[144]. Известно, что белок FOXO1 является субстратом протеинкиназы B и уменьшает реактивность скелетной мускулатуры к действию инсулина и инсулино-подобных факторов роста, ухудшая тем самым метаболизм и регенеративную способность мышечной ткани [86]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что рецепторы PPAR являются ингибиторами FOXO1 – опосредованной клеточной сигнализации.

Кроме того, рецепторы PPAR могут играть существенную роль в восстановлении оптимального уровня кровотока в скелетных мышцах [135]. Последние исследования показывают, что PPAR β/δ модулируют функцию паракринной сети между эндотелиальными прогениторными клетками и мышечными волокнами, что способствует интенсификации капиллярного ангиогенеза. В исследовании *Han J.K et.al (2013г.)* подобный эффект связывают с PPAR-опосредованной активацией матриксной металлопротеиназы 9 (MMP 9) [118]. Увеличение активности MMP 9 на фоне стимуляции рецепторов PPAR β/δ вызывает усиленное образование инсулинотропного связывающего белка в неповрежденных эндотелиоцитах, что ускоряет регенерацию эндотелиальной выстилки и улучшает уровень мышечного кровотока [97].

Как указывалось выше, рецепторы PPAR играют значимую роль в поддержании должного уровня энергетических процессов в мышечной ткани, регулируя гомеостаз глюкозы и липидов - основных источников макроэргических соединений для активно работающей мышцы. В этой связи был проведен ряд исследований, посвященных изучению роли рецепторов PPAR в энергообеспечении мышечной ткани. Так в работе *Liu Y.et.al.(2014г.)* в качестве основного регулятора гомеостаза макроэргов был предложен подтип рецепторов PPAR β/δ . Было установлено, что активация данных рецепторов вызывает образование специфического миокина-адипонектина [138]. В скелетной мускулатуре адипонектин регулирует проницаемость мембраны для глюкозы и жирных кислот, активирует биогенез митохондрий. Кроме того, адипонектин повышает оксидацию жирных кислот со значительным образованием АТФ, участвуя в каскаде аутокаталитических реакций АМФК - пути [168]. Таким образом, можно предположить, что рецепторы PPAR могут быть перспективной фармакотерапевтической мишенью для коррекции метаболических расстройств в мышечной ткани в условиях чрезмерных физических нагрузок.

В противовес субпопуляции SSM, митохондрии подкласса IFM более чувствительны к апоптотическим стимулам. Известно, что IFM митохондрии

являются основными индукторами апоптотических процессов в мышечной ткани (рис.3). При этом отмечаются два возможных варианта течения апоптотического события, известных как каспаза-зависимый и каспаза-независимый пути апоптоза [159]. Каспаза-независимый (внутренний) путь апоптоза напрямую связан с дезорганизацией митохондриальных мембран, формированием поры переменной проницаемости и повышенным клеточным инфлюксом кальция. При этом возникающая цепь событий приводит к релингу цитохрома С и апоптоз индуцирующего фактора (AIF), который прямо секвенирует ДНК, инициируя клеточную гибель [85].

Каспаза-зависимый (внешний) путь апоптоза активируется при воздействии на специфические мембранные «рецепторы смерти», которые представлены в основном TNF-рецепторами 1 типа (рецепторы к фактору некроза опухоли – α). При этом в клетке возникает ряд необратимых событий, активирующих каспазный механизм ядерной деструкции, конечным этапом которого является распознавание каспазой-3 специфического сайта связывания DxxD на участке хроматина с последующим расщеплением молекул ДНК [202].

При этом следует отметить, что наряду с окислительным стрессом, апоптоз является одним из основных патогенетических механизмов деструкции миоцитов скелетной мускулатуры в условиях интенсивной работы мышц, а его модуляция представляет собой новое перспективное направление восстановления функциональной активности поперечно-полосатой мускулатуры [119].

Согласно недавним исследованиям потенциальной мишенью, позволяющей регулировать апоптотические процессы (как каспаза-зависимые, так и каспаза-независимые) может являться с-Jun-концевая киназа (JNK) [115,204].

JNK является представителем семейства ферментов митоген-активированных протеинкиназ (МАРК), которые усиливают и интегрируют трансдукционные сигналы от разнообразного рода внутриклеточных и внеклеточных стимулов [204].

Известно три JNK-изоформы: JNK1, JNK2 и JNK3, различающихся по своим функциональным свойствам [115]. При этом на процессы апоптоза оказывают влияние в основном изоферменты JNK1 и JNK2. Так в исследовании *Tournier et al(2000г.)* с использованием в качестве модели эмбриональных фибробластов, доказано, что JNK1 и JNK2 участвуют в апоптотических сигнальных путях путем дестабилизации митохондриальной мембраны и моделирования релизинга AIF, а также прямой активации каспаз [189].

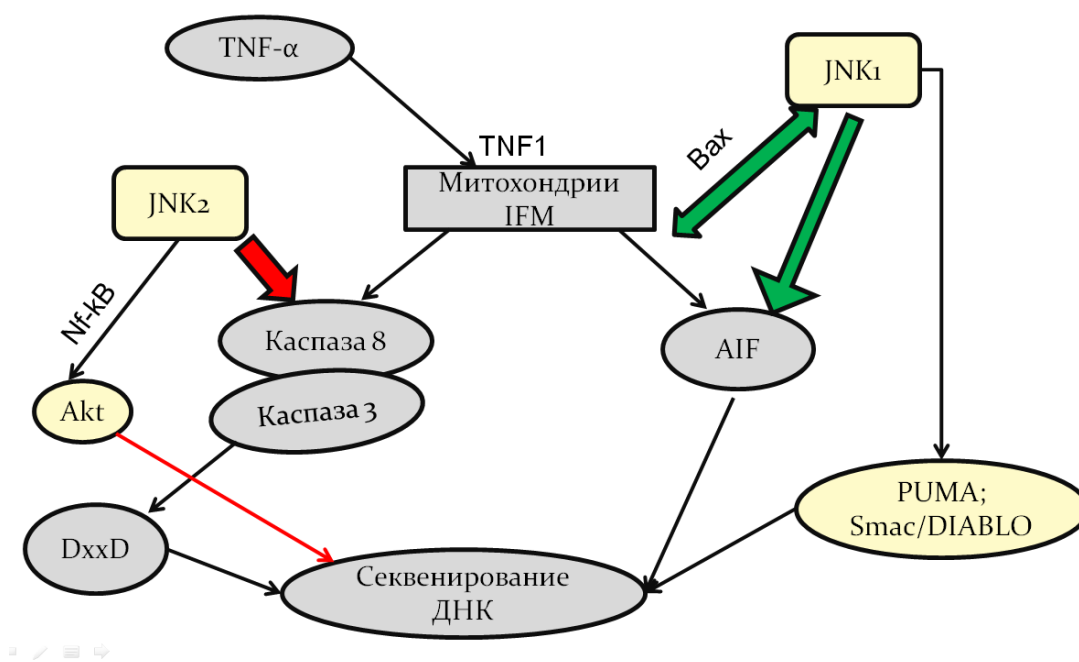


Рисунок 3. Апоптотические пути мышечной деструкции. Роль JNK в каскаде апоптотических событий.

Альтернативный путь, способствующий JNK-опосредованному апоптозу, включает фосфорилирование семейства белков p53. Установлено, что фосфорилирование JNK1 белка p53 на сайте связывания Ser6 ингибирует опосредованную убиквитином деградацию p53 и тем самым стабилизирует активность данного белка. Недавние исследования показали, что фосфорилирование JNK1 белка p53 по Ser6 является необходимым событием для инициации внешнего пути апоптоза [151]. Поскольку p53 участвует в экспрессии нескольких проапоптотических молекул, таких как Bax (bcl2-ассоциированный х-белок), PUMA (p53-регулируемый модулятор апоптоза) и Smac/DIABLO, вполне

возможно, что апоптотический путь, активированный JNK, представляет собой комплексный процесс [105].

В тоже время для JNK описана способность подавлять реакции апоптоза, участвуя в каскаде реакций TNFRSF10B/TRAIL-R2 пути. JNK2 фосфорилируя специфический сайт Thr4 на TNFSF10 подавляет дальнейший ход реакций, в ходе которых отмечается последовательная активация TRAIL-R2, каспазы 8 и каспазы 3 [121]. Кроме того, в сложившихся условиях JNK2 способствует активации Nf-kB пути с последующим фосфорилированием Akt, в результате чего отмечается редукция апоптотического сигнала и увеличивается адаптационный потенциал скелетной мускулатуры (рис.3) [79].

Таким образом, на основании вышеизложенных данных можно предположить, что патогенез психо-физического утомления носит комплексный характер с нарушениями, как центральной нервной системы, так и периферических тканей, что может предполагать целесообразность назначения препаратов поливалентного действия с целью фармакокоррекции данного состояния.

1.3. Медикаментозная коррекция психо-физического утомления. Актопротекторы.

На сегодняшний день существует две основные стратегии фармакотерапии психо-физической дисфункции: мобилизация внутренних ресурсов организма (что предполагает кратковременный эффект) и оптимизация процессов энергопродукции и энергопотребления в организме (продолжительное действие) [88]. В связи с этим выделяют две фармакотерапевтические группы корректоров психо-физического утомления: средства «мобилизующего» и «оптимизирующего» типа действия.

К первой группе относятся средства истощающего типа действия – классические психостимуляторы [158].

- аналоги фенамина (первитин, пиридрол);

- производные сидномина (сиднокарб, сиднофен);
- ксантины (кофеин, теобромин, теофиллин) и другие средства природного происхождения (секуренин, стрихнин);
- антидепрессанты - ингибиторы моноаминооксидазы (ниаламид)

Препараты данной группы вызывают усиление релизинга дофамина в подкорковых структурах головного мозга, усиливают серотонинэргический, адренэргический и подавляют аденозинэргический нейротрансмиттинг [199]. В результате подобной «мобилизации» при длительном применении данных средств отмечается истощение запасов медиаторов ЦНС, что сопряжено с появлением значительного числа сопутствующих осложнений фармакотерапии. В спектр побочных реакций данных препаратов входят: снижение либидо, анорексия, депрессия, ксеростомия, диарея, головокружение, головная боль изжога, раздражительность, тревога, агрессия, паранойя, увеличение силы и частоты сердечных сокращений, аритмогенное действие [180].

Кроме того большинство средств данной группы относятся к средствам регламентированного отпуска, а также входят в список запрещенных препаратов Всемирного антидопингового агентства [19].

В группу «оптимизирующих» средств входят следующие препараты [72]:

- адаптогены (препараты женьшеня, лимонника китайского, золотого корня, элеутерококка, левзеи, аралии маньчжурской, заманихи);
- макроэргические субстраты и корректоры метаболизма (АТФ, креатинфосфат, аминокислоты, субстраты цикла трикарбоновых кислот (яблочная, янтарная, кетоглутаровая кислоты));
- поливитаминные комплексы;
- антиоксиданты и антигипоксанты (токоферол, эмоксипин, мексидол, гипоксен)
- ноотропы (пирацетам, цитиколин, холина альфосцерат)

Средства данной группы обладают «мягким» активирующим действием на ЦНС, устраняют негативные проявления окислительного стресса, энергодефицита, оптимизируют процессы синтеза белка и ДНК, митофагии, повышают иммунологическую реактивность организма, оказывают общее активирующее и противострессорное действие [180]. Кроме того данные препараты зачастую обладают оптимальным профилем безопасности применения, что уменьшает лекарственную нагрузку на пациента. Однако эффект от применения данных средств, отмечается только при их длительном использовании и связан с активной перестройкой функциональных систем организма под действием «оптимизирующих» препаратов, что исключает возможность применения данных средств для кратковременного повышения физической и ментальной активности [187].

Таким образом, можно предположить перспективность поиска средств, обладающих одновременно выраженным эффектом, низким уровнем системной токсичности и непродолжительным латентным периодом действия. В этой связи были начаты научные изыскания, целью которых был целенаправленный поиск препаратов с заданными фармакологическими свойствами, в результате чего была сформированная концепция актопротекторных средств.

Термин «актопротектор» был предложен проф. Ю. Г. Бобковым. Согласно определению Ю. Г. Бобкова «Актопротекторы - это средства «неистощающего» типа действия, предназначенные для поддержания высокой двигательной активности и работоспособности в экстремальных условиях» [4,74]. Однако, проведенные в дальнейшем исследования, позволили уточнить трактовку термина «актопротекторы». В издании «Фармакология спорта» предложено следующее определение: ««Актопротекторы - это новый, небольшой пока класс стимуляторов физической работоспособности, воздействующих на многие органы и системы организма и препятствующих развитию утомления»» [31]. В тоже время по определению Ю. Б. Буланова «Актопротекторы - это группа синтетических препаратов, препятствующих развитию утомления и повышающих

работоспособность, а также способные обладать антигипоксической и антиоксидантной активностями»».

На наш взгляд, актопротекторы - это группа препаратов «неистощающего» типа с поливалентным механизмом действия, предназначенных для коррекции психо-физического утомления, как в стрессовых, так и повседневных условиях, имеющих синтетическое или природное происхождение.

Кроме того, препарат - актопротектор, помимо перечисленных видов фармакологической активности, предложенных авторами ранее, должен влиять на когнитивные и мнестические функции, проявлять анксиолитическую активность без седативного эффекта, а также обладать эндотелиопротекторной активностью (рис.4) [11].



Рисунок 4. Виды фармакологической активности актопротекторов

Также немало важно, чтобы актопротектор обладал низкой системной токсичностью и достаточно выраженным пролонгированным действием, сочетающимся с оптимальной скоростью наступления эффекта [31,34].

Однако, несмотря на перспективность применения актопротекторов, на сегодняшний день единственным разрешенным к использованию в общемировой практической медицине препаратом данной группы является этилтиобензимидазола гидробромид («Metaprot»), который на данный момент не зарегистрирован для применения в Российской Федерации [19].

Кроме того, спектр побочных реакций препарата «Metaprot» не в полной мере отвечает требованиям фармакобезопасности, предъявляемым к актопротекторам. При применении данного средства возможно развитие следующих нежелательных реакций: парестезии, судороги, повышение АД, тахикардия, нарушение сна, беспокойство, раздражительность [68]. Таким образом, ограниченный спектр препаратов-актопротекторов, диктует актуальность поиска новых средств, обладающих актопротекторными свойствами.

В настоящем особое внимание экспериментальной фармакологии уделяется объектам растительного происхождения, сочетающим в себе высокую эффективность и низкую системную токсичность, в частности флавоноидам и производным коричной кислоты [133,197,174,185].

Флавоноиды являются биологически активными, полифенольными соединениями, конститутивно присутствующими в растительных объектах. Последние исследования свидетельствует о том, что применение флавоноидов может уменьшить риск некоторых связанных хронических дегенеративных патологий, таких как: сердечно-сосудистые заболевания, диабет 2-го типа и некоторые виды рака [95,140]. Спектр фармакологической активности флавоноидов включает: антиоксидантное [54,140], противовоспалительное, нейропротекторное, метаболическое, эндотелиопротекторное действие [59]. Также следует отметить, что применение флавоноидов сопряжено со значительно меньшим риском появления токсического действия, по сравнению с их синтетическими аналогами по действию [160].

Для производных коричной кислоты также характерен обширный набор разнонаправленных видов фармакологической активности: антидиабетическая [80], противораковая [147], антиоксидантная [143,81], ноотропная [112,107], антибактериальная, противогрибковая [205] и эндотелиотропная [16]. Таким образом, высокая фармакологическая активность, оптимальный профиль безопасности применения и потенциальные актопротекторные свойства флавоноидов [43] и производных коричной кислоты [25] послужили критериями выбора данных классов соединений в качестве объектов данного исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

В работе изучено актопротекторное действие флавоноидов и производных коричной кислоты на фоне истощающей физической и психоэмоциональной нагрузки животных. Исследуемые соединения (производные коричной кислоты: 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота, р-кумаровая, кофейная, сорбиновая, синаповая кислоты; класс флавоноиды - апигенин, гесперидин, гесперетин, флоридзин, икариин) были выделены в Пятигорском медико-фармацевтическом институте ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ на кафедре органической химии под руководством профессора, д.ф.н. Оганесяна Э.Т, за что выражаем ему и всем сотрудникам кафедры глубокую благодарность.

Коммерческими субстанциями производства Sigma-Aldrich (Германия) являются катехин гидрат, морин гидрат и полифенолы зеленого чая.

На этапе скрининга и на этапе углубленного изучения актопротекторной активности в качестве препаратов сравнения выступали: Метапрот (ЗАО «Фармпроект», Россия) в дозировке 25 мг/кг [69]; Фенотропил (ОАО «Валента Фармацевтика», Россия) в дозировке 200 мг/кг [7] (выбраны с учетом межвидового коэффициента пересчета); Гипоксен (ОЛИФЕН Корпорация, Россия) в дозировке 150 мг/кг [24]; Мексидол (ФАРМАСОФТ НПК, Россия) дозировка 100 мг/кг [10]; Сулодексид (AlfaWasserman, Италия) в дозе 30 ЕВЛ/кг [15]. Выбор препарата сравнения на каждом этапе был обусловлен доказанным видом фармакологической активности.

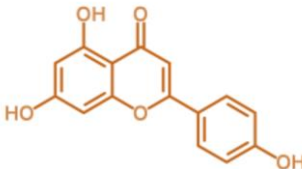
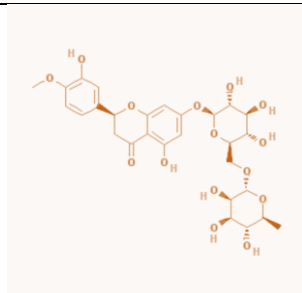
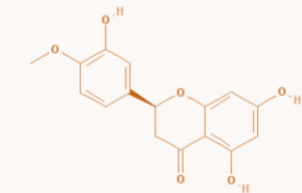
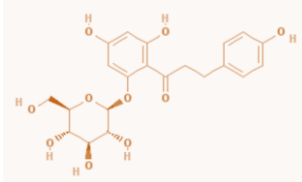
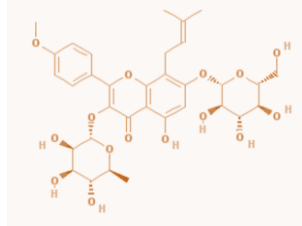
2.2. Лабораторные животные

Данное экспериментальное исследование воспроизводилось на 320 крысах-самцах линии Wistar массой 220-240 г. и 440 беспородных мышам-самцам массой 20-23 г. Животные содержались в виварии ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

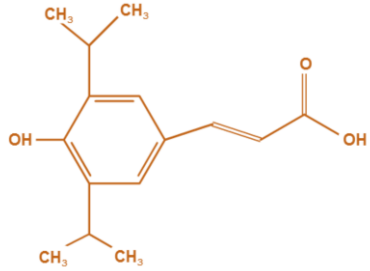
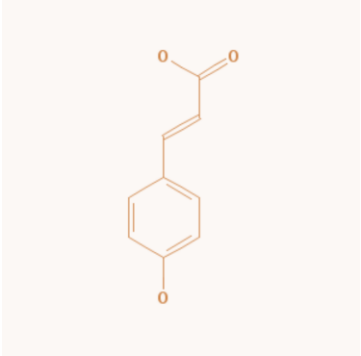
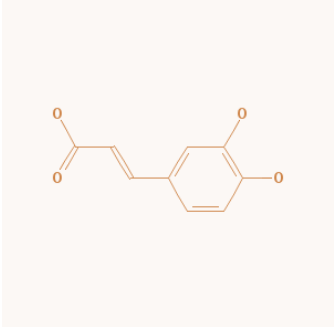
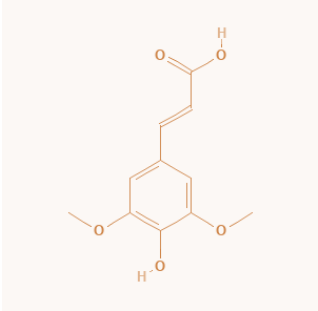
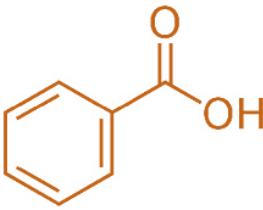
Все экспериментальные животные, в процессе проведения эксперимента, содержались в стандартных условиях вивария (естественный режим смены света, температура, относительная влажность, стандартная диета лабораторных животных (ГОСТР 50258-92), еженедельная смена подстила и клеток, фиксированное время кормления и подачи питья) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. Кроме этого, при проведении доклинических исследований в РФ руководствовались правилами лабораторной практики (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики») и Приказом МЗ РФ от 23 августа 2010 г. N 708 н «Правила лабораторной практики». Протокол заседания научного этического комитета ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России №19 от 10.12.2015 г.

Местом размещения животных были макролоновые клетки Т-3, имеющими стальные решетчатые крышки и кормовое углубление, расположенные в несколько ярусов. Материалом для подстила в клетке служили древесные опилки (стружка) смешанных пород, сухая, обеспыленная фракция №3. Уборка помещений (влажная) с дезинфицирующими средствами осуществлялась ежедневно, еженедельно-замена клеток, подстила и аксессуаров, полная санитарная обработка - ежемесячно.

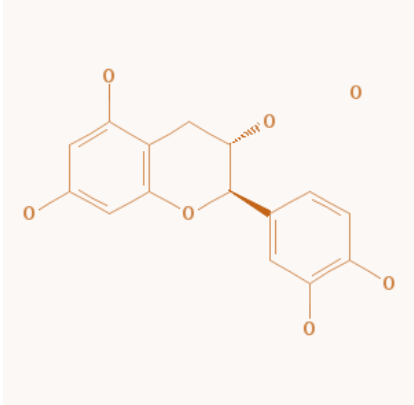
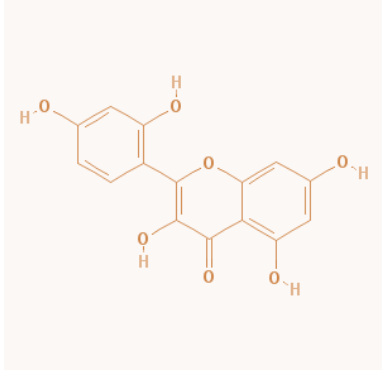
Исследуемые соединения
А)Выделенные флавоноиды

Наименование	Химическая формула
Апигенин	
Гесперидин	
Гесперитин	
Флоридзин	
Икариин	

Б) Производные коричной кислоты

Лабораторный шифр – АТАСЛ 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота	
р-Кумаровая кислота	
Кофейная кислота	
Синаповая кислота	
Сорбиновая кислота	

В) Коммерческие субстанции производства Sigma-Aldrich (Германия)

Полифенолы зеленого чая. Лабораторный шифр -PGT	комплекс соединений фенольной структуры
Катехин гидрат	
Морин гидрат	

2.3. Этапы проведения исследования и дизайн исследования.

Этапы проведения исследования

1. Проведение фармакологического скрининга посредством оценки влияния данных веществ на уровень физической работоспособности и влиянию на психоэмоциональный фон, с целью выявления наиболее активного соединения в ряду изучаемых веществ. Оценка зависимости «доза-эффект» соединения-лидера.
2. Углубленное изучение соединения-лидера на показатели выносливости, скоростно-силовые характеристики, а также изменение психоэмоционального фона животных. Определение некоторых биохимических показателей.

Оценка дыхательной функции эритроцитов и митохондрий поперечно-полосатых мышц.

3. Изучение актопротекторного действия соединения-лидера на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок (оценка антигипоксической, антиоксидантной, ноотропной, анксиолитической, эндотелиопротекторной активности).

4. Выяснение потенциальных механизмов действия соединения-лидера с помощью ИФА-методов анализа.

Дизайн исследования

Таблица-3

Этапы	Тест-система
1. Фармакологический скрининг	«Принудительное плавание с нагрузкой», «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт»
2. Углубленное изучение соединения-лидера	«Принудительное плавание с нагрузкой» в различных аверсивных средах, «Бег на тредбане», «Челночное плавание без отягощения», «Темно-светлая камера». Определение некоторых биохимических показателей: лактат, пируват, лактат/пируват, миоглобин, АТФ. Оценка респирометрической функции.
3. Изучение актопротекторной активности соединения-лидера	
Изучение антигипоксической активности	Гемическая, гистотоксическая, гипобарическая, гиперкапническая, циркуляторная гипоксии
Изучение ноотропной активности	«Водный лабиринт Морриса», «Экстраполяционное избавление», «Условный рефлекс пассивного избегания»
Изучение анксиолитической активности	«Конфликтная ситуация по Вогелю (Vogel), «Четыре пластины»
Изучение эндотелиопротекторной активности	Вазодилатирующая и антитромботическая функции
4. Оценка потенциальных механизмов действия	Определение СОД, каталаза, ГП, МДА, ДК. Определение концентрации маркеров: изоформы оксида азота- eNOS, nNOS iNOS, JNK (с-Jun-концевая киназа), AIF - (апоптоз-индуцирующий фактор), PPAR (рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом) методом ИФА-анализа

Фармакологический скрининг в ряду изучаемых соединений – потенциальных актопротекторов проводился посредством оценки влияния данных

веществ на уровень физической работоспособности, оцениваемой в тесте «принудительное плавание с отягощением» в течение 10 дней, а также по способности изучаемых объектов стабилизировать психоэмоциональный фон экспериментальных животных, после перенесенных истощающих нагрузок (оцениваемой в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»). При проведении скрининга веществ, все исследуемые соединения, вводились в дозе 100 мг/кг интрагастрально.

2.3.1. Модели физических и психоэмоциональных перегрузок

Модель «принудительного плавания» с нагрузкой от массы тела животного

Данная модель выполнялась в акриловом цилиндре в аверсивной среде с разными температурными режимами (НПК «Открытая Наука», Россия). Один заполнялся водой температурой 15⁰ С [14], другой - горячей водой температура 41⁰С) [78]. Цилиндр имел следующие размеры: h=45см., d=20см-для мышей, и h=75 см., d=30см - для крыс. Животным к хвосту крепился груз: 20% массы его тела-мышы, (крысы-10%), и опускали в цилиндр. Животное вытаскивали из воды после полного погружения его на дно. Критерием достижения полного истощения являлось нахождение животного на дне цилиндра, в течение 10 сек и более, без попыток всплытия к поверхности. Время плавания фиксировалось [94,165,48,166].

Модель «бег на тредбане» до отказа

Данная модель воспроизводилась на установке (Panlab, США), которая представляет собой прибор с отсеками для индивидуального размещения животных, через которую проходит вращающийся вал (скорость вращения-60 об/мин). Каждое животное помещается в индивидуальный вал. К каждому отсеку подведена электростимулирующая подложка с током силой 0,6 мА. Скорость вращения вала, а также сила тока подложки, регулируются по мере необходимости. После помещения животного в отсек, включался вал, и регистрировалась общая продолжительность бега животного. Критерием

достижения утомления служило нахождение животного в течение 10 сек на электростимулирующей площадке, без попыток «обратного возвращения» на вал [1].

Модель «челночное плавание» без дополнительного отягощения

Модель воспроизводилась в установке (Panlab, США) с размерами 1200x200x350 мм., и имела вид бассейна прямоугольной формы, заполненного водой температурой 15⁰ С. Включали секундомер и опускали животное с зоны «старта» в сторону зоны «финиша». При достижении отметки «финиш», его вновь возвращали в зону «старта», так повторяли несколько раз. Критерием прекращения эксперимента служило время преодоления дистанции (свыше 60 секунд), либо отказ плыть в заданном направлении. Данный эксперимент выполнялся после предварительного обучения животных в течение 3х-дней. Фиксировали следующие показатели: скорость, время, расстояние (преодоленное за 60 сек.), коэффициент усталости ($K_{уст} = t_{max}/S_{max}$) [71].

Тест «темно-светлая камера»

Данная установка («Темно-светлая камера») (НПК «Открытая Наука», Россия) предназначена для изучения поведения животных (крысы/мыши) в условиях переменного стресса (при выборе комфортных условий). Состоит установка из двух частей - темной и светлой, которые имеют размеры 30x30 см, между собой оба отсека камеры разделены перегородкой. Высота стенок равна 30 см. Темный отсек камеры можно как закрывать крышкой, так и оставлять открытым, в зависимости от задач эксперимента.

Эксперимент выполнялся в течение 3-5 минут. Суть эксперимента сводится к тому, что животное помещают в светлый отсек камеры, хвостом к закрытому темному отсеку. Производят регистрацию первого захода в темный отсек, число повторяющихся заходов, время, проведенное как в светлом отсеке, так и темном. Фиксировали также вертикальную активность в светлом отсеке, и выглядывания из темного отсека в светлый [100,50].

2.3.2. Модель оценки психоэмоционального статуса

Модель «Открытое поле»

Установка «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Россия) представляет собой круглую площадку, имеющую следующие размеры: $d=97$ см с h стенок 42 см, разделенную на 19 равных секторов (для мышей-диаметр 63 см, высота стенок-32 см). В полу площадки имеются 13 отверстий $d=2$ см (мыши $d=1$ см). [«Установка «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Россия)]. Данный тест используется для оценки поведенческой активности крыс/мышей животных, а также для оценки двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. Суть методики заключается в помещении животного в центр площадки хвостом к экспериментатору. Проводилось фиксирование следующих параметров: двигательная активность (пересеченные сектора, количество), вертикальная и горизонтально-исследовательская активность (стойки и заглядывания, количество раз), уровень тревожности (время нахождения в центральном квадрате, груминг (продолжительность)), вегетативный статус (число уринаций, число фекальных болюсов). Время проведения данного теста 3 минуты.

На втором этапе исследования по результатам скрининга отбирались соединения-лидеры для дальнейшего более детального изучения [104,14,51,57].

Модель «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Данный метод позволяет оценить степень нарушения неврологического статуса, а также уровень тревожности животных. Установка (НПК «Открытая Наука», Россия) для тестирования представляет собой арену в виде креста, состоящую из 2-х открытых и 2-х закрытых рукавов. Параметры рукавов: длина-50см, ширина - 15см. Тестирование основывается на помещении животного в центр ПКЛ носом к открытому рукаву. Время проведения данного теста 3 минуты. Проводилось фиксирование следующих параметров: время в центре, время нахождения животного в закрытых и открытых рукавах, а также число стоек, и переходов между открытыми и закрытыми рукавами «ПКЛ» [175,193].

2.3.3. Метод оценки биохимических показателей

Определение концентрации лактата в сыворотке крови

Определение лактата в сыворотке крови осуществляли с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+» энзиматическим колориметрическим методом.

Определение концентрации пирувата в сыворотке крови

Определение пирувата в сыворотке крови осуществляли с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Арбис+» энзиматическим колориметрическим методом.

Определение концентрации миоглобина в сыворотке крови

Определение миоглобина в сыворотке крови проводили методом высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере Tecan Infinite F50 (Австрия). Ход работы полностью соответствовал прилагаемым производителем инструкции к набору реактивов.

Определение концентрации АТФ в гомогенате мышц

Определение АТФ в гомогенате мышц проводили методом высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере Tecan Infinite F50 (Австрия). Ход работы полностью соответствовал прилагаемым производителем инструкции к набору реактивов.

2.3.4. Метод оценки дыхательной функции эритроцитов и митохондрий мышечной ткани

Скелетные мышцы и кровь служили биологическим материалом. Предварительно гомогенизировали скелетные мышцы с добавлением HEPES – буфера. После чего гомогенат биообразцов проходил дифференциальное центрифугирование в режиме 3,500g-5 мин. Образовавшийся супернатант переносили в пробирки и подвергали его центрифугированию, но в режиме 13000 g-10 мин. Для анализа

отбиралась надосадочная жидкость. Определение потребления кислорода проводили с помощью лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, Россия). Ход работы полностью соответствовал прилагаемой производителем инструкции к прибору [157].

2.3.5. Метод оценки антигипоксической активности.

Оценку противогипоксической активности проводили на всех видах гипоксии. Гемическая, гистотоксическая, гипобарическая, гиперкапническая виды воспроизводились на беспородных мышах-самцах, массой 20-23 грамма. Модель циркуляторной гипоксии осуществлялась на крысах-самцах линии Wistar. Исследуемые соединения-лидеры вводились за 30 минут до тестирования.

Гемическая гипоксия

Модель гемической гипоксии вызывали однократным подкожным введением нитрита натрия в дозировке 250 мг/кг. Фиксировали наступление времени смерти животных [5].

Гипобарическая гипоксия

Гипобарическую гипоксию вызывали в электровакуумной установке, путем «поднятия» животных на «высоту» 10000 м со средней скоростью 50 м/с. Фиксировали наступление времени смерти [28].

Гиперкапническая гипоксия

Модель гиперкапнической гипоксии у мышей вызывалась помещением каждого животного в аптечную емкость, объемом емкости 250 мл с притертой стеклянной пробкой. Для ограничения поступления воздуха в емкость, ее пробку смазывали вазелином. Во время пребывания мышей в герметично закрытой емкости содержание кислорода уменьшается, а концентрация углекислого газа увеличивается. Время наступления смерти фиксировалось [28].

Циркуляторная гипоксия

Модель циркуляторной гипоксии воспроизводили путем полной необратимой одномоментной билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс под

хлоралгидратным (350 мг/кг, AcrosOrganics) наркозом. После выхода животного из наркоза через 6, 12, 24 часа оценивали количество летальных исходов [49].

Гистотоксическая гипоксия

Данный вид гипоксии воспроизводили путем введения нитропрусида натрия внутривентрально, в дозировке 20 мг/кг. Фиксировали наступление времени смерти [23].

2.3.6. Метод оценки ноотропной активности.

Тест «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ)

Лабиринт Морриса (НПК «Открытая Наука», Россия) представляет собой круглый бассейн, который имеет диаметр 150-200 см и высоту 50-60 см, температура непрозрачной воды (например, подбеленной молоком) была 26-28 °С. В бассейн опускалась невидимая животному керамическая платформа высотой 14 см. Крысы находились в бассейне 2 минуты. Для помощи животным в определении местоположения в водном лабиринте в помещении использовались зрительные ориентиры. В течение 10 с, нашедшие платформу крысы, оставались на ней. В случае, когда животным не удавалось найти платформу в течение 120 с, их целенаправленно помещали на 10 с на нее. Крысам предоставлялось 2 попытки на поиск. До выполнения эксперимента проводилось обучение в течение четырех дней. Тест на запоминание выполняли на 5-й день [46].

Тест «Экстраполяционного избавления» (ТЭИ)

Установка (НПК «Открытая Наука», Россия) предназначена для изучения когнитивных функций мышей/крыс в условиях острого стресса и позволяет оценить: индивидуальные различия когнитивного стиля решения задачи (поиска пути избавления из стрессовой ситуации). Прибор представляет собой емкость (внешний цилиндр) с помещенным в подвешенном состоянии акриловым цилиндром (внутренний цилиндр) диаметром 9 см и высотой 23 см. Во внешний цилиндр заливают воду (температура 22⁰С) и фиксируют внутренний цилиндр, с помощью 3-х штанг-креплений с винто-резьбовым соединением, погружая его в водную среду на 2,5 см. После чего животное помещают во внутренний цилиндр

и проводят регистрацию поведенческой активности. При этом фиксируют следующие параметры: латентный период избегания (подныривания), число аверсивных реакций в форме карабканий и прыжков. Длительность тестирования составляет 2 мин [75].

Тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ)

Установка УРПИ (НПК «Открытая Наука», Россия) состоит из 2х секций: платформы 24,5х6 см, подвешанной над полом $h=1$ м, освещенной лампой, и камерой с черными стенками размером 39х39х39 см с электродным полом. Металлические прутья, из которых состоит пол, имеют $d=3$ мм, 11 мм-расстояние между прутьями. Между двумя секциями находится гильотинная дверь, отверстие, имеющее размеры 6х6 см. Животное помещалось хвостом к отверстию с полом, на которое подавалось напряжение (сила тока 0,45 мА), и находилось на ярко освещенной платформе. Фиксировали период первого захода в темную камеру с электродным полом. Животное извлекалось из установки по истечении 2-х мин [38].

2.3.7. Методы оценки анксиолитической активности.

Тест «Конфликтной ситуации по Вогелю (Vogel)

Суть теста заключается в конфликте электроболевого раздражения животного и питьевой мотивации. Методика осуществлялась в течение 3 дней. Суть первого дня заключалась в лишении животных питья. Во второй день отрабатывали навык взятия воды из поилки. На третий день животным интрагастрально вводили испытуемые вещества и препараты сравнения и через 15 мин помещали в экспериментальные камеры на 10 мин. Каждое взятие воды сопровождалось электроболевым воздействием, через 10 сек после начала питья. В тесте отмечали латентный период первого наказуемого подхода к поилке (иногда и второго), а также число наказуемых взятий воды из поилки [128]. Установка (Panlab, США).

Тест «Четырех пластин»

Установка (Panlab, США) представляет собой квадратную камеру, которая поделена внутри на отсеки, крест-накрест проходят металлические пластины с

током. Животным разрешено спокойно исследовать камеру, но при каждом переходе из одной части в другую животное будет получать электроболевое раздражение током. Тест продолжался 3 минуты и фиксировалось количество переходов между секторами [101].

2.3.8. Метод оценки эндотелиопротекторной активности.

Оценка вазодилатирующей функции эндотелия

Оценка вазодилатирующей функции эндотелия осуществлялась на ультразвуковом доплерографе УЗОП-010-01 («Минимакс» Санкт–Петербург, Россия) с последующей регистрацией скорости мозгового кровотока. Функцию сосудистого эндотелия оценивали путем введения специфичных анализаторов. В качестве модификаторов синтеза монооксида азота выступали: ацетилхолин (АЦХ), L-аргинин, L-NAME в дозировках 0,1 мг/кг, 150 мг/кг, 15 мг/кг соответственно. Независимую вазорелаксацию оценивали по реакции сосудов на введение нитроглицерина в дозе 0,007 мг/кг. После восстановления мозгового кровотока осуществлялось последующее введение анализатора. Местом введения анализаторов служила левая бедренная вена (внутривенно). В дальнейшем, по завершении необходимых манипуляций, животные выводились из эксперимента декапитированием. В последующем, в зависимости от изменения показателя скорости кровотока делали заключение о вазодилатирующей активности эндотелия [63].

Оценка антитромботической функции эндотелия

Методом G. Born в модификации Габбасова [39] производили оценку определения скорости и степени агрегации на агрегометре «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», РФ). В измерительную кювету агрегометра предварительно помещали 0,3 мл плазмы, термостатировали при температуре 37 °С в течение 3-х минут. Регистрацию агрегации осуществляли графически, после добавления АДФ (5 мкМ), служившего индуктором реакции. В течение 5 минут осуществляли графическую регистрацию процесса агрегации. В дальнейшем был введен

поправочный коэффициент равный 0,1 для облегчения интерпретации полученных результатов.

2.3.9. Метод оценки антиоксидантной активности.

Определение антирадикальной активности

Антирадикальная активность в отношении нитрозильного-анион радикала

Как известно, натрия нитропруссид в водном растворе разлагается, образуя оксид азота. Реагируя с кислородом, $\text{NO}\cdot$ образует нитрит и нитрат, количество которых возможно определить, используя реактив Грисса. Натрия нитропруссид 2 мл 10 мМ добавляли к фосфатному буферу 0,5 мл (pH 7,4) и смешивали с раствором исследуемого соединения в двукратном диапазоне разведений 0,5 мл. В дальнейшем происходило инкубирование смеси при 25°. После инкубации (15 мин) 0,5 мл аликвоты смешивали с 0,5 мл реактива. В дальнейшем происходило инкубирование полученной смеси при комнатной температуре 30 мин, после чего производили измерение оптической плотности при длине волны равной 546 нм (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия). По формуле $\text{NO}\cdot = [A_0 - A_1]/A_0 \times 100$, производили расчет процента ингибирования синтеза NO , где A_0 -экстинкция до реакции, A_1 экстинкция после реакции с реактивом Грисса [84].

Антирадикальная активность в отношении супероксидного-анион радикала

Данный вид активности был проведен по методу Winterbourne. Реакционная среда включала в себя: раствор нитро-синего тетразолия 0,1 мл 1,5 мМ, ЭДТА (0,1 М) 0,2 мл рибофлавина (0,12 мМ) 0,05 мл и 2,55 мл фосфатного буфера (pH 7,4), и смешивали с раствором исследуемого соединения в двукратном диапазоне разведений 0,5 мл. Инкубирование смеси происходило при 25° в течение 5 минут. Оптическая плотность полученных растворов измерялась при длине волны 560 нм (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия). По формуле $\text{O}_2^{\cdot-} = [A_0 - A_1]/A_0 \times 100$, рассчитывали процент ингибирования, где A_0 - экстинкция контрольной пробы, A_1 - экстинкция опытной пробы [84].

Определение концентрации малонового диальдегида

Малоновый диальдегид (МДА) определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия) в гомогенате мышечной ткани крыс. Суть заключается в образовании окрашенного продукта реакции малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой, имеющий максимум поглощения при 532 нм. Окраска раствора пропорциональна концентрации МДА. По величине молярного коэффициента экстинкции ($1,56 \times 10^5 \text{ лмоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$) рассчитывали содержание МДА. Размерность содержания МДА- нмоль/мг белка [58]. По методу Фолина определяли содержание белка.

Определение концентрации диеновых конъюгатов

Диеновые конъюгаты (ДК) определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия) в гомогенате мышечной ткани при длине волны 233 нм. Данные продукты (ДК) извлекали смесью гептан: изопропанол (1:1). По величине молярного коэффициента экстинкции ($2,2 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) рассчитывали концентрацию диеновых конъюгатов. Размерность содержания ДК- нмоль /мг белка [17]. По методу Фолина определяли содержание белка. Гомогенат мышечной ткани готовили на 100мМ трис-НСl буфере (рН 7,4 в соотношении 1:10).

Определение активности каталазы

В гомогенате мышечной ткани спектрофотометрическим (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия) методом определяли активность каталазы по скорости разложения H_2O_2 . Количество H_2O_2 определяли в реакции с 4% раствором аммония молибдата при 410 нм. Активность каталазы находили, как разность между опытной и холостой пробой (коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода $22,2 \times 10^3 \text{ мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$), выражали в нмоль/мин/мг белка [29]. По методу Фолина определяли содержание белка Супернатант мышечной ткани

получали центрифугированием гомогената (см. выше) на холоду в режиме - 1000g /10 мин.

Определение активности супероксиддисмутазы

В супернатанте гомогената мышечной ткани определяли активность СОД в реакции терминации образования формаза п-нитротетразолия хлорида (НТХ). Данный продукт (НТХ) служил как индикатор O_2^{*-} , а формазан (восстановленная форма НТХ) подвергалась растворению в ацетоне. Систему, состоящую из раствора рибофлавина $2,8 \cdot 10^{-5} M$, раствора ТМЭДа $1 \cdot 10^{-2} M$ в 0,05 M К-фосфатном буфере (рН 7,8) использовали для генерации O_2^{*-} при воздействии дневного света на расстоянии 20 см в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее применяли 5% раствор дезоксихолата для извлечения СОД из клеточных органелл. Добавлением ацетона и 20% раствора трихлоруксусной кислоты терминировали реакцию. Измерение оптической плотности производили на КФК-3 при длине волны 440 нм (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия). Размерность «активность СОД» - ед. акт/мг белка [67]. По методу Фолина определяли содержание белка.

Определение активности глутатионпероксидазы

В супернатанте гомогената мышечной ткани в сопряженной глутатионредуктазной реакции по убыли НАДФН определяли активность глутатионпероксидазы (ГП). Активность регистрировали в среде, содержащей $1,0 \cdot 10^{-3} M$ ЭДТА, 50мМ К, Na-фосфатный буфера, рН 7,4; 1 ед. акт./мл глутатиоредуктазы; $0,2 \cdot 10^{-3} M$ НАДФН; $1,0 \cdot 10^{-3} M$ GSH; 30-60 мкг белка на 1 мл среды на КФК-3 при 340 нм (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия). Реакцию проводили при температуре $25^{\circ}C$ с добавлением субстрата (гидропероксид кумола- $1,5 \cdot 10^{-3} M$). Размерность «активность ГП» - ед. акт /мг белка [162,125]. По методу Фолина определяли содержание белка.

2.4. Методы иммуноферментных исследований

Для изучения потенциальных механизмов действия исследуемых соединений-лидеров в гомогенате скелетной мышцы определяли концентрацию следующих маркеров: изоформы оксида азота- eNOS, nNOS iNOS, JNK (с-Jun-концевая киназа), AIF - (апоптоз-индуцирующий фактор), PPAR (рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом) методом высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере Tecan Infinite F50 (Австрия). Ход работы полностью соответствовал прилагаемому производителем инструкции к набору реактивов.

2.5. Методы статистической обработки результатов эксперимента

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Вычисляли среднее значение и его стандартную ошибку ($M \pm m$). Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки средних значений при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. В противном случае, при ненормальном распределении использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни [18]. Метод множественного сравнения использовался при углубленном изучении соединения-лидера: параметрический критерий – Ньюмана-Кейлса, непараметрический – Крускала-Уоллиса [37].

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ (ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ)

Одной из определяющих составляющих актопротекторной активности фармакологически активных веществ является способность препятствовать развитию физического утомления и психоэмоционального дисбаланса, что отражает уровень общей работоспособности организма.

Фармакологический скрининг в ряду изучаемых соединений – потенциальных актопротекторов проводился посредством оценки влияния данных веществ на уровень физической работоспособности, оцениваемой в тесте «принудительное плавание с отягощением», а также по способности изучаемых объектов стабилизировать психоэмоциональный фон экспериментальных животных после перенесенных истощающих нагрузок.

3.1.1. Влияние изучаемых соединений на физическую работоспособность экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в холодной воде

До начала проведения эксперимента у всех взятых в работу животных проводили оценку базовой продолжительности плавания, на основании данного времени были сформированы опытные группы. В итоге исходное время плавания во всех экспериментальных группах мышей статистически значимо не отличалось.

Группа животных положительного контроля (ПК) подвергалась нагрузкам группами по 3 особи ежедневно с днями отдыха, что не приводило к истощению мышей и стабилизировало уровень их физической активности. В результате 10 дней эксперимента продолжительность плавания мышей группы ПК значимо не изменялась (табл.4).

У группы животных негативного контроля (НК) время плавания с 1-го по 4-й день увеличивалось практически линейно. Пик работоспособности данной группы мышей отмечен на 4-й день плавания с нагрузкой и составлял + 27,1% ($p < 0,05$) относительно исходного времени плавания мышей НК группы. Однако, начиная с 5-го дня эксперимента физическая активность животных НК группы уменьшалась, и к концу эксперимента (10-й день плавания) работоспособность мышей группы НК снизилась по отношению к начальному времени плавания животных данной группы на 72,1% ($p < 0,05$).

На фоне введения экспериментальным животным референтного препарата Метапрот продолжительность плавания мышей увеличивалась до 8-го дня эксперимента (табл.4), где (на 8-й день) была отмечена пиковая работоспособность животных, получавших Метапрот, превосходившая исходный уровень физической активности данной группы мышей на 147,8% ($p < 0,05$) и на 113,5% ($p < 0,05$) продолжительность плавания НК группы животных в пиковый день физической работоспособности. Однако затем наблюдался спад физической активности и к концу эксперимента время плавания мышей, получавших Метапрот, превосходило исходную продолжительность плавания данной группы животных на 67,8% ($p < 0,05$), относительно НК группы мышей (10-й день эксперимента), изменения составили +216,2% ($p < 0,05$).

У животных, получавших соединение АТАСЛ, пик физической активности наблюдался на 8-й день плавания с нагрузкой, при этом продолжительность плавания по сравнению с ее исходным временем плавания данной группы мышей увеличилась на 191,1% ($p < 0,05$). Относительно пикового дня активности животных НК группы и мышей, которым вводили Метапрот максимальная работоспособность животных, получавших АТАСЛ, была выше на 230,1% ($p < 0,05$) и, получавшая Метапрот, на 54,6% ($p < 0,05$) соответственно. При этом следует отметить, что значимого падения физической активности на фоне введения соединения АТАСЛ не наблюдалось (табл.4) и к концу эксперимента продолжительность плавания животных, которым вводили соединение АТАСЛ,

было выше начального времени плавания данной группы мышей на 91% ($p<0,05$) и выше на 373,5% ($p<0,05$) аналогичного показателя группы животных НК.

Применение р-кумаровой кислоты способствовало линейному повышению физической работоспособности, максимальная продолжительность плавания животных была зафиксирована на 8-й день эксперимента. При этом работоспособность мышей, получавших р-кумаровую кислоту, превосходила исходное время плавания данной группы, на 158,1% ($p<0,05$), и была выше аналогичного показателя группы мышей НК на 186% ($p<0,05$). Пик работоспособности, который наблюдался в группе мышей, получавших р-кумаровую кислоту, был выше, относительно 8-го дня эксперимента группы НК, на 372,6% ($p<0,05$).

У группы животных, получавших кофейную кислоту, изменения в плавании носили вариабельный характер. Максимальная продолжительность плавания составляла $347,8\pm 6,1$ сек. и была установлена на 7-й день эксперимента. Относительно исходного значения данной группы работоспособность мышей в день пиковой физической активности увеличилась на 104,8% ($p<0,05$), в сравнении с группой негативного контроля работоспособность была выше 162,1% ($p<0,05$). В дальнейшем у группы, получавшей кофейную кислоту, произошел спад физической активности, и к концу эксперимента (10-й день) время плавания было ниже пикового дня плавания данной группы на 57,8% ($p<0,05$).

На фоне введения мышам синаповой кислоты наблюдалась положительная динамика в продолжительности плавания. Так, начиная с первого дня введения, время плавания росло линейно без выраженных скачков по 8-й день эксперимента. На девятый день пришелся пик работоспособности, которая была выше относительно исходного значения данной группы на 161,6%, и на 251,5% относительно исходного времени группы мышей негативного контроля. К концу эксперимента (10-й день) время плавания мышей, получавших синаповую кислоту, было также достоверно выше исходного времени данной группы на 99,

5% ($p < 0,05$) и выше, относительно первоначального показателя группы НК на 106,3% ($p < 0,05$).

Увеличение физической работоспособности наблюдалось и при применении сорбиновой кислоты. Пик наивысшей активности плавания наблюдался на 6-й день эксперимента, и составлял $477,1 \pm 10,2$ сек. Что было выше на 166,8% ($p < 0,05$) первоначальных показателей плавания данной группы и на 259,5% ($p < 0,05$) группы негативного контроля. В дальнейшем произошло плавное падение работоспособности. Статистически значимых отличий, между данными плавания 10 дня и первоначальными показателями данной группы, установлено не было.

У мышей, при применении апигенина максимальная продолжительность плавания отмечена на 9-й день эксперимента, при этом уровень физической работоспособности у животных, получавших апигенин, превосходил исходное время плавания данной группы мышей на 80,9% ($p < 0,05$), также аналогичный показатель группы животных НК на 157,3% ($p < 0,05$). На 10-й день плавания с нагрузкой продолжительность плавания мышей, которые получали апигенин, была на 52,8% ($p < 0,05$) выше первоначального уровня физической работоспособности данной группы животных и на 274% ($p < 0,05$) превосходила показатель НК группы мышей (табл.1)

Таблица-4

Влияние исследуемых соединений на физическую работоспособность мышей в тесте «принудительное плавание с отягощением» в холодной воде

Группа	День 1 (сек.)	День 2 (сек.)	День 3(сек.)	День 4 (сек.)	День 5 (сек.)	День 6 (сек.)	День 7 (сек.)	День 8 (сек.)	День 9 (сек.)	День 10 (сек.)
ПК	121,3±2,49	123,4±3,71	121,3±4,48	125,5±3,58	<u>126,1±4,76</u>	125,4±3,79	124,4±2,99	124,6±3,07	124,6±3,46	121,1±3,65
НК	132,7±3,46	150,8±4,98	147,3±6,27	<u>168,6±4,87α</u>	120,3±3,29	102,5±4,06	98,2±3,91	84,1±3,34	80,3±2,83	77,1±3,73 α #
Метапрот	145,3±5,49	169,22±3,60	258,22±4,629	264,556±4,571	264,4±3,99	279,44±2,25	266,67±2,34	<u>360±3,09 α^*</u>	220,44±3,26	243,78±5,49 α
АТАСЛ	191,2±11,08	250,5±13,37	268,7±11,06	407,6±15,77	465,1±12,94	417,6±14,05	378,3±21,47	<u>556,5±23,28α^*</u>	548,8±16,71	365,1±7,49 α
р-кумаровая кислота	147,1±14,72	149,1±11,70	159,4±14,50	170,9±12,09	209,5±10,04	259,8±16,65	353,2±14,23	<u>379,5±16,38α^*</u>	209,3±9,58	187,7±9,05
Кофейная кислота	169,8±11,93	177,2±8,47	196,1±14,50	227,2±12,41	265,5±12,11	299,5±14,98	<u>347,8±5,97α^*</u>	184,3±14,30	165,8±12,66	146,7±8,20
Синаповая кислота	178,3±15,96	234,3±6,22	263,7±11,24	310±14,68	369,1±12,35	391,6±11,59	426,5±14,95	450,4±10,59	<u>466,5±6,22α^*</u>	273,7±12,99
Сорбиновая кислота	178,8±13,1	210,7±8,72	212,4±8,81	235,1±6,63	289±10,32	<u>477,1±10,25α^*</u>	336,8±7,85	321,4±6,41	281,4±6,32	163,7±10,04
Апигенин	188,8±21,93	195,63±24,56	217±31,74	231,25±25,18	230,13±36,91	265,13±34,64	237,25±35,41	253,75±40,08	<u>341,5±22,97α^*</u>	288,38±40,28 α^*
РGT	144±6,44	165,1±7,98	143,6±14,44	180,67±14,41	143,5±9,7	183,57±15,17	171,28±17,4	204,71±38,94	<u>226,85±21,07α</u>	212,86±32,18 α^*
Гесперидин	198,8±16,17	296,4±4,02	323,2±3,56	328,4±5,64	321,2±3,86	393,5±1,67	380,6±1,82	<u>457,7±11,9 α^*</u>	403,2±8,87	344,9±6,24
Флоридзин	152,1±10,52	236,25±4,42	256,38±4,85	231,3±2,96	230,9±5,37	264,5±7,26	362,25±7,3	334,8±5,42	<u>378,3±2,92α^*</u>	302,4±2,62 α^*
Катехин гидрат	171,4±14,43	199,2±16,28	142,1±8,41	130,2±5,57	134,5±6,67	241,7±12,6	239,1±7,22	242,3±6,09	<u>395±14,47 α^*</u>	362,6±7,24
Морин гидрат	171,4±3,77	215,11±1,96	323,11±10,24	236,25±13,87	242,5±4,36	354,3±4,11	<u>430±4,22 α^*</u>	312±3,62	418,6±2,03	394±5,69 α^*
Икариин	<u>170,1±8,19</u>	167,1±7,92	136,4±3,94	124,3±4,14	120,4±4,71	128,3±7,37	119,3±5,49	120,3±4,55	115,3±9,85	99,4±5,8
Гесперетин	150,9±14,74	141,4±11,23	142,5±10,39	135,9±13,69	152,8±12,23	183,3±19,16	162,3±14,2	159±16,6	136,8±21,26	<u>187,4±23,32*</u>

Примечание: # - достоверно, относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); * - достоверно, относительно НК группы (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); α - достоверно, относительно исходного уровня работоспособности (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$).

На фоне введения экспериментальным животным PGT (табл.4) пиковое значение продолжительности плавания наблюдалось на 9-й день эксперимента и превосходило исходное время плавания данной группы мышей на 57,5% ($p<0,05$). Статистически значимых отличий между группой животных, получавших PGT, и НК группой мышей установлено не было.

У животных, получавших гесперидин, увеличение физической работоспособности происходило практически линейно начиная со 2-го дня введения исследуемого соединения, при этом максимальное время плавания, у мышей которым вводили гесперидин наблюдалось на 8-й день эксперимента и составляло +130,2% ($p<0,05$) по сравнению с первоначальным уровнем физической активности данной группы животных и +171,5% ($p<0,05$) относительно дня максимальной работоспособности мышей НК группы. Также следует отметить, что пиковое значение физической активности животных, которым вводили гесперидин на 27,1% ($p<0,05$) превосходило аналогичный показатель группы мышей, получавших референтный препарат Метапрот. Время плавания мышей к концу эксперимента на фоне применения гесперидина было выше на 73,5% ($p<0,05$) относительно первоначального значения данной группы животных и выше на 347,3% ($p<0,05$) аналогичного показателя группы мышей негативного контроля.

На фоне введения животным катехин гидрата максимальный уровень физической активности отмечен на 9-й день эксперимента, при этом продолжительность плавания мышей, получавших катехин гидрат, превосходила исходное значение работоспособности данной группы животных на 130,4% ($p<0,05$) и на 134,3% ($p<0,05$) была выше пикового уровня физической активности НК группы мышей. В последствие время плавания экспериментальных животных, которым вводили катехин гидрат, значимых изменений не претерпело и на 10-й день эксперимента продолжительность плавания мышей, получавших катехин гидрат, превосходило аналогичный показатель НК группы животных на 370,3%

($p < 0,05$) и на 111,6% ($p < 0,05$) превосходило первоначальный уровень работоспособности данной группы мышей (табл.4).

Применение морин гидрата способствовало повышению физической работоспособности экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок, однако, изменения носили «волнообразный» характер со значительными колебаниями уровня физической активности, при этом максимальная продолжительность плавания у данной группы мышей отмечена на 7-й день эксперимента и превышала исходное время плавания животных, получавших морин гидрат на 150,9% ($p < 0,05$) и на 155% ($p < 0,05$) превосходила аналогичный показатель НК группы мышей. К 10-му дню уровень физической активности животных, получавших морин гидрат, статистически значимо превосходил первоначальный показатель данной группы мышей на 129,9% ($p < 0,05$) и на 411% ($p < 0,05$) продолжительность плавания животных НК группы.

Применение икариина и гесперетина значимого влияния на уровень физической работоспособности экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок не оказало. Однако следует отметить, что на фоне введения мышам гесперетина продолжительность плавания к концу эксперимента статистически значимых изменений относительно исходного времени плавания данной группы животных не претерпевала, в то время как у НК группы животных и мышей, получавших икариин, уровень физической работоспособности имел тенденцию к снижению на всем протяжении эксперимента. Следовательно, можно предположить, что применение гесперетина в условиях истощающих нагрузок препятствовало срыву физической работоспособности, но не способствовало ее повышению.

3.1.2. Влияние изучаемых соединений на изменение психоэмоционального статуса экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в тесте «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В ходе проведения данного блока исследования установлено, что после перенесенных истощающих нагрузок у мышей наблюдается ухудшение

локомоторной и ориетировочно-исследовательской активности (табл.2), о чем свидетельствует снижение числа пересеченных секторов у НК группы животных по отношению к мышам ПК группы на 115,3% ($p<0,05$), а также уменьшение числа «заглядываний» на 166,7% ($p<0,05$) и числа стоек на 70% ($p<0,05$). Кроме того, у НК группы животных было отмечено повышение уровня тревожности, выражаемое в увеличении актов краткосрочного груминга по сравнению с ПК группой мышей на 90,7% ($p<0,05$) и времени пребывания в центральном квадрате на 55,6% ($p<0,05$).

Таблица-5

Влияние исследуемых соединений на состояние психоэмоционального статуса экспериментальных животных в тесте «Открытое поле» после перенесенных истощающих нагрузок

Группа	Число пройденных секторов, ед.	Число «заглядываний», ед.	Число стоек, ед.	Уринации, ед.	Болюсы, ед.	Груминг, число актов	Время в центральном секторе, сек.
ПК	65,8±9,1	8,0±1,8	7,0±1,4	0	0	4,3±0,6	9,0±2,6
НК	30,5±3,4#	3,0±0,7#	4,1±0,9#	1,9±0,5	6,5±1,1	8,2±0,9#	14,0±4,6#
Метапрот	195,8±16,7*	9,9±3,2*	33,3±8,3*	1,1±0,3	1,3±0,4	4,5±0,4*	2,2±0,4*
Гесперидин	182,7±19,5*	12,7±1,2*	32,1±4,3*	2,8±0,4	0,9±0,3	8,7±1,1	9,3±2,1*
АТАСЛ	153,9±9,5*	21,6±1,5*	34,8±3,8*	0	0,6±0,2	3,8±0,5*	3,4±0,5*
р-Кумаровая кислота	134,7±5,8	14,7±2,2	22,1±3,1	0	0,9±0,3	8,4±0,5	4,3±0,6
Кофейная кислота	143,6±7,5	10,2±1,8	17,3±3,4	0	0,6±0,2	9,2±0,5	3,1±0,5
Синаповая кислота	111,4±7,3	17,3±4,1	24,5±4,7	0	1,4±0,3	7,4±1,2	5,6±1
Сорбиновая кислота	128,3±15,1	13,1±2,5	27,6±3,7	0	1,1±0,4	9,1±1,4	4,7±0,7
Катехин гидрат	142±10,5*	12±1,07*	15,5±2,3*	0	1,2±0,26	4,9±0,4*	2,8±0,7*
Морин гидрат	127,1±7,7*	6,5±1,4*	6,6±1,1*	0	0,6±0,3	8,9±1,1	8,4±1,36*
Флоридзин	154±17,8*	7,3±1,2*	28,9±3,4*	0	2,4±0,5	9,4±0,7	9,6±1,57*
Икариин	55,3±6,5	7,0±2,3	10,8±1,7	0	0,5±0,2	7,2±0,8	14,5±3,5
Апигенин	97,9±8,61*	9,0±0,69*	2,9±1,85	0	0,5±0,38	8,8±1,1	17,2±3,3
Гесперетин	41,9±13,25	9,0±1,28	26,5±4,52	0	0,9±0,23	9,2±1,3	21,5±0,56
PGT	151,1±14,31*	11,9±3,54*	5,9±2,62	0	0,3±0,18	9,6±1,1	12,3±1,4

Примечание: # - достоверно, относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); *- достоверно, относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$).

У животных, получавших препарат сравнения Метапрот в тесте «Открытое поле» после перенесенных истощающих нагрузок отмечено восстановление локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности, а также уменьшение уровня тревожности, о чем свидетельствует повышение у данной группы мышей количества пересеченных секторов, числа стоек и «заглядываний» в 6,4 раза ($p < 0,05$), и 8,1 раза ($p < 0,05$) в 3,3 раза ($p < 0,05$) соответственно и снижение актов краткосрочного груминга, времени нахождения в центральном секторе в 1,8 раза ($p < 0,05$), и 6,4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

В ряду исследуемых соединений наиболее выраженное влияние на поведенческую активность мышей в тесте «Открытое поле» оказало применение соединений: АТАСЛ, р-кумаровая, кофейная, синаповая, сорбиновая кислоты, гесперидин, катехин гидрат, морин гидрат, флоридзин, апигенин и PGT. При этом на фоне введения экспериментальным животным соединений АТАСЛ и гесперицина показатели локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности и уровня тревожности были сопоставимы с таковыми при применении референтного препарата Метапрот и статистически значимо превосходили аналогичные значения НК группы мышей: число пересеченных секторов в 5 ($p < 0,05$) и 6 ($p < 0,05$) раз соответственно, число стоек-в 8,4 раза ($p < 0,05$) и 7,8 ($p < 0,05$) раза соответственно, числа «заглядываний» - в 7,2 ($p < 0,05$) раза и 4,2 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл.5). Число актов груминга и время пребывания в центральном секторе при применении АТАСЛ по отношению к НК группе животных, напротив, уменьшились в 2,2 раза ($p < 0,05$), 6,3 раза ($p < 0,05$), у группы, получавшей гесперидин, время в центральном секторе было ниже в 1,5 раза ($p < 0,05$), в сравнении с группой животных НК. По показателю «груминг» значимых отличий от группы животных НК отмечено не было.

На фоне введения р-кумаровой и кофейной кислоты наблюдается увеличение числа пройденных секторов в 4,4 раза ($p < 0,05$) и 4,7 раз ($p < 0,05$) соответственно, числа стоек-в 5,4 ($p < 0,05$) и 4,2 раза ($p < 0,05$), числа «заглядываний»-4,9 ($p < 0,05$) 3,4 раза ($p < 0,05$), относительно группы мышей

негативного контроля. Наряду с двигательной и ориентировочно-исследовательской активностью изменения претерпевали и показатели тревожности. У групп мышей, получавших р-кумаровую и кофейную кислоты (относительно группы негативного контроля) наблюдается снижение таких показателей, как: «время нахождения в центральном квадрате» в 3,3 ($p<0,05$) и 4,5 ($p<0,05$) раза и «болюсы» в 7,2 ($p<0,05$) и 10,8 раз ($p<0,05$).

Повышение двигательной, ориентировочно-исследовательской активности наблюдалось также в группах мышей, получавших синаповую и сорбиновую кислоты. Это нашло свое отражение в достоверном увеличении числа пересеченных секторов в 3,7 ($p<0,05$) раз и 4,2 ($p<0,05$) раза, стоек - в 4,2 ($p<0,05$) и 6,7 ($p<0,05$) раза, числа «заглядываний»-5,8 раз ($p<0,05$) и 4,4 раза ($p<0,05$) соответственно аналогичных показателей группы животных НК.

Кроме того, у данных групп мышей, в сравнении с группой животных НК, было отмечено уменьшение уровня тревожности. Данный факт нашел свое отражение в снижении времени нахождения в центральной зоне- 2,5 ($p<0,05$) и 3,1 раза ($p<0,05$), количестве болюсов-4,6 ($p<0,05$) и 5,9 раза ($p<0,05$).

У животных, получавших катехин гидрат число пересеченных секторов «Открытого поля» статистически значимо превосходило аналогичный показатель НК группы животных в 4,6 раза ($p<0,05$). Число стоек и «заглядываний» у мышей, которым вводили катехин гидрат, также было выше по отношению к НК группе животных в 3,8 ($p<0,05$) и 4 раза ($p<0,05$) соответственно. Число актов груминга и время нахождения в центральном секторе на фоне введения мышам катехин гидрата было ниже относительно НК группы животных в 1,7 раза ($p<0,05$) и 5 раз ($p<0,05$) соответственно.

На фоне введения экспериментальным животным PGT относительно НК группы мышей наблюдалось увеличение числа пройденных секторов и «заглядываний» в 4,9 раза ($p<0,05$), 4 раза ($p<0,05$) соответственно. Остальные изучаемые показатели статистически значимых изменений по отношению к НК группе мышей не претерпевали (табл. 5.).

Применение морин гидрата, флоридзина и апигенина оказало значимое влияние на изменение локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности. Так, на фоне введения экспериментальным животным морин гидрата, флоридзина и апигенина число пересеченных секторов по отношению к НК группе мышей увеличилось в 4,2 ($p<0,05$) раза, 5 ($p<0,05$) раз и 3,2 раза соответственно, число «заглядываний» возросло в 2,2 ($p<0,05$) раза, в 2,4 ($p<0,05$) раза и 3 раза соответственно. Количество стоек по отношению к НК группе животных статистически значимо увеличилось только при применении флоридзина в 7 ($p<0,05$) раз.

Введение экспериментальным животным икарина и гесперетина значимого влияния на поведенческую активность мышей в тесте «Открытое поле» после перенесенных истощающих перегрузок не оказало.

Ухудшение психоэмоционального статуса наблюдалось после физических нагрузок в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у группы мышей НК в сравнении с животными ПК, что отражалось в снижении ориентировочно-исследовательской активности (стойки, свешивания) - в 3,3 ($p<0,05$) и 2,8 раз ($p<0,05$), локомоторной активности (число переходов) - в 2,1 раз ($p<0,05$) и повышении уровня тревожности. У группы мышей НК наблюдалось повышение времени пребывания животных в закрытых рукавах «ПКЛ» относительно животных ПК на 20,2% ($p<0,05$), а также повышение времени нахождения в центральном квадрате - на 51,2% ($p<0,05$), при этом на открытые рукава теста приходилось $42,6\pm 3,2$ сек. Число актов груминга и число болюсов были достоверно выше аналогичных показателей группы животных ПК в 2 ($p<0,05$) и 3 раза ($p<0,05$).

На фоне применения препарата сравнения Метапрота отмечается достоверное снижение времени нахождения в закрытых рукавах «ПКЛ» относительно группы НК на 50,1% ($p<0,05$), времени в центре - на 48,3% ($p<0,05$), и повышение продолжительности пребывания животных в открытых рукавах на 300,5% ($p<0,05$). Следует также отметить, что число кратковременного груминга

и количество болюсов было ниже в 2,2 ($p<0,05$) в 6,5 раз ($p<0,05$) относительно группы НК. Касательно ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности, то у группы мышей, получавших Метапрот, наблюдалось увеличение числа стоек в 6,8 раз ($p<0,05$), количества свешиваний - в 7,6 раз ($p<0,05$), и повышение числа переходов-в 3 раза ($p<0,05$) относительно группы негативного контроля.

Группы животных, получавших геперидин, р-кумаровую и кофейную кислоты показали схожие результаты. Так, время нахождения в открытых рукавах увеличилось, относительно группы мышей негативного контроля на 180,5% ($p<0,05$), 174,9% ($p<0,05$) и 176,8% ($p<0,05$) соответственно. Уменьшилось время пребывания в центральной зоне на 44,3% ($p<0,05$), 41,5% ($p<0,05$), 33,3% ($p<0,05$), относительно группы животных НК. На фоне истощающих нагрузок при применении данных соединений относительно группы НК наблюдается снижение количества болюсов - в 2,4 раза ($p<0,05$) (гесперидин), в 2,7 раза ($p<0,05$) (р-кумаровая кислота), и в 4,7 ($p<0,05$) и 1,6 раз ($p<0,05$) (кофейная кислота). Кроме этого, необходимо отметить повышение ориентировочно-исследовательской активности-в 5,2 ($p<0,05$), 6,5 ($p<0,05$), 4,9 раз ($p<0,05$) (стойки); в 3,8 ($p<0,05$), 2,2 ($p<0,05$), 2,2 раза ($p<0,05$) (свешивания) соответственно, в сравнении с группой негативного контроля. Показатели двигательной активности были сопоставимы с показателями группы животных НК.

Относительно группы НК, на фоне применения АТАСЛ увеличилась двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных. Так, число стоек, свешиваний и переходов увеличилось в 9,2 раза ($p<0,05$), 6,2 ($p<0,05$) и 2,5 раз ($p<0,05$). Время нахождения животных в открытых рукавах «приподнятого крестообразного лабиринта», а также время в центральной зоне, было выше, относительно группы животных негативного контроля, на 289,4% ($p<0,05$) и 53,5% ($p<0,05$) соответственно.

Таблица-6

Влияние исследуемых соединений на состояние психоэмоционального статуса экспериментальных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» после перенесенных истощающих нагрузок

Группы	Время в закрытых рукавах,сек	Время в центральном квадрате,сек	Время в открытых рукавах,сек	Стойки	Болюсы	Свешивания	Груминг, число актов	Число переходов
ПК	172,4±7,1	33±3,0	94,6±4,9	15,62,7	2,4±0,5	6,4±1	3,1±0,4	8,5±1,3
НК	207,3±5,5*	50,1±3,1*	42,6±3,2*	4,7±0,7*	7,2±1*	2,3±0,6*	6,2±0,8*	4,0±0,6*
Метапрот	103,5±7,6#	25,9±2,5#	170,6±7,2#	32,1±2,9#	1,1±0,4#	17,4±2,1#	2,8±0,4#	12,0±1,9#
Гесперидин	152,6±4,8#	27,9±2,8#	119,5±5,2	24,3±2,2#	3,1±0,7#	8,7±1,3#	6,8±0,8	4,0±0,7
АТАСЛ	110,8±6,5#	23,3±2,5#	165,9±5,8	43,4±3,9#	0,4±0,2#	14,2±3,4#	3,5±0,4#	10±1,5#
р-Кумаровая к-та	153,6±5,9#	29,3±2,9#	117,1±6,1#	30,4±4,1#	2,7±0,4#	6,3±1,9	6,9±1,0	3,0±0,4
Кофейная к-та	148,7±3,3#	33,4±2,9#	117,9±4,3#	23,1±3,1#	4,4±0,7#	5,0±1,4	7,1±0,6	4,0±0,8
Синаповая к-та	187,5±4,9#	25,7±2,2#	86,8±3,3#	12,7±2,8#	3,2±1,2#	4,8±1,4	7,8±1,0	5,0±1,2
Сорбиновая к-та	174,2±7,8#	25,1±1,7#	100,7±4,3#	22,6±3,3#	5,6±1#	7,1±1,7#	8,2±1,3	7,0±1,7
Катехин гидрат	134,3±6,7#	20,6±1,3#	145,1±5,8#	27,4±4,1#	0,6±0,3#	10,3±1,4#	2,6±0,3#	8,0±1,2#
Морин гидрат	161,3±5,4#	37,5±2,3#	101,3±5,5#	19,3±2,5#	5,3±1,8	5,2±1,9	7,4±1,4	5,0±0,8
Флоридзин	163,4±6,3#	42,2±2,6	94,4±4,1#	35,6±4#	4,2±0,9#	4,3±1,4	6,5±0,9	3,0±0,4
Икариин	170,6±6,4#	47,3±2,9	82,1±5,4#	10,5±1,5#	3,3±1,1#	4,6±1,5	7,7±1,1	6,0±1
Апигенин	186,3±5,5#	46,1±3,5	67,6±3,4#	6,6±1	6,2±1,5	7±1,3#	8,4±1,3	4,0±1,1
Гесперетин	168,6±5,4#	52,6±4	78,8±4,9#	14,8±3,1#	5,9±1,1	6,2±1,1#	8,1±1,2	3,0±0,5
PGT	175,8±7#	48,4±3,4	75,8±3,3#	16,3±3,4#	3,6±1#	3,6±0,9	8,8±1,2	4,0±0,9

Примечание: * - достоверно, относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$), #- достоверно, относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

Продолжительность пребывания мышей в закрытых рукавах «ПКЛ» была ниже на 46,6% ($p<0,05$) (группы негативного контроля). Болюсы и кратковременный груминг, относящиеся к показателям тревожности, также были достоверно ниже в 18 и 1,8 раз ($p<0,05$).

Ряд веществ синаповая кислота, сорбиновая кислота, морин гидрат, флоридзин, икариин, апигенин, гесперитин и PGT проявляли схожую активность между собой. Продолжительность пребывания животных в открытых рукавах «приподнятого крестообразного лабиринта» была выше, относительно группы негативного контроля, на 103,8% ($p<0,05$), 136,4% ($p<0,05$), 137,8% ($p<0,05$), 121,6% ($p<0,05$), 92,7% ($p<0,05$), 58,7% ($p<0,05$), 85,1% ($p<0,05$), 77,9% ($p<0,05$) соответственно. Необходимо отметить также, что достоверно уменьшилось пребывание животных в закрытых рукавах лабиринта, соответственно на 9,6% ($p<0,05$), 16,1% ($p<0,05$), 22,2% ($p<0,05$), 21,2 ($p<0,05$), 17,7% ($p<0,05$), 10,1% ($p<0,05$), 18,7% ($p<0,05$), 15,2% ($p<0,05$). Время в центральной зоне было также ниже на 48,7%-у группы, получавшей синаповую кислоту, на 49,9% ($p<0,05$) - получавшей сорбиновую кислоту. В группах мышей, получавших морин гидрат, флоридзин, икариин, апигенин, гесперитин и PGT, время в центральной зоне, а также число актов груминга в тесте «ПКЛ» статистически значимо не отличались от аналогичных показателей, в сравнении с группой НК (табл.6).

Достоверное снижение числа болюсов наблюдалось в группах, получавших синаповую кислоту, в 2,3 раза ($p<0,05$), икариин в 2,2 раза ($p<0,05$), PGT-в 2 раза ($p<0,05$). Касательно ориентировочно-исследовательской активности наблюдалось увеличение числа стоек - в 2,7 раз ($p<0,05$) (синаповая кислота); в 4,8 раз ($p<0,05$) (сорбиновая кислота); в 4,1 раз ($p<0,05$) (морин гидрат); в 7,6 раз ($p<0,05$) (флоридзин); в 2,2 раза ($p<0,05$) (икариин); в 3,1 раза ($p<0,05$) (гесперетин); в 3,5 раза ($p<0,05$) (PGT).

Относительно группы НК число свешиваний было выше, в группе, получавшей сорбиновую кислоту, в 3,1 раза ($p<0,05$); апигенин - в 3 раза ($p<0,05$); и гесперетин - в 2,7 раз ($p<0,05$).

Значимое влияние на уровень психоэмоционального статуса животного, после перенесенных физических нагрузок, оказало применение катехин гидрата. Что выражается в увеличении ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности после истощающих нагрузок, а также снижение уровня тревожности мышей. Так, продолжительность пребывания животных в открытых рукавах лабиринта была выше, относительно группы мышей НК, на 240,6% ($p<0,05$). Время в центральном квадрате и в закрытых рукавах имело тенденцию к снижению на 58,9% ($p<0,05$) и 35,2% ($p<0,05$), относительно также группы НК. Показатели «болюсы» и «груминг» были значительно ниже значений группы негативного контроля в 12 ($p<0,05$) и в 13,8 раз ($p<0,05$). При применении катехин гидрата возросла двигательная активность животных, что отражается в увеличении числа переходов в 2 раза ($p<0,05$), и увеличении числа стоек и свешиваний животных (ориентировочно-исследовательская активность) - в 5,8 ($p<0,05$) и 4,5 раз ($p<0,05$). Показатели локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности, а также показатели тревожности в тесте «ПКЛ» сопоставимы с результатами «ОП».

3.2. Изучение дозозависимого влияния соединений–лидеров на физическую работоспособность и психоэмоциональный статус животных в условиях истощающих нагрузок в холодной воде

В данной серии экспериментов оценивалось дозозависимое влияние соединений-лидеров (АТАСЛ и катехин гидрат) на уровень физической активности и изменение психоэмоционального статуса мышей (массой 20-23 грамма) в условиях длительных истощающих нагрузок, воспроизведенных в

тесте «принудительное плавание с отягощением». Соединения - лидеры вводились в двух вариантах доз: 100 мг/кг и 200 мг/кг каждое.

3.2.1. Влияние различных доз соединений-лидеров на уровень физической работоспособности животных в условиях истощающих нагрузок в холодной воде

До проведения экспериментов у всех животных производили оценку первичного уровня работоспособности в тесте «принудительное плавание с отягощением», на основании чего была проведена рандомизация и формирование экспериментальных групп мышей. В итоге исходное время плавания во всех экспериментальных группах животных статистически значимо не отличалось между собой.

Как и в ранее проведенных экспериментах ПК группа мышей подвергалась дозированным нагрузкам группами, без наступления истощения. В итоге продолжительность плавания ПК группы животных статистически значимых изменений на всем протяжении эксперимента не претерпела.

У мышей НК группы максимальное время плавания зафиксировано на 4-й день эксперимента, однако, статистической достоверности относительно исходной продолжительности плавания данной группы животных отмечено не было. В дальнейшем уровень физической работоспособности у НК группы мышей снижался (рис.5) и на 10-й день плавания с нагрузкой продолжительность плавания мышей НК группы уменьшилась относительно первоначального показателя данной группы животных на 55,9% ($p < 0,05$), и на 53,6% ($p < 0,05$) относительно конечного экспериментального дня группы ПК.

На фоне введения мышам референтного препарата Метапрот пиковая физическая работоспособность отмечена на 7-й день плавания с нагрузкой и составляла +175,6% ($p < 0,05$) относительно исходной продолжительности плавания данной группы животных и +124,8% ($p < 0,05$) по сравнению с

максимальным временем плавания мышей НК группы. На 10-й день эксперимента время плавания животных, получавших Метапрот, превосходило исходную продолжительность плавания данной группы мышей на 86,8% ($p < 0,05$) и в 2 раза ($p < 0,05$) было выше времени плавания НК группы животных.

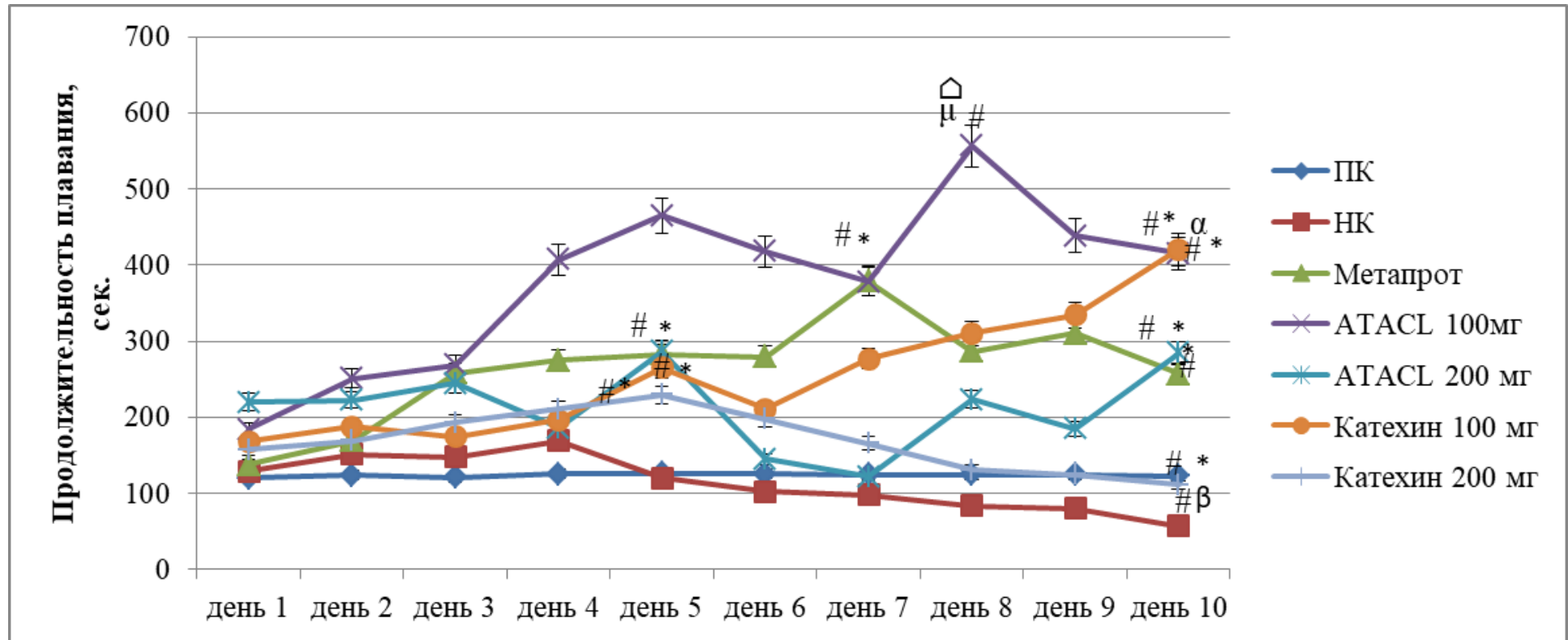
Соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг способствовало повышению уровня работоспособности мышей (рис.5), что нашло свое отражение в увеличении продолжительности плавания животных конечного дня эксперимента, относительно исходного времени плавания данной группы, на 125,4% ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что увеличение продолжительности плавания у животных, получавших соединение АТАСЛ, происходило плавно, без резких перепадов уровня физической активности с пиком работоспособности на 8-й день эксперимента. В сравнении с референтным препаратом Метапрот продолжительность плавания мышей, которым вводили соединение АТАСЛ, в дозе 100 мг/кг в день максимальной физической активности превосходила аналогичное значение животных, получавших Метапрот на 46,8% ($p < 0,05$). К концу эксперимента время плавания мышей, которым вводили соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, превосходило показатель 10-го дня плавания НК группы животных в 7,3 раза ($p < 0,05$). Было отмечено, что пик работоспособности мышей, получавших соединение АТАСЛ, в дозировке 100 мг/кг был выше на 94,6% ($p < 0,05$), относительно группы мышей, получавших АТАСЛ в дозировке 200 мг/кг.

Максимальная продолжительность плавания у мышей, которым вводили соединение АТАСЛ в дозе 200 мг/кг, отмечена на 5-й день эксперимента, превосходя при этом первоначальное время плавания данной группы животных на 30,1% ($p < 0,05$) и на 121% ($p < 0,05$) продолжительность плавания мышей НК группы. В дальнейшем уровень физической активности животных на фоне применения соединения АТАСЛ в дозе 200 мг/кг не изменялся и на 10-й день время плавания мышей, получавших АТАСЛ в дозе

200 мг/кг, было выше аналогичного значения НК группы животных на 398,8% ($p<0,05$).

У животных, получавших катехин гидрат в дозе 100 мг/кг, пиковая продолжительность плавания отмечена на 10-й день эксперимента и превосходила при этом исходное время плавания данной группы мышей на 149,8% ($p<0,05$) и на 225% ($p<0,05$) была выше исходного дня физической активности группы животных НК. Работоспособность мышей, получавших катехин гидрат, в дозировке 100 мг/кг была выше на 83,3% ($p<0,05$), относительно времени плавания животных, получавших данную субстанцию, в дозировке 200 мг/кг.

На фоне применения катехин гидрата в дозе 200 мг/кг максимальное время плавания мышей было выше аналогичного показателя НК группы животных на 36,1% и на 45,6% ($p<0,05$) выше исходной продолжительности плавания данной группы мышей (рис.5).



Примечание: *- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); # - статистически значимо относительно исходного времени плавания (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); α - статистически значимо относительно группы животных, получавшей катехин гидрат в дозировке 200 мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей АТАСЛ в дозировке 200 мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); β - статистически значимо относительно конечно дня группы животных ПК (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

Рисунок 5 - . Влияние различных доз катехин гидрата и соединения АТАСЛ на продолжительность плавания животных в тесте «принудительное плавание с отягощением»

3.2.2. Влияние различных доз соединений-лидеров на изменение психоэмоционального статуса экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в тесте «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

После перенесенных истощающих нагрузок у группы животных НК отмечено ухудшение психоэмоционального статуса, что выражалось в снижении в тесте «Открытое поле» локомоторной (число пересеченных секторов), ориентировочно-исследовательской активности (число «заглядываний» и число стоек) и повышении уровня тревожности мышей (число актов груминга и время в центральном секторе), относительно ПК группы животных, что согласуется с ранее проведенным исследованием на этапе фармакологического скрининга (табл.7).

У мышей, получавших Метапрот, по сравнению с НК группой животных, наблюдалось повышение количества пройденных секторов в 4,4 раза ($p < 0,05$), числа «заглядываний» и стоек в 2,9 ($p < 0,05$) и 10 ($p < 0,05$) раз соответственно, а также уменьшение числа актов кратковременного груминга в 1,8 ($p < 0,05$) раза, что отражает благоприятное влияние Метапрота на психоэмоциональный фон экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок (табл.7).

На фоне введения экспериментальным животным соединения АТАСЛ в дозе 100 мг/кг по отношению к НК группе мышей наблюдалось улучшение локомоторной функции, выражаемой в повышении числа пройденных секторов в 4,3 ($p < 0,05$), ориентировочно-исследовательской активности, о чем свидетельствует повышение числа стоек и «заглядываний» у животных, которым вводили АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, относительно НК группы мышей в 11,5 ($p < 0,05$) раза и в 6,4 ($p < 0,05$) раза соответственно, а также исходя из уменьшения числа актов кратковременного груминга и времени нахождения в центральном секторе у животных, получавших соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг по отношению к НК группе мышей в 2,6 ($p < 0,05$) раза и 2,8 ($p < 0,05$)

раза соответственно, можно предположить, что применение соединения АТАСЛ в дозе 100 мг/кг способствует снижению уровня тревожности экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок (табл.7).

Применение соединения АТАСЛ в дозе 200 мг/кг способствовало увеличению, относительно НК группы животных числа пройденных секторов в 3,9 ($p<0,05$) раза, количества стоек и «заглядываний» в 6,3 ($p<0,05$) и 3,6 ($p<0,05$) раза соответственно. Остальные изучаемые показатели статистически значимо по отношению к НК группе мышей не изменились.

При сравнении соединения АТАСЛ в двух дозировках 100 мг/кг и 200 мг/кг между собой, наблюдалось достоверное улучшение ориентировочно-исследовательской активности мышей, получавших АТАСЛ в дозе 100мг/кг, что выражалось в увеличении числа стоек и «заглядываний» в 1,2 раза ($p<0,05$) и 1,8 раз($p<0,05$) соответственно, относительно группы животных, получавших АТАСЛ в дозировке 200мг/кг. Уровень тревожности также был ниже, относительно группы, получавших АТАСЛ в дозе 200 мг/кг, в 1,6 раз ($p<0,05$) (число актов груминга) и в 2 раза ($p<0,05$) (время в центральном секторе).

Таблица-7

Влияние различных доз соединений-лидеров и их комбинации на изменение психоэмоционального статуса животных в тесте «Открытое поле» после перенесенных истощающих нагрузок

Группа	Число пройденных секторов	Число «заглядываний»	Число стоек	Уринации	Болюсы	Груминг, число актов	Время в центральном секторе
ПК	81,3±2,3	15,2±1,9	12,4±0,9	0	0,1±0,013	4,8±0,8	12,2±0,3
НК	34,1±1,5#	5,8±0,9#	2,4±1,4#	0	0,3±0,024	8,7±0,8#	31,6±2,2#
Метапрот	151,3±7,2*	17,1±3,5*	24,0±1,3*	0	0	4,9±0,5*	20,6±0,8
АТАСЛ 200 мг	133,8±11,8*	20,8±1,8*	15,2±2,9*	0	0	5,3±0,7*	23,8±2,7*
АТАСЛ 100 мг	147,4±11,3*	37,0±3,8* α	27,6±2,2* α	0	0,1±0,134	3,4±0,4* α	11,4±1,7* α
Катехин гидрат 200 мг	123,3±24,5*	7,7±1,1	8,6±1,2	0	0,9±0,459	7,4±1,0	13,4±1,3*
Катехин гидрат 100 мг	122,3±13,5*	16,9±1,8* $\triangle$	14,5±1,8* $\triangle$	0	0,7±0,3	4,2±0,4* $\triangle$	5,9±0,8* $\triangle$

Примечание: # - статистически значимо относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

* - статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

α - статистически значимо относительно группы животных, получавших АТАСЛ, в дозе 200мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

$\triangle$ - статистически значимо относительно группы животных, получавших катехин гидрат, в дозе 200 мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

У животных, получавших катехин гидрат в дозе 200 мг/кг, по сравнению с НК группой мышей статистически значимо изменилось лишь число пересеченных секторов, а именно, отмечено увеличение данного показателя в 3,6 ($p<0,05$) раза. Время нахождения в центральном секторе у животных, которым вводили катехин гидрат в дозе 200 мг/кг, относительно НК группы мышей, напротив, уменьшились в 2,8 ($p<0,05$) раза (табл.7).

На фоне введения экспериментальным животным катехин гидрата в дозе 100 мг/кг (табл.7) по сравнению с мышами НК группы отмечено повышение числа пересеченных секторов, «заглядываний» и стоек в 3,6 ($p<0,05$), 2,9 ($p<0,05$) и 6,0 ($p<0,05$) раза соответственно, а также снижение краткосрочного груминга и времени нахождения в центральном секторе в 2,1 ($p<0,05$) и 5,4 ($p<0,05$) раза соответственно.

Увеличение числа стоек и «заглядываний» наблюдается у группы, получавших катехин гидрат, в дозе 100 мг/кг - в 1,7 ($p<0,05$) и 2,2 раза ($p<0,05$), относительно группы мышей, получавших аналогичное соединение в дозировке 200 мг/кг, и снижение продолжительности груминга и времени нахождения животного в центральном секторе в 1,8 раз ($p<0,05$) и 2,3 раза ($p<0,05$).

Ухудшение психоэмоционального статуса мышей после физических нагрузок наблюдается и в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», данный факт нашел свое отражение в снижении ориентировочно-исследовательской активности группы животных негативного контроля (стойки, свешивания) - в 3,4 ($p<0,05$) и 2,4 раза ($p<0,05$); локомоторной активности (число переходов) - 1,7 раза ($p<0,05$), относительно группы мышей ПК. Относительно этой же группы возрос уровень тревожности, что наблюдается в снижении времени нахождения мышей в открытых рукавах крест-лабиринта в 1,9 раза ($p<0,05$), повышении времени пребывания мышей в центральном квадрате - в 2,3 раза ($p<0,05$), а также в достоверном

повышении количества болюсов в 16 раз ($p < 0,05$) и в количестве актов груминга в 2,3 раза ($p < 0,05$) (табл.8).

У группы животных, получавших препарат сравнения Метапрот, наблюдается повышение числа стоек и свешиваний, относительно группы НК, в 7,3 раза ($p < 0,05$) и 4,8 раз ($p < 0,05$), при этом достоверно возросло число переходов в 2 раза ($p < 0,05$). Значительно ниже был показатель груминга относительно группы НК, в 1,7 раз ($p < 0,05$). На фоне применения Метапрота существенно возросло пребывание мышей как в открытых рукавах «ПКЛ», что было выше в 3,1 раза, так и в центральном квадрате - в 2,3 ($p < 0,05$), в свою очередь, снизилось время посещения закрытых рукавов в 1,8 раза ($p < 0,05$), относительно группы НК животных. Полученные результаты подтверждают благоприятное влияние препарата на психоэмоциональный фон в тесте «Открытое поле» на фоне ежедневных истощающих нагрузок животных.

Улучшение двигательной (число переходов) в 1,8 раз ($p < 0,05$) и ориентировочно-исследовательской активности (число стоек, число свешиваний) - 9,4 раза ($p < 0,05$) и 3,7 раз ($p < 0,05$) наблюдалось на фоне применения соединения АТАСЛ в дозировке 100 мг/кг, в сравнении с группой НК. При этом время нахождения в закрытых рукавах, краткосрочный груминг, а также время в центральной зоне было ниже, по отношению к группе НК, в 1,5раза ($p < 0,05$), 2,5 раз ($p < 0,05$) и 2,6 раза ($p < 0,05$) соответственно, а время в открытых рукавах площадки было выше в 2,9 раза ($p < 0,05$).

У мышей на фоне применения АТАСЛ в дозе 200 мг/кг в сравнении с группой НК, наблюдалось улучшение ориентировочно-исследовательской активности, что находит свое отражение в увеличении числа стоек и свешиваний в 4,8 ($p < 0,05$) и 1,6 раз ($p < 0,05$), и улучшении показателей тревожности, о чем свидетельствует снижение времени в закрытых рукавах в 1,4 раза ($p < 0,05$), в центральном квадрате - в 2,6раз ($p < 0,05$), и повышение в

открытых - в 2,4 раза ($p < 0,05$) (табл.8). Число болюсов было ниже, по отношению к группе НК животных в 3,4 раза ($p < 0,05$).

Группа мышей, которым вводили соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, достоверно превосходила аналогичную группу, с вводимой дозировкой 200 мг/кг по показателям: «время в открытых рукавах» - в 1,2 раза ($p < 0,05$); «число стоек» - в 2 раза ($p < 0,05$); «число свешиваний» - в 2,3 раза ($p < 0,05$); «число переходов» - в 2 раза ($p < 0,05$).

Введение животным катехин гидрата в дозе 100 мг/кг способствует достоверному снижению уровня тревожности, что отражается в снижении актов груминга, относительно группы НК животных в 2,1 раз ($p < 0,05$), времени в центральном квадрате в 2,8 раз ($p < 0,05$), нахождении в закрытых рукавах в 1,4 раза ($p < 0,05$), повышении времени пребывания в открытых рукавах «ПКЛ» в 2,8 раза ($p < 0,05$). Наблюдалось улучшение ориентировочно-исследовательской активности в 6,8 раз ($p < 0,05$) (стойки), в 2,7 раз ($p < 0,05$) (свешивания) и локомоторной активности в 1,5 раза (переходы).

На фоне применения аналогичного соединения, но в различной дозе от предыдущего (200 мг/кг), отмечалось также снижение времени пребывания мышей в закрытых рукавах в 1,2 раза ($p < 0,05$), в центральном квадрате в 3,2 раза ($p < 0,05$), числа болюсов в 2,3 раза ($p < 0,05$) относительно группы НК, при этом время нахождения в открытых рукавах, а также число стоек было выше в 2,3 ($p < 0,05$) и 4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица-8

Влияние различных доз соединений-лидеров и их комбинации на изменение психоэмоционального статуса животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» после перенесенных истощающих нагрузок

Группы	Время в закрытых рукавах	Время в центральном квадрате	Время в открытых рукавах	Стойки	Болюсы	Свешивания	Груминг, число актов	Число переходов
ПК	168,2±8,6	29,4±3,1	102,4±8,1	14,6±2,2	0,3±0,2	8,1±0,9	3,5±0,8	10,3±1,3
НК	178,1±7,6	68,3±4,6#	53,6±5,1#	4,3±0,7#	4,8±0,8#	3,4±0,6#	7,9±0,9#	6,0±0,7#
Метапрот	101,3±7,6*	30,2±2,1*	168,5±6,1*	31,5±2,5*	0	16,4±1,7*	4,6±0,5*	12,3±1,9*
АТАСЛ 200 мг	131,9±4,8*	25,8±1,9*	130,4±4,8*	20,7±1,8*	1,4±0,5*	5,5±0,6*	5,1±1,2	5,4±0,8
АТАСЛ 100 мг	116±7,7*	26,6±2,7*	157,4±6,1*α	40,6±3,5*α	0	12,5±3*α	3,2±1,0*α	10,6±1,4*α
Катехин гидрат 200 мг	143,9±6,0*	21,4±1,1*	124,7±5,7*	17,3±1,1*	2,1±0,6*	5,7±0,7	7,6±0,8	4,2±0,7
Катехин гидрат 100 мг	124,6±5,8*	24,3±1,8*	151,1±7,2*△	29,4±3,9*	0	9,2±1,3*△	3,8±0,1*△	9,1±1,1*△

Примечание: *- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

- статистически значимо относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

α-статистически значимо относительно группы животных, получавших АТАСЛ, в дозе 200 мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

△-статистически значимо относительно группы животных, получавших катехин гидрат, в дозе 200 мг/кг (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$);

Применение катехин гидрата в дозировке 100 мг/кг в сравнении с аналогичной группой, получавшей катехин гидрат в дозировке 200 мг/кг, привело к достоверному увеличению времени нахождения животных в открытых рукавах лабиринта в 2,1 раза ($p<0,05$), числа переходов в 2,2 раз ($p<0,05$) и снижению груминга (число актов) в 2 раза ($p<0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения данного блока исследований установлено, что в условиях истощающих нагрузок у животных без фармакологической поддержки уровень физической работоспособности практически линейно уменьшается от первого к десятому дню плавания с нагрузкой с пиком продолжительности плавания на 4-й день эксперимента. При этом истощающие нагрузки, смоделированные в тесте «принудительного плавания с отягощением», способствовали ухудшению психоэмоционального статуса экспериментальных животных, о чем свидетельствуют данные, полученные в тесте «Открытое поле».

Применение референтного препарата Метапрот способствовало не только сохранению физической активности экспериментальных животных, но и ее повышению по сравнению как, с исходным временем плавания данной группы животных (на 147,8% ($p<0,05$)), так и относительно НК группы мышей (на 113,5% ($p<0,05$)). Стоит отметить, что на фоне введения препарата сравнения Метапрот в тесте «Открытое поле» не было отмечено проявлений психоэмоционального дефицита у мышей.

В ряду исследуемых веществ наиболее выраженное влияние на уровень физической работоспособности оказало применение соединения АТАСЛ, на фоне введения которого максимальная продолжительность плавания мышей превосходила аналогичное значение группы животных, лишенных фармакологической поддержки на 230,1% ($p<0,05$). При этом пиковый уровень физической активности у мышей, получавших АТАСЛ был выше, чем у животных, которым вводили референтный препарат Метапрот на 54,6% ($p<0,05$), мышей, получавших апигенин; р-кумаровую, кофейную, синаповую и

сорбиновую кислоты; PGT, гесперидин, флоридзин, катехин гидрат, морин гидрат, икариин и гесперетин на 63% ($p<0,05$), 46,6% ($p<0,05$); 60% ($p<0,05$); 19% ($p<0,05$); 16% ($p<0,05$); 145,3% ($p<0,05$), 21,6% ($p<0,05$), 47,1% ($p<0,05$), 41% ($p<0,05$), 29% ($p<0,05$), 227,2% ($p<0,05$) и 197% ($p<0,05$) соответственно.

Необходимо также отметить, что в сравнении с препаратом Метапрот продолжительность плавания мышей, получавших соединение АТАСЛ, в дозе 100 мг/кг в день максимальной физической активности превосходила аналогичное значение животных, получавших Метапрот на 30,9% ($p<0,05$).

Кроме того, применение соединения АТАСЛ способствовало стабилизации психоэмоционального фона экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок, о чем свидетельствует снижение уровня тревожности и повышение локомоторной и исследовательской активности мышей в тесте «Открытое поле» и «ПКЛ».

Наряду с соединением АТАСЛ значительный интерес вызывает катехин гидрат. На фоне истощающих физических нагрузок наблюдалось увеличение ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности мышей, и снижение тревожность животных, что находит свое подтверждение в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Оценка дозозависимого влияния соединения АТАСЛ и катехин гидрата на уровень физической работоспособности и психоэмоциональный статус мышей, в условиях истощающих нагрузок позволила установить, что наиболее оптимальной дозой соединения АТАСЛ для проведения дальнейших исследований является 100 мг/кг. Стоит отметить, что физическая работоспособность животных в тесте «принудительное плавание с отягощением» была выше, относительно животных, получавших соединение АТАСЛ в дозе 200 мг/кг на 89,5 % ($p<0,05$). Необходимо также сказать, что в сравнении с препаратом Метапрот продолжительность плавания мышей, получавших соединение АТАСЛ, в дозе 100 мг/кг в день максимальной физической

активности превосходила аналогичное значение животных, получавших Метапрот на 30,9% ($p < 0,05$).

При оценке изменения психоэмоционального статуса мышей в тесте «Открытое поле» установлено, что локомоторная и ориентировочно-исследовательская активность были выше, а уровень тревожности ниже, у животных, которым вводили соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, по сравнению с мышами, получавшими данное соединение под шифром в дозе 200 мг/кг, о чем свидетельствует повышение числа «заглядываний» и стоек, а также снижение продолжительности груминга и времени нахождения в центральном секторе на 78,1% ($p < 0,05$), 81,5% ($p < 0,05$), 2,8 раз ($p < 0,05$) и 109% ($p < 0,05$) соответственно.

Схожие изменения психоэмоционального фона мышей наблюдались и в тесте «ПКЛ» у мышей, получавших соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, что нашло свое отражение в увеличении «времени в открытых рукавах» - в 1,2 раза ($p < 0,05$); «число стоек» - в 2 раза ($p < 0,05$); «число свешиваний» - в 2,3 раза ($p < 0,05$); «число переходов» - в 2 раза ($p < 0,05$), в сравнении с группой, получавших аналогичное соединение, но в дозе 200 мг/кг.

Изменения были установлены и для групп, получавших катехин гидрат в дозах 200 мг/кг и 100 мг/кг. Так, наиболее выраженное влияние на физическую активность и психоэмоциональный статус экспериментальных животных, в условиях истощающих нагрузок, оказало применение катехин гидрата в дозе 100 мг/кг. На фоне введения данной субстанции, пиковое время плавания мышей превосходило аналогичный показатель животных, получавших катехин гидрат, в дозе 200 мг/кг на 29,3% ($p < 0,05$), а поведенческая активность мышей в тесте «Открытое поле», которым вводили катехин гидрат в дозе 100 мг/кг была наиболее приближена к таковой у животных ПК группы.

На фоне истощающих ежедневных нагрузок в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» наблюдалось повышение локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности на фоне применения субстанции

катехин гидрата в дозировке 100 мг/кг, а также снижение уровня тревожности по отношению к группе, получавших катехин гидрат в дозе 200 мг/кг.

Таким образом, в совокупности полученных результатов для проведения дальнейших исследований были выбраны дозы соединений-лидеров: АТАСЛ- 100 мг/кг, катехин гидрат -100 мг/кг.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА НА РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ЖИВОТНЫХ

На основе ранее проведенного нами скрининга веществ были определены потенциальные вещества - лидеры, которые и включены в дальнейшее углубленное изучение. Как было сказано ранее в работе *В. А. Малахова и Е.С. Ромелашвили, 2011* актопротекторы - это вещества, повышающие физическую работоспособность [34] без увеличения потребления кислорода в экстремальных ситуациях [9] (гипо-/гипертермия, голод, жажда).

Поэтому в дальнейшем нами была проведена оценка физической работоспособности животных в условиях истощающих физических нагрузок в различной аверсивной среде с последующей фиксацией кислорода кровью и работающими мышцами [6].

4.1.1. Влияние изучаемых соединений на физическую работоспособность экспериментальных животных в условиях истощающих нагрузок в различных аверсивных средах

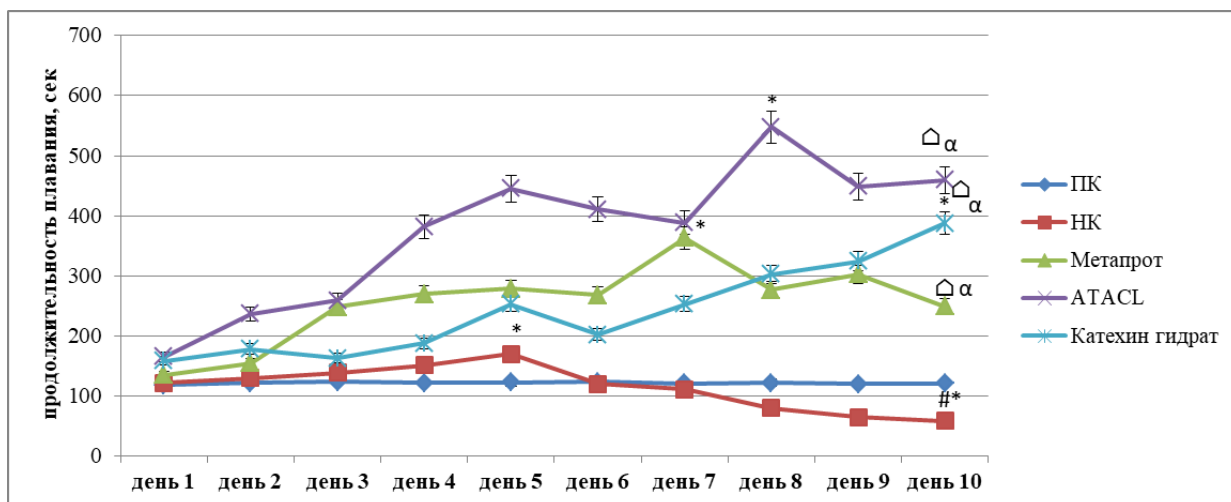
Тест «Принудительное плавание с отягощением» - температура воды 15°C

В условиях истощающих нагрузок, в группе положительного контроля на всем протяжении эксперимента в холодной воде изменения уровня плавания отмечено не было.

Продолжительность плавания животных группы негативного контроля возрастала с первого дня эксперимента. При этом стоит сказать, что пик физической активности был зафиксирован на 5-й день принудительного плавания животных, и составил $169,7 \pm 24,8$ сек., что было выше на 39,4% ($p < 0,05$) относительно 1-го экспериментального дня плавания данной группы. Начиная с 6-го дня плавания, физическая работоспособность животных начала заметно снижаться. Так, физическая активность мышцей к концу эксперимента (10-й день)

была ниже, в сравнении с исходным временем плавания данной группы на 51,9% ($p<0,05$) и на 50,3% ($p<0,05$) в сравнении с 1-м днем плавания группы положительного контроля (рис.6).

На фоне ежедневного введения группе мышей Метапрота, у которых в качестве аверсивной среды выступала холодная вода, уже с 1-го дня у животных наблюдалось достоверное повышение работоспособности, что нашло свое отражение в увеличении времени плавания с $134,5\pm 27,6$ сек. до $363,0\pm 37,1$ сек. Пик плавания мышей установлен на 7-й день эксперимента.



Примечание: * - статистически значимо относительно исходного времени плавания данной группы (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); # - статистически значимо относительно исходного времени плавания группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); $\triangle$ - статистически значимо относительно конечного времени плавания группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); α - статистически значимо относительно конечного времени плавания группы негативного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

Рисунок 6 – Тест «Принудительное плавание» с отягощением в холодной воде

Стоит отметить, что падения в продолжительности плавания данной группы отмечено не было. Работоспособность конечного дня эксперимента была выше в сравнении с подобным днем группы положительного и негативного контроля в 3,8 ($p<0,05$) и 7,8 раза ($p<0,05$) соответственно.

Линейное повышение работоспособности наблюдалось в группах, получавших соединения - лидеры - ATACL и катехин гидрат, начиная с первого

дня эксперимента. Пик активности был достоверно выше исходного дня теста «принудительного плавания» на 231,4% (АТАСЛ) ($p < 0,05$) и на 144,7% ($p < 0,05$) (катехин гидрат). Необходимо сказать, что максимальная продолжительность плавания мышей в холодной воде, в группе, получавшая АТАСЛ, была выше на 50,8% ($p < 0,05$) относительно группы, получавшая Метапрот (рис.6). Затем произошло небольшое падение физической активности в обеих группах (АТАСЛ и катехин гидрат) и на 10-й день время плавания было выше в сравнении с группой положительного в 3,1 ($p < 0,05$), 3,2 ($p < 0,05$) раза и негативного контроля в 6,3 ($p < 0,05$), 6,6 раз ($p < 0,05$) соответственно.

Максимальная работоспособность мышей в группе, получавшая катехин гидрат была сопоставима с пиковым днем группы, получавшая препарат сравнения Метапрот.

Тест «Принудительное плавание с отягощением» - температура воды 41°C

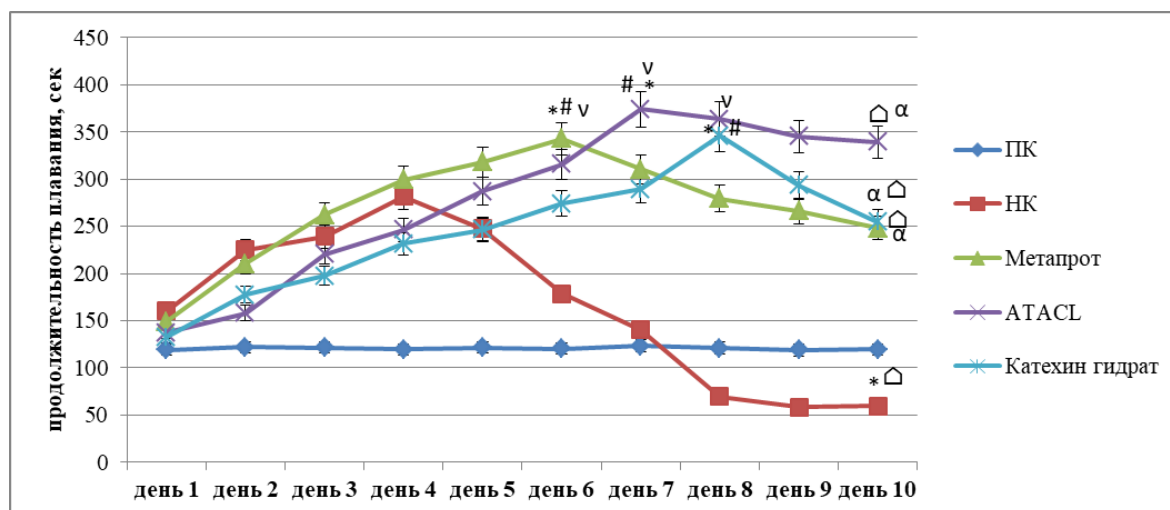
В группе мышей положительного контроля время плавания в горячей воде существенного изменения на всем протяжении эксперимента не претерпевало.

Физическая работоспособность в группе негативного контроля повышалась с 1-го по 4-й день плавания, после чего наблюдался резкий спад активности. Так продолжительность плавания мышей 10-го экспериментального дня была ниже исходного плавания данной группы на 63% ($p < 0,05$), и ниже на 50,4% ($p < 0,05$) в сравнении с конечным днем плавания группы положительного контроля.

Ежедневное введение группе мышей Метапрота способствовало плавному нарастанию работоспособности. Пик активности в горячей воде был отмечен на 6-й день плавания с нагрузкой, что было выше на 129,8% ($p < 0,05$) исходного времени плавания данной группы, на 188% ($p < 0,05$) выше аналогичного дня группы положительного контроля и на 113,7% ($p < 0,05$) группы негативного контроля. Физическая активность конечного дня эксперимента у группы, получавшая Метапрот, в условиях истощающих физических нагрузок, была выше

относительного 10-го дня плавания группы положительного и негативного контроля, соответственно, в 2,4 раза ($p<0,05$) и 4,2 раза ($p<0,05$).

На фоне введения соединений - лидеров АТАСЛ и катехин гидрата с 1-го дня эксперимента наблюдалось плавное возрастание времени плавания, пик активности был зафиксирован на 7-й (АТАСЛ) и 8-й день (катехин гидрата) эксперимента.



Примечание: * - статистически значимо относительно исходного времени плавания данной группы (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); # - статистически значимо относительно исходного времени плавания группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); $\triangle$ - статистически значимо относительно конечного времени плавания группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); v- статистически значимо относительно исходного времени плавания группы негативного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); α - статистически значимо относительно конечного времени плавания группы негативного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

Рисунок 7 – Тест «Принудительное плавание» с отягощением в горячей воде

Стоит отметить, что продолжительность максимального дня плавания мышей, получавших АТАСЛ и катехин гидрат, была выше относительно исходного времени данных групп - на 147% ($p<0,05$) и 92,2% ($p<0,05$); относительно работоспособности положительного контроля - 185,4% ($p<0,05$), 114,1% ($p<0,05$); относительно группы негативного контроля - на 111,7% ($p<0,05$), 58,9% ($p<0,05$) соответственно (рис.7).

Работоспособность 10-го дня эксперимента в группе, получавшая АТАСЛ, была выше в сравнении с группой положительного и негативного контроля в 2,8 раза ($p<0,05$) и 4,3 раза ($p<0,05$).

Что касается группы, получавшая катехин гидрат, то работоспособность конечного дня принудительного плавания животных в горячей воде была выше в 2,1 ($p<0,05$) и 4,3 раза ($p<0,05$) в сравнении с плаванием 10-го дня группы положительного и негативного контроля.

Статистически значимых отличий между днями пика в группах, получавших АТАСЛ и катехин гидрат, отмечено не было.

4.1.2. Оценка потребления кислорода эритроцитами и митохондриями поперечно-полосатых мышц на фоне теста «принудительного плавания» в различных аверсивных средах

Установлено, что кислородная емкость крови животных как в холодной, так и в горячей воде, существенных изменений во всех экспериментальных группах не претерпевала (рис.8).

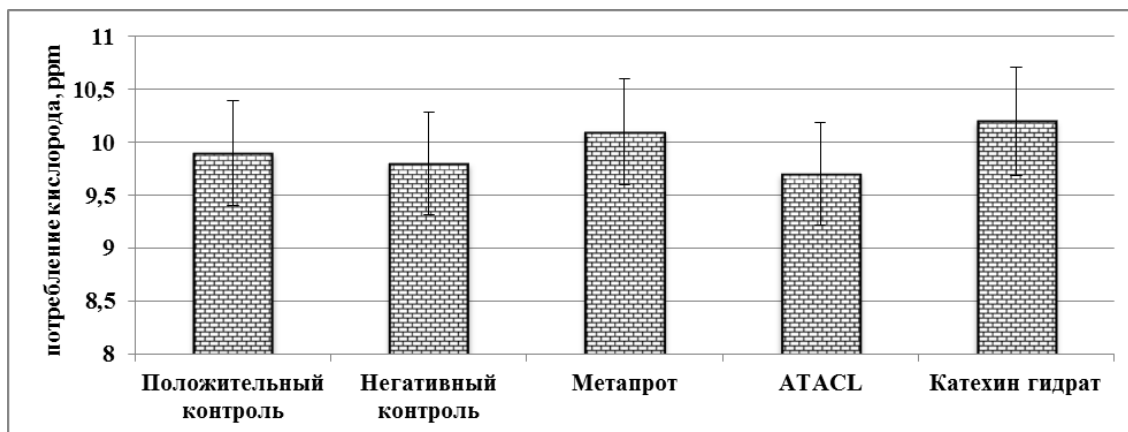


Рисунок 8- Потребление кислорода эритроцитами на фоне ежедневных истощающих нагрузок в холодной воде

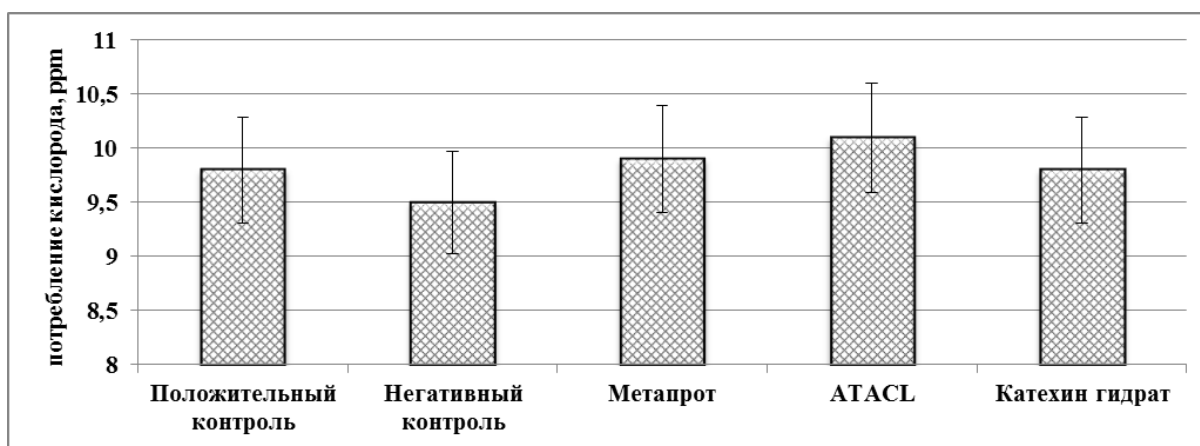
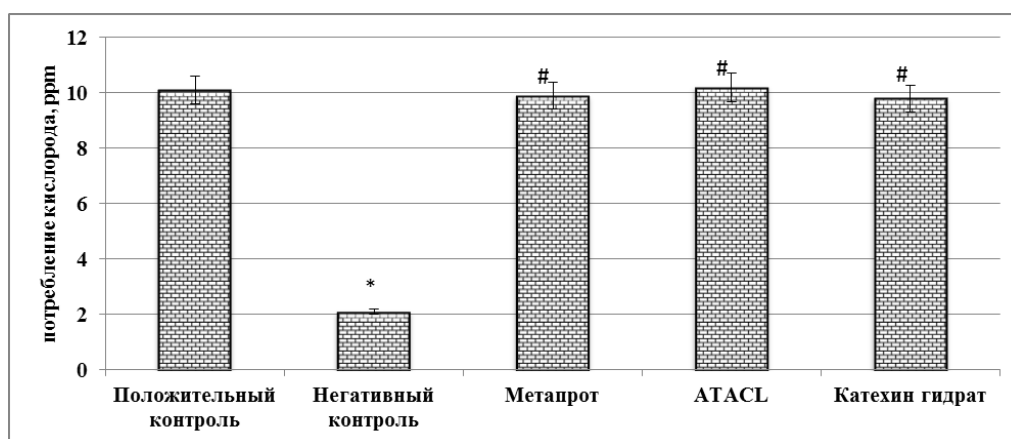


Рисунок 9- Потребление кислорода эритроцитами на фоне ежедневных истощающих нагрузок в горячей воде

Необходимо отметить, что потребление кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц в группе негативного контроля в холодной воде было ниже на 79,2% ($p < 0,05$) относительно группы ПК. Стоит сказать, что на фоне применения референтного препарата Метапрот, относительно группы мышц НК, наблюдалось повышение потребления кислорода работающими мышцами в 4,7 раза ($p < 0,05$). Потребление кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц в группе, получавшая Метапрот, существенных изменений не претерпевало, в сравнении с группой положительного контроля.



Примечание: *- статистически значимо относительно группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- статистически значимо относительно группы негативного контроля (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

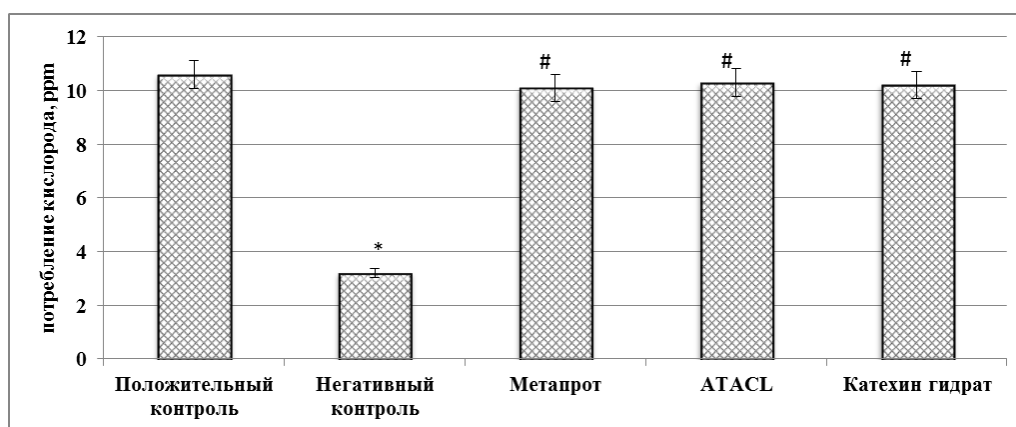
Рисунок 10 - Потребление кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц на фоне ежедневных истощающих нагрузок в холодной воде

На фоне введения исследуемых соединений также наблюдалось повышение потребления кислорода работающими мышцами, что было выше в 4,9 раза ($p<0,05$) у группы мышей, получавшая АТАСЛ, и в 4,7 раз ($p<0,05$) у группы, получавшая катехин гидрат. Изменения потребления кислорода у данных групп, относительно группы ПК, отмечено не было (рис.10).

Изменения в потреблении кислорода митохондриями мышц были отмечены у животных в горячей воде. Так, потребление кислорода было ниже у группы НК, относительно группы ПК, в 3,3 раза ($p<0,05$).

На фоне введения Метапрота не наблюдалось увеличения потребления кислорода относительно группы ПК, однако, что касается группы НК, то данным показатель был выше в 3,2 раза ($p<0,05$).

Потребление кислорода мышечной тканью было выше на фоне введения АТАСЛ и катехин гидрата, относительно группы НК, в 3,2 ($p<0,05$) и 3,2 раза ($p<0,05$) соответственно (рис.11).



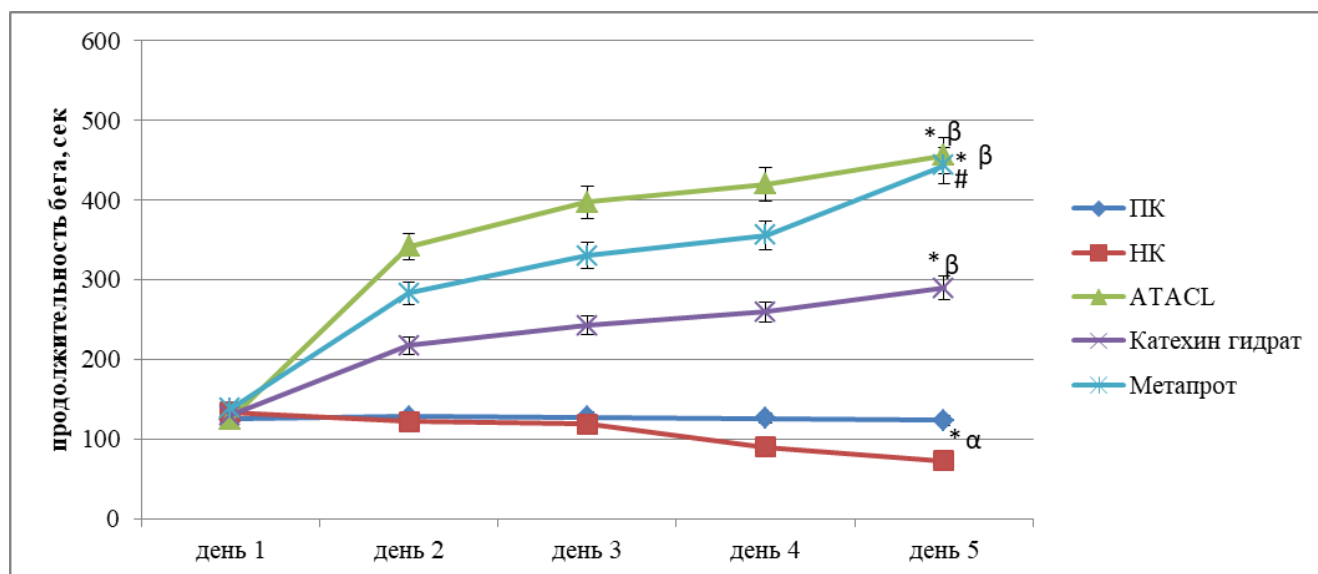
Примечание: *- статистически значимо относительно группы положительного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); #- статистически значимо относительно группы негативного контроля (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

Рисунок 11 - Потребление кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц на фоне ежедневных истощающих нагрузок в горячей воде

По показателю «потребление кислорода» митохондриями поперечно-полосатых мышц соединения - лидеры не уступали референтному препарату сравнения Метапрот как в холодной, так и в горячей воде.

4.2. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на физическую работоспособность животных на модели «бег на тредбане».

Перед проведением данной серии исследования все экспериментальные группы животных были рандомизированы по продолжительности бега и максимально преодолённому расстоянию. В дальнейшем было сформировано 5 равных экспериментальных групп животных ($n=30$, $n=10$).



Обозначение: * - достоверно относительно исходного показателя данной группы (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); β - достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); # - достоверно относительно группы, получавшая катехин гидрат (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); α - достоверно относительно конечного дня группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

Рисунок 12 - Изменение времени бега мышей – самцов на фоне применения соединений-лидеров и препарата сравнения на модели «бег на тредбане»

В результате 5 дней эксперимента продолжительность бега мышей группы ПК значимых изменений не претерпевало (рис.12).

Продолжительность времени бега мышей группы НК на тредбане линейно уменьшалась, начиная с первого дня эксперимента. К концу 5-го дня эксперимента наблюдалось значительное падение продолжительности бега, что было ниже на 45,8% ($p<0,05$) относительно первоначального показателя времени

бега животных данной группы, и ниже на 41,3% относительно конечного дня группы ПК.

На фоне применения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты наблюдалось линейное увеличение работоспособности мышей без резких скачков и падений, и превышала работоспособность мышей группы негативного контроля на всем протяжении дней эксперимента. В результате, продолжительность бега к концу эксперимента была значительно выше аналогичного значения группы негативного контроля на 527% ($p < 0,05$), и выше исходных показателей данной группы на 264,9% ($p < 0,05$).

Применение катехин гидрата на протяжении 5-ти дней также способствовало повышению бега животных. Работоспособность мышей при этом была выше исходного значения данной группы на 122,3% ($p < 0,05$), а также выше на 297,9% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК (5-й день эксперимента) (рис.5).

Подобные изменения в повышении работоспособности наблюдались и при применении препарата сравнения Метапрота. Работоспособность повышалась линейно без резких скачков и падений, к пятому дню она превышала исходную работоспособность данной группы на 220,4% ($p < 0,05$), а также была выше на 509,2% ($p < 0,05$), относительно конечного дня бега на тредбане группы животных НК, и на 53,1% ($p < 0,05$) относительно группы мышей, получавших катехин гидрат. Статистически значимых отличий в показателе работоспособности конечного дня эксперимента между группами, получавшими Метапрот и 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту установлено не было.

4.3. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на физическую работоспособность животных на модели «Челночное плавание» без отягощения.

В данной части экспериментального исследования оценивалось влияние потенциальных соединений-лидеров не только на работоспособность мышей, но также на выносливость и скорость, которые являются основными интегральными показателями физической работоспособности. Данные параметры очень полно

можно оценить в тесте «челночного плавания», при этом возможна смена создаваемой нагрузки.

В группе мышей негативного контроля (группа, лишенная фармакологической поддержки) время плавания составляло $197,2 \pm 6,02$ сек, расстояние, преодоленное животными, $17,8 \pm 7,2$ м, скорость была равна $0,089$ м/сек, коэффициент усталости $19,9$ усл. ед. (табл.9).

Применение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты (АТАСЛ), привело к повышению скоростно-силовых характеристик и выносливости лабораторных животных, что выражается в увеличении скорости плавания на $25,8\%$, а также в увеличении расстояния на $246,6\%$ ($p < 0,05$) и времени плавания на $230,9\%$ ($p < 0,05$) относительно группы животных негативного контроля. Коэффициент усталости у данной группы был ниже в $2,1$ раза ($p < 0,05$), относительно группы мышей НК, но выше, в $1,5$ раза ($p < 0,05$), относительно группы, получавшая Метапрот. Статистически значимых отличий между показателями животных, которым вводили АТАСЛ и мышами, получавшими препарат сравнения, установлено не было.

Таблица-9

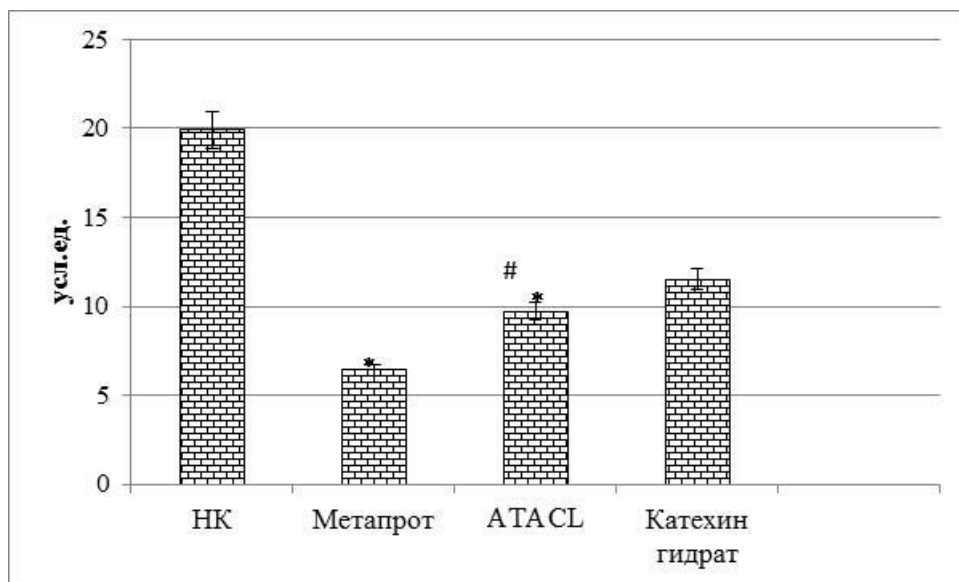
Изменение показателей теста «челночное плавание» без отягощения на фоне применения соединений-лидеров

Группа	S, м	t, сек	V, м/сек
НК	$17,8 \pm 7,2$	$197,2 \pm 6,02$	$0,089 \pm 0,033$
Метапрот	$74,0 \pm 3,7^*$	$469,7 \pm 8,2^*$	$0,158 \pm 0,006$
АТАСЛ	$61,7 \pm 8,2^{**}$	$553,3 \pm 20,53^*$	$0,115 \pm 0,019$
Катехин гидрат	$32,2 \pm 2,3^{* \#}$	$362,7 \pm 12,3^{* \#}$	$0,0888 \pm 0,005^{\#}$

Примечание: *- достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); ** - достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,02$); #- достоверно относительно группы, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$).

У мышей, получавших катехин гидрат, наблюдается увеличение скоростно-силовых характеристик, в сравнении с животными негативного контроля, что выражается в достоверном повышении времени плавания на $83,9\%$

($p < 0,05$) и преодоленного расстояния: 80,1% ($p < 0,05$). При этом было ниже преодоленное расстояние, относительно группы мышей, получавшая препарат сравнения Метапрот, на 56,5% ($p < 0,05$), а также время плавания на 22,8% ($p < 0,05$) и скорость на 43,8% ($p < 0,05$).



Обозначение: *- достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно группы, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Рисунок 13 - Вариабельность развития утомляемости мышей в тесте «Челночное плавание» без отягощения.

В группе мышей, получавших препарат сравнения Метапрот, наблюдалось повышение времени плавания на 138,2% ($p < 0,05$), а также увеличение преодоленного расстояния на 315,7% ($p < 0,05$), относительно группы мышей негативного контроля, эти параметры свидетельствуют о повышении выносливости мышей. При этом скорость плавания увеличилась на 77,5%, а коэффициент усталости был ниже в 3,1 раза ($p < 0,05$) относительно группы мышей НК. Коэффициент утомляемости в группе, получавших катехин гидрат статистически значимых отличий с группой мышей негативного контроля не претерпевал.

4.4. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на психоэмоциональный статус в тесте «Темно-светлая камера»

В результате проведения теста «Темно-светлая камера» в группе мышей, лишенных фармакологической коррекции (НК) на фоне физических нагрузок, отмечалось предпочтение животными темного отсека камеры, что было выше, относительно группы ПК в 5,9 раза ($p<0,05$). На фоне нагрузки в группе НК время пребывания животных в светлом отсеке камеры было ниже в 11 раз ($p<0,05$). Количество перемещений, а также число стоек в группе НК было ниже, относительно группы животных ПК в 3,7 ($p<0,05$) и 8,3 раза ($p<0,05$) соответственно.

На фоне применения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты происходит снижение тревожности животных и повышение ориентировочно-исследовательской активности, что нашло свое отражение в увеличении времени пребывания в светлом отсеке на 1024,6% ($p<0,05$), и снижении времени пребывания в темном отсеке камеры на 85,2% ($p<0,05$), а также в увеличении перемещений и стоек в 3 ($p<0,05$) и 7,8 раза ($p<0,05$) соответственно, относительно группы животных НК.

Таблица-10

Изменение поведенческой активности на фоне применения исследуемых соединений и препарата сравнения в тесте «Темно-светлая камера»

Группа	Время в темном отсеке, сек	Время в светлом отсеке, сек	Число перемещений	Число стоек
ПК	28,6±1,8	151,4±2,1	12,7±0,8	21,6±1,1
НК	167,6±7,1μ	13,8±1,5μ	3,4±0,7μ	2,6±0,4μ
АТАСЛ	24,8±2,9*	155,2±5,9*	10,3±1,7*	20,3±1,2*
Катехин гидрат	32,5±2,6*	147,5±6,5*	8,6±1,1*	15,6±1,0*
Метапрот	11,7±0,8*	168,3±3,9*	13,7±2,0*	19,4±1,5*

*Примечание:** - достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);
μ-достоверно относительно группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

У мышей, получавших катехин гидрат, достоверно увеличилось время нахождения животного в светлой части камеры, число перемещений и стоек соответственно – в 10,7 ($p<0,05$), в 2,5 ($p<0,05$) и 6 раз ($p<0,05$) соответственно, относительно группы НК, при этом снижалось время в темном отсеке на 80,1% ($p<0,05$).

Уровень тревожности также был ниже и при применении препарата сравнения Метапрот. Была выше вертикальная ориентировочно-исследовательская активность (число стоек) в 7,5 раз ($p<0,05$), двигательная активность (число перемещений) - в 4 раза ($p<0,05$), а также достоверно выше было время пребывания в светлой части установки на 1119,6% ($p<0,05$) относительно группы, лишенной фармакологической коррекции. Статистически значимых отличий между группами, получавшими Метапрот, катехин гидрат и АТАСЛ установлено не было.

4.5. Изменение некоторых биохимических показателей на фоне физической нагрузки

Известно, что истощающие физические нагрузки приводят к функциональному снижению работы скелетных мышц и в дальнейшем к мышечному утомлению [167]. Утомление скелетных мышц связано, прежде всего, с истощением запасов источников энергии (АТФ, гликогена), накоплением недоокисленных продуктов распада (лактат, неорганические фосфаты и д.р.) как в крови, так и в тканях, а также с развитием процесса деструкции мышечной ткани [194,8,12,22]. Известно, что некоторые маркеры, отражающие функциональное состояние организма, можно определить путем биохимического анализа, что и предопределило в дальнейшем ход нашей работы.

Изменение некоторых биохимических показателей крови после перенесенных физических нагрузок

Данные об изменении уровня энергетического обмена, а также миоглобина приведены в таблице 11.

Таблица-11

Биохимические показатели животных после перенесенных физических нагрузок животных

Показатели	Исследуемые группы				
	ПК	НК	АТАСЛ	Катехин гидрат	Метапрот
Лактат, ммоль/мл	2,6±0,29	12,5±0,45*#	5,5±0,38*#	5,8±0,38*#	3,4±0,48#△μ
Пируват, ммоль/мл	0,25±0,018	0,048±0,0029*	0,38±0,026#	0,34±0,018#	0,26±0,02#
Лактат/пируват	11,7±1,24	288,9±22,2*	14,7±1,13#	17,4±1,49#	13,1±2,06#
Миоглобин, нг/мл	19,6±0,95	38,6±0,97*	18,4±0,83μ	24,2±1,02	18,7±0,44#μ

Примечание: * - достоверно относительно группы положительного контроля ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,001$); #- достоверно относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); △- достоверно относительно группы, получавшая АТАСЛ (t-критерий Стьюдента, $p < 0,002$); μ- достоверно относительно группы, получавшая катехин гидрат (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$).

Из приведенной таблицы 11 мы видим, что истощающие физические нагрузки в группе мышей негативного контроля привели к повышению уровня лактата в 4,8 раз ($p < 0,001$); снижению пирувата - в 5,2 раз ($p < 0,001$) и увеличению лактат-пируватного коэффициента в 24,7 раз ($p < 0,001$) относительно группы положительного контроля. В группе негативного контроля также был достоверно выше маркер мышечной деструкции-миоглобин, что превышает показатель группы интакта в 1,7 раза ($p < 0,001$).

Введение референтного препарата Метапрота способствовало устранению возникшего ацидоза в крови мышей, что нашло свое отражение в снижении уровня молочной кислоты, относительно группы животных НК в 3,7 раз ($p < 0,05$); повышении пирувата- в 5,4 раза ($p < 0,05$); а также в снижении коэффициента лактат-пируват в 22,1 раза ($p < 0,05$). При этом показатель миоглобина в крови был ниже относительно группы НК в 2,1 раза ($p < 0,05$). Под влиянием Метапрота наблюдается также снижение показателя молочной кислоты в 1,6 раз ($p < 0,002$), относительно группы мышей, получавших АТАСЛ, и в 1,7 раз ($p < 0,05$) относительно группы, получавшая катехин гидрат. Установлено, что в группе, получавшей Метапрот, в 1,3 раза ($p < 0,05$) был ниже показатель миоглобина,

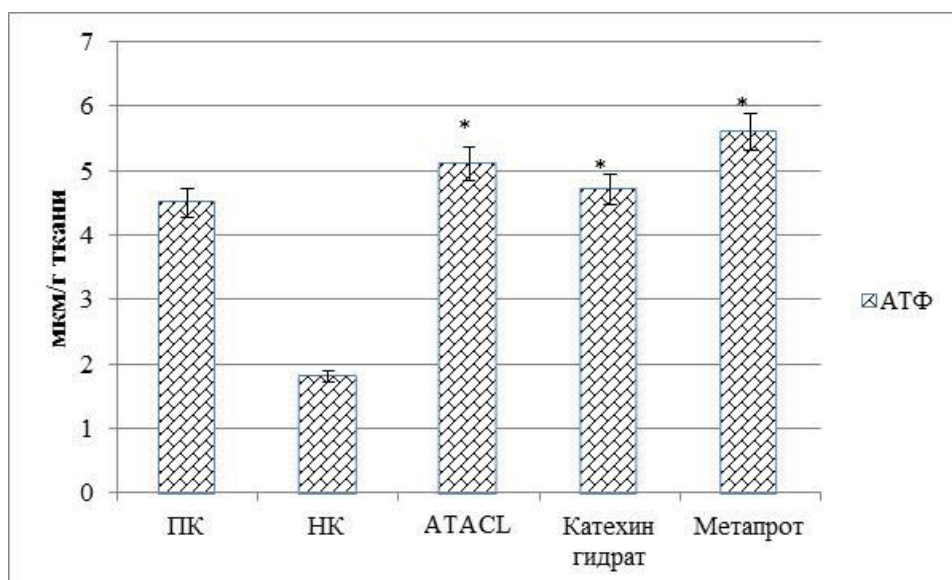
относительно группы, получавшая катехин гидрат. Статистически значимых отличий в показателях пировиноградной кислоты и лактат-пируватного коэффициента между группой, получавшей препарат сравнения Метапрот, и исследуемые соединения, установлено не было.

Исследуемые соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота и катехин гидрат в равной степени положительно влияют на уровень молочной кислоты, пирувата и лактат-пируватного коэффициента. На фоне истощающих нагрузок произошло устранение возникшего ацидоза, что нашло свое отражение в снижении содержания лактата в 2,1 ($p<0,05$) (группа, получавшая АТАСЛ) и 2,2 раза (группа, получавшая катехин гидрат) ($p<0,05$) относительно группы НК. Пируват был выше, относительно группы негативного контроля у экспериментальных групп, получавших АТАСЛ и катехин гидрат в 7,9 ($p<0,05$) и 7,1 раз ($p<0,05$) соответственно. При этом, уровень миоглобина, а также коэффициент лактат-пируват в группах, получавших АТАСЛ и катехин гидрат был ниже, в сравнении с группой НК, в 2,1 ($p<0,05$) и 2,1 раз ($p<0,05$)-миоглобин и в 19,7 ($p<0,05$) и 16,6 раз ($p<0,05$) соответственно.

Известно, что источником энергии в мышцах является АТФ, которая необходима для нормального сокращения скелетных мышц [129]. В дальнейшем, нами была проведена оценка влияния изучаемых соединений-лидеров и препарата сравнения на уровень АТФ в скелетных мышцах после перенесенных физических нагрузок животных.

Как следует из рисунка 7, физические нагрузки приводят к снижению содержания АТФ в скелетной мышце в 2,5 раза ($p<0,05$)- в группе животных негативного контроля, относительно ПК.

Факт изменения энергетического обмена в скелетной мышце, вероятно, может служить о снижении работоспособности и выносливости животных.



Обозначение: * - достоверно относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Рисунок 14 - Изменение уровня АТФ в мышцах животных на фоне применения исследуемых соединений-лидеров и препарата сравнения после перенесенных физических нагрузок.

При выполнении животными работы смешанной направленности (анаэробной-аэробной) в группах мышей, получавших АТАСЛ, катехин гидрат и Метапрот наблюдается достоверное повышение содержания АТФ в мышцах, относительно группы НК, в 2,8 ($p < 0,05$), 2,6 ($p < 0,05$) и 3,1 ($p < 0,05$) раза соответственно. Статистически значимых отличий между группами исследуемых соединений и препаратом сравнения установлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения данного блока исследований было установлено влияние холодной и горячей воды, выступающей в роли стрессора, на работоспособность животных в тесте «Принудительное плавание с отягощением». Стоит отметить, что в группе мышей положительного контроля время плавания, как в холодной, так и в горячей воде существенного изменения на всем протяжении эксперимента не претерпевало. Тогда, как в группе животных негативного контроля, у которой в качестве аверсивной среды служила холодная вода, пик работоспособности приходился на 5-й день и составлял $169,7 \pm 24,8$ сек., в то время как в горячей воде

пик физической работоспособности был зафиксирован на 4-й экспериментальный день и составил $281,5 \pm 31,7$ сек. Важно отметить, что на фоне исследуемых соединений - лидеров наблюдалось повышение физической работоспособности животных в холодной воде уже с первого дня введения соединений. При этом максимальная продолжительность плавания мышей в холодной воде, в группе, получавшая АТАСЛ, была выше на 50,8% ($p < 0,05$) относительно группы, получавшая Метапрот, а максимальная работоспособность мышей в группе, получавшая катехин гидрат, была сопоставима с пиковым днем группы, получавшая препарат сравнения Метапрот.

Установлено, что ежедневное введение мышам референтного препарата Метапрот в горячей воде способствовало линейному нарастанию физической работоспособности. Пик активности в горячей воде был отмечен на 6-й день плавания с нагрузкой, что было выше на 129,8% ($p < 0,05$) исходного времени плавания данной группы. На фоне введения соединений - лидеров АТАСЛ и катехин гидрата с 1-го дня эксперимента наблюдалось плавное возрастание времени плавания, пик активности был зафиксирован на 7 - й (АТАСЛ) и 8 - й день (катехин гидрата) эксперимента. Стоит отметить, что продолжительность максимального дня плавания мышей, получавших АТАСЛ и катехин гидрат, была выше относительно исходного времени данных групп - на 147% ($p < 0,05$) и 92,2% ($p < 0,05$).

Установлено, что на фоне истощающих физических нагрузок кислородная емкость крови животных, как в холодной, так и в горячей воде, существенных изменений во всех экспериментальных группах не претерпевала.

Потребление кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц в холодной воде в группе НК было ниже на 79,2% ($p < 0,05$), а в горячей воде соответственно, на 69,8% ($p < 0,05$) относительно группы животных ПК. Стоит отметить, что увеличения потребления кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц, в сравнении с группой ПК, как в холодной, так и в горячей воде, в группе, получавшая референтный препарат Метапрот, а также в группах,

получавших исследуемые соединения-лидеры, отмечено не было. Резюмируя все вышесказанное, выявляется, что наиболее значительные изменения в структуре и в функциях мышечной ткани отмечены в условиях принудительного плавания животных с температурным режимом воды 15°C.

Необходимо отметить, что при углубленном изучении работоспособности наблюдалось снижение в группе животных негативного контроля выносливости (в тесте «Бег на тредбане»), работоспособности и скоростно-силовых характеристик (тест «Челночное плавание» без отягощения). Кроме этого, у животных группы негативного контроля возрос уровень тревожности, о чем свидетельствует предпочтение животными темной камеры (тест «Темно-светлая камера»), а также снижение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, что подтверждается проведенными ранее тестами «ОП» и «ПКЛ».

Применение препарата сравнения способствовало в большей степени не только повышению выносливости и скоростных характеристик, но также устранению возникшего психоэмоционального дисбаланса.

Наиболее выраженное влияние на выносливость и скоростные характеристики как в тесте «Бег на тредбане», так и тесте «Челночное плавание» без отягощения из исследуемых соединений оказывает АТАСЛ. При этом эффект от его применения сопоставим с эффектом референтного препарата Метапрот. Исследуемая субстанция катехин гидрат уступает по показателям физической работоспособности АТАСЛ и Метапроту, но достоверно от них не отличается по влиянию на психоэмоциональную сферу.

После проведения биохимических исследований было установлено, что исследуемые соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота и катехин гидрат положительно влияют на энергетический обмен, нивелируя возникший на фоне физической нагрузки метаболический ацидоз (снижают содержание лактата, повышают содержание пирувата, при этом, приводя в норму (10:1) соотношение лактат/пируват). Стоит отметить, что эффект от применения данных исследуемых веществ был сопоставим с аналогичным от применения

препарата сравнения Метапрот. Необходимо также сказать, что при выполнении нагрузок животными (аэробной-анаэробной направленности) наблюдалось повышение содержания АТФ в мышцах животных относительно группы НК, в 2,8 ($p<0,05$), 2,6 ($p<0,05$) раз(группы, получавшие АТАСЛ и катехин гидрат соответственно). При этом статистически значимых отличий между группами исследуемых соединений и препаратом сравнения установлено не было.

На фоне физических нагрузок было ниже содержание маркера мышечной деструкции, что выражалось в снижении содержания миоглобина в группе, получавшая АТАСЛ, в 2,1 ($p<0,05$), и группе, получавшая катехин гидрат в 2,1 раз ($p<0,05$), в сравнении с группой животных негативного контроля. Применение референтного препарата Метапрот также приводило к снижению содержания миоглобина в крови животных, относительно группы НК, в 2,1 раз ($p<0,05$)

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА НА ФОНЕ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

Дальнейшее углубленное изучение актопротекторной активности было воспроизведено на фоне истощающих физических нагрузок животных в модели «Принудительное плавание» с отягощением. Крысы (мыши) были рандомизированы по времени плавания, а также по уровню эмоционально-поведенческой реактивности (в тестах «ВЛМ», «ТЭИ» «УРПИ»), после чего были сформированы равные экспериментальные группы.

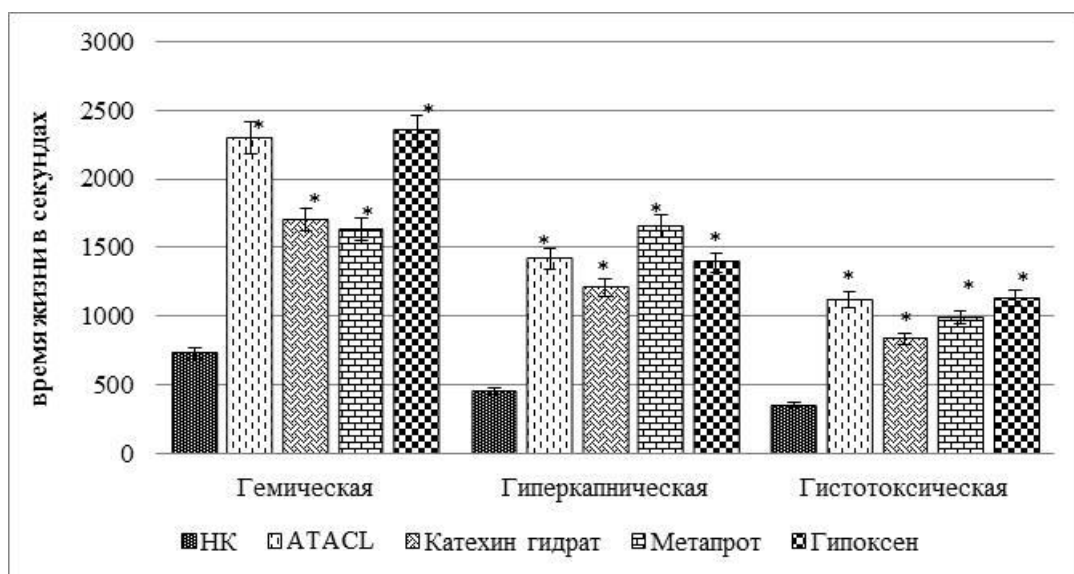
5.1. Изучение антигипоксической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.

В условиях длительных психофизических перегрузок наблюдается максимальное напряжение всех регуляторно - компенсаторных систем, в результате чего снижается восстановительный ресурс организма и возникает гипоксия (гипоксия нагрузки) [56]. Гипоксия представляет собой типовой патологический процесс, сопровождающий различного рода заболевания и синдромы. Гипоксию наиболее часто ассоциируют с недостаточным образованием оксигемоглобина и ухудшением доставки, либо нарушением утилизации кислорода и питательных веществ в органах и тканях. Гипоксия нагрузки объединяет все основные патофизиологические типы гипоксии: гемическую, тканевую, гипобарическую и циркуляторную. В условиях гипоксии нагрузки возникает нарушение ионного равновесия и кислотно-основного состояния крови, что уменьшает физический ресурс организма и замедляет его восстановление после перенесенных перегрузок. Таким образом, развивающаяся в условиях истощающих психофизических нагрузок гипоксия, несомненно, требует коррекции [36].

На данном этапе исследования оценивались потенциальные противогипоксические свойства изучаемых объектов на моделях гистотоксической, гемической, гиперкапнической, гипобарической и циркуляторной гипоксии. Препаратами сравнения служили Гипоксен в дозе 150 мг/кг [24] и Метапрот в дозе 25 мг/кг [68].

5.1.1. Влияние исследуемых объектов на время жизни и выживаемость экспериментальных животных в условиях гипоксии различного генеза.

Продолжительность жизни мышей НК группы в условиях моделирования гемической, гиперкапнической, гистотоксической и составляло $730,8 \pm 92,3$ сек., $452,8 \pm 47,1$ сек., $352 \pm 68,2$ сек., соответственно (рис.15). При воспроизведении гипобарической гипоксии время жизни животных НК группы составляло $26,14 \pm 1,792$ сек. (рис.16), а при моделировании циркуляторной гипоксии в НК группе крыс был отмечен 100% уровень летальности.



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

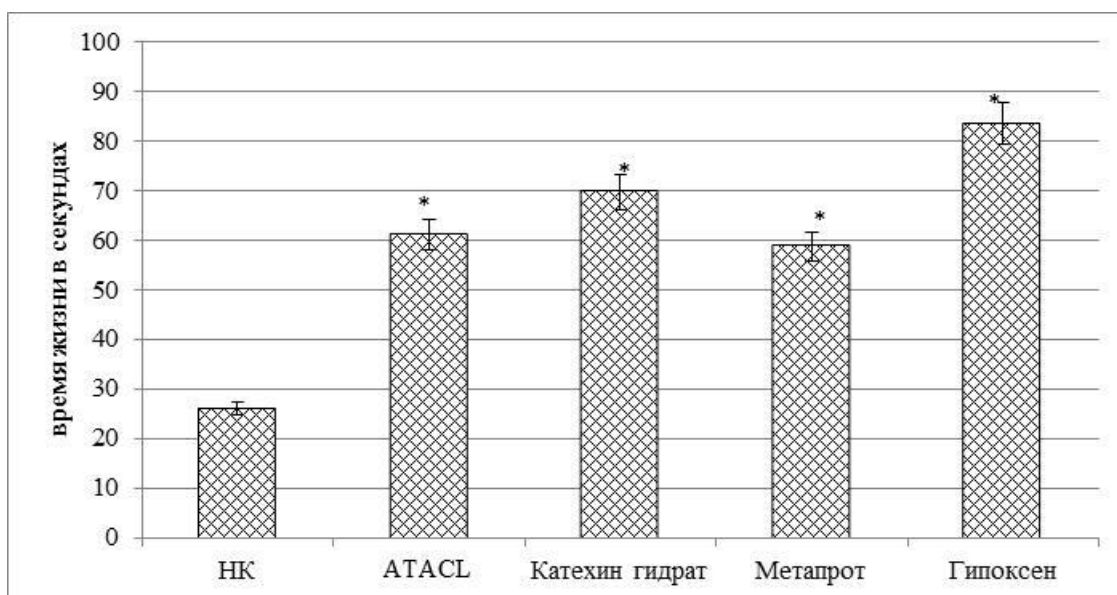
Рисунок 15 - Влияние изучаемых объектов на продолжительность жизни экспериментальных животных при моделировании гипоксии различного генеза.

На фоне введения экспериментальным животным Гипоксена наблюдалось увеличение времени жизни мышей относительно НК группы мышей при воспроизведении гемической гипоксии – в 3,2 раза ($p<0,05$), гиперкапнической гипоксии – в 3,1 раза ($p<0,05$), гистотоксической гипоксии – 3,2 раза ($p<0,05$), гипобарической гипоксии- 3,2 раза ($p<0,05$). В условиях циркуляторной гипоксии процент летального исхода у группы животных, получавших Гипоксен, составлял 33,3%.

При применении Метапрота продолжительность жизни животных превышала аналогичные показатели НК группы мышей в условиях гиперкапнической гипоксии - в 3,1 раза ($p<0,05$), гистотоксической гипоксии – 2,8 раза ($p<0,05$), гемической гипоксии – 2,2 раза ($p<0,05$), гипобарической гипоксии – 2,2 раза ($p<0,05$). При воспроизведении циркуляторной гипоксии уровень летальности животных, которым вводили Метапрот, составил 40%.

Профилактическое введение соединения АТАСЛ способствовало увеличению времени жизни экспериментальных животных, по сравнению с НК группой мышей в условиях гемической гипоксии в 3,1 раза ($p<0,05$), гиперкапнической гипоксии – в 3,1 раза ($p<0,05$), гистотоксической и гипобарической гипоксии – 3,2 раза ($p<0,05$) и 2,3 раза ($p<0,05$) соответственно. Кроме того, процент летальности у животных, получавших соединение АТАСЛ, при воспроизведении циркуляторной гипоксии, составлял 40%.

При применении катехин гидрата продолжительность жизни животных в условиях гемической, гиперкапнической, гистотоксической и гипобарической гипоксии превышало аналогичные показатели НК группы крыс в 2,3 раза ($p<0,05$), 2,7 раза, 2,5 раза ($p<0,05$) и 2,7 раза соответственно.



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

Рисунок 16 - Влияние изучаемых объектов на продолжительность жизни экспериментальных животных в условиях гипобарической гипоксии.

При этом уровень летальности данной группы животных при воспроизведении циркуляторной гипоксии составлял 66,7%.

Таким образом, наиболее выраженный противогипоксический эффект отмечен при применении соединения АТАСЛ.

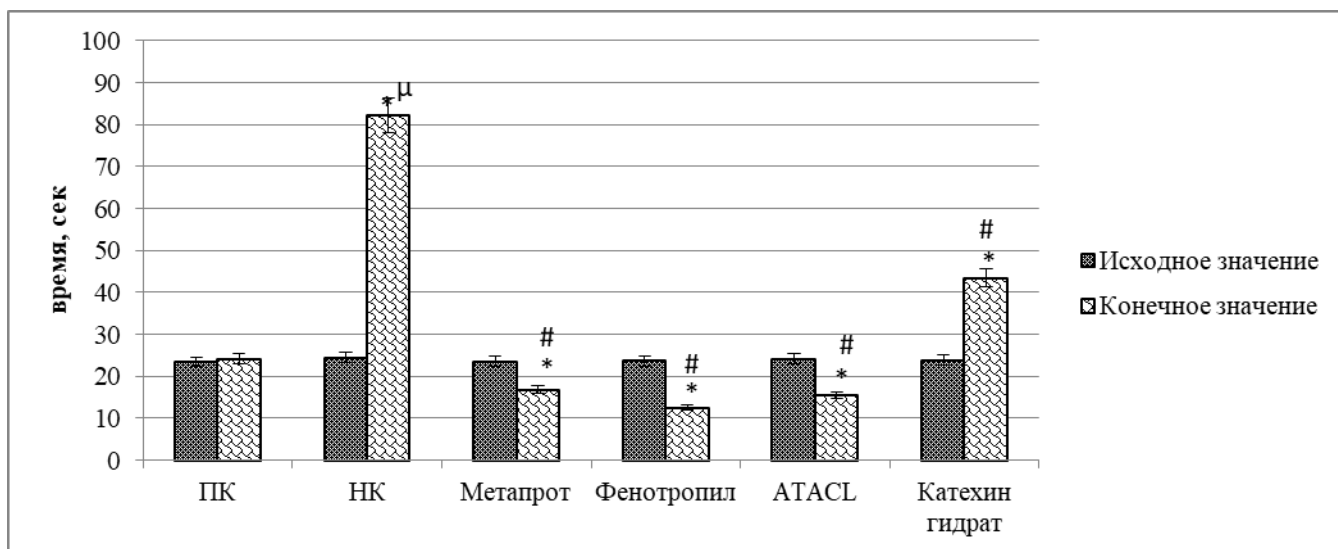
5.2. Изучение ноотропной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок

Для оценки ноотропной активности нами были проведены тесты «Водный лабиринт Морриса», «ТЭИ», «УРПИ». Препаратами сравнения в данном блоке исследований были Метапрот и Фенотропил.

5.2.1. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

После проведения эксперимента было установлено, что в группе негативного контроля (лишенных фармакологической коррекции) конечное значение времени достижения площадки было достоверно выше исходного на 235,1% ($p < 0,05$) и выше конечного времени достижения площадки на 239,3% ($p < 0,05$) относительно группы ПК, при этом число недостигших платформу крыс группы НК было равно 30% (рис. 10).

На фоне ежедневных истощающих физических нагрузок, в группах крыс, получавших препараты сравнения Фенотропил и Метапрот, наблюдается сокращение латентного времени достижения площадки экспериментальными животными, относительно аналогичного исходного показателя на 47,3% ($p < 0,05$) и 28,5% ($p < 0,05$) соответственно.



Обозначение: *- достоверно относительно исходного времени данной группы крыс (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно конечного значения группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); μ-достоверно относительно конечного значения группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

Рисунок 16 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на время достижения площадки в тесте «ВЛМ».

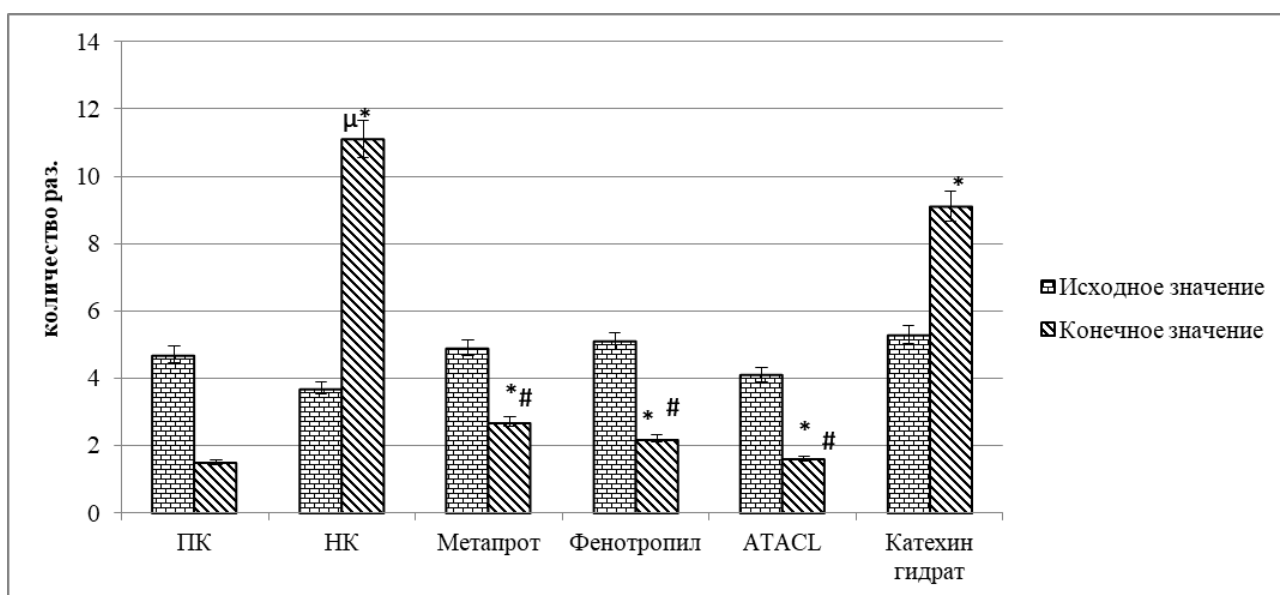
В группе крыс, получавшей соединение АТАСЛ, наблюдается сохранение памятного следа после истощающих физических нагрузок, что выражается в снижении времени, затрачиваемого на поиск возвышающейся платформы, на 35,3% ($p < 0,05$) (относительно исходного времени). Статистически значимых

отличий в конечном времени достижения площадки в группах, получавших АТАСЛ, и в группах, получавших препараты сравнения, не установлено.

При применении катехина гидрата отмечено достоверное повышение времени достижения площадки относительно исходного времени на 82% ($p < 0,05$), что касается конечного времени, то оно было ниже данного показателя группы негативного контроля на 47% ($p < 0,05$).

5.2.2. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Экстраполяционного избавления»

Интенсивные физические и психоэмоциональные перегрузки в группе крыс негативного контроля вызвали увеличение числа аверсивных реакций в форме прыжков, а также увеличение латентного времени подныривания относительно группы животных ПК на 640% ($p < 0,05$) и 123,3% ($p < 0,05$) соответственно.

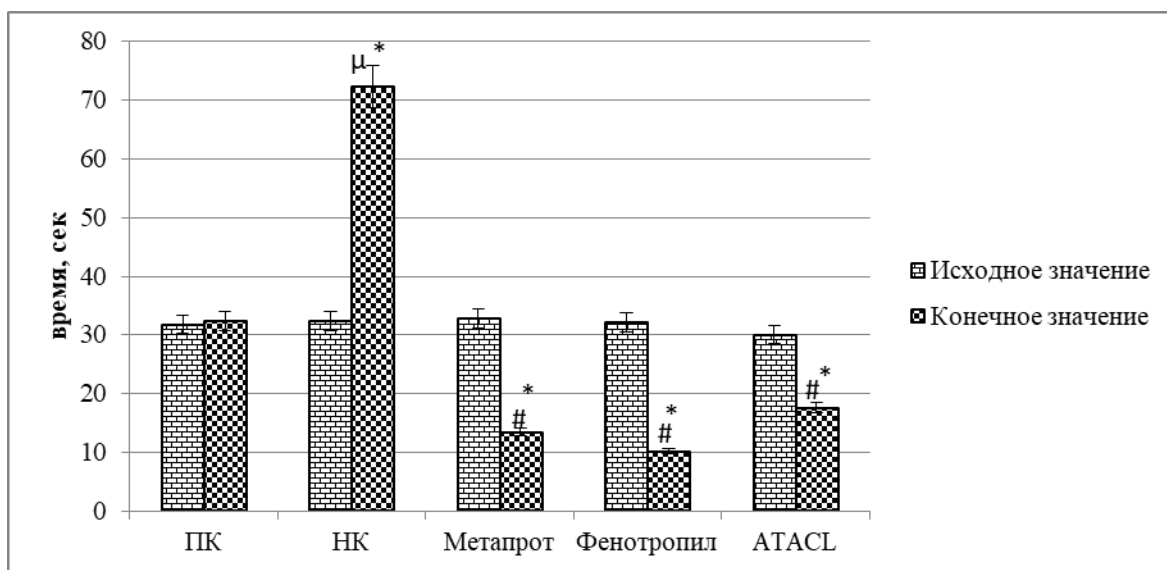


Обозначение: * - достоверно относительно исходного значения времени данной группы крыс (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - достоверно относительно конечного значения группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); μ - достоверно относительно конечного значения группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

Рисунок 17 - Изменение поведенческих реакций крыс в тесте «ТЭИ» на фоне интенсивных физических перегрузок.

Группы крыс, получавшие препараты сравнения, решили задачу экстраполяционного избавления. Сократилось количество прыжков на стенки цилиндра на 44,9% ($p<0,05$) (у крыс, получавших Метапрот), на 56,9% ($p<0,05$) (у крыс, получавших Фенотропил). Латентное время на принятие решения относительно данных до опыта снизилось на 51,1% ($p<0,05$) и 68,2% ($p<0,05$) соответственно.

Ежедневное введение животным 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты приводит к достоверному сокращению латентного периода решения ТЭИ на 41,3% ($p<0,05$), а также приводит к уменьшению числа прыжков в цилиндре на 61,1% ($p<0,05$) относительно данных до истощающей физической нагрузки. Статистически значимых отличий в группах, получавших исследуемое соединение АТАСЛ и препарат сравнения Метапрот, по показателям «латентный период подныривания» и «число аверсивных реакций в форме карабканий и прыжков» установлено не было.



Обозначение: * - достоверно относительно исходного значения времени данной группы крыс (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); #- достоверно относительно конечного значения группы крыс НК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); μ-достоверно относительно конечного значения группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$)

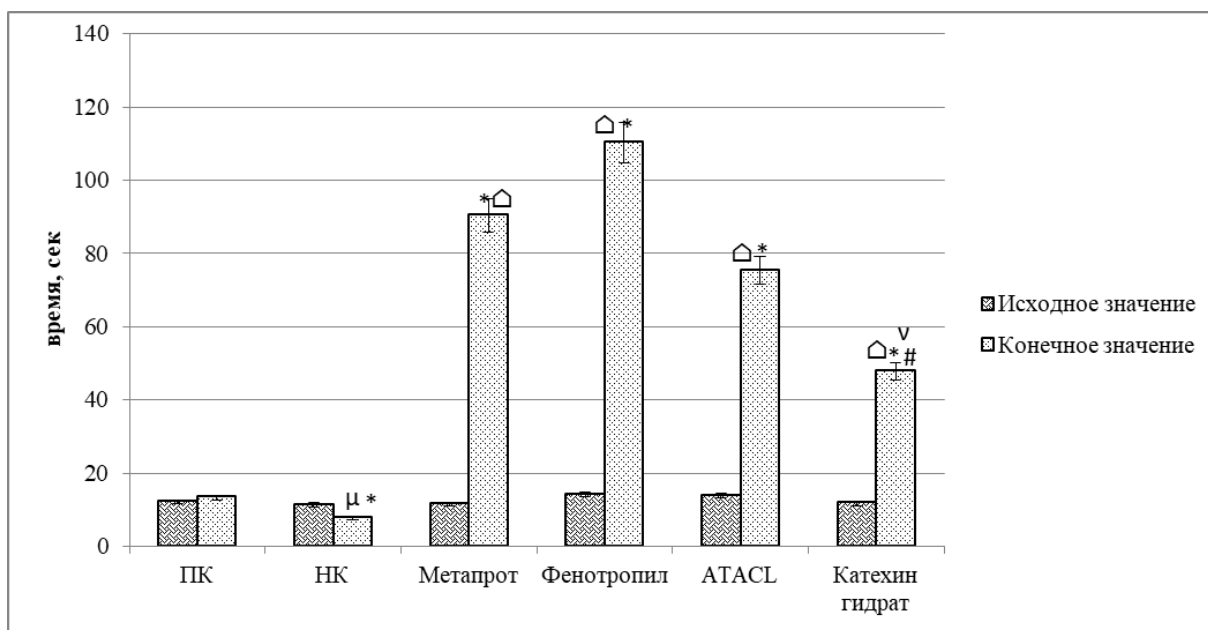
Рисунок 18 - Оценка изменения латентного периода подныривания крыс в «ТЭИ» на фоне истощающих физических перегрузок.

При применении катехин гидрата было отмечено увеличение числа карабканий и снижение периода подныривания под цилиндр на 71,7% ($p<0,05$), 29,6% ($p<0,05$), относительно исходных значений.

5.2.3. Изучение влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, катехин гидрата и препаратов сравнения на показатели поведенческой активности крыс в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания»

Исходные показатели теста «условный рефлекс пассивного избегания» представлены на рисунке 19. Как видно, по латентному периоду захода в темную камеру, статистически значимых отличий между всеми экспериментальными группами установлено не было.

После воспроизведения физической нагрузки поведенческий статус животных группы негативного контроля значительно меняется. Это находит свое отражение в сокращении латентного периода захода в темный отсек относительно исходного значения на 32,5% ($p<0,01$), а также на 42,5% ($p<0,05$) относительно конечного значения группы ПК, что, вероятно, может свидетельствовать об отсутствии памятного следа, в результате ежедневной физической нагрузки.



Обозначение: * - достоверно относительно исходного значения данной группы крыс (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); Δ- достоверно относительно конечного значения группы крыс НК(t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); μ-достоверно относительно конечного значения группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); γ- достоверно конечного значения времени группы крыс,

получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,02$); #- достоверно относительно конечного значения времени группы крыс, получавшая Фенотропила (t-критерий Стьюдента, $p < 0,001$);

Рисунок 19 - Оценка изменения латентного периода крыс в темном отсеке в тесте «УРПИ» на фоне истощающих физических перегрузок

На фоне введения препаратов сравнения Фенотропила и Метапрота увеличение времени захода в темный отсек наблюдается как относительно исходного времени данных групп (на 671,3% ($p < 0,05$) и на 686,1% ($p < 0,05$)), так и относительно конечного времени захода группы крыс негативного контроля- 1332,5% и 1074% ($p < 0,05$) соответственно. Необходимо также отметить, что при данном тестировании 30% (группа крыс, получавших Фенотропил) и 20% (группа крыс, получавших Метапрот) не заходят в темную камеру в течение эксперимента.

Увеличение латентного времени захода в темный отсек наблюдается также у группы крыс, получавших АТАСЛ. Относительно исходных данных ЛП был достоверно выше на 442,4% ($p < 0,05$), и 879,2% ($p < 0,05$) возрос относительно конечного времени группы крыс НК. По отношению к животным, которым вводили Фенотропил и Метапрот, у крыс на фоне введения АТАСЛ, латентный период был ниже на 16,6% ($p < 0,05$) и 31,6% ($p < 0,05$).

Курсовое введение катехин гидрата на фоне физической нагрузки привело к достоверному возрастанию латентного периода относительного исходного значения на 305,9% ($p < 0,05$). Необходимо также отметить, данное соединение уступает препаратам сравнения, что отражается в сокращении времени захода в темный отсек камеры после нагрузки на 47% ($p < 0,02$), относительно группы животных, получавших Метапрот и на 56,6% ($p < 0,001$)-относительно группы, получавшей Фенотропил.

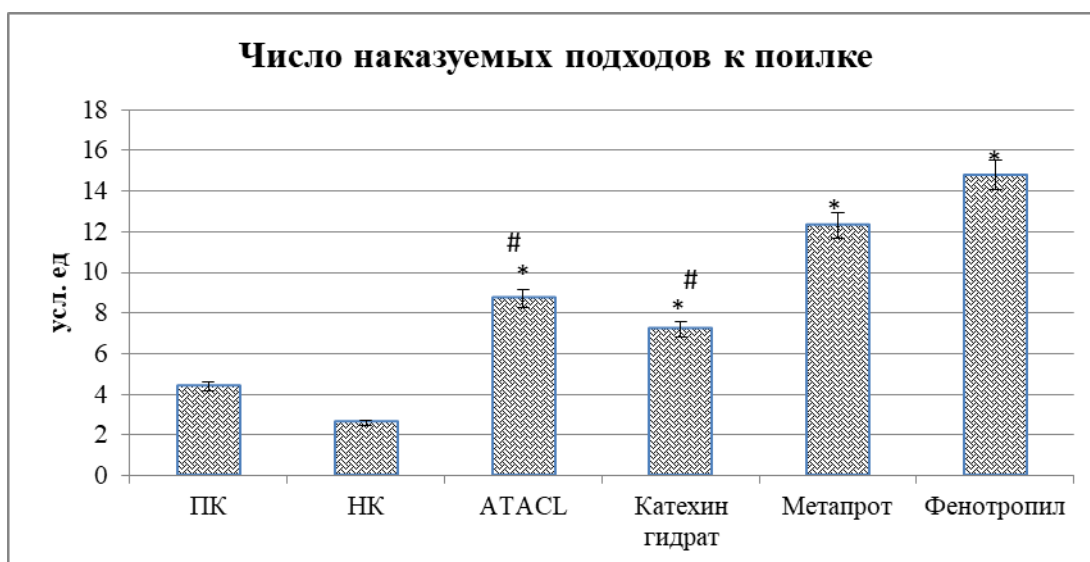
5.3. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок

Во время стрессовых ситуаций организм подвержен влиянию как внешних, так и внутренних сил, которые могут привести к изменению его гомеостаза [172]. Адаптивные изменения, которые происходят в организме во время стресса, могут быть либо поведенческими, либо физическими. Помимо того, что физиологически стресс стимулирует активацию симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, психологически он может привести к развитию симптомов тревоги и депрессии, а также невротических состояний [195]. Поэтому сохранение психоэмоционального баланса организма можно по праву считать частью актопротекторной активности фармакологически активных соединений.

5.3.1. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок в тесте «Конфликтной ситуации по Вогелю»

В тесте «Конфликтной ситуации по Вогелю (Vogel)» на фоне нагрузки в группе животных НК латентное время первого подхода к поилке статистически значимо не отличалось от такового в группах, получавших исследуемые соединения и препарат сравнения. Значительно возрос латентный период второго наказуемого взятия воды из поилки у данной группы, относительно латентного периода первого подхода, что было выше на 79,1% ($p < 0,05$) (рис.21). Стоит отметить, что латентный период второго подхода в группе животных НК был выше, относительно данного показателя группы ПК в 5,2 раза ($p < 0,05$).

У группы крыс, получавших исследуемое соединение АТАСЛ, относительно животных негативного контроля, достоверно возросло количество попыток утолить жажду в 3,3 раза ($p < 0,05$), а также снизилось латентное время второго взятия воды из поилки на 77,4%. Относительно латентного периода первого наказуемого взятия воды данной группы, ЛП второго был ниже на 57,8% ($p < 0,05$).

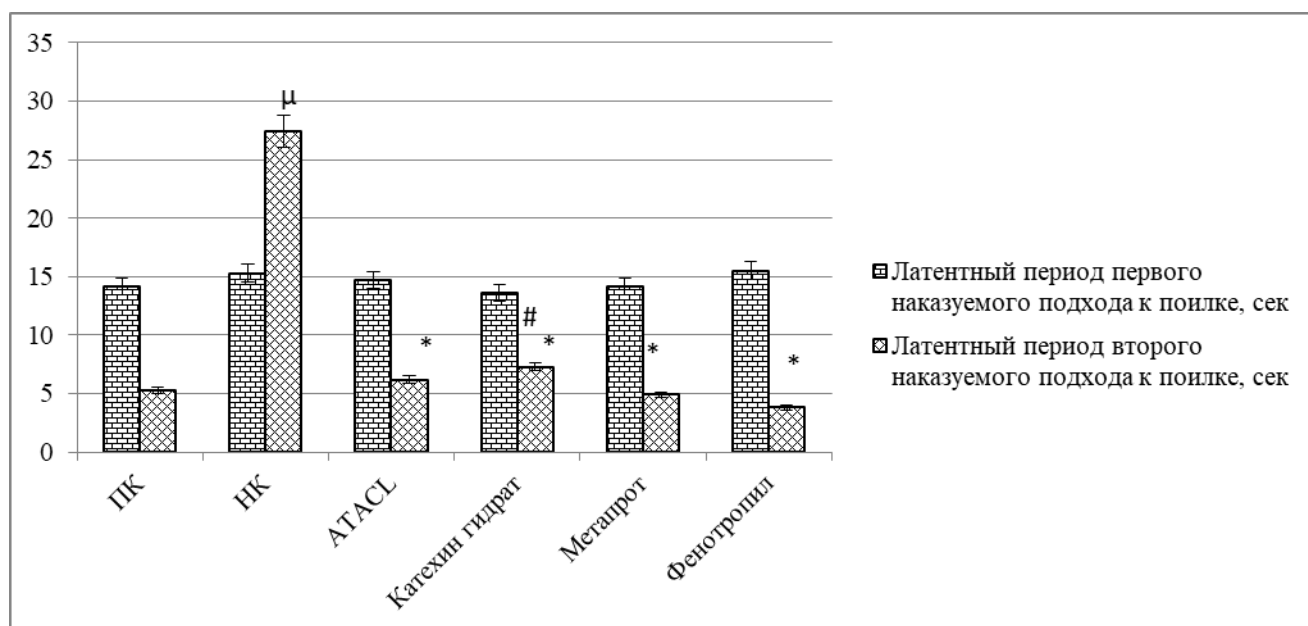


Обозначение: *- достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - достоверно относительно группы, получавшей Фенотропил (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Рисунок 20 - Изменение числа подходов к поилке под влиянием исследуемых соединений и препаратов сравнения под воздействием электроболевого раздражителя.

Применение катехин гидрата также способствовало снижению уровня тревожности грызунов. О чем свидетельствует как значительное потребление жидкости у депривированных животных (число подходов к поилке) относительно группы животных, лишенных фармакологической коррекции, в 2,8 раз ($p < 0,05$), так и уменьшение второго латентного времени подхода к поилке на 73,4% ($p < 0,05$) (рис. 21).

Подобные изменения отмечены при применении препаратов сравнения Метапрота и Фенотропила. Относительно группы НК латентный период второго «наказуемого лакания» у групп, получавших Метапрот и Фенотропил, был ниже на 82,1% ($p < 0,05$) и 86,1% ($p < 0,05$) соответственно. При этом существенно возросло количество попыток утолить жажду, относительно группы НК в 4,7 раз (группа животных, получавшая Метапрот) и 5,7 раз (группа животных, получавшая Фенотропил). Число наказуемых попыток утолить жажду в группе животных, получавших препарат сравнения Фенотропил, было выше в 1,7 раз ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных получавших катехин гидрат, и в 2 раза, по отношению к группе, получавших АТАСЛ.



Обозначение: *- достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); μ -достоверно относительно группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно группы, получавшей Фенотропил (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

Рисунок 21 - Изменение латентного периода подхода к поилке под влиянием исследуемых соединений и препаратов сравнения под воздействием электроболевого раздражителя.

Латентный период второго подхода к поилке у группы животных, получавших Фенотропил, был ниже, относительно групп, получавших АТАСЛ и катехин гидрат соответственно, в 1,6 ($p < 0,05$) и 1,9 раз ($p < 0,05$). Статистически значимых отличий по показателю «латентный период» второго наказуемого подхода к поилке в группах, получавших препарат сравнения Метапрот, и исследуемые соединения, установлено не было.

5.3.2. Изучение анксиолитической активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок в тесте «Четырех пластин»

В тесте «Четырех пластин» во всех экспериментальных группах не наблюдалось статистически достоверных отличий в латентном периоде первого движения животного (рис. 22).

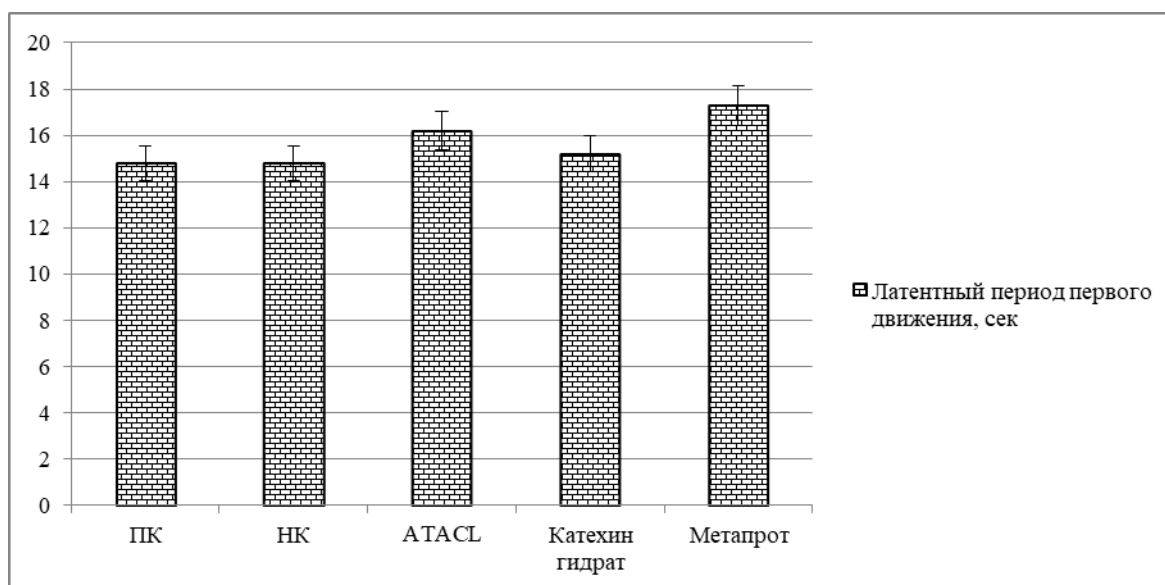
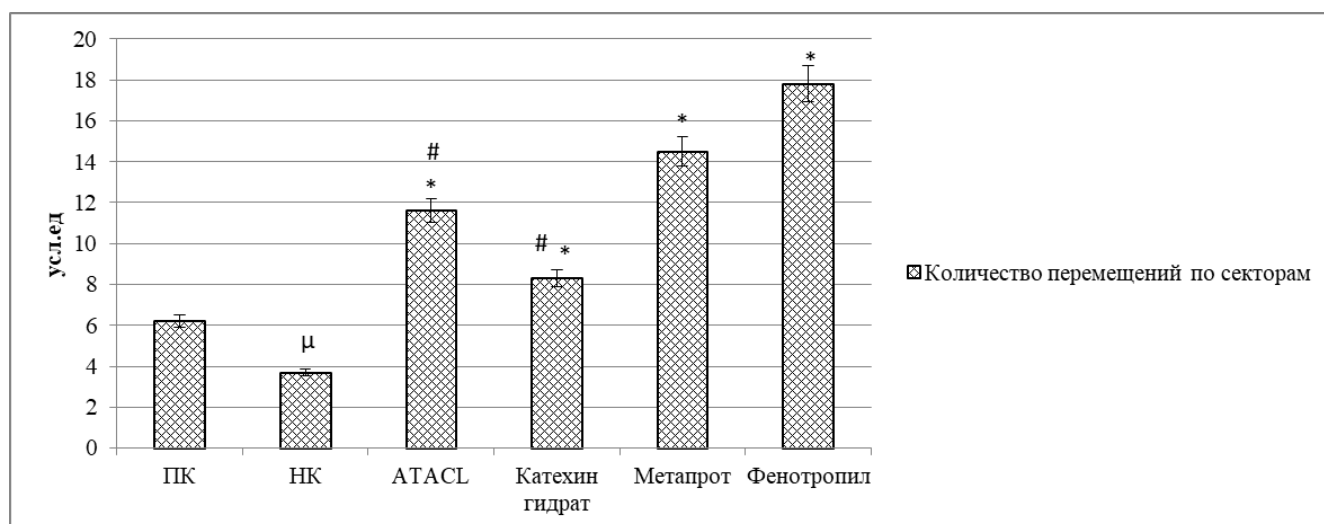


Рисунок 22 - Изменение латентного периода первого движения животного под влиянием исследуемых соединений и препаратов сравнения в тесте «Четырех пластин» под воздействием электроболевого раздражителя.

На фоне истощающих физических нагрузок в группе животных НК количество перемещений по секторам было ниже в 1,7 раз ($p < 0,05$) относительно группы ПК.



Обозначение: * - достоверно относительно группы НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); μ - достоверно относительно группы ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - достоверно относительно группы, получавшей Фенотропил (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

Рисунок 23 - Изменение количества перемещений по секторам под влиянием исследуемых соединений и препаратов сравнения под воздействием электроболевого раздражителя.

При применении исследуемых соединений АТАСЛ и катехин гидрата происходит достоверное увеличение количества перемещений животного по секторам, относительно животных НК, в 3,1 ($p<0,05$) и 2,2 раза ($p<0,05$), а также было ниже аналогичного показателя группы, получавшей препарат сравнения Фенотропила, в 1,5 ($p<0,05$) и 2,1 раза ($p<0,05$).

Количество переходов в группе, получавшей катехин гидрат, было также достоверно ниже в 1,7 раз ($p<0,05$), относительно группы, получавшей Метапрот.

В группах животных, получавших препараты сравнения Метапрот и Фенотропил, также отмечено увеличение количества переходов грызунов по секторам, что было выше, относительно негативной группы животных, в 3,9 раз ($p<0,05$) и 4,8 раз ($p<0,05$) соответственно.

В проведенной части исследования было установлено, что исследуемые соединения снижают уровень тревожности животных, что было подтверждено в тесте «Конфликтная ситуация» и тесте «Четырех пластин». Таким образом, можно сделать вывод, что исследуемые соединения обладают анксиолитической активностью, и эффект от применения был сопоставим с эффектом от применения препаратов сравнения.

5.4. Изучение эндотелиопротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок.

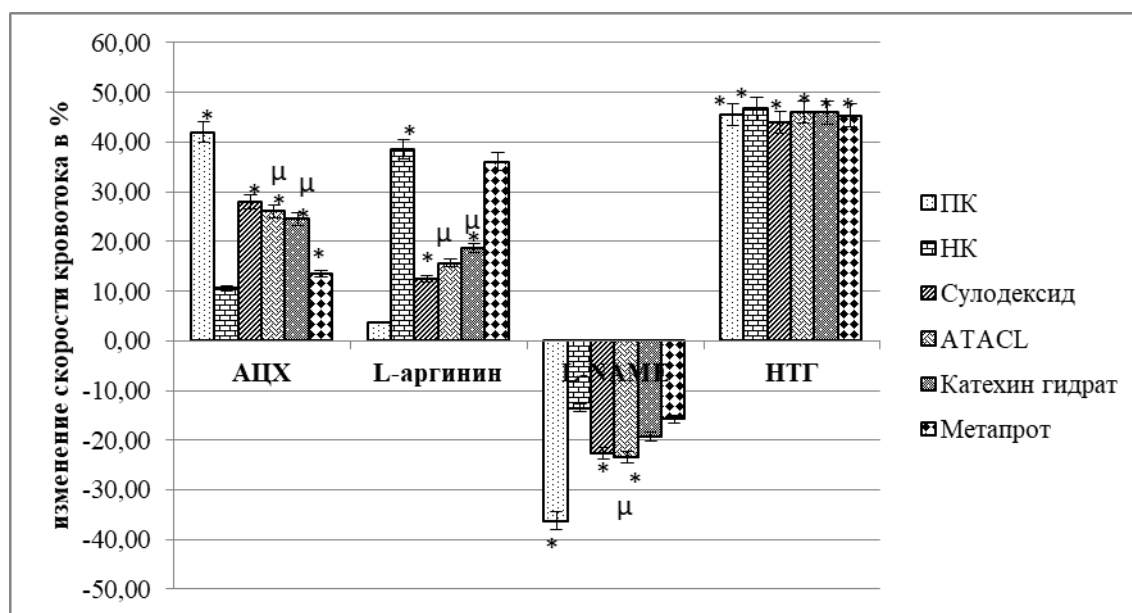
Эндотелий сосудов – уникальный по своей природе и функциям паракринный орган, обеспечивающий целый ряд гомеостатических функций и охватывающий все области человеческого организма [170]. В условиях экстремальных психофизических перегрузок наблюдается сбой регуляции сердечно-сосудистой системы, увеличивается частота сердечных сокращений, повышается центральный симпатический тонус, в результате усиливается ламинарный ток крови и интенсифицируется его повреждающее действие на лабильный эндотелий сосудов, особенно в местах ветвления сосудистого дерева [108]. В результате развивающейся эндотелиальной дисфункции ухудшается

эндотелий-зависимая вазодилатация и реологические свойства крови, активируются процессы воспаления сосудистой стенки, «нитритного» стресса и апоптоза [66], что вызывает ухудшение микроциркуляторного кровотока в скелетной мускулатуре, уменьшая ее функциональный резерв [170]. Таким образом, сохранение эндотелиальной функции можно считать одной из немаловажных составляющих актопротекторной активности фармакологически активных соединений.

В данной серии экспериментов оценивалось влияние соединения АТАСЛ в дозе 100 мг/кг и катехин гидрата в дозе 100 мг/кг на изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов и агрегационной активности тромбоцитов на фоне физической нагрузки крыс. Препаратом сравнения служили эндотелиопротектор - Сулодексид и актопротектор-Метапрот.

5.4.1. Влияние изучаемых соединений-лидеров на изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс.

Группа животных положительного контроля (ПК) подвергалась дозированным нагрузкам группами, без наступления истощения. В результате у ПК группы крыс исходная скорость кровотока (СК) составляла $4,099 \pm 0,235$ см/сек. В ответ на введение данной группе животных АЦХ и L-NAME изменение СК от ее исходного уровня составило +42% ($p < 0,05$) и – 36,2% ($p < 0,05$) соответственно (рис.17). На фоне введения L-аргинина крысам ПК группы СК статистически значимо по сравнению с ее исходным значением не изменилась, а при введении НТГ увеличилась на 45,5% ($p < 0,05$).



Обозначение: * - достоверно относительно исходной скорости кровотока (критерий Крускала-Уоллиса, $p < 0,05$); μ -достоверно относительно группы животных, получавших Метапрот (критерий Крускала-Уоллиса, $p < 0,05$);

Рисунок 24 - Влияние изучаемых объектов на изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов крыс в условиях длительных истощающих физических нагрузок.

В условиях истощающих нагрузок у НК крыс отмечено снижение исходной СК по сравнению с группой ПК животных на 20,3% ($p < 0,05$). При введении АЦХ и L-NAME данной группе крыс скорость кровотока по отношению к первоначальному значению СК группы животных негативного контроля значимо не изменилась, в то время как при введении НК группе крыс L-аргинина СК увеличилась на 38,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует о развитии у данной группы животных феномена «L-аргининового парадокса». При этом сосудистая реакция в ответ на введение АЦХ и L-NAME у НК группы животных была меньше, чем аналогичные показатели ПК группы крыс на 296,2% ($p < 0,05$) и 168,1% ($p < 0,05$) соответственно, в тоже время увеличение СК на фоне введения L-аргинина у НК группы животных было выше соответствующего значения ПК группы крыс в 10,4 ($p < 0,05$) раза. Следует отметить, что СК при введении НТГ была сопоставима во всех группах крыс, подверженных длительным истощающим нагрузкам и

статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя ПК группы животных (рис.24).

У группы крыс, получавших Сулодексид, первоначальная СК составляла $3,892 \pm 0,367$ см/сек. В ответ на введение АЦХ у данной группы животных СК увеличилась на 28% ($p < 0,05$), а при введении L-NAME снизилась на 22,6% ($p < 0,05$) относительно первоначальной СК крыс, получавших Сулодексид. При введении L-аргинина СК у животных, которым вводили Сулодексид, увеличилась на лишь 12,4%, что было на 149,5% ($p < 0,05$) меньше аналогичного значения НК группы крыс (рис.24).

Статистически значимо от группы НК не отличались показатели исходной скорости кровотока, а также реакция сосудов на вводимые анализаторы у группы, получавшей препарат сравнения Метапрот.

При применении соединения АТАСЛ исходная СК составляла $4,217 \pm 0,165$ см/сек. На фоне внутривенного введения данной группе крыс АЦХ скорость кровотока увеличилась по отношению к исходной СК животных, получавших соединение АТАСЛ, на 26,1% ($p < 0,05$), и на 48,7% ($p < 0,05$) была выше относительно скорости кровотока в группе, получавших Метапрот. При введении L-NAME СК уменьшилась на 23,5% ($p < 0,05$), относительно исходной скорости, и на 33% ($p < 0,05$) относительно аналогичного показателя группы, получавшая Метапрот. При введении L-аргинина животным, которые получали соединение АТАСЛ, СК увеличилась на 15,6% по сравнению с первоначальной скоростью кровотока данной группы крыс, и на 131% ($p < 0,05$) относительно СК группы животных, получавших препарат сравнения Метапрот.

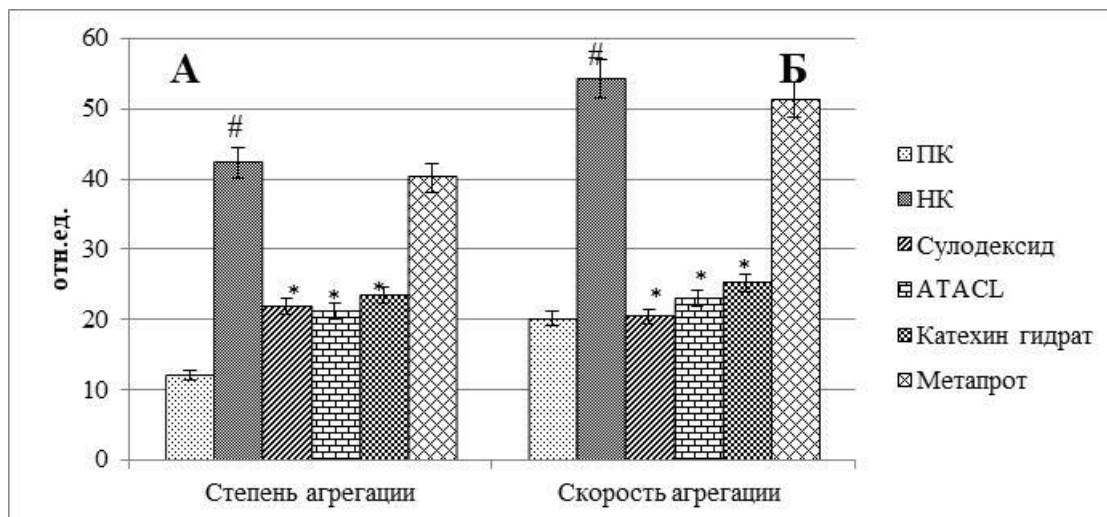
У животных, получавших катехин гидрат, исходная СК была сопоставима с ПК группой крыс и принимала значение $3,953 \pm 0,391$ см/сек. В ответ на введение АЦХ и L-NAME данной группе животных изменения СК составили +24,5% ($p < 0,05$) и -19,3% относительно первоначального значения скорости кровотока крыс, которые получали катехин гидрат. Относительно группы, получавшая Метапрот, скорость кровотока была выше при введении АЦХ на 45,3% ($p < 0,05$). В

тоже время при введении L-аргинина данной группе животных СК увеличилась на 18,7% ($p<0,05$) относительно исходной скорости кровотока, и была выше 93,4% ($p<0,05$) относительно группы животных, получавших Метапрот.

5.4.2. Влияние изучаемых соединений-лидеров на изменение агрегационной активности тромбоцитов в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс

У ПК группы животных степень и скорость агрегации тромбоцитов составляли $12,08 \pm 1,181$ отн.ед. и $20,07 \pm 0,434$ отн.ед. соответственно (рис.25). В условиях истощающих физических нагрузок у группы крыс негативного контроля наблюдалось увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов относительно ПК группы животных на 250% ($p<0,05$) и 170,4% ($p<0,05$) соответственно.

На фоне введения экспериментальным животным Сулодексида отмечено снижение степени (рис.25 А) агрегации тромбоцитов по отношению к НК группе крыс на 93% ($p<0,05$), а скорости (рис. 25 Б) агрегации – на 165,5% ($p<0,05$).



Обозначение: #- достоверно относительно группы животных ПК (критерий Крускалла-Уоллиса, $p<0,05$); *- достоверно относительно НК группы животных (критерий Крускалла-Уоллиса, $p<0,05$);

Рисунок 25- Влияние изучаемых объектов на изменение агрегационной активности тромбоцитов в условиях длительных истощающих физических нагрузок.

Применение препарата Метапрот не оказало значимого влияния на скорость и степень агрегации, эффект от применения которого был сопоставим с эффектом группы крыс негативного контроля.

Применение изучаемых объектов способствовало нормализации изучаемых показателей. Так степень агрегации тромбоцитов уменьшилась на 99,3% ($p<0,05$), 80,3% ($p<0,05$) при применении соединения АТАСЛ, катехин гидрата соответственно. Скорость агрегации также имела тенденцию к снижению. Так на фоне введения крысам соединения АТАСЛ и катехин гидрата данный показатель уменьшился на 136,6% ($p<0,05$), 116,1% ($p<0,05$) (рис. 25 Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном блоке исследований было изучено влияние исследуемых объектов на следующие виды фармакологической активности: антигипоксическую, ноотропную, анксиолитическую, эндотелиопротекторную на фоне истощающих физических нагрузок.

Проведенная оценка антигипоксических свойств изучаемых объектов показала, что наиболее выраженный противогипоксический эффект отмечен при применении соединения АТАСЛ. Так в условиях гемической гипоксии продолжительность жизни животных, которым вводили соединение АТАСЛ, статистически значимо не отличалось от показателя группы мышей, получавших Гипоксен, и превосходило время жизни животных, которые получали Метапрот на 40,9% ($p<0,05$), катехин гидрат – на 34,9% ($p<0,05$). При моделировании гиперкапнической гипоксии продолжительность жизни мышей, получавших соединение АТАСЛ, было выше аналогичного показателя у групп животных, которым вводили катехин гидрат на 17,2% ($p<0,05$) и было сопоставимо со временем жизни мышей, получавших препараты сравнения. В условиях гистотоксической гипоксии на фоне применения соединения АТАСЛ продолжительность жизни мышей превосходила показатель группы животных, получавших Метапрот на 13,2% ($p<0,05$), катехин гидрат – на 34,1% ($p<0,05$). В

условиях гипобарической гипоксии статистически значимых отличий между группами животных, получавших фармакологическую поддержку, не установлено. Таким образом, исходя из полученных данных, препараты сравнения и исследуемые соединения по величине антигипоксического действия можно расположить в следующий ряд активности: Гипоксен < Метапрот = АТАСЛ < катехин гидрат.

Наиболее отчетливое сохранение памятного следа и мнестических функций наблюдается в группе животных, получавших АТАСЛ. Что находит свое отражение в снижении времени, затрачиваемого на поиск возвышающейся платформы, на 35,3% ($p < 0,05$) (относительно исходного времени). А также ежедневное введение животным 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты приводит к достоверному сокращению латентного периода решения ТЭИ на 41,3% ($p < 0,05$) и снижению числа прыжков в цилиндре на 61,1% ($p < 0,05$) относительно данных до истощающей физической нагрузки. По проведению ноотропной активности природное соединение не уступало по эффективности представленным препаратам сравнения.

Также соединение АТАСЛ проявляет выраженный анксиолитический эффект, что находит свое подтверждение в тестах скринингового исследования. В тестах «Конфликтная ситуация» и «Четырех пластин» 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислота приводит к снижению чувства страха и беспокойства, что отражается в увеличении количества попыток утолить жажду в 3,3 раза ($p < 0,05$), относительно группы негативного контроля крыс, несмотря на электроболевое воздействие. Применение катехин гидрата также способствовало снижению уровня тревожности грызунов. Об этом свидетельствует как значительное потребление жидкости у депривированных животных, так и уменьшение второго латентного времени подхода к поилке. При применении исследуемых соединений АТАСЛ и катехин гидрата в тесте «Четырех пластин» происходит достоверное увеличение количества перемещений животного по секторам, относительно животных НК, в 3,1 ($p < 0,05$) и 2,2 раза ($p < 0,05$). Таким образом, по величине

анксиолитического действия исследуемые соединения и препараты сравнения можно расположить в следующий ряд: Фенотропил=Метапрот $\leq$ АТАСЛ<катехин гидрат.

Установлено, что в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс наблюдается развитие эндотелиальной дисфункции, выражаемой в снижении уровня стимулированной и базальной секреции оксида азота, а также в сбое NO-синтазной системы (при сохранении эндотелий-независимой вазодилатации), о чем свидетельствует снижение реактивности сосудов к АЦХ и L-NAME, развитие феномена «L-аргининового парадокса» у группы экспериментальных животных, лишенных фармакологического обеспечения (группа НК). Также у данной группы крыс наблюдалось повышение агрегационной активности тромбоцитов, что отражает ухудшение антитромботической функции эндотелия сосудов. В совокупности полученные данные позволяют предположить развитие стойких негативных структурно-функциональных изменений эндотелия сосудов у животных, подверженных истощающим физическим перегрузкам и не получавших лекарственную поддержку, что согласуется с литературными источниками [13,15].

Применение Сулодексида позволило восстановить эндотелиальную функцию в условиях истощающих физических нагрузок у крыс. Так на фоне применения Сулодексида у экспериментальных животных сосудистая реакция в ответ на введение АЦХ и L-NAME была выше, а на введение L-аргинина ниже по сравнению с группой крыс негативного контроля на 165,2% ($p<0,05$), 67,4% ($p<0,05$) и 67,8% ($p<0,05$) соответственно. Кроме того на фоне применения Сулодексида у крыс отмечена нормализация агрегационной активности тромбоцитов, что подтверждает полученные ранее результаты о положительном влиянии Сулодексида на эндотелиальную функцию экспериментальных животных.

На фоне применения изучаемых объектов эндотелиальная функция у крыс изменялась неоднозначно. Так агрегационная активность тромбоцитов –

составляющая антитромботической функции эндотелия изменялась практически в равной степени при введении всех изучаемых объектов, тогда как вазодилатирующая функция эндотелия сосудов наиболее значимо изменилась при применении соединения АТАСЛ.

На фоне применения соединения АТАСЛ реакция сосудов в ответ на введение АЦХ и L-NAME была выше аналогичных показателей животных, лишенных фармакологической поддержки на 147,2% ($p<0,05$) и 74,2% ($p<0,05$) соответственно, а при введении L-аргинина сосудистый ответ у крыс, получавших соединение АТАСЛ, был ниже такового у НК группы животных на 59,4% ($p<0,05$). При этом статистически значимых отличий между группами животных, которым вводили Сулодексид и соединение АТАСЛ, установлено не было.

Препарат сравнения Метапрот не оказал значимого влияния как на вазодилатирующую, так и на антитромботическую функцию эндотелия.

Таким образом, изучаемые объекты оказывают положительное влияние на состояние эндотелиальной функции у крыс в условиях длительных истощающих нагрузок, при этом по величине эндотелиопротекторного действия исследуемые объекты можно расположить в следующем порядке: Сулодексид = АТАСЛ > катехин гидрат > Метапрот.

По совокупности полученных данных можно сказать, что выдвинутые на этапе скрининга соединения обладают противогипоксической, ноотропной, анксиолитической и эндотелиопротекторной видами активности.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИН ГИДРАТА

Данный блок исследования был выполнен в 2 этапа. На первом этапе была проведена оценка антирадикальных свойств соединений-лидеров 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата *in vitro*. Антирадикальную активность определяли по отношению к супероксидному анион – радикалу и нитрозильному радикалу. Опытным путем находили значение величины концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀). На втором этапе была проведена оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях истощающих физических перегрузок.

6.1.1. Оценка антирадикальных свойств 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на фоне истощающих физических перегрузок

Оценивая антирадикальную активность АТАСЛ и катехин гидрата было установлено, что изучаемые соединения в концентрации 10 мг/мл подавляли генерацию супероксидного радикала на 98,4% ($p < 0,05$) (АТАСЛ) и на 71,1% ($p < 0,05$) (катехин гидрат), величина IC₅₀ при этом была соответственно равна 4,3 мг/мл и 5,1 мг/мл (табл.-12).

Как видно из представленных данных, по величине антирадикальной активности в отношении гидроксильного анион-радикала исследуемые объекты и препараты сравнения можно расположить в следующей последовательности (по мере уменьшения активности в ряду): Мексидол → Метапрот → АТАСЛ → катехин гидрат.

Таблица-12

Влияние соединений-лидеров и препаратов сравнения на степень связывания супероксидных - анион радикалов в зависимости от концентрации

Изучаемые объекты	Концентрация, мг/мл % ингибирования					IC50, мг/мл
	10	5	2,5	1,25	0,625	
Мексидол	92,3	79,2	54,1	20,2	10,1	3,7
Метапрот	81,7	86,1	58,3	13,1	5,3*	4
АТАСЛ	98,4*	71,3	38,5*#	15,4	7,1	4,3
Катехин гидрат	71,1*	68,6	52,1	11,3*	4,2*	5,1

Примечание: *- достоверно относительно группы животных, получавшая Мексидол (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно группы животных, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Далее была проведена антирадикальная активность АТАСЛ и катехин гидрата по отношению к нитрозильному радикалу (NO). Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица-13

Влияние соединений-лидеров и препаратов сравнения на степень связывания нитрозильных - анион радикалов в зависимости от концентрации

Изучаемые объекты	Концентрация, мг/мл % ингибирования					IC50, мг/мл
	10	5	2,5	1,25	0,625	
Мексидол	97,2	86,4	61,2	22,6	8,3	3,3
Метапрот	73,2*	65,4*	53,2	13,4*	7,6	5,1
АТАСЛ	72,5*	71,2*	63,6	13,5*	8,5	4,5
Катехин гидрат	74,5*	59,2*	38,3*	17,2	6,5	5,4

Примечание: *- достоверно относительно группы животных, получавшая Мексидол (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Изучаемые соединения в концентрации 10 мг/мл подавляли генерацию нитрозильного радикала, уступая при этом препарату сравнения Мексидолу,

процент ингибирования был ниже на 25,4% ($p < 0,05$) (АТАСЛ) и 23,4% ($p < 0,05$) (катехин гидрат) соответственно, величина IC_{50} была равна 4,5 мг/мл и 5,4 мг/мл.

В результате полученных данных, по величине антирадикальной активности в отношении нитрозильного радикала исследуемые объекты и препараты сравнения можно расположить в следующий ряд: Мексидол→АТАСЛ→Метапрот→катехин гидрат.

Результаты эксперимента в условиях *in vitro* показали, что исследуемые соединения проявляют антирадикальную активность в отношении свободных радикалов- (NO^* и O_2^{*-}).

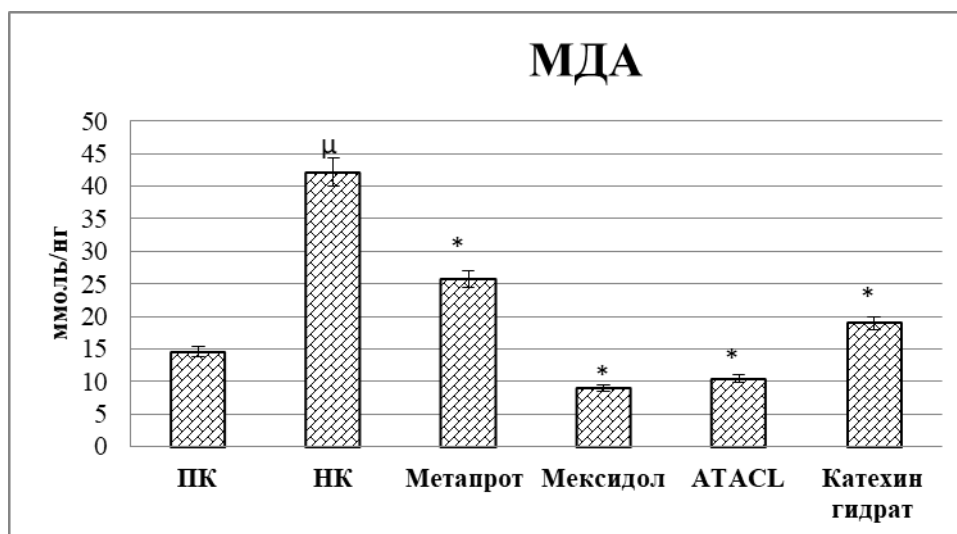
6.1.2. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на состояние про/антиоксидантного равновесия в условиях истощающих физических перегрузок

Согласно современным представлениям, физические нагрузки, сопровождающиеся гипоксией, оксидативным стрессом, приводят к существенному изменению процессов свободнорадикального окисления (СРО) [60]. Накопление токсичных продуктов ПОЛ (МДА, гидроперексидов) приводят к метаболическим нарушениям, которые, в свою очередь, сопровождают повреждение клетки и ее гибель [20].

Таким образом, поддержание равновесия про/АОЗ систем является одним из главных факторов при истощающих нагрузках в развитии компенсаторных процессов, и поэтому медикаментозное воздействие должно быть направлено на данный баланс про/АОЗ, в сторону увеличения последних. В данной серии исследований в качестве препаратов сравнения использовали Метапрот и Мексидол.

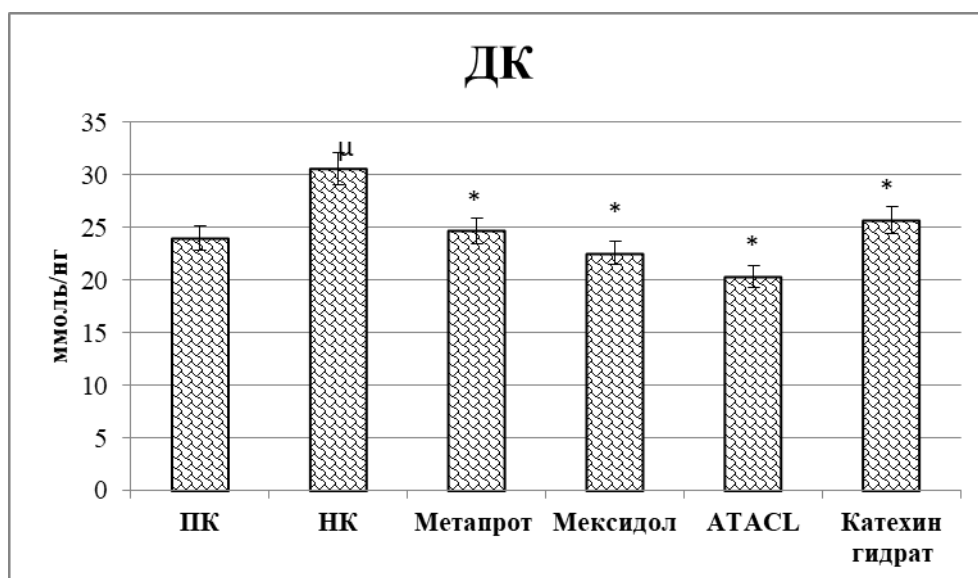
На фоне физических и психоэмоциональных перегрузок у животных группы негативного контроля, относительно интактной группы крыс, наблюдается увеличение концентрации образования ТБК-активных продуктов на 189%

($p < 0,05$) (рис. 26) и диеновых конъюгатов на 40,4% ($p < 0,05$) соответственно (рис.27).



Обозначение: μ - достоверно относительно группы крыс ПК (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);
 *- достоверно относительно группы крыс НК (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);

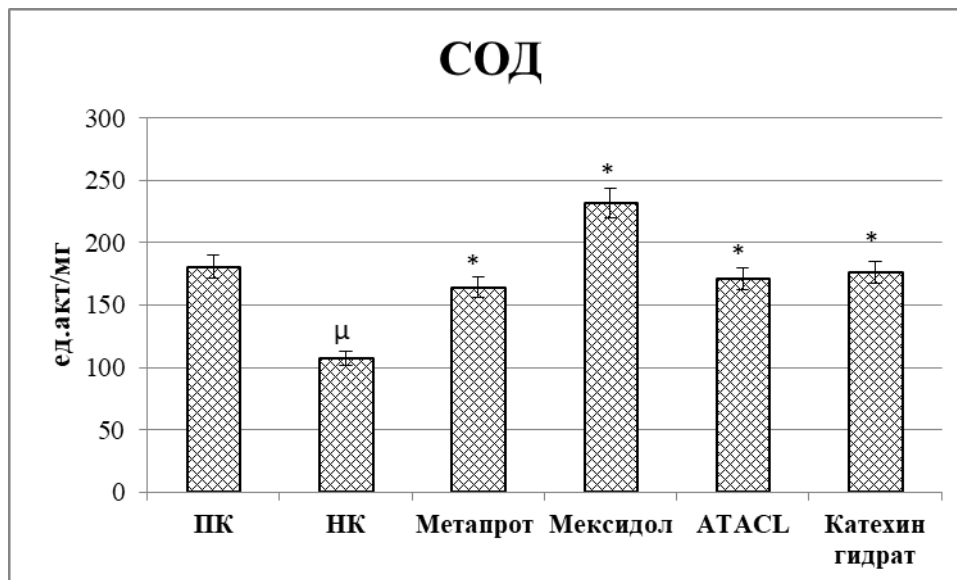
Рисунок 26 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание ТБК - активных продуктов в мышечной ткани крыс на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок.



Обозначение: μ - достоверно относительно группы крыс ПК (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);
 *- достоверно относительно группы крыс НК (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);

Рисунок 27 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание ДК в мышечной ткани крыс на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок.

В то же время у крыс группы НК, значительно уменьшилась активность антиоксидантной защиты организма, что отражается в снижении показателей концентрации СОД, каталазы и ГП: на 40,6% ($p<0,05$), 33,8% ($p<0,05$), 30,1% ($p<0,05$), относительно группы крыс положительного контроля.



Обозначение: μ- достоверно относительно группы крыс ПК (U-критерий Манна-Уитни, $p<0,05$); *- достоверно относительно группы крыс НК (U-критерий Манна-Уитни, $p<0,05$);

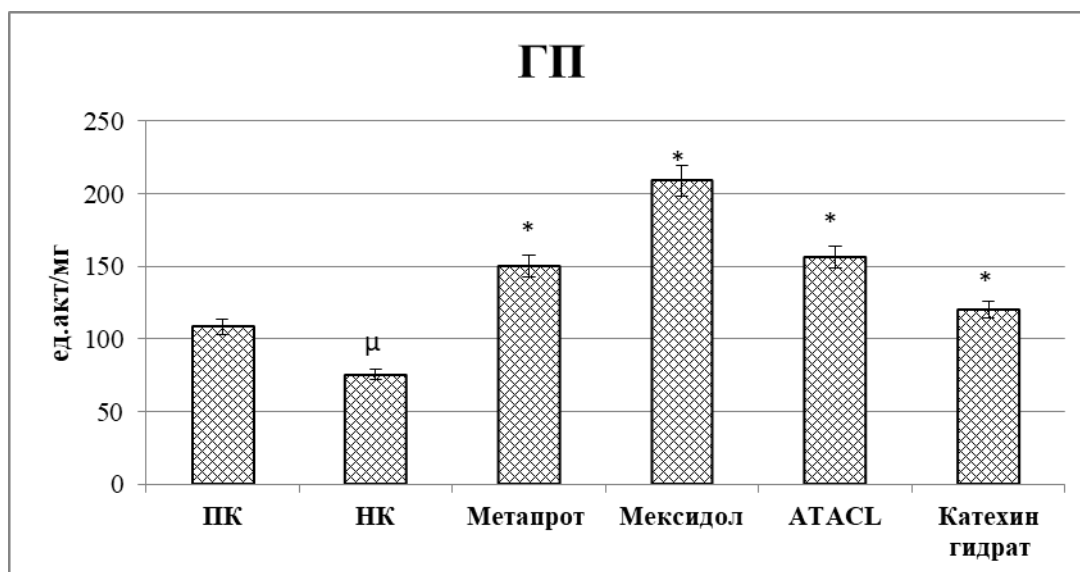
Рисунок 28 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание СОД в мышечной ткани крыс на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок.

Полученные данные позволяют предположить, что в условиях длительных истощающих физических и психоэмоциональных перегрузок, у крыс развивается явление оксидативного стресса, с увеличением количества прооксидантов и снижением активности ферментов АОЗ, что согласуется с литературными источниками [41].

В группе крыс, получавших Метапрот, образование МДА увеличилось, по сравнению с группой животных ПК на 76,7% ($p<0,05$), при этом концентрация ДК статистически значимо от данной группы не отличалась.

Относительно животных, неподвергавшихся фармакологической коррекции (НК), на фоне введения Метапрота статистически достоверно уменьшилась концентрация ТБК-активных продуктов и ДК на 38,8% ($p<0,05$), и 19,2% ($p<0,05$).

Активность ферментов АОЗ, напротив, была выше: СОД- 53% ($p<0,05$), каталаза на 73,9% ($p<0,05$), ГП - 98% ($p<0,05$).

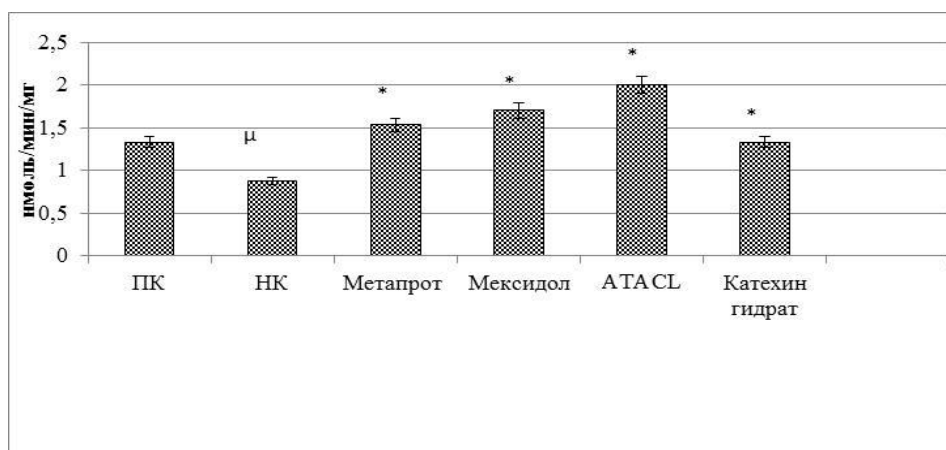


Обозначение: μ- достоверно относительно группы крыс ПК (U-критерий Манна-Уитни, $p<0,05$); *- достоверно относительно группы крыс НК (U-критерий Манна-Уитни, $p<0,05$);

Рисунок 29 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание ГП в мышечной ткани крыс на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок.

Подобные изменения наблюдаются при введении Мексидола, относительно ПК группы крыс, достоверное снижение концентрации МДА на 38% ($p<0,04$), при этом статистически значимых различий между показателем ДК установлено не было (рис. 28). По сравнению с группой НК у животных, получавших Мексидол, на фоне ежедневных физических нагрузок наблюдалось уменьшение концентрации малонового диальдегида на 78,5% ($p<0,05$) и диеновых конъюгатов на 26% ($p<0,05$). Содержание ферментов антиоксидантной защиты увеличилось, относительно группы НК: супероксиддисмутаза: 116,1% ($p<0,05$), каталаза: 93,2% ($p<0,05$), глутатион-пероксидаза: 175,8% ($p<0,05$) (рис.29).

При сравнении показателей, характеризующих про/антиоксидантное равновесие, у групп крыс, которым вводили АТАСЛ с группой ПК, статистически значимых отличий между всеми изучаемыми параметрами установлено не было.



Обозначение: μ- достоверно относительно группы крыс ПК (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);*- достоверно относительно группы крыс НК(U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$);

Рисунок 30 - Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на активность каталазы в мышечной ткани крыс на фоне физических и психоэмоциональных перегрузок.

В свою очередь, введение 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты способствовало устранению возникшего дисбаланса, уменьшая, тем самым, МДА на 75,1% ($p < 0,05$), ДК-33,6% ($p < 0,05$), относительно группы крыс НК. СОД, каталаза и ГП были статистически достоверно выше аналогичных показателей у группы НК на 59,3 ($p < 0,05$), 127,3% ($p < 0,05$), 106,2% ($p < 0,05$).

Статистически значимых отличий между группой, получавшей АТАСЛ, и группами, получавшими препарат сравнения Мексидол и Метапрот, по показателям: ДК, СОД, каталаза и ГП установлено не было.

Ежедневное применение катехин гидрата, на фоне физических перегрузок, приводит к заметному снижению перекисного окисления, тем самым, статистически достоверно уменьшая образование ТБК-активных продуктов на 55% ($p < 0,05$), не оказывая влияния, на содержание диеновых конъюгатов, относительно группы негативного контроля.

Система «защиты» отмечалась в повышении активности супероксиддисмутазы: 64,5% ($p < 0,05$), глутатионпероксидазы на 58,4% ($p < 0,05$) и каталазы на 51,1% ($p < 0,05$) соответственно, относительно группы крыс НК.

6.2. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на концентрацию изоферментов монооксида азота (NO) в условиях истощающих физических перегрузок

В группе интактных животных концентрация изоферментов NO составляла: $81,2 \pm 2,32$ пг/мл - eNOS; $20,3 \pm 1,05$ нг/мл – nNOS; $11,7 \pm 1,23$ нг/мл - iNOS.

На фоне физической нагрузки в группе крыс негативного контроля произошло снижение концентрации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) на 112% ($p < 0,05$), повышение концентрации индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) на 143,6%, при этом концентрация nNOS статистически значимо не отличалась от группы интактных крыс.

Применение референтного препарата Метапрота не оказало значимого влияния на содержание изоферментов монооксида азота, их концентрация статистически значимо не отличалась от группы крыс негативного контроля.

У крыс, получавших 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту, концентрация eNOS была выше на 95% ($p < 0,05$) и была ниже на 53,3% ($p < 0,05$) индуцибельная NO-синтаза, в сравнении с группой негативного контроля.

Таблица-14

Влияние исследуемых соединений-лидеров на концентрацию изоферментов NO-синтазной системы

Группа	ПК	НК	АТАСЛ	Катехин гидрат	Метапрот
nNOS нг/мл	$20,3 \pm 1,05$	$17,3 \pm 1,05$	$18,2 \pm 1,22$	$19,5 \pm 0,56$	$18,5 \pm 0,67$
iNOS нг/мл	$11,7 \pm 1,23$	$28,5 \pm 1,6^*$	$13,3 \pm 1,28^\#$	$15,3 \pm 1,33^*$	$25,2 \pm 1,54$
eNOS пг/мл	$81,2 \pm 2,32$	$38,3 \pm 1,58^*$	$74,7 \pm 2,87^\#$	$54,3 \pm 1,87^\#$	$42,3 \pm 2,4$

*Примечание:**- статистически значимо относительно группы животных ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- статистически значимо относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Отмечен более высокий уровень eNOS, и меньшая концентрация iNOS в группе, получавшая катехин гидрат, что было выше на 41,8% (eNOS) ($p < 0,05$) и ниже на 46,3% (iNOS) ($p < 0,05$), относительно группы крыс негативного контроля (табл. 13).

Применение исследуемых соединений 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата, а также препарата сравнения Метапрота не привело к достоверному изменению экспрессии изофермента нейрональной синтазы (nNOS).

6.3. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата на концентрацию JNK, AIF и PPAR в условиях истощающих физических перегрузок.

Как было отмечено ранее, митохондриальная дисфункция может опосредовать энергодефицит клетки с последующей запрограммированной гибелью (апоптоз) [102,129]. Один из регуляторных механизмов, способных препятствовать данным негативным изменениям, является воздействие на рецепторы PPAR. Установлено, что активация рецепторов PPAR играет значимую роль в поддержании должного уровня энергетических процессов в мышечной ткани, регулируя гомеостаз основных источников макроэргических соединений для активно работающей мышцы - глюкозы и липидов. В ряду некоторых ученых в качестве основного регулятора гомеостаза макроэргов был предложен подтип рецепторов PPAR β/δ , активация которых приводит к образованию специфического миокина—адипонектина, участвующего в повышении оксидации жирных кислот с образованием АТФ [138,168].

Другим патогенетическим механизмом деструкции миоцитов скелетной мускулатуры в условиях интенсивной работы мышц является апоптоз. По последним литературным данным мишень, позволяющая регулировать процессы апоптоза, является JNK-протеинкиназа. Известно три JNK-изоформы: JNK1, JNK2 и JNK3, различающихся по своим функциональным свойствам [115]. В тоже время для JNK описана способность подавлять реакции апоптоза, как через каспаз-зависимый, так и через каспаз-независимый путь.

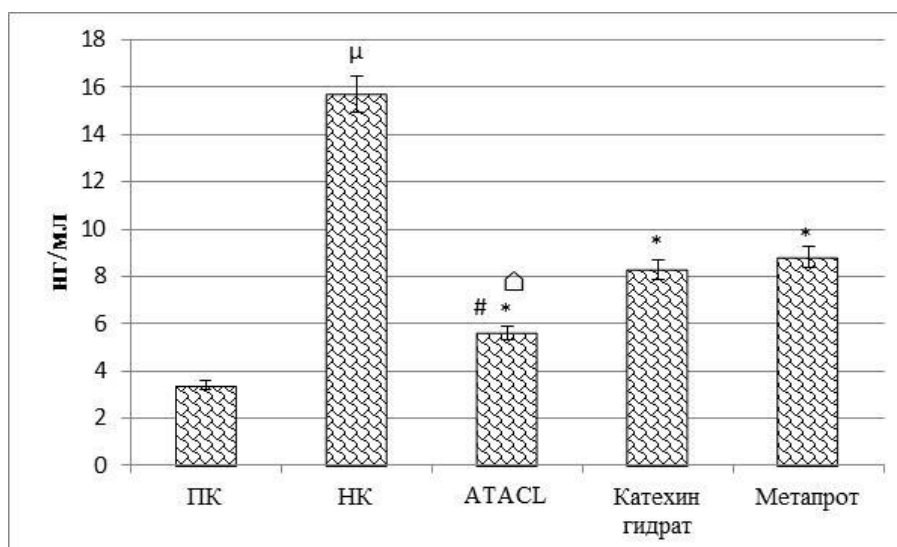
Стоит также сказать, что деструкция митохондрий приводит к запуску запрограммированной гибели клетки, которая активирует апоптоз-индуцирующий фактор (AIF).

Таким образом, нами, с помощью метода имуноферментного анализа были определены концентрации JNK, AIF, PPAR в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.

6.3.1. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию JNK в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.

В группе крыс ПК концентрация JNK составляла $3,4 \pm 0,8$ нг/мл. В группе, лишенной фармакологической коррекции (НК), активность ферментативного белка была достоверно выше группы ПК на 78,3% ($p < 0,05$).

На фоне применения как исследуемых веществ-АТАСЛ и катехин гидрата, так и препарата сравнения Метапрот, наблюдалось ингибирование JNK, на 64,3% ($p < 0,05$), 47,1% ($p < 0,05$) и 43,9% ($p < 0,05$) соответственно, относительно группы крыс НК.



Обозначение: μ - достоверно относительно группы животных ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); *- достоверно относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно группы, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); $\triangle$ - достоверно относительно группы, получавшая катехин гидрат (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

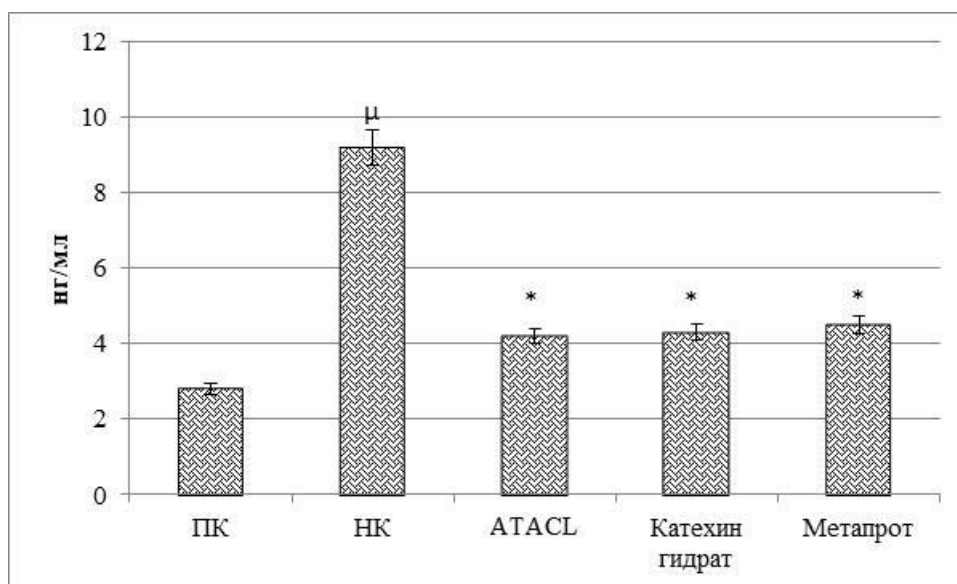
Рисунок 31 - Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию JNK в супернатанте скелетной мышцы животных

Активность JNK была ниже на 36,4% ($p<0,05$) в группе животных, получавших АТАСЛ, в сравнении с группой крыс, получавших препарат сравнения Метапрот. Достоверных отличий между группами, получавшими катехин гидрат и Метапрот, установлено не было.

6.3.2. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию AIF в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.

В группе положительного контроля концентрация AIF составляла 2,8 нг/мл. У крыс, подверженных физическим нагрузкам (НК), наблюдалось достоверное повышение концентрации на 228,6% ($p<0,05$), в сравнении с группой крыс положительного контроля (ПК).

На фоне применения исследуемых соединений АТАСЛ и катехин гидрата, а также препарата сравнения Метапрот, наблюдалось снижение активности фактора AIF, что было ниже, относительно содержания в группе крыс НК на 54,3% ($p<0,05$), 53,3% ($p<0,05$) и 51,1% ($p<0,05$) соответственно.



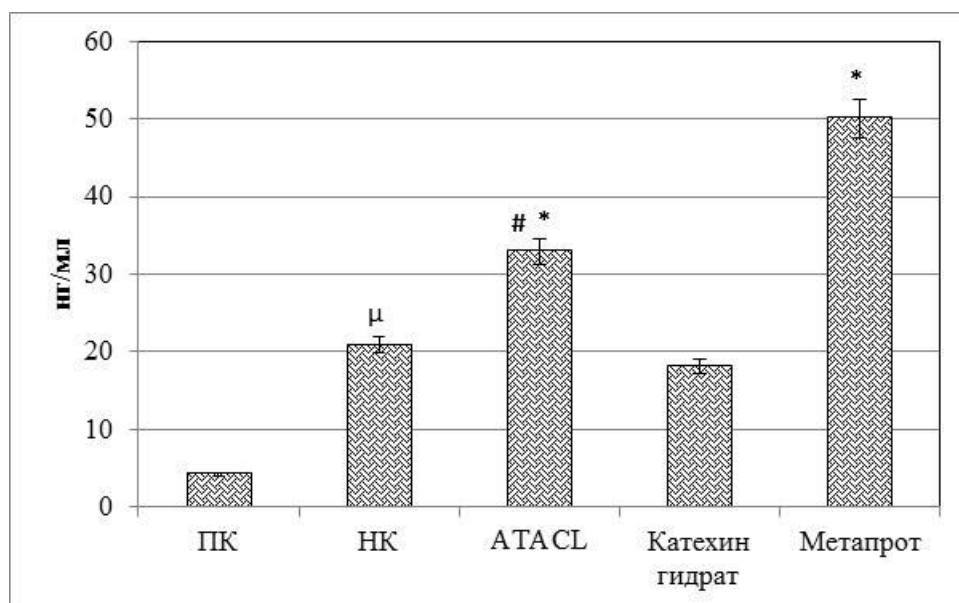
Обозначение: μ- достоверно относительно группы животных ПК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$); *- достоверно относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p<0,05$);

Рисунок 32 - Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию AIF в супернатанте скелетной мышцы животных.

Статистически значимых отличий между группами крыс, получавшими исследуемые вещества, и группой животных, получавших референтный препарат сравнения Метапрот, установлено не было.

6.3.3. Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию PPAR в супернатанте скелетной мышцы животных, подвергавшихся истощающим физическим нагрузкам.

В группе крыс ПК активность PPAR составляла $4,2 \pm 0,7$ пг/мл. Повышение уровня PPAR на 79,9% ($p < 0,05$) наблюдалось в группе крыс НК, относительно группы животных ПК.



Обозначение: μ- достоверно относительно группы животных ПК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); *- достоверно относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #- достоверно относительно группы, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Рисунок 33 - Изучение влияния соединений-лидеров и препарата сравнения на концентрацию PPAR в супернатанте скелетной мышцы животных.

У животных, получавших препарат сравнения Метапрот концентрация PPAR была выше на 139,7% ($p < 0,05$), в сравнении с группой крыс НК, а также выше на 176,8% ($p < 0,05$) группы крыс, получавших исследуемое соединение катехин гидрат, и на 51,8% ($p < 0,05$) относительно группы, получавшая АТАСЛ.

Применение исследуемого соединения АТАСL, в свою очередь, способствовало повышению уровня РРАR на 57,9% ($p<0,05$) относительно группы НК, при этом показатель активности РРАR в группе, получавшей катехин гидрат, статистически значимо не отличался от группы крыс НК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучив возможные механизмы актопротекторного действия соединений-лидеров было установлено, что ежедневные физические нагрузки вызывают значительную активацию перекисных процессов, оказывающих повреждающее действие и затрагивающих разные органы и системы, что выражается в увеличении образования ТБК-активных продуктов на 189% ($p<0,05$) и диеновых конъюгатов на 40,4% ($p<0,05$) относительно группы крыс ПК. Также у данной группы животных, значительно уменьшилась активность антиоксидантной защиты организма, что отражается в снижении показателей СОД, каталазы и ГП: на 40,6% ($p<0,05$), 33,8% ($p<0,05$), 30,1% ($p<0,05$) относительно ПК группы крыс. Кроме того, у животных в условиях физических нагрузок, как в скелетных мышцах, так и крови, происходит накопление недоокисленных продуктов распада, образование маркеров мышечной деструкции (миоглобин), что в конечном итоге может приводить к появлению энергодефицита в клетке, развитию ацидоза и последующей ее гибели (апоптоз). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными [12,22].

Введение препарата сравнения Метапрот позволило нивелировать процессы перекисного окисления, возникшие на фоне чрезмерных истощающих нагрузок крыс, активируя, тем самым, систему «защиты» организма (увеличилась активность СОД, каталазы и ГП относительно группы негативного контроля). Было установлено, что Метапрот проявляет антирадикальную активность по отношению к супероксидному анион – радикалу и нитрозильному радикалу.

При применении Мексидола наблюдается снижение (по отношению к группе, лишенной фармакологической коррекции) малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Активность АОЗ была существенно выше, чем у группы

НК, а также у групп крыс, получавших изучаемые соединения и препарат сравнения Метапрот. В исследовании была подтверждена антирадикальная активность Мексидола по отношению к супероксидному и нитрозильному радикалам.

Применение изучаемых соединений оказало неоднозначный про-/антиоксидантный эффект. Наибольшая антиоксидантная активность отмечена в группе животных, получавших АТАСЛ. При этом по величине эффекта практически в равной степени соответствовал Метапроту и лишь немного уступал «истинному» антиоксиданту Мексидолу. Антирадикальная активность данного соединения по отношению к нитрозильному радикалу была выше, чем активность у препарата сравнения Метапрота. Исследуемая субстанция катехин гидрат также проявляет антирадикальную активность как по отношению к супероксидному радикалу, так и к нитрозильному.

Применение исследуемых соединений оказало позитивное влияние на концентрации изоферментов на фоне истощающих физических нагрузок, что выражается в достоверном увеличении концентрации эндотелиальной NO-синтазы на 95% ($p<0,05$) и на 41,8% ($p<0,05$) группы, получавшие АТАСЛ и катехин гидрат, и снижении концентрации индуцибельной изоформы на 53,3% ($p<0,05$) и 46,3% ($p<0,05$) соответственно.

Было также установлено, что на фоне ежедневных истощающих нагрузок у животных, получавших исследуемые соединения-лидеры АТАСЛ и катехин гидрат, наблюдается снижение концентрации JNK на 64,3% ($p<0,05$), 47,1% ($p<0,05$) соответственно, в сравнении с группой негативного контроля крыс, что может свидетельствовать об адаптивном ремоделировании скелетных мышц в ответ на развитие выносливости [137]. Активность JNK была ниже на 36,4% ($p<0,05$) в группе животных, получавших АТАСЛ, по отношению к группе крыс, получавших препарат сравнения Метапрот.

Необходимо также отметить, что важную роль, в качестве медиатора апоптоза, отводится AIF. На фоне применения исследуемых соединений было

отмечено снижение концентрации AIF, относительно группы НК, на 54,3% ($p < 0,05$) (группа крыс, получавших АТАСЛ), 53,3% ($p < 0,05$) (группа крыс, получавших катехин гидрат). При этом важно сказать, что статистически значимых отличий между группами крыс, получавшими исследуемые вещества, и группой животных, получавших препарат сравнения, установлено не было.

Что касается изменения концентрации PPAR, то на фоне физической нагрузки, отмечается достоверное повышение уровня у группы крыс, получавших 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту, что было выше на 57,9% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. При использовании катехин гидрата не было зафиксировано достоверных изменений концентрации PPAR относительно группы негативного контроля.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день проблема борьбы с психо-физической дезадаптацией (усталостью), вызванной различными факторами является актуальной в области современной фармакологии и медицины [111,40,65]. Последние данные ВОЗ указывают на то, что на показатель структуры хронических заболеваний, которые ассоциированы с усталостью, приходится 76,6% [192], что в дальнейшем может служить причиной повышения смертности населения. В первую очередь, следует выделить категорию людей, чья профессиональная деятельность связана главным образом, с экстремальными нагрузками - это ликвидаторы аварий ЧС, космонавты, военные, горнопроходцы, летчики [91,3,52,76]. Также, важно отметить, другую многочисленную группу, в которой уровень как физической, так и психической активности является определяющим это профессиональные спортсмены.

Ввиду высокой эпидемиологической роли психо-физической дисфункции, проявляемой как в повседневной сфере, так и профессиональной, актуальным становится вопрос о коррекции данных нарушений.

Известно множество препаратов, относящихся к различным фармакотерапевтическим группам для устранения психо-физической дисфункции, но интерес представляет относительно новый класс «Актопротекторы» [158,180,181,2,26,64]. Несмотря на перспективность применения лекарственных средств данной группы, единственным разрешенным препаратом в общемировой медицине был Метапрот, однако, он на данный момент не имеет регистрации для применения в Российской Федерации [19]. Учитывая вышеизложенный факт, возникает острая необходимость поиска веществ, обладающих актопротекторным видом активности, с возможным их применением в различных областях медицины: экстремальной, спортивной, военной, авиационной, космической.

Важно отметить, что особое внимание, при этом, уделяют растительным объектам, которые сочетают в себе помимо высокой активности, низкую системную токсичность [122,145]. По данным литературы, актопротекторы - это вещества, которые способны не только повышать работоспособность, но также

обладать ноотропной, антиоксидантной, антигипоксической, анксиолитической и эндотелиопротекторной видами активности [152,153,34,4,11]. Установлено, что к числу возможных объектов, проявляющих полифункциональную активность, могут быть отнесены флавоноиды [25] и коричные кислоты [95,112,143,16]. Поэтому отбор веществ проводился именно в данном направлении. Проведенный фармакологический скрининг позволил из 13 веществ выявить соединения-лидеры, которые проявляют наиболее выраженную актопротекторную активность: 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота (АТАСЛ) и катехин гидрат.

При оценке влияния соединений - лидеров на работоспособность и психоэмоциональный статус животных на модели «принудительного плавания» с отягощением в холодной воде установлено, что применение АТАСЛ в большей мере способствовало повышению физической работоспособности (максимальная продолжительность плавания мышей превосходила аналогичное значение группы животных, лишенных фармакологической поддержки, на 230,1%), и в меньшей стабилизировало психоэмоциональный фон. В свою очередь, катехин гидрат, наоборот, оказал менее выраженный характер в истощающих нагрузках, но в большей степени стабилизировал поведенческий статус мышей.

В результате проведенных исследований было установлено, что работоспособность животных в тесте «Принудительное плавание с отягощением» как в холодной воде, так и в горячей, в группе животных ПК не претерпевала существенных изменений на всем протяжении эксперимента. В то время как в холодной воде максимальная продолжительность плавания составляла $169,7 \pm 24,8$ сек. Стоит отметить, что на фоне введения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты и катехин гидрата в холодной воде наблюдалось линейное повышение работоспособности. Так, физическая активность пикового дня в группе, получавшая АТАСЛ, была выше, относительно группы мышей, получавшая Метапрот, на 50,8% ($p < 0,05$). Что касается группы животных, получавшая катехин

гидрат, то день пиковой работоспособности был сопоставим с аналогичным днем группы, получавшая Метапрот.

В группе животных НК, где в качестве аверсивной среды выступала горячая вода, пик работоспособности составлял $281,5 \pm 31,7$ сек., и был зафиксирован на 4-й день принудительного плавания. Стоит отметить плавное увеличение физической активности на фоне введения исследуемых соединений: АТАСЛ и катехин гидрата. Пик активности в группе, получавшая АТАСЛ, и в группе, получавшая катехин гидрат, был зафиксирован на 7-й и 8-й экспериментальный день соответственно. При этом, в сравнении с исходным временем плавания данных групп (АТАСЛ и катехин гидрат) продолжительность максимального дня плавания была выше на 147% ($p < 0,05$) и 92,2% ($p < 0,05$). В то время, пик плавания мышей в горячей воде в группе, получавшая референтный препарат Метапрот был выше, относительно исходного времени плавания, на 129,8% ($p < 0,05$).

Следует отметить, что на фоне истощающих физических нагрузок кислородная емкость крови животных в различных аверсивных средах, не претерпевала существенных изменений. Однако, в группе НК в холодной воде, было отмечено снижение потребления кислорода митохондриями поперечно-полосатых мышц, относительно группы ПК, на 79,2% ($p < 0,05$). В горячей воде в группе животных негативного контроля, в сравнении с группой ПК, также отмечено снижение уровня потребления кислорода мышечной тканью на 69,8% ($p < 0,05$). Важно отметить, что в группах, получавших 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту и катехин гидрат, а также в группе мышей, получавшая Метапрот, на фоне истощающих нагрузок в различных аверсивных средах, потребление кислорода статистически значимо не отличалось от группы ПК.

Резюмируя полученные результаты, выявляется, что в тесте «принудительного плавания с отягощением», где в качестве аверсивной среды выступала холодная вода, наблюдаются наиболее значительные изменения в структуре и в функциях скелетной мускулатуры.

Предположительно, подобные изменения физической работоспособности опосредованы влиянием аверсивной среды на скелетную мускулатуру. Вероятно, в горячей воде сначала происходит дилатация кровеносных сосудов, активация метаболических процессов с увеличением доставки к миоцитам кислорода и питательных веществ, что в совокупности препятствует мышечному утомлению [150,196]. Однако в дальнейшем, тепловое воздействие на скелетную мускулатуру приводит к структурным изменениям в мышцах и нарушению их сократительной функции, что отражается в снижении времени плавания мышей [139].

В аверсивной среде, где в качестве стрессора выступала холодная вода, повышение физической активности животных, в краткосрочном периоде, можно связать с активацией митохондриального разобщающего белка типа 1 (UCP-1) [89]. Известно, что активация данного белка приводит к снижению в митохондриальном матриксе протонного градиента, активации гликолиза, что, в свою очередь, может способствовать как сохранению, так и повышению мышечной активности [113]. Стоит сказать, что снижение времени плавания можно объяснить гиперфункцией данного белка UCP-1, который приводит к разобщению окисления и фосфорилирования, а также ухудшению синтеза макроэргических соединений и активации оксидативного стресса [99].

Далее при изучении исследуемых веществ-лидеров на модели «бег на тредбане» наблюдалось отчетливое повышение времени бега животных к концу эксперимента, что было выше на 527% ($p < 0,05$) (АТАСЛ) и на 297,9% ($p < 0,05$) (катехин гидрат) относительно показателей группы негативного контроля. На фоне применения АТАСЛ и катехин гидрата в тесте «челночное плавание без отягощения» наблюдалось изменение выносливости животных, что выражалось в повышении преодоленного расстояния на 246,6% ($p < 0,05$) и 80,1% ($p < 0,05$) соответственно. Кроме того, в ходе проведенного исследования было установлено, что на фоне применения веществ-лидеров нивелируются гипоксические состояния, улучшаются мнестические функции, а также снижается чувство тревоги и страха.

Анализируя полученные результаты можно предположить, что действие исследуемых веществ, вероятно, связано с наличием у них антиоксидантных свойств. По литературным данным известно, что флавоноиды и коричные кислоты являются по своей природе мощными антиоксидантами [143,59]. На сегодняшний день имеются работы зарубежных авторов, подтверждающие данный антиоксидантный вид активности у субстанции катехин гидрат [171]. Наличие аналогичных свойств у АТАСЛ, вероятно, можно связать с химическим строением данного соединения. Имеющаяся в структуре 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты ОН-группа (гидроксильная) делает выше восстановительные свойства АТАСЛ, так как первичным центром связывания радикала является именно протон гидроксильной группы. В результате образуется феноксил, который является реакционно неактивным, и препятствует запуску цепи свободно-радикального окисления. В этой связи нами была проведена оценка антирадикальной и антиоксидантной видов активности исследуемых соединений, для того, чтобы подтвердить выдвинутую ранее гипотезу. Результаты исследований, выполненные *in vitro* показали, что и 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота и катехин гидрат обладают способностью ингибировать свободные радикалы - супероксидный анион-радикал и нитрозильный. К тому же, по данным *in vivo* на фоне введения АТАСЛ и катехин гидрата повышается концентрация ферментов антиоксидантной защиты (увеличилась активность СОД, каталазы и ГП) относительно группы негативного контроля, в группе, получавшая 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту на 59,3 ($p<0,05$), 127,3% ($p<0,05$), 106,2% ($p<0,05$) и получавшая катехин гидрат-на 64,5% ($p<0,05$), 51,1% ($p<0,05$) 58,4% ($p<0,05$) соответственно). При этом по величине эффекта АТАСЛ практически в равной степени соответствовал препарату сравнения Метапроту и Мексидолу.

Известно, что эндотелий является паракринным органом, выполняющим множество различных функций, в том числе играющий ведущую роль в поддержании кровоснабжения [188]. А в связи с тем, что одним из факторов,

лимитирующих активность поперечно-полосатой мускулатуры является уровень кровотока в мышечной ткани, следует уделить внимание функциональному состоянию эндотелия сосудов [177,190]. Было установлено, что природные соединения повышают функциональную активность эндотелиоцитов. При этом, на фоне применения исследуемых веществ, происходит не только сохранение вазодилатирующей функции, но и антитромбогенной, что отражается в увеличении скорости кровотока, а также в снижении скорости и степени агрегации тромбоцитов. Так, скорость кровотока была выше на фоне введения анализатора АЦХ, по сравнению с исходной скоростью на 26,1% в группе, получавшая соединение АТАСЛ, и на 24,5% ($p<0,05$) в группе, получавшая катехин гидрат. Так, повышение скорости кровотока наблюдалось и на фоне введения L-аргинина. Скорость кровотока была выше, относительно первоначальной скорости на 15,6% ($p<0,05$) (группа животных, получавших АТАСЛ) и на 18,7% ($p<0,05$) (группа животных, получавших катехин гидрат). Оба соединения оказывали свое влияние и на агрегационную активность тромбоцитов в сосудах. Так, при применении АТАСЛ и катехин гидрата степень агрегации тромбоцитов была ниже на 99,3% ($p<0,05$), 80,3% ($p<0,05$); а скорость агрегации была меньше на 136,6% ($p<0,05$), 116,1% ($p<0,05$) соответственно.

Вероятно, данный факт можно объяснить тем, что оба вещества повышают биодоступность монооксида азота (NO) [83], обладающего антиагрегантным действием [184]. По данным литературы известно, что одной из частых причин снижения уровня оксида азота является избыточная продукция супероксидного-анион-радикала (O_2^-), приводящая в дальнейшем к образованию цитотоксичного пероксинитрита [156]. Как было установлено ранее, оба вещества, способны устранить запуск цепи свободно-радикального окисления, снижая содержание (O_2^-) и (NO^*), благодаря чему в дальнейшем не происходит образование пероксинитрита, оказывающего повреждающее действие на стенки сосудов. В совокупности эти данные представляют убедительные доказательства того, что снижение уровня свободных радикалов может способствовать увеличению

кровотока на фоне физических нагрузок, опосредуемых окислительным стрессом. Сопутствующее увеличение кровотока и поглощение кислорода может привести к повышению работоспособности и выносливости, что в конечном итоге способно привести к увеличению физической активности и улучшению функции периферических сосудов и микроциркуляторного русла.

Однако, помимо сохранения мышечного кровотока и агрегационной активности на фоне истощающих физических нагрузок, несомненный интерес могут представлять и другие аспекты актопротекторной активности исследуемых соединений, например, улучшение функции митохондрий.

Как известно, развивающийся окислительный стресс приводит к усилению генерации активных форм кислорода [90] также и в митохондриях, что в дальнейшем приводит к развитию митохондриальной дисфункции [102]. Известно, что митохондрии играют центральную роль в биоэнергетике и метаболизме клетки. Ввиду этого, возникшая дисфункция митохондрий может опосредовать энергодефицит и ацидоз в клетках скелетных мышц, выделяя избыток продуктов распада в кровь. Необходимо отметить, что АТФ является универсальным источником энергии в клетке [129]. В ходе исследования было установлено, что ежедневная физическая нагрузка приводила к снижению накопления АТФ в скелетной мышце (в 2,5 раза ($p < 0,05$)) и увеличению уровня молочной кислоты (в 4,8 раз ($p < 0,001$)) в группе животных, неподвергавшихся фармакологической коррекции (НК), относительно аналогичных показателей группы животных ПК. Исследуемые же соединения оказывали положительное влияние на развившийся лактат-ацидоз и содержание АТФ в мышечной ткани. Что нашло свое отражение в снижении уровня молочной кислоты в 2,1 ($p < 0,05$)(группа, получавшая АТАСЛ) и 2,2 раза (группа, получавшая катехин гидрат) ($p < 0,05$) относительно группы НК, а также наблюдалось достоверное повышение содержания АТФ в мышцах, относительно группы НК, в 2,8 ($p < 0,05$) (группа, получавшая АТАСЛ), 2,6 ($p < 0,05$) (группа, получавшая катехин гидрат). Поэтому можно предположить, что улучшение митохондриальной функции, а

именно, повышение энергии в мышцах и снижение метаболического ацидоза, косвенно связано с выдвинутыми ранее прямыми и непрямыми антиоксидантными свойствами исследуемых соединений и их антирадикальной активностью.

Антиоксидантные свойства также могут положительно влиять на продуцирующие факторы NO в скелетных мышцах, а именно вырабатываемые его изоформы. Различают эндотелиальную (eNOS), индуцибельную (iNOS) и нейрональную (nNOS) синтазы [96,176]. В физиологических условиях, благодаря eNOS, синтезируется базальный уровень монооксида азота, который необходим для поддержания гомеостаза в сосудах. В свою очередь, индуцибельная изоформа является кальций независимой и активируется в организме только под действием раздражающих стимулов, так же как и nNOS. Увеличение активности iNOS, nNOS приводят к накоплению токсических концентраций NO, что ведет к ингибированию ключевых ферментов окислительного фосфорилирования или ослаблению сократительной способности скелетной мышцы. Необходимо также отметить, что образовавшийся с избытком NO, и протекающие в клетке процессы свободно-радикального окисления, приводят к образованию цитотоксичного пероксонитрита, который усиливает нитритный или оксидативный стресс, ведущие к апоптозу клетки [169].

Кроме того, наряду с оптимальным уровнем мышечного кровотока для адекватной работы скелетной мышцы огромную роль играет энергия в клетке. Известно, что рецепторы PPAR играют важную роль в поддержании необходимого уровня энергетических процессов, регулируя метаболизм глюкозы и липидов [183,186].

Исходя из вышеизложенного, нами было изучено влияние АТАСЛ и катехин гидрата на изменение данных параметров, а именно их концентрации.

В результате проведенного экспериментального исследования было установлено, что исследуемые соединения-лидеры повышают концентрацию эндотелиальной синтазы на фоне истощающих физических нагрузок, на 95%

($p < 0,05$) (4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота) и на 41,8% ($p < 0,05$) (катехин гидрат). Достоверно снижая при этом концентрацию iNOS, в группе, получавшей 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту на 53,3% ($p < 0,05$) и группе, получавшей катехин гидрат на 46,3% ($p < 0,05$), относительно группы крыс негативного контроля.

Также 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота способствовала повышению уровня PPAR на 57,9% ($p < 0,05$) относительно группы НК, при этом показатель активности PPAR в группе, получавшей катехин гидрат, статистически значимо не отличался от группы крыс НК. Известно, что активация данных рецепторов PPAR вызывает образование специфического адипонектина. В скелетной мускулатуре адипонектин [109] регулирует проницаемость мембраны для глюкозы и жирных кислот, активирует митохондриальное окисление. Кроме того, адипонектин, повышает оксидацию жирных кислот со значительным образованием АТФ, участвуя в каскаде аутокаталитических реакций АМФК-пути [168].

Наряду с окислительным стрессом апоптоз является одним из основных патогенетических механизмов деструкции миоцитов скелетной мускулатуры в условиях интенсивной работы мышц [119]. При этом отмечаются два возможных варианта течения апоптотического события, известных как каспаза-зависимый и каспаза-независимый пути апоптоза [85]. Недавние исследования показывают, что потенциальной мишенью воздействия может являться с-Jun-концевая киназа (JNK). Известно также, что ингибирование JNK в скелетных мышцах приводит к ремоделированию мышц и тем самым повышению их работы [137].

В ходе работы было установлено, что на фоне исследуемых соединений наблюдается снижение концентрации JNK в группах, получавших АТАСЛ и катехин гидрат, относительно группы животных негативного контроля на 64,3% ($p < 0,05$), 47,1% ($p < 0,05$). Активность JNK была ниже на 36,4% ($p < 0,05$) в группе животных, получавших АТАСЛ, в сравнении с группой крыс, получавших препарат сравнения Метапрот. Как было отмечено ранее, для определения

варианта течения апоптоза, нами была измерена концентрация внутреннего регулятора апоптоза-AIF-(апоптоз-индуцирующего фактора) [85]. Было отмечено, применение исследуемых соединений привело к снижению концентрации AIF, относительно группы НК, на 54,3% ($p<0,05$) (группа крыс, получавших АТАСЛ), 53,3% ($p<0,05$) (группа крыс, получавших катехин гидрат). Статистически значимых отличий между группами крыс, получавшими исследуемые вещества, и группой животных, получавших препарат сравнения, установлено не было. В результате проведенных экспериментов можно предположить, что возможный путь запрограммированной смерти клетки независимый от каспаз, и, следовательно, потенциальной мишенью воздействия является JNK.

Резюмируя все вышесказанное можно сделать вывод, что исследуемые соединения обладают актопротекторным действием, относятся к растительным объектам, обладающим мультитаргетным действием.

Таким образом, вышеизложенные результаты позволяют рекомендовать исследуемые соединения для проведения дальнейших исследований (клинических и доклинических), с целью создания на их основе средства для терапии психофизической утомляемости, при этом, особое внимание стоит обратить на 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Установлено, что из представителей флавоноидов и коричных кислот (из 13 соединений) наиболее выраженный эффект и влияние на работоспособность и психоэмоциональный фон животных оказывают соединения 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота и катехин гидрат.

2. Оценка дозозависимого влияния соединений-лидеров показала, что наиболее выраженный актопротекторный эффект отмечен в дозировке 100 мг/кг.

3. Наиболее значительные изменения в функциях скелетной мускулатуры отмечены в условиях принудительного плавания животных с температурным режимом воды 15°C. На фоне исследуемых соединений - лидеров наблюдалось повышение физической работоспособности животных в холодной воде уже с первого дня введения соединений. При этом максимальная продолжительность плавания мышей в холодной воде, в группе, получавшая АТАСЛ, была выше на 50,8% ($p < 0,05$) относительно группы, получавшая Метапрот, а максимальная работоспособность мышей в группе, которой вводился катехин гидрат, была сопоставима с пиковым днем группы, получавшая препарат сравнения Метапрот.

4. В условиях истощающих физических нагрузок у групп животных, получавших АТАСЛ и катехин гидрат, не наблюдалось повышения потребления кислорода относительно группы положительного контроля.

5. На фоне применения АТАСЛ и катехин гидрата наблюдались изменения в выносливости животных, которая в тесте «Бег на тредбане» была выше относительно группы негативного контроля, на 527% ($p < 0,05$) в группе, получавшая АТАСЛ, и на 297,9% ($p < 0,05$) в группе, получавшая катехин гидрат. При этом эффект от применения АТАСЛ сопоставим с эффектом референтного препарата Метапрот.

6. Введение АТАСЛ и катехин гидрата на фоне истощающих физических нагрузок способствовало увеличению времени жизни животных в условиях гипоксии различного генеза. Применение соединения АТАСЛ

способствовало увеличению времени жизни экспериментальных животных, по сравнению с НК группой мышей в условиях гемической гипоксии в 3,1 раза ($p<0,05$), гиперкапнической гипоксии – в 3,1 раза ($p<0,05$), гистотоксической и гипобарической гипоксии – 3,2 раза ($p<0,05$) и 2,3 раза ($p<0,05$) соответственно. Кроме того, процент летальности у животных, получавших соединение АТАСЛ, при воспроизведении циркуляторной гипоксии, составлял 40%. При применении катехин гидрата продолжительность жизни животных в условиях гемической, гиперкапнической, гистотоксической и гипобарической гипоксии превышало показатели группы НК в 2,3 раза ($p<0,05$), 2,7 раза, 2,5 раза ($p<0,05$) и 2,7 раза соответственно. При этом уровень летальности данной группы животных при воспроизведении циркуляторной гипоксии составлял 66,7%.

7. На фоне применения АТАСЛ и катехин гидрата отчетливо сохранялся памятный след и мнестические функции животных, что проявляется в снижении латентного времени достижения животными площадки в тесте «ВЛМ» на 35,3% ($p<0,05$) (относительно исходного времени) (группа, получавшая АТАСЛ). Снижение тревожности животных нашло свое отражение в увеличении количества попыток утоления жажды при воздействии электроболевого раздражителя в 3,3 раза ($p<0,05$) (АТАСЛ) и 2,8 раз ($p<0,05$) (катехин гидрат). В совокупности воспроизводимых тестов эффект от применения АТАСЛ и катехин гидрата был сопоставим с эффектом от применения препаратов сравнения.

8. Соединения АТАСЛ и катехин гидрат оказывают влияние на вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия сосудов, что подтверждается улучшением эндотелиальной вазодилатации, менее выраженным феноменом «L-аргининового парадокса» в отличие от группы НК, а также восстановлением антитромбогенного потенциала. Статистически значимых отличий между группой животных, получавших Сулодексид и группой животных, получавших соединения АТАСЛ и катехин гидрат по показателю «скорость кровотока», установлено не было.

9. Механизм реализации актопротекторного действия обусловлен антиоксидантными свойствами АТАСЛ и катехин гидрата, а также повышением концентрации эндотелиальной синтазы (на 95% ($p<0,05$) (АТАСЛ) и на 41,8% ($p<0,05$) (катехин гидрат), снижением индуцибельной - в группе, получавшей АТАСЛ на 53,3% ($p<0,05$) и группе, получавшей катехин гидрат на 46,3% ($p<0,05$), относительно группы крыс негативного контроля. Кроме того, указанные выше соединения корректируют концентрацию ферментов апоптоза (JNK, AIF). При этом активность JNK, в группе животных, получавших АТАСЛ была ниже на 36,4% ($p<0,05$) в сравнении с группой крыс, получавших препарат сравнения Метапрот. Статистически значимых отличий между группой животных, получавших исследуемые вещества, и группой животных, получавших референтный препарат Метапрот, по показателю «концентрация PPAR» установлено не было.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты собственных исследований и литературные данные позволяют рекомендовать поиск и разработку среди флавоноидов и коричных кислот соединений с актопротекторным видом активности.

2. Полученные данные о выраженной актопротекторной активности соединений 4-гидрокси-3,5-ди-третбутилкоричной кислоты и катехин гидрата свидетельствуют о целесообразности разработки на их основе нового лекарственного средства для коррекции психо-физической утомляемости, развивающейся на фоне длительных истощающих нагрузок.

3. Результаты настоящего исследования об актопротекторной активности соединений 4-гидрокси-3,5-ди-третбутилкоричной кислоты и катехин гидрата целесообразно включить в программу преподавания общей и клинической фармакологии в медицинских и фармацевтических вузах.

Список сокращений

НК-негативный контроль	ПОЛ - перекисное окисление липидов
СОД - супероксиддисмутаза	Bax-bcl2-ассоциированный х-белок
ДК-диеновые конъюгаты	МДА - малоновый диальдегид
PGT- полифенолы зеленого чая	iNOS -индуцибельная синтаза оксида азота
NO-монооксид азота	ГАМК-гамма-аминомасляная кислота
TNF α -Фактор некроза опухоли	VWF-Фактор фон Виллебранда
АДФ - аденозиндифосфат	АТФ - аденозинтрифосфат
Ск - скорость мозгового кровотока	НТГ - нитроглицерин
АОЗ - антиоксидантная защита	ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
eNOS - эндотелиальная синтаза оксида азота	АЦХ ацетилхолин
pNOS - нейрональная синтаза оксида азота	ГП - глутатионпероксидаза
АТАСL- 4-гидрокси-3, 5-ди- трет-бутилкоричная кислота	ЕВЛ-единицы высвобождения липротеидлипазы
L-NAME-нитро-L-аргинин	НАДФН-никотинамидаденин
метиловый эфир	динуклеотидфосфат восстановленный
GM-CSF-гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор	PUMAp53-регулируемый модулятор апоптоза
MAPK - митоген-активированная протеинкиназа	PPAR-рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами
MMP 9-матриксная металлопротеиназа-9	AIF-апоптоз-индуцирующий фактор
TNF-рецептор-фактора некроза опухоли	Nf-kB- ядерный фактор kB
JNK- c-Jun N-концевая киназа	FOXO1- транскрипционный фактор
ADMA-ассиметрический диметиларгинин	АФК-активные формы кислорода
Akt-фермент сигнального пути (киназа)	UCP-1-разобщающий белок типа1
ПК-положительный контроль	

Список литературы

1. Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике «Бег на тредбане» /Д. Г. Иванов, Н. В. Александровская, Е. А. Афонькина [и др.] // Биомедицина. - 2017.- № 2. - С. 4-22.
2. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов-50 лет поисков / Е. П. Студенцов, С. М. Рамш, Н. Г. Казурова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2013. - Т. 11, № 4. - С. 3-43.
3. Анализ фармакологических подходов к повышению физической работоспособности спасателей в условиях чрезвычайных ситуаций / Е.Н. Купко, Б. А. Гусова, М. В. Молчанов, А. Н. Семухин // Фармация и фармакология.- 2014. - № 6 (7). - С. 88-91.
4. Бобков, Ю. Г. Фармакологическая коррекция утомления / Ю. Г. Бобков, В. М. Виноградов, В. Ф. Катков, С. С. Лосев, Л. В. Смирнов // - М.: Медицина - 1984. – 208 с.
5. Бородкина, Л. Е. Сравнительное изучение противогипоксических свойств новых производных гамма-аминомасляной кислоты на моделях гиперкапнической и гемической гипоксии / Л.Е Бородкина, В.В. Епишина, Багметов М.Н // Современные наукоемкие технологии. - 2007. - № 5. - С. 63-64.
6. Влияние различной аверсивной среды на потребление кислорода в мышцах и крови у мышей в условиях теста «принудительного плавания» / А.В. Воронков, А.Д. Геращенко, Д.И. Поздняков [и др.]. // Фармация и фармакология.- 2019.-Т.7.-№3 - С. 148-157.
7. Влияние скополамина и ноотропного препарата фенотропила на рецепторы нейромедиаторов мозга крыс в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) / Ю. Ю. Фирстова, Д. А. Абаимов, Т. А. Воронина, И. Г. Капица [и др.] // Нейрохимия. – 2011. – Т. 28. – № 2. – С. 130-141.

8. Волков, Н. И. Биохимия мышечной деятельности / Н. И. Волков, Э. Н. Несен, А. А. Осипенко [и др.] // Учебник – Изд. Олимпийская литература. - 2000. - 503 с.
9. Воробьева, В. В. Защитные эффекты метапрота и этомерзола в экспериментальных моделях отравлений бытовыми ядами / В. В. Воробьева, И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2012. — Т. 10, № 1. — С. 3–21
10. Воронина, Т. А. Сравнительное исследование влияния мексидола и милдроната на физическую работоспособность в эксперименте / Т. А. Воронина, И. Г. Капица, Е. А. Иванова // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2017. – Т. 117. – №. 4. – С. 71-74.
11. Воронков А. В. Психофизическая утомляемость и пути ее фармакологической коррекции / А. В. Воронков, А. Д. Геращенко, М. П. Воронкова // Астраханский медицинский журнал.-2019.- №1.-С.8-17.
12. Воронков, А. В. Развитие эндотелиальной дисфункции, возникающей при физическом и психоэмоциональном перенапряжении / А. В Воронков, Н. А. Муравьева //Лечебная физкультура и спортивная медицина. – 2013. – №. 10. – С. 32-39.
13. Воронков, А. В. Исследование вазодилатирующей функции эндотелия в условиях экстремальных физических и психоэмоциональных нагрузок / А. В. Воронков, Н. А. Муравьева // Вестник ВолГМУ. - 2013. - Т. 3 (47).-С. 100-102.
14. Воронков, А. В. Комплексная валидационная оценка нового методического подхода к изучению физического и психоэмоционального перенапряжения в эксперименте / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, М. П. Воронкова // Фундаментальные исследования. - 2015. – №. 1-5. - С. 915-919.
15. 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). - С. 111-114.

16. 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. - С. 58-64.

17. Гаврилов, В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. - 1983. - № 3. - С. 33 - 35.

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

19. Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа : <http://grls.rosminzdrav.ru/>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 11.02.2019.

20. Гунина, Л. Окислительный стресс и адаптация: метаболические аспекты влияния физических нагрузок / Л. Гунина // Наука в олимпийском спорте. - 2013. - № 4. - С. 19-21.

21. Дячкова, О. М. Психолого-педагогические принципы профессионального отбора для профессий экстремального профиля деятельности / О. М. Дячкова // Вектор науки Тольяттинского государственного университета. Серия: Педагогика. Психология. – 2014. – № 3.-С. 94-96.

22. Еликов, А. В. Комплексная оценка белкового, пуринового, углеводного и липидного метаболизма при умеренной и напряженной мышечной деятельности / А. В. Еликов, П. И. Цапок // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 2. – С. 27-30.

23. Изучение антигипоксической активности металлокомплексных соединений производных винилимидазола при гистотоксической гипоксии / С. А.

Лебедева, Н. Н. Самойлов, И. В. Ильина [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник - 2009. - № 8. - С. 53-55.

24. Изучение антигипоксической активности новых соединений производных винилимидазола / Е. Н. Стратиенко, Н. П. Катунина, Н. Ф. Петухова, С. В. Ромащенко // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - № 8 (113). - С. 79-80.

25. Изучение влияния субстанции АТАСЛ на физическое и психическое состояние животных в условиях длительных истощающих нагрузок / А. В. Воронков, В. Т. Абаев, Э. Т. Оганесян [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 3. – С. 628-635.

26. Изучение комбинированного действия металлокомплексных соединений производных винилимидазола на физическую работоспособность. / С. А Лебедева, Бабаниязова З. Х, Бабаниязов Х. Х. [и др.]. // Вестник Брянского государственного университета. - 2010. - № 4. - С. 182-185.

27. Каркищенко, Н. Н. Фармакология процессов адаптации переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков / Н. Н Каркищенко // Биомедицина. - 2010. - № 4. - С. 6-23.

28. Катунина, Н. П. Экспериментальное изучение противогипоксической активности новых производных 3-оксипридина в модели острой гипоксии с гиперкапнией и острой гипобарической гипоксии / Н. П. Катунина // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. - 2011. - Т. 9, № 1. - С. 69-72.

29. Королук, М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук // Лаб. дело. – 1988. - № 1. - С. 16 -19.

30. Кулиненков, Д. О. Справочник фармакологии спорта. Лекарственные препараты спорта / Д. О. Кулиненков, О. С. Кулиненков // Справочное пособие. - 2012. - 232 с.

31. Кулиненков, О. С. Фармакология спорта в таблицах и схемах / О.С. Кулиненков// - М.:Изд-во Советский спорт, 2011. - 192 с.

32. Лебедев, В. И. Личность в экстремальных условиях / В.И. Лебедев // Политиздат-1989.-303 с.
33. Лызилов, А. Н. Перспективы клинического применения антигипоксанта «бемитил» / А. Н. Лызилов, Э. С. Питкевич, С. Н. Мельник // Проблемы здоровья и экологии. - 2011.- № 1 (27). - С. 7-14.
34. Малахов, В. А. Актопротекторы / В. А. Малахов, Е. С. Ромешвили // Новости медицины и фармации. - 2011. -№ 1. - С. 39-42.
35. Мусина, С. В. Физическая и умственная работоспособность студентов и влияние на нее различных факторов / С. В. Мусина, Е. В. Егорычева, М. К. Татарников // Известия волгоградского государственного технического университета. Серия: новые образовательные системы и технологии обучения в вузе. - 2008. - № 5.- С. 148-150.
36. Новиков, В. Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В. Е. Новиков, Н. П. Катунина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2002. – Т. 1. – №. 2.-С. 73-87.
37. Новиков, Д.А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте / Д.А. Новиков, В.В. Новочадов. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.
38. Новоселецкая, А. В. Влияние иммуноактивных препаратов на формирование условного рефлекса пассивного избегания / А.В. Новоселецкая, Н. М. Киселёва, О. В. Белова [и др.] // Актуальные вопросы физиологии. Вестник РАМН. - 2014. - № 7–8. - С. 24-29.
39. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. / З. А. Габбасов, Е.Г. Попов, И. Ю. Гаврилов [и др.] // Лабораторное дело. - 1989.- № 10. - С. 15-18.
40. Оганов, Р. Г. Стресс: что мы знаем сегодня об этом факторе риска?/ Р. Г. Оганов, Г. В. Погосова // РФК. - 2007. - № 3. - С. 60-67.
41. Окислительный стресс при занятиях физической культурой: методы диагностики и коррекции антиоксидантного статуса / Л. А. Калинин, Е. А.

Стаценко, А. Г. Пономаренко. [и др.] // Вестник спортивной науки. – 2014. – №. 1.- С. 31-35.

42. Оковитый, С. В. Актопротекторы как синтетические адаптогены нового поколения / С.В. Оковитый // Психофармакология и биологическая наркология. – 2003. – Т. 3. – №. 1-2. – С. 510-516.

43. Оценка степени влияния флоридзина и икариина на уровень работоспособности и неврологический статус животных в условиях длительных истощающих физических и психоэмоциональных нагрузок / А. В. Воронков, И. Н. Дьякова, Д. И. Поздняков, Н. А. Муравьева // Фармация и фармакология. – 2015. – №. 4 (11). - С. 25-29.

44. Очерки спортивной медицины. Т. 3 / Н. Н. Каркищенко [и др.]; под ред. Н. Н. Каркищенко, В. В. Уйба. М.- СПб.: Айсинг, 2014. - 356 с.

45. Очерки спортивной фармакологии. Т.2: Векторы фармакопротекции / под ред. Н. Н. Каркищенко, В. В. Уйба, В. Н. Каркищенко, Е. Б. Шустов. [и др.]. - М.-СПб.:Айсинг, 2014. - 448 с

46. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария / Н. В. Хоцкин, В. А. Куликов, Е. Л. Завьялов. [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2015. - Т. 19 (4). - С. 388-393.

47. Производные адамантана, повышающие устойчивость организма к экстремальным воздействиям / И. С. Морозов, Н. В. Климова, С. А. Сергеева [и др.]. // Вестник РАМН. – 1999. – №. 3. – С. 28-32.

48. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов / В. Н. Каркищенко, Г. Д. Капанадзе, С. Е. Деньгина. [и др.] // Биомедицина. - 2011. - № 1. - С. 72-74.

49. Реакция клеточных элементов головного мозга крыс на циркуляторную гипоксию / А. В. Дробленков, Н. В. Наумов, М. В. Монида [и др.] // Медицинский академический журнал. - 2013. -Т. 13, №. 4. - С. 19-28.

50. Редкозубова О. М, Болкунов А. В., Ванькин Г. И. и др. Поведенческие признаки ангедонии и отсутствие поведения «отчаяния» на модели старческой депрессии у 18-месячных мышей C57BL/6/ О. М. Редкозубова, А. В. Болкунов, Г. И. Ванькин. [и др.]. // Патогенез. - 2013. - Т. 11, № 1. - С. 63-68.
51. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под ред. Р. У. Хабриева.- 2-е изд., перераб. и доп.-М.:ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. - 832 с.
52. Савилов, Е. Д. Техногенное загрязнение окружающей среды - новый фактор рискаинфекционной патологии / Е.Д. Савилов // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011.- № 2 - С. 4-8.
53. Сапфирова, В. А. Синдром хронической усталости / В. А. Сапфирова, Е. В. Гусева, А. А Зульсман // Альманах клинической медицины, Москва. – 2005.- № 8-3. - С. 202-204.
54. Собакарь, М. С. Антиоксидантная терапия и метаболические подходы к лечению заболеваний сердечно сосудистой системы / М. С. Собакарь, Е. В. Ших // Биомедицина. - 2010. - Т. 1. - №. 3. - С. 10-21.
55. Список запрещенных веществ и методов [wada-publishes-2019-list-of-prohibited-substances-and-methods]. – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2018-09/>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 11.02.2019.
56. Сравнительная характеристика гипоксии, развивающейся при мышечной деятельности, и гипоксической гипоксии в горах / М. М. Филиппов, М. В. Балыкин, В. Н. Ильин, В. И. Портниченко [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2014. – №. 4. - С. 88-97.
57. Сравнительное исследование параметров ориентировочного поведения и эмоциональности крыс в тесте «открытое поле» под влиянием оригинальных лекарственных форм афобазола / Ю. А. Полковникова, Э. Ф. Степанова, О. С. Гудырев, М. В. Покровский // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2011.- № 1. - С. 192-195.

58. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК // Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили под. ред. В. Н. Ореховича. - М.: Медицина, 1977. - С. 44-46.
59. Тараховский, Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдраимов, Е. Н. Музафаров // Synchronobook.- 2013.-310 с.
60. Тевдорадзе, С. И. Влияние физической нагрузки на процессы свободнорадикального окисления и коррекция церулоплазмином/ С. И.Тевдорадзе, Б. А. Медведев, Р. Р. Фархутдинов // Медицинский вестник Башкортостана. - 2006. - Т. 1. - №. 1. - С. 134-135.
61. Торкунова О. В., Шабанов П. Д. Фармакологическая коррекция неблагоприятного действия низкочастотных акустических колебаний // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12. – №. 3. – С.20-26.
62. Тулесонова, А. С. Актопротекторное действие комплексного растительного средства / А. С. Тулесонова, П. Ц. Елбаева, Л. Н. Шантанова [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2010. - № 3 (73). - С. 264-266.
63. Тюренок, И. Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И. Н. Тюренок, А. В. Воронков // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2008. - Т.71. - № 1. - С.49-51.
64. Фармакологические препараты, способствующие ускорению адаптации спортсменов, в условиях горной местности / А. С. Солодков, В. П. Ганапольский, А. Н. Ятманов. [и др.]. // Научно-теоретический журнал «Ученые записки». - 2014. - № 11 (117). - С. 142-147.
65. Фармакология спорта / Н. А. Горчакова, Я. С. Гудивок, Л. М. Гунина [и др.]. - Киев: Олимп. лит., 2010. - 620 с.
66. Чубуков, Ю. А. Фактор Виллебранда и эндотелиальная дисфункция при стрессе / Ю.А. Чубуков // Проблемы здоровья и экологии. - 2012. - Т. 2 (32). - С. 40-45.

67. 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.
68. Шабанов, П. Д. Клиническая фармакология Метапрота, нового противоастенического препарата с психоактивирующими свойствами / П.Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.*- 2009. - Т. 7, вып. 3. - С. 48-81.
69. Шабанов, П. Д. Клиническая фармакология Метапрота: методические рекомендации для врачей / П.Д.Шабанов.- СПб.: ВМедА, 2010. - 96 с.
70. Шабанов, П. Д. Применение Метапрота в неврологии / П.Д. Шабанов // *Terra Medica Nova.* - 2009. - № 3. - С. 34-38.
71. Шустов, Е. Б. Биологическое моделирование утомления при физических нагрузках / Е. Б. Шустов, В. Ц. Болотова // *Биомедицина.* - 2013. - Т. 1. -№. 3. - С. 95-104.
72. Шустов, Е. Б. Обоснование направлений коррекции функционального состояния спортсменов исходя из методологии экстремальных состояний / Е. Б. Шустов, Н. Н. Каркищенко, В. Н. Каркищенко // *Биомедицина.* - 2013. -№ 3.- С. 26-35.
73. Эндотелиопротекторы-новый класс фармакологических препаратов / И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс, Е. В.Волотова // *Вестник РАМН.* - 2012. - № 7. - С. 50-57.
74. Эргогенный вклад регуляции антиоксидантных процессов в создание здоровьесберегающей технологии улучшения работоспособности тяжелоатлетов / Л. М. Гунина, С. А. Конюшок, Р. В. Головащенко. [и др.]. // *Современные здоровьесберегающие технологии.* - 2016. - № 3 (4). - С. 34-43.
75. Якимова, Н. Л. Дофамин-зависимое нарушение поведения белых крыс с интоксикацией сулемой в тесте экстраполяционного избавления / Н. Л. Якимова, Л. М. Соседова // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* - 2013.- № 1 (89). - С. 130-133.

76. Яковлев, А. А. Экологическое направление в эпидемиологии / А. А. Яковлев // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - № 3 - С. 33-37.
77. Abbiss C. R., Peiffer J. J., Meeusen R., Skorski S. Role of ratings of perceived exertion during self-paced exercise; what are we actually measuring? // Sport Med. - 2015. - Vol. 45.-P. 1235-1243.
78. Abdelhamid R. E., Kovács K. J., Nunez M. G. [et al.]. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors // Pharmacol Res. – 2013. - Vol. 79. - P. 21 – 27.
79. Abdulghani J., El-Deiry W. S. Trail receptor signaling and therapeutics // Expert Opin Ther Targets. - 2010. - Vol. 14. - P. 1091-108.
80. Adisakwattana S. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications // Nutrients. - 2017. - Vol. 9 (2). - P. 163.
81. Adisakwattana S. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications // Nutrients. - 2017. - Vol. 9 (2). - P. 163-190.
82. Adler A. L., Reyes R., Chen B. [et al.]. Age and exercise training alter signaling through reactive oxygen species in the endothelium of skeletal muscle arterioles // J Appl Physiol. - 2013. – Vol. 114. - P. 681-693.
83. Allen J. D., Giordano T., Kevil C. G. Nitrite and nitric oxide metabolism in peripheral artery disease // Nitric Oxide. - 2012. - Vol. 26 (4). - P. 217-222.
84. Amudha M., Rani S. Evaluation of In Vitro Antioxidant Potential of Cordia retusa // Indian J Pharm Sci. - 2016. - Vol 78 (1). - P. 80-86.
85. Andersson D. C., Betzenhauser M. J., Reiken S. [et al.]. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging // Cell Metab. - 2011. - Vol. 14. - P. 196-207.
86. Angione A. R., Jiang C., Pan D. [et al.]. PPAR δ regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration // Skelet Muscle. - 2011. - Vol. 1. - P. 33.

87. Apostolova N., Victor V. M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications // *Antioxid Redox Signal.* - 2015. - Vol. 22 (8). - P. 686-729.
88. Asser A., Taba P. Psychostimulants and movement disorders // *Front Neurol.* - 2015. - Vol. 6. – P. 75.
89. Bal N.C., Singh S., Reis F.C.G., [et al.] Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice // *J Biol Chem.* - 2017. - Vol. 292, №40. - P. 16616 –16625.
90. Balmus I. M., Ciobica A., Antioch I. [et al.]. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches // *Oxid Med Cell Longev.* - 2016.- Vol. 2016:
91. Baron D. A., Martin D. M., Abol Magd S. Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review // *World Psychiatry.* - 2007. - Vol. 6. - P. 118-123.
92. Blank M., Zhang J., Lamers F. [et al.]. Health correlates of insomnia symptoms and comorbid mental disorders in a nationally representative sample of US adolescents // *Sleep.* - 2015. - Vol. 38 (2). - P. 197-204.
93. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* - 2017. - Vol.8 (3). - P. 349-369.
94. Bogdanova O.V., Kanekar S., D'Anci K.E. [et al.]. Factors influencing behavior in the forced swim test // *Physiol Behav.* - 2013. - Vol. 118. - P. 227-239.
95. Bousova I., Skalova L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences // *Drug Metab Rev.* - 2012. - Vol. 44. - P. 267-286.
96. Carnicer R., Crabtree M. J., Sivakumaran V. [et al.]. Nitric oxide synthases in heart failure // *Antioxid Redox Signal.* - 2013. - Vol. 18 (9). - P. 1078-1099.

97. Ceddia R. B., Somwar R., Maida A. [et al.]. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells // *Diabetologia*. - 2005. - Vol. 48. - P. 132-139.
98. Chandrashekar P., Manickam R., Ge X. [et al.]. Inactivation of PPAR β/δ adversely affects satellite cells and reduces postnatal myogenesis // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* - 2015. - Vol. 309. - P. E122–E131.
99. Chung N., Park J., Lim K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue // *J Exerc Nutrition Biochem.* – 2017. - Vol. 21(2). - P. 39 – 47.
100. Crawley J., and Goodwin F. K. Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. - 1980. - Vol. 13. - P. 167-170.
101. Cryan J. F., Sweeney F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery // *Br J Pharmacol.* - 2011. - Vol. 164 (4). - P. 1129-1161.
102. Dai D. F., Rabinovitch P. S., Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging // *Circ. Res.* - 2012. - Vol. 110. - P. 1109-1124.
103. Daiber A., Steven S., Weber A. [et al.]. Targeting vascular (endothelial) dysfunction // *Br J Pharmacol.* - 2016. - Vol. 174 (12). - P. 1591-1619.
104. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide/
Natalia Sestakova, Angelika Puzserova, Michal Kluknavsky, Iveta Bernatova // *Interdisciplinary Toxicology*. - 2013. - Vol. 6 (3). - P. 126-135.
105. Dhanasekaran D. N., Reddy E. P. JNK signaling in apoptosis // *Oncogene*. 2008. - Vol. 27 (48). - P. 6245-6251.
106. Di Meo S., Reed T.T., Venditti P. [et al.]. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions // *Oxid Med Cell Longev.* - 2016. - Vol. 2016: 1245049.

107. Doreddula S.K., Bonam S.R., Gaddam D.P [et al]. Phytochemical analysis, antioxidant, antistress, and nootropic activities of aqueous and methanolic seed extracts of ladies finger (*Abelmoschus esculentus* L.) in mice // *Scientific World Journal* - 2014. - Vol. 2014. - P. 519848.
108. Duerrschmidt N., Stielow C., Muller G. [et al.]. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells // *J Physiol.* -2006. - Vol. 576 (Pt 2). - P. 557-567.
109. Ebrahimi-Mamaeghani M., Mohammadi S., Arefhosseini S.R. [et al.]. Adiponectin as a potential biomarker of vascular disease // *Vasc Health Risk Manag.* - 2015. - Vol. 11.-P. 55-70.
110. Eitenmuller I., Volger O., Kluge A. [et al.]. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion // *Circ Res.* - 2006. - Vol. 99. - P. 656-662.
111. Enoka R. M., Duchateau J. Translating Fatigue to Human Performance // *Medicine and science in sports and exercise.* - 2016. - Vol. 48 (11). - P. 2228-2238.
112. Gao X., Tang J., Liu H. [et al.]. Structure-activity relationship investigation of tertiary amine derivatives of cinnamic acid as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: compared with that of phenylpropionic acid, sorbic acid and hexanoic acid // *J Enzyme Inhib Med Chem.* - 2018. - Vol. 33 (1). - P. 519-524.
113. Gorski T., Mathes S., Krützfeldt J. Uncoupling protein 1 expression in adipocytes derived from skeletal muscle fibro/adipogenic progenitors is under genetic and hormonal control // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.*-2018.- Vol. 9,(2). - P. 384–399.
114. Govindpani K., Calvo-Flores Guzmán B., Vinnakota C. [et al.]. Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease // *Int J Mol Sci.* - 2017. - Vol. 18 (8). -P. 1813-1854.
115. Gupta S., Barrett T., Whitmarsh A. J. [et al.]. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors // *EMBO J.* - 1996. - Vol. 15. -P. 2760-2770.

116. Hallal P. C., Andersen L. B., Bull F. C. [et al.]. Physical Activity Series Working Group. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects // *Lancet*. - 2012. - Vol. 380. - P. 247-257.
117. Hamburg N. M., Balady G. J. Exercise rehabilitation in peripheral artery disease Functional impact and mechanisms of benefits // *Circulation*. - 2011. - Vol. 123. -P. 87-97.
118. Han J. K., Kim H. L., Jeon K. H. [et al.]. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta activates endothelial progenitor cells to induce angio-myogenesis through matrix metallo-proteinase-9-mediated insulin-like growth factor-1 paracrine networks // *Eur. Heart J*. - 2013. - Vol. 34. - P. 1755-1765.
119. Hao Y., Jackson J. R., Wang Y. [et al.]. β -Hydroxy- β -methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. - 2011.- Vol. 301 (3). - P. R701-715.
120. Harington M. Neurobiological studies of fatigue // *Prog Neurobiol*. -2012. - Vol. 99 (2). - P. 93-105.
121. He W., Wang Q., Xu J. [et al.]. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation // *Autophagy*. - 2012. - Vol. 8(12). -P. 1811-1821.
122. Henry B. L., Monien B. H., Bock P. E. [et al.]. A Novel allosteric pathway of thrombin inhibition: Exosite II mediated potent inhibition of thrombin by chemo-enzymatic, sulfated dehydropolymers of 4-hydroxycinnamic acids // *The Journal of biological chemistry*. -2007. - Vol. 282. - P. 31891-31899.
123. Hespanhol Junior L. C., Barboza S. D., van Mechelen W. [et al.]. Measuring sports injuries on the pitch: a guide to use in practice // *Braz J Phys Ther*. - 2015. - Vol. 19 (5). - P. 369-380.
124. Hollander J. M., Thapa D., Shepherd D. L. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of

cardiac pathologies // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2014. - Vol. 307 (1). - P. H1-14.

125. İşlekel S., İşlekel H., Güner G. [et al.]. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion // *Res. Exp. Med.* - 1999. – Vol. 199. - P. 67-76.

126. Joyner M. J., Casey D. P. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs // *Physiol Rev.* - 2015. - Vol. 95 (2). - P. 549-601.

127. Jude E. B., Eleftheriadou I., Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes-A review // *Diabet. Med.* - 2010. - Vol. 27. - P. 4-14.

128. Kirlic N., Young J., Aupperle R. L. Animal to human translational paradigms relevant for approach avoidance conflict decision making // *Behav Res Ther.* - 2017. - Vol. 96. - P. 14-29.

129. Kjøbsted R., Hingst J. R, Fentz J. [et al.]. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J.* – 2018. - Vol. 32 (4). - P. 1741-1777.

130. Kluger B. M., Krupp L. B., Enoka R. M. Fatigue and fatigability in neurologic illnesses: proposal for a unified taxonomy // *Neurology.* - 2013. - Vol. 80. - P. 409-416.

131. Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A. [et al.]. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes // *J Muscle Res Cell Motil.* - 2016. - Vol. 36 (6). - P. 377-393.

132. Kudo T., Loh D. H., Truong D. [et al.]. Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease // *Exp.Neurol.* - 2011a. - Vol. 232. - P. 66-75.

133. Kunwar R. M., Shrestha K. P., Bussmann R. W. Traditional herbal medicine in Far-west Nepal: a pharmacological appraisal // *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* - 2010. - Vol. 6. - P. 35.

134. Lamichane S., Dahal Lamichane B., Kwon S. M. Pivotal Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Their Signal Cascade for

Cellular and Whole-Body Energy Homeostasis // *Int J Mol Sci.* - 2018. - Vol. 19 (4). - P. 949.

135. Latroche C., Gitiaux C., Chretien F. [et al.]. Skeletal muscle microvasculature: A highly dynamic lifeline // *Physiology (Bethesda).* - 2015. - Vol. 30.-P. 417-427.

136. Leijten F. R., de Wind A., van den Heuvel S.G. [et al.]. The influence of chronic health problems and work-related factors on loss of paid employment among older workers // *Epidemiol Community Health.* - 2015. - Vol. 69 (11). - P. 1058-1065.

137. Lessard S. J., MacDonald T. L., Pathak P. [et al.]. JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition // *Nat Commun.* - 2018. - Vol. 9 (1). - P. 3030.

138. Liu Y., Sweeney G. Adiponectin action in skeletal muscle // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2014. - Vol. 28. - P. 33-41.

139. Locke M., Celotti C. The effect of heat stress on skeletal muscle contractile properties // *Cell Stress Chaperones.* – 2013. - Vol. 19(4). – P. 519 – 527.

140. Mach J., Midgley A.W., Dank S [et al.]. The effect of antioxidant supplementation on fatigue during exercise: potential role for NAD⁺(H) // *Nutrients.*- 2010.- Vol. 2(3). - P. 319–329.

141. Malve H.O. Sports Pharmacology: A Medical Pharmacologist's Perspective // *J Pharm Bioallied Sci.*-2018. –Vol. 10(3). - P. 126–136.

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

143. McIntyre N. R., Lowe E. W., Battistini M. R. [et al.]. Inactivation of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase by cinnamic acid analogs // *J Enzyme Inhib Med Chem.* - 2015. - Vol. 31 (4). - P. 551-562.

144. 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.

145. Morillas-Ruiz J. M. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress // *Clinical Nutrition*. - 2006. - Vol. 25. - P. 444-453.
146. Morozov I. S., Ivanova I. A., Lukicheva T. A. Actoprotector and adaptogen properties of adamantane derivatives (a review) // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2001. – Vol. 35. – №. 5. – P. 235-238.
147. Niero E. L., Machado-Santelli G. M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells // *J Exp Clin Cancer Res*. - 2013. - Vol. 32 (1). - P. 31.
148. Nishii A., Amemiya S., Kubota N. [et al.]. Adaptive Changes in the Sensitivity of the Dorsal Raphe and Hypothalamic Paraventricular Nuclei to Acute Exercise, and Hippocampal Neurogenesis May Contribute to the Antidepressant Effect of Regular Treadmill Running in Rats // *Front Behav Neurosci*. - 2017. - Vol. 11. - P.235.
149. Odden M. C., Coxson P. G., Moran A. [et al.]. The Impact of the Aging Population on Coronary Heart Disease in the U.S // *The American journal of medicine*. - 2011. - Vol. 124 (9). - P. 827-833.
150. Ohira T., Higashibata A., Seki M., [et al.]The effects of heat stress on morphological properties and intracellular signaling of denervated and intact soleus muscles in rats // *Physiol Rep*. – 2017. - Vol. (15). - P. e13350.
151. Oleinik N. V., Krupenko N. I., Krupenko S. A. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway // *Oncogene*. – 2007. - Vol. 26.-P. 7222–7230.
152. Oliynyk S, Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance // *Journal of Ginseng Research*. - 2013. - Vol. 37 (2). - P. 144-166.
153. Oliynyk S, Oh S. The Pharmacology of Actoprotectors: Practical Application for Improvement of Mental and Physical Performance // *Biomolecules&Therapeutics*. - 2012. - Vol. 20 (5). - P. 446-456.

154. Olshansky S. J., Passaro D. J., Hershow R. C. [et al.]. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century // *N Engl J Med.* - 2005. - Vol. 352. - P. 1138-1145.
155. Ouellet J., Boisvert L., Fischer L. Patients presenting to an outpatient sport medicine clinic with concussion [Cas de commotion en clinique externe de médecine du sport]: Retrospective observational analysis // *Can Fam Physician.* - 2016. - Vol. 62 (6). - P. e340–e345.
156. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol Rev.* - 2007. - Vol. 87 (1). - P. 315-424.
157. Patel S.P., Sullivan P.G., Pandya J.D., [et al.]. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma // *Exp Neurol.*-2014.-Vol. 257.-P. 95–105.
158. Peña I., Gevorkiana R., Shi W. X. Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms // *Eur J Pharmacol.* - 2015. - Vol. 764. - P. 562-570.
159. Pérez-Garijo A., Fuchs Y., Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway // *Elife.* - 2013. - Vol. 2. - P. e01004.
160. Peterson J. J., Dwyer J. T., Jacques P. F. [et al.]. Improving the estimation of flavonoid intake for study of health outcomes // *Nutr Rev.* - 2015. - Vol. 73 (8). - P. 553-576.
161. Phua W. W. T., Wong M. X. Y., Liao Z. [et al.]. An aPPARent Functional Consequence in Skeletal Muscle Physiology via Peroxisome Proliferator-Activated Receptors // *Int J Mol Sci.* - 2018. - Vol. 19 (5). - P. 1425.
162. Pierce S., Tappel L. Glutathione peroxidase activities from rat liver // *Biochim. et biophys. Acta.* - 1978. - Vol. 523, № 1. - P. 27 -36.
163. Poggesi A., Pasi M., Pescini F. [et al.]. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: A review // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2016. - Vol. 36 (1). - P. 72-94.

164. Poole D. C., Copp S. W., Ferguson S. K. [et al.]. Skeletal muscle capillary function: Contemporary observations and novel hypotheses // *Exp. Physiol.* - 2013. - Vol. 98. - P. 1645-1658.
165. Porsolt R. D., Anton G., Blavet N. [et al.]. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Europ. J. Pharmacol.* - 1978. - Vol. 47. - P. 379-391.
166. Porsolt R. D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* - 1977. - Vol. 229.-P. 327-336.
167. Proia P., Di Liegro C. M., Schiera G. [et al.]. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System // *Int J Mol Sci.* - 2016. - Vol. 17 (9).-P. 1450.
168. Qiao L., Kinney B., Yoo H. S., Lee B. [et al.]. Adiponectin increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 // *Diabetes.* - 2012. - Vol. 61. - P. 1463-1470.
169. Radi F. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J Biol Chem.* - 2013. - Vol. 288 (37). - P. 26464-26472.
170. Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J. [et al.]. The Vascular Endothelium and Human Diseases // *International Journal of Biological Sciences.*-2013. - Vol. 9 (10). - P. 1057-1069.
171. Rashidinejad A., Birch E. J., Everett D. W. Effects of (+)-Catechin on the Composition, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Full-Fat Cheese during Ripening and Recovery of (+)-Catechin after Simulated In Vitro Digestion. *Antioxidants (Basel).* - 2016. - Vol. 5 (3). - P. 29.
172. Rice S. M., Purcell R., De Silva S. [et al.]. The Mental Health of Elite Athletes: A Narrative Systematic Review. *Sports Medicine (Auckland, N.z).*-2016. - Vol. 46 (9). - P. 1333-1353.
173. Saper C. B., Fuller P. M., Pedersen N. P. [et al.]. Sleep state switching. *Neuron.* - 2010. - Vol. 68. - P. 1023-1042.

174. Sathyapalan T., Beckett S., Rigby A.S [et al]. High cocoa polyphenol rich chocolate may reduce the burden of the symptoms in chronic fatigue syndrome // *Nutr J.* -2010. - Vol. 9.-P. 55.
175. 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.
176. Shu X., Keller T. C., Begandt D. [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation // *Cell Mol Life Sci.* - 2015. - Vol. 72 (23). - P. 4561-4575.
177. Shuvaev V. V., Brenner J. S., Muzykantov V. R. Targeted endothelial nanomedicine for common acute pathological conditions // *J Control Release.* - 2015. - Vol. 219. - P. 576-595.
178. Simmons G. H., Padilla J., Young C. N. [et al.]. Increased brachial artery retrograde shear rate at exercise onset is abolished during prolonged cycling: role of thermoregulatory vasodilation // *J Appl Physiol.* - 2011. - Vol. 110. - P. 389-397.
179. Smith A. R., Hagen T. M. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid // *Biochem Soc Trans.* - 2003. - Vol. 31. - P. 1447-1449.
180. Smith T. E., Martel M. M., DeSantis A. D. Subjective Report of Side Effects of Prescribed and Nonprescribed Psychostimulant Use in Young Adults // *Subst Use Misuse.* - 2016. - Vol. 52 (4). - P. 548-552.
181. Sreemantula S., Nammi S., Kolanukonda R. [et al.]. Adaptogenic and nootropic activities of aqueous extract of *Vitis vinifera* (grape seed): an experimental study in rat model // *BMC Complement Altern Med.* - 2005. - Vol. 5. - P. 1.
182. Stagg C. J. Magnetic Resonance Spectroscopy as a tool to study the role of GABA in motor-cortical plasticity // *Neuroimage.* - 2014. - Vol. 86. - P. 19-27.
183. Stump C. S., Henriksen E. J., Wei Y. [et al.]. The metabolic syndrome: Role of skeletal muscle metabolism // *Ann. Med.* – 2006. - Vol. 38. - P. 389-402.

184. Su J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment // *World J Cardiol.* - 2015. - Vol. 7 (11). - P. 719-741.
185. Su K.Y., Yu C.Y., Chen Y.W [et al]. Rutin, a flavonoid and principal component of *saussurea involucrata*, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model // *Int J Med Sci.* - 2014. - Vol. 11 (5). - P. 528–537.
186. Tan C. K., Zhuang Y., Wahli W. Synthetic and natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome // *Expert Opin. Ther. Targets.* - 2017. - Vol. 21. - P. 333-348.
187. Thakur A. K., Chatterjee S. S., Kumar V. Adaptogenic potential of andrographolide: An active principle of the king of bitters (*Andrographis paniculata*) // *J Tradit Complement Med.* - 2014. - Vol. 5 (1). - P. 42-50.
188. Tirziu D., Simons M. Endothelium as master regulator of organ development and growth // *Vascul Pharmacol.* - 2008. - Vol. 50 (1-2). - P. 1-7.
189. Tournier C., Hess P., Yang D. D. [et al.]. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway // *Science.* - 2000. - Vol. 288. - P. 870-874.
190. Van Ierssel S. H., Jorens P. G., Van Craenenbroeck E. M., Conraads V. M. The endothelium, a protagonist in the pathophysiology of critical illness: focus on cellular markers // *Biomed Res Int.* - 2014. - Vol. 2014:985813.
191. Vos T., Barber R. M., Bell B. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 // *Lancet.* - 2015. - Vol. 386 (9995). - P. 743-800.
192. Vos T., Flaxman A. D., Naghavi M. [et al.]. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet.* - 2012. - Vol. 380. - P. 2163–2196.
193. 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. – T. 2. – №. 2. – P. 322.

194. Wan J.J., Qin Z., Wang P.Y. [et al.]. Muscle fatigue: general understanding and treatment // *Exp Mol Med*. -2017. - Vol. 49 (10). - P. e384.
195. Weber S., Puta C., Lesinski M. [et al.]. Symptoms of Anxiety and Depression in Young Athletes Using the Hospital Anxiety and Depression Scale // *Frontiers in Physiology*. - 2018. - Vol. 9. - P. 182.
196. Wei M., Gibbons L.W., Kampert J. B. [et al.]. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes // *Ann Intern Med*.-2000.- Vol. 132, №8. - P. 605 – 611.
197. Xiaoming W., Ling L., Jinghang Z. Antioxidant and anti-fatigue activities of flavonoids from *Puerariae radix* // *Afr J Tradit Complement Altern Med*. - 2011. - Vol. 9 (2). - P. 221–227.
198. Xue C., Ge Y., Tang B. [et al.]. A meta-analysis of risk factors for combat-related PTSD among military personnel and veterans // *PLoS One*.-2015. - Vol. 10 (3). - P. e0120270.
199. Yagishita S., Hayashi-Takagi A., Ellis-Davies G. C. [et al.]. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines // *Science*. - 2014. - Vol. 345 (6204). - P. 1616-1620.
200. Yang T. C., Chen Y. J., Chang S. F. [et al.]. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation // *J Biomed Sci*. - 2014. - Vol. 21 (1). - P. 11.
201. Yang W., Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation // *J. Orthop. Transl*. - 2018. - Vol. 13. - P. 25-32.
202. Yun N., Lee Y. M., Kim C. [et al.]. Anamorsin, a novel caspase-3 substrate in neurodegeneration // *J Biol Chem*. - 2014. - Vol. 289 (32). - P. 22183-22195.
203. Zammit P. S. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? // *J. Cell Sci*. - 2008. - Vol. 121. - P. 2975-2982.

204. Zeke A., Misheva M., Reményi A. [et al.]. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships // Microbiol Mol Biol Rev. - 2016. - Vol. 80 (3). - P. 793-835.

205. Zhou K., Chen D., Li B. [et al.]. Bioactivity and structure-activity relationship of cinnamic acid esters and their derivatives as potential antifungal agents for plant protection // PLoS One. - 2017. - Vol. 12 (4). - P. e0176189.