

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

*На правах рукописи*

Хури Елена Игоревна

Изучение церебропротекторной активности производных пиримидин-4-1(Н)-  
она при черепно-мозговой травме у экспериментальных 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.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Эпидемиологические, социально-экономические и патогенетические аспекты черепно-мозгового травматизма .....	11
1.2. Фармакотерапия ЧМТ. Перспективы применения производных пириимидина в фармакологической коррекции ЧМТ .....	19
Глава 2. Материалы и методы.....	28
2.1. Экспериментальные животные и их содержание .....	28
2.2. Исследуемые объекты.....	28
2.3. Методы определения «острой» токсичности .....	30
2.4. Методы воспроизведения черепно-мозговой травмы .....	31
2.5. Методы оценки сенсомоторного дефицита.....	34
2.6. Методы оценки психоэмоционального статуса экспериментальных животных.....	34
2.7. Методы оценки когнитивного статуса экспериментальных животных.....	35
2.8. Методы оценки изменения линейной скорости кровотока .....	36
2.9. Методы определения потребления глюкозы головным мозгом ...	36
2.10. Методы определение содержания лактата в сыворотке крови ..	37
2.11. Методы определения величины отека ткани головного мозга ..	37
2.12. Методы определения проницаемости гемато-энцефалического барьера .....	37
2.13. Методы электроэнцефалографического исследования.....	38
2.14. Методы оценки активности креатинфосфокиназы-BB.....	38
2.15. Методы оценки активности лактатдегидрогеназы .....	38
2.16. Методы оценки концентрации гомоцистеина.....	39
2.17. Методы оценки эндотелиальной функции .....	39
2.18. Методы оценки антиоксидантной активности.....	40
2.19. Методы гистоморфологических исследований .....	43
2.20. Методы иммуноферментного анализа.....	43
2.21. Методы статистического анализа.....	44

Глава 3. Изучение «острой» токсичности изучаемых соединений.	
Фармакологический скрининг .....	45
3.1. Оценка «острой» токсичности изучаемых соединений .....	45
3.2. Фармакологический скрининг .....	46
Заключение .....	51
Глава 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединения-лидера – PDMGLY в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы.....	52
4.1. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение линейной скорости кровотока у крыс в условиях экспериментальной ЧМТ.....	52
4.2. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение сывороточной концентрации лактата в условиях экспериментальной ЧМТ.....	54
4.3. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение уровня потребления глюкозы головным мозгом в условиях ЧМТ.....	55
4.4. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение концентрации белка S100 $\beta$ в условиях экспериментальной ЧМТ .....	57
Заключение .....	58
Глава 5. Оценка ноотропной активности и влияния соединения-лидера PDMGLY на психо-эмоциональный статус животных в условиях экспериментальной ЧМТ.....	60
5.1. Оценка ноотропной активности соединения-лидера.....	60
5.2. Оценка влияния соединения-лидера на изменение психо-эмоционального статуса животных в условиях экспериментальной ЧМТ.....	64
Заключение .....	67
Глава 6. Изучение церебропротекторной активности соединения-лидера и препарата сравнения в условиях экспериментальной ЧМТ .....	69
6.1. Влияние соединения-лидера gly и препарата сравнения на степень выраженности неврологического дефицита по шкале mNSS .....	69
6.2. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на степень выраженности посттравматического отека головного мозга и проницаемость ГЭБ у животных в условиях экспериментальной ЧМТ .....	71

6.3. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации нейрон-специфической энолазы и глиального фибриллярного кислого белка у животных в условиях экспериментальной ЧМТ.....	72
6.4. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение активности ЛДГ и КФК-ВВ у животных в условиях экспериментальной ЧМТ.....	74
6.5. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение показателей электроэнцефалограммы у животных в условиях экспериментальной ЧМТ.....	76
6.6. Гистологическое исследование ткани головного мозга экспериментальных животных в условиях коррекции ЧМТ исследуемым соединением-лидером и глиатилином .....	80
Заключение .....	86
Глава 7. Оценка возможных механизмов церебропротекторного действия соединения-лидера PDMGLY в условиях экспериментальной ЧМТ.....	88
7.1. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на состояние эндотелиальной функции в условиях экспериментальной ЧМТ... ..	88
7.2. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на активность про/антиоксидантных систем в условиях экспериментальной ЧМТ... ..	96
7.3. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на активность апоптотических систем в условиях экспериментальной ЧМТ... ..	98
7.4. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации GLUT1 в условиях экспериментальной ЧМТ .....	100
Заключение .....	102
Обсуждение результатов .....	104
Общие выводы.....	116
Научно-практические рекомендации .....	117
Список сокращений .....	118
Библиографический список .....	120

## **Введение**

### **Актуальность проблемы**

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и, прежде всего, инвалидизации населения [79]. Согласно эпидемиологическим исследованиям в США около 2 млн. человек и 1,7 млн. человек в странах Европейского союза подвержены черепно-мозговому травматизму [127]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется свыше 600 тыс. случаев ЧМТ, при этом 70-90% приходится на травму легкой, либо средней тяжести [91]. Многие исследователи травматическое повреждение головного мозга называют «недооцененной тихой эпидемией» [31]. В первую очередь это может связано с тем, что большинство случаев черепно-мозговой травмы (легкой и умеренно-тяжелой форм) не диагностируется и соответственно пациенты не получают должного лечения, что в свою очередь увеличивает риск отсроченных осложнений ЧМТ: прогрессирующий когнитивный дефицит, болезнь Паркинсона, хроническая травматическая энцефалопатия, депрессия. Ежегодно в общемировых масштабах регистрируется более 13 млн. новых случаев отсроченной инвалидности после перенесенной черепно-мозговой травмы [37], при этом лица, у которых отмечаются посттравматические расстройства, подвержены социальной дезадаптации и требуют специализированного ухода, что негативно сказывается на экономической эффективности системы здравоохранения и влечет за собой увеличение прямых и косвенных затрат на поддержание должного уровня качества жизни пациентов, перенесших черепно-мозговую травму [126]. Во-вторых, поскольку большинство случаев легкой и умеренно-тяжелой форм ЧМТ не регистрируется в неврологических стационарах, проблематично оценить полноту и достоверность случаев черепно-мозгового травматизма, особенно в густонаселенных и экономически развитых районах, что влечет за собой определенные трудности в выборе оптимальной медико-экономической стратегии лечения

лиц с черепно-мозговой травмой [61]. В связи со значительной медико-социально-экономической ролью черепно-мозгового травматизма, совершенствование и разработка новых путей лечения данного патологического состояния представляет несомненный научно-практический интерес.

### **Степень разработанности темы**

Разработка новых стратегий фармакокоррекции черепно-мозговой травмы является одной из передовых областей научных изысканий во всем мире [45]. Ежегодно на исследование и внедрение в практическую медицину новых методов диагностики и лечения ЧМТ выделяются значительные объемы финансовых средств. Затраты экономик, прежде всего, развитых стран, на научно-прикладные исследовательские работы, в области изучения фармакотерапии черепно-мозговой травмы достигают миллиардов долларов США [77]. Однако, несмотря на значительный объем финансовых вложений существенного прогресса в оптимизации лекарственного обеспечения лиц, перенесших черепно-мозговую травму, на сегодняшний день не отмечается [138]. Прежде всего, данный факт связан со сложностью патогенеза черепно-мозгового травматизма, объединяющего в себе ряд взаимосвязанных факторов, обеспечивающих первичный и вторичный каскад повреждения головного мозга при воздействии травматического фактора [19]. В этой связи фармакотерапия черепно-мозговой травмы ограничивается либо применением церебропротекторных средств – направленная на ограничение вторичного каскада травматического повреждения головного мозга, либо использованием препаратов-корректоров клинических проявлений черепно-мозговой травмы – симптоматическая терапия [16]. При этом, патогенетически обоснованной и наиболее эффективной стратегией терапии черепно-мозговой травмы признается применение церебропротекторных средств [99]. Однако, спектр лекарственных препаратов, обладающих церебропротекторной активностью и рекомендованных для лечения

черепно-мозговой травмы, ограничен и не в полной мере удовлетворяет потребностям современной практической неврологии [41], что предопределяет целесообразность поиска новых средств, способных оказать цереброзащитное действие в условиях черепно-мозговой травмы.

### **Цель исследования**

Оценить наличие церебропротекторных свойств у производных пиримидин-4-1(Н)-она в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы.

### **Задачи исследования**

1. Определить параметры токсичности исследуемых соединений, оценить «острую токсичность» изучаемых производных пиримидин-4-1(Н)-она. Провести фармакологический скрининг в ряду изучаемых веществ, определить соединение-лидер.
2. Провести оценку зависимости «доза-эффект» для соединения-лидера. Установить наиболее эффективную дозу соединения-лидера для проведения дальнейших исследований.
3. Оценить церебропротекторную активность соединения-лидера в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы.
4. Оценить возможные механизмы церебропротекторного действия соединения-лидера.

### **Научная новизна исследования**

В рамках данного исследования впервые экспериментально обоснована возможность применения производного пиримидин-4-1(Н)-она под лабораторным шифром PDMGLY для терапии черепно-мозговой травмы. Впервые для соединения PDMGLY определены параметры «острой» токсичности, установлена оптимальная доза соединения-лидера. Впервые для соединения PDMGLY изучены церебропротекторные свойства, проанализировано влияние данного соединения на процессы деструкции

мозговой ткани, поведенческую активность, когнитивные функции и развитие неврологического дефицита у животных в условиях черепно-мозговой травмы. Оценено влияние соединения-лидера на эндотелиальную функцию, активность про/антиоксидантной системы и интенсивность апоптотических процессов в ткани головного мозга в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы.

### **Реализация и научно-практическая ценность работы**

Результаты диссертационного исследования, свидетельствующие о церебропротекторном действии соединения PDMGLY, позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения данного соединения с целью создания на его основе церебротекторного лекарственного препарата для терапии черепно-мозговой травмы. Результаты экспериментальной работы позволяют рекомендовать химикам-синтетикам целенаправленный поиск и синтез в ряду производных пиримидина новых соединений для коррекции церебральных нарушений. Полученные в работе результаты используются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ, а также на кафедре органической химии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В ряду исследуемых соединений наиболее выраженным церебропротекторным эффектом в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы обладает соединение PDMGLY. Данное соединение корректирует неврологический и сенсомоторный дефицит, а также восстанавливает церебральный кровоток.

2. Соединение PDMGLY в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы оказывает церебропротекторное действие, выражаемое в улучшении поведенческих и когнитивных функций у животных, снижении отека, неврологического дефицита, деструкции мозговой ткани и

восстановлении биоэлектрической активности головного мозга, превосходя по активности препарат сравнения- холина альфосцерат.

3. Потенциальными механизмами реализации церебропротекторного действия соединения PDMGLY могут являться восстановление функции эндотелия сосудов, нормализация про/антиоксидантного равновесия, подавление апоптотических реакций и улучшение энергообеспечения головного мозга.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

В исследовании использованы передовые методы ведения экспериментальной работы и статистического анализа данных, высокотехнологичное оборудование. В ходе работы был получен значительный объем статистически обработанных данных, что позволяет судить о высокой степени достоверности полученных результатов. Основные положения диссертационной работы были доложены на научных конференциях и симпозиумах: III Международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», Пятигорск, 2017. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 1 в базе журналов, индексируемых в SCOPUS.

### **Методология исследования**

В диссертационном исследовании использовался комплексный морфо-функциональный подход к оценке церебропротекторной активности изучаемых соединений с применением функциональных, биохимических и гистологических методов. Дизайн исследования соответствовал этическим нормам работы с экспериментальными животными.

Исследование выполнено на современном уровне с использованием необходимого количества биологических моделей, современных методов и оборудования, адекватных поставленным задачам исследования.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал активное участие на всех этапах работы. Проведён анализ литературных данных по теме исследования, на основании чего были разработаны протоколы экспериментов, проведены необходимые исследования и дальнейшая обработка полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

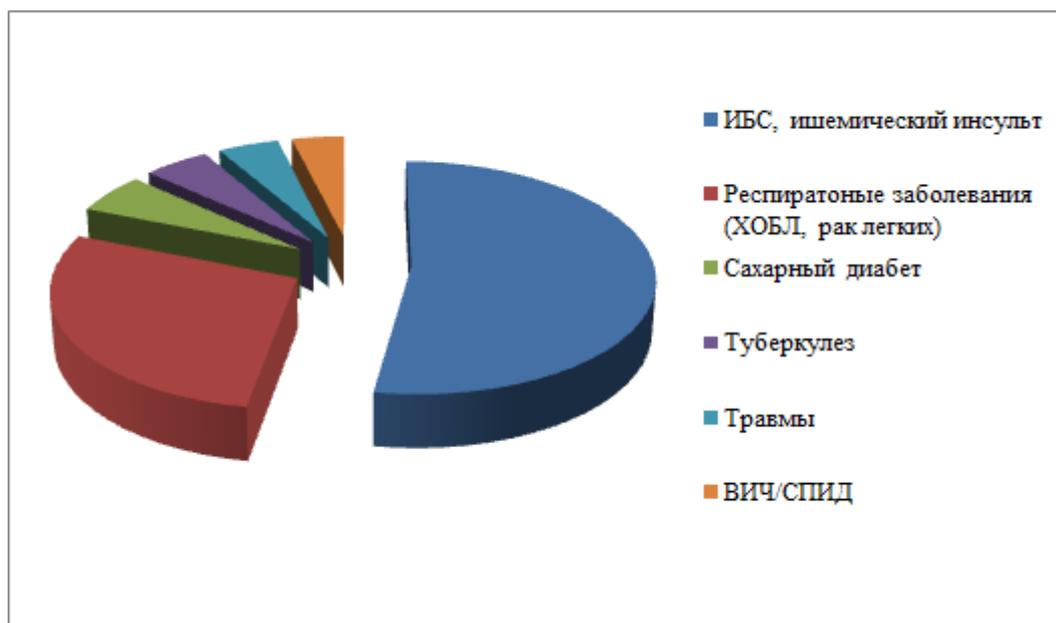
### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, глав собственных исследований, обсуждения результатов, общих выводов, научно-практических рекомендаций и библиографического списка, включающего 165 источников, из них 17 отечественных и 148 зарубежных автора. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит таблиц –12, рисунков –31.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Эпидемиологические, социально-экономические и патогенетические аспекты черепно-мозгового травматизма

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) определяется как структурное или функциональное нарушение мозговой деятельности, возникшее при воздействии на головной мозг внешней силы с последующим развитием амнезии, потери сознания, неврологического дефицита, которые возникают в разные период травмы [106]. Общемировые статистические данные показывают, что от различных форм ЧМТ ежегодно страдает свыше 17 млн. человек, в числе которых отмечается 2,75 млн. случаев неотложной госпитализации и в 520 тыс. регистрируется летальный исход. При этом, ЧМТ входит в число ведущих причин смертности населения (рис.1) [110].



*Примечание:* травмы – черепно-мозговая травма, возникшие в результате ДТП.

**Рисунок 1. Ведущие причины смертности населения по данным ВОЗ на 2015г [77].**

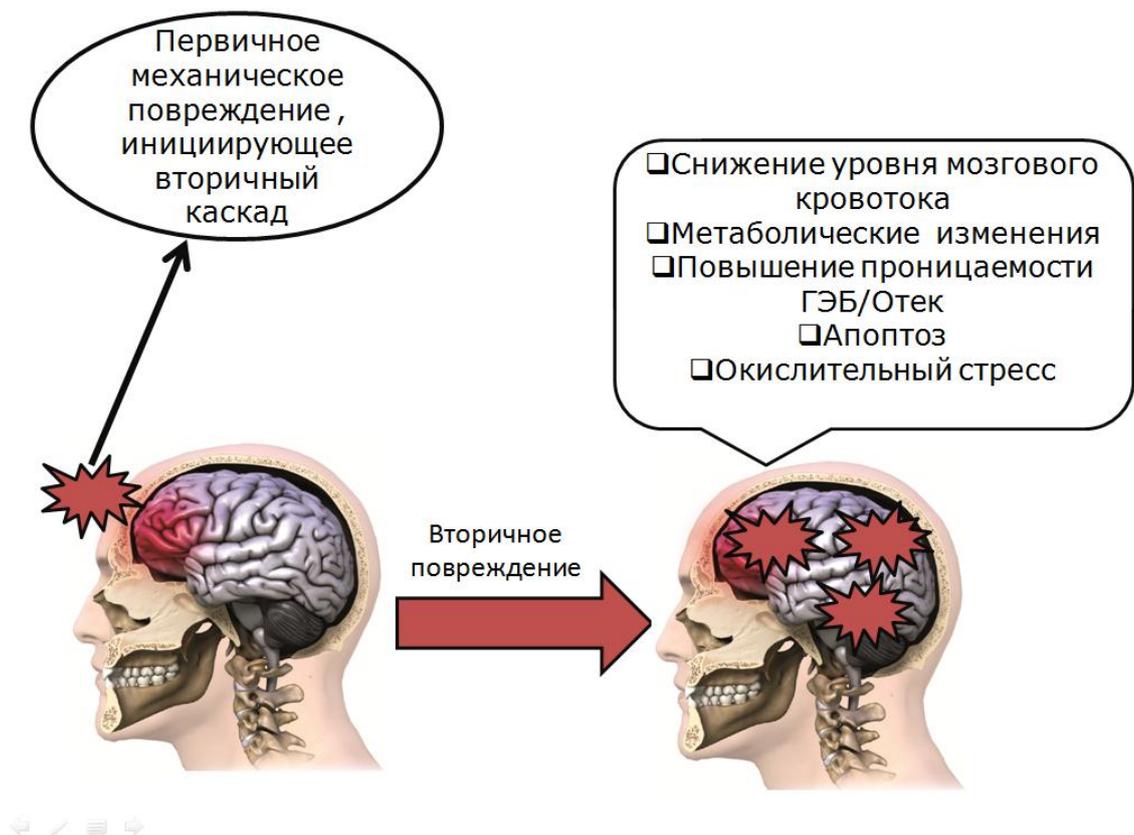
Немаловажно, что пик возникновения ЧМТ отмечается в возрасте до 45 лет, т.е. наиболее экономически трудоспособном, при этом в силу

отсроченных осложнений ЧМТ, включающих в себя: паралич, снижение памяти и интеллекта, мышечную дискоординацию значительным является процент посттравматической инвалидизации, достигающий, по современным эпидемиологическим выкладкам, порядка 30%, что, безусловно, снижает качество жизни населения [136]. Кроме того, специалисты Всемирной организации здравоохранения прогнозируют к 2025 г. увеличение числа ЧМТ до 25 млн. случаев ежегодно, с увеличением прямых затрат на лечение пациентов с ЧМТ до 96 млрд. долларов [122]. Зачастую ЧМТ является труднодиагностируемым состоянием (в особенности легкие формы), что осложняет своевременную коррекцию и повышает вероятность посттравматических осложнений, появление и степень выраженности которых зависит от тяжести ЧМТ.

На сегодняшний день общепринятой системой оценки степени тяжести ЧМТ является шкала комы Глазго (*Teasdale and Jennett, 1974*), где по общей сумме баллов в вербальных, моторных и зрительно-координационных тестах, судят о тяжести возникшей ЧМТ. В соответствии с данной классификацией выделяют тяжелую, умеренную и легкую формы ЧМТ, что соответствует сумме баллов 3-8; 9-12 и 13-15 соответственно [56]. В общей структуре черепно-мозгового травматизма большинство случаев (75-85%) приходится на долю ЧМТ легкой степени и часто ассоциируется с сотрясением мозга. Легкая форма ЧМТ является практически повсеместно распространенным состоянием, наиболее часто встречающимся в профессиональном спорте (бокс, борьба, регби, хоккей) и у военнослужащих. Кроме того, легкая форма ЧМТ может проявляться в межприступном периоде у больных эпилепсией, а также значительное число эпизодов бытового травматизма приходится на данную форму ЧМТ [46]. Однако истинную частоту сотрясения мозга установить не удастся, поскольку зачастую данное состояние должным образом не диагностируется и, как правило, разрешается спонтанно, без медицинского вмешательства. Несмотря на полное восстановление мозговой

деятельности в краткосрочном посттравматическом периоде, порядка 15-30% пациентов с легкой формой ЧМТ в долгосрочной перспективе подвержены изменению поведенческого и когнитивного дефицита, известного как посттравматический стресс, что представляет определенные сложности для системы здравоохранения (необходима своевременная ранняя коррекция ЧМТ в периоде до 3-х суток, что может предотвратить развитие отсроченных осложнений) [47]. При наличии умеренной ЧМТ пациент вялый и слабо реагирует на внешние стимулы, процесс восстановления аналогичен таковому при ЧМТ легкой степени, т.е. наблюдается практически полное восстановление мозговой деятельности в краткосрочном периоде, но в то же время риск возникновения осложнений существенно выше. ЧМТ тяжелой степени характеризуется коматозным состоянием с наличием вербального, сенсорного и моторного дефицита [78]. Риск осложнений, как проявляющихся в незначительный временной промежуток (порядка 3-х дней), так и в отсроченном периоде, при наличии ЧМТ тяжелой степени существенно возрастает. У пациентов, перенесших тяжелую ЧМТ, в долгосрочной перспективе в разы увеличивается вероятность проявления болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, хронической травматической энцефалопатии, ишемического инсульта и транзиторной ишемической атаки, злокачественных новообразований головного мозга [128]. Значительное число случаев осложнений у лиц, перенесших ЧМТ, во многом связано с характером повреждения головного мозга, которое носит ступенчатый характер.

В патогенезе ЧМТ выделяют первичное и вторичное повреждение мозговой ткани (рис.2).



**Рисунок 2. Схематическое представление патогенеза ЧМТ.**

Первичное повреждение головного мозга происходит незамедлительно при действии травмирующего внешнего агента (удар, быстрое ускорение/торможение, взрывная волна) и носит кумулятивный характер (в мозговой паренхиме наблюдается наличие воронкообразного дефекта) [153]. При первичном повреждении мозговой ткани отмечается прогрессирующее повреждение нейронов, вызванное внешним разрушительным давлением, сдавлением или разрывом мозговых сосудов, что чревато внутримозговым кровоизлиянием. Первичный мозговой травматизм может быть в значительной степени предотвращен использованием механических защитных средств (шлемы) [105], однако негативные изменения (при условии их возникновения) в деятельности мозга при его первичной механической травме носят необратимый характер и не подлежат коррекции. В дальнейшем, изменения, наблюдаемые при первичной травме головного мозга, инициируют диффузное повреждение мозговой ткани со сложной

взаимосвязанной динамической системой метаболических, нейрохимических, митохондриальных и клеточных патологических сдвигов [70]. Одним из первоочередных негативных изменений, характеризующих начало этапа вторичного повреждения головного мозга, является ограничение уровня мозгового кровотока [123]. При этом, сбой церебральной гемодинамики во многом опосредован механическим воздействием на сосуды головного мозга, в результате чего отмечается их разрыв, либо сдавление с повышением напряжения сдвига, что приводит к деструкции эндотелия сосудов и развитию эндотелиальной дисфункции [148]. Эндотелиальная дисфункция представляет собой патофизиологический процесс, характеризующийся наличием дисбаланса в системе регуляторных эндотелий-продуцируемых веществ, сопровождающийся нарушением вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной и антипролиферативной функций эндотелия сосудов [8]. Дисфункцию эндотелия наиболее часто ассоциируют с разобщением NO-продуцирующих ферментативных комплексов (изоферментов NOS) и дисбалансом в образовании эндогенного оксида азота. При этом ведущая роль в патогенезе ЧМТ отводится эндотелиальной и индуцибельной изоформам [96]. Недостаточная активность eNOS, которая возникает практически сразу после ограничения церебрального кровотока, может провоцировать протромбогенный сдвиг в крови, в результате чего потенциально возрастает риск образования микротромбов, закупоривающих мелкие капилляры, что в совокупности с механическим сдавлением сосуда приводит к их разрыву и геморрагическим осложнениям ЧМТ. В дополнение к нарушению реологических свойств крови, истощение eNOS способствует снижению концентрации NO, что вызывает нарушение сосудистой адаптации, вазоспазм и ухудшает мозговой кровоток, как в интактных, так и в областях головного мозга, находящихся под воздействием травматического фактора [80]. В ответ на снижение образования NO с целью сохранения оптимального уровня кровотока отмечается активация индуцибельной (iNOS) и нейрональной

синтаз оксида азота (nNOS), которые катализируют образование NO в количествах на порядок превосходящих физиологическую норму [144]. При этом, образующийся оксид азота подвергается окислительной модификации, преимущественно в реакции с супероксидным радикалом, имеющим митохондриальное происхождение. В результате данной реакции образуется цитотоксичный пероксонитрит, который через ряд, как прямых альтернативных реакций (интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижение активности ферментов антиоксидантной защиты), так и опосредованного действия (продукция цито-и хемокинов) инициирует клеточную гибель [119]. Также, в условиях «нитритного стресса», наблюдается повышенное образование провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-6), которые способствуют усилению воспалительных процессов в клетках ГЭБ и глии [86]. При этом, повреждение ГЭБ приводит к повышению проницаемости сосудов для воды и растворенных электролитов (отмечается дисфункция системы аквапоринов), в результате чего возникает отек головного мозга цитотоксического типа [25]. Дисфункция ГЭБ, развивающийся цитотоксический отек и дисфункция ионных транспортных систем, вызывают ограничение поступления в нейрональную клетку питательных веществ, в частности глюкозы, поскольку интрацеллюлярная гипергидратация и гиперосмолярная среда способствуют инактивации систем активного транспорта глюкозы – транспортеров глюкозы типа GLUT, при этом наиболее выраженные негативные изменения отмечаются в системе GLUT-1, которая обеспечивает «быстрое» проникновение питательных веществ в клетку [51].

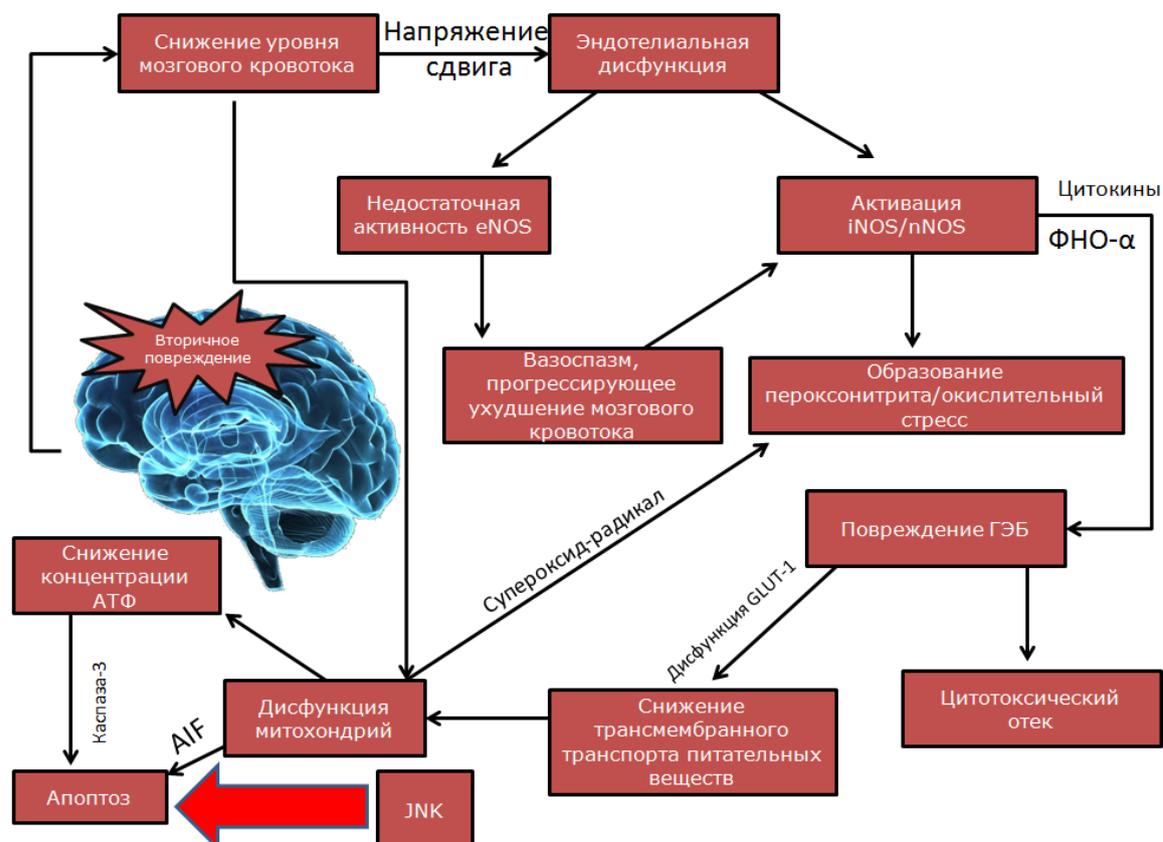
В сложившихся условиях нарушение функционирования митохондрий и прогрессирующий дефицит субстратов окисления способствуют интенсификации процессов гликолиза, с повышенным образованием интермедиатов окисления (молочной кислоты), которые усугубляют развившиеся патологические сдвиги, усиливая гиперосмолярность

внутриклеточной среды за счет изменения ионного равновесия [68]. Ограничение окисляющей способности митохондрий, возникающее в следствии дефицита глюкозы, приводит к разобщению реакций митохондриальной дыхательной цепи, в результате чего отмечается снижение синтеза АТФ и повышение генерации активных форм кислорода (АФК) [55]. Нарушение процессов окисления в митохондриальных комплексах I и II, ведет к перераспределению потока электронов в сторону образования АФК, в частности супероксидного радикала, интенсифицируя окислительный стресс. При этом, недостаток кислорода терминирует дальнейший ход реакций митохондриальной дыхательной цепи, что вызывает дисфункцию комплекса V, в результате снижается интенсивность процессов фосфорилирования и уменьшается продукция АТФ [76]. Снижение внутриклеточного уровня АТФ, а также повышение интрацеллюлярного содержания АФК являются иницирующими сигналами для внутреннего («митохондриального») пути апоптоза [63]. При этом, «митохондриальный» апоптоз может протекать, как по каспаза-зависимому, так и каспаза-независимому механизмам.

Каспаза-зависимый путь апоптоза активируется по достижении минимального физиологического уровня АТФ, концентрация которого недостаточна для оптимального функционирования клетки, но способна активировать каспазы. «Классический» вариант каспаза-зависимого пути апоптоза представляет собой каскадную активацию про-каспазы-8 и про-каспазы-3, при этом эффекторным ферментом является каспаза-3, непосредственно разрушающая ДНК [83]. Также, активация каспазы-3 наблюдается в реакции внешнего пути апоптоза, который запускается при активации ФНО- $\alpha$  специфических мембранных рецепторов FAS / CD95 и TNF-1, в результате чего отмечается увеличение образования активного белка tBID, непосредственно активирующего каспазу-3 [95]. Однако, в виду существенной зависимости каспаза-зависимого пути апоптоза от наличия

субстратов окисления, данному механизму запрограммированной гибели клетки в условиях ЧМТ, отводится второстепенная роль [87]. В отличие от каспаза-зависимого пути каспаза-независимый путь апоптоза не требует затрат энергии на активацию ферментов-каспаз и запускается апоптоз-индуцирующим фактором и цитохромом С – оба митохондриального происхождения [42]. Апоптоз-индуцирующий фактор (АИФ/АIF) флавопротеин межмембранного митохондриального матрикса, который после высвобождения транспортируется к околоядерному пространству, где в комплексе с циклофилином А, проникает в ядро и вызывает необратимую конденсацию хроматина [114]. При этом, активация апоптоза не всегда может привести к гибели клетки. Значительную роль в предотвращении апоптотической гибели клеток в условиях ЧМТ играет активность ферментов типа JNK (с-Jun-концевой киназы) [162].

Из литературных источников известно два основных изофермента JNK, участвующих в регуляции апоптотического сигнала – JNK1 и JNK2. При этом JNK1 является положительным регулятором каспаза-независимого пути апоптоза, который через активацию белка p53 и PUMA, а также проапоптотических митохондриальных белков Bax и Bcl2 способствует ускоренному релизingu АIF и дальнейшему ходу апоптотических реакций [52]. Альтернативная функция отводится изоферменту JNK2. Активация JNK2 на ранних этапах ЧМТ позволяет нивелировать реакции каспаза-зависимого пути апоптоза, посредством активации антиапоптотических сигнальных молекул сIAP2/BIRC3, что может предотвратить преждевременную гибель клетки. Также, в сложившихся условиях, JNK2 способствует активации Nf-kB пути с последующим фосфорилированием Akt, в результате чего отмечается редукция апоптотического сигнала [1]. Резюмировать патогенетические особенности вторичного повреждения головного мозга в условиях ЧМТ можно следующей схемой (рис.3).



**Рисунок 3. Патогенетические особенности вторичного повреждения головного мозга в условиях ЧМТ**

Таким образом, патогенез ЧМТ носит комплексный, каскадный характер, в ходе которого в результате взаимосвязанных реакций отмечается прогрессирующее ухудшение метаболических процессов и деструкция мозговой ткани в результате окислительной модификации клеточных структур, и интенсификации процессов апоптоза, что в свою очередь может служить основанием к проведению комплексной фармакотерапевтической коррекции ЧМТ.

## **1.2. Фармакотерапия ЧМТ. Перспективы применения производных пиридина в фармакологической коррекции ЧМТ**

Несмотря на значительные усилия современной экспериментальной и практической медицины, достигнутые в коррекции ЧМТ, данное состояние

остаётся значимой медико-социально-экономической проблемой с достаточно высоким уровнем смертности и инвалидизации населения [111].

На сегодняшний день фармакотерапия ЧМТ имеет 2 основные стратегии: церебропротективная терапия – направленная на ограничение повреждения мозговой ткани и восстановление нейрональной целостности и симптоматическая терапия – лечение стойких симптомов хронической формы ЧМТ (энцефалопатия, когнитивный дефицит) [54]. Церебропротекторные средства, обеспечивающие регенерацию и восстановление мозговой ткани, могут иметь более широкое терапевтическое окно, чем иные методы фармакотерапии (симптоматические препараты). Кроме того, данные лекарственные препараты также потенциально эффективны в острой и хронической формах ЧМТ. Механизмы, обеспечивающие восстановление ткани мозга, при применении церебропротекторных средств, могут включать оптимизацию ангиогенеза, ремоделирование и ремиелинизацию нейронов, нейро- и синаптогенез [158]. Фармакологическая коррекция, направленная на лечение стойких симптомов, связанных с хронической формой ЧМТ (например, нарушение памяти, депрессия, головная боль), широко используются врачами-клиницистами. Данный вид фармакотерапии ЧМТ, направлен на модуляцию дофаминергической, норадренергической, серотонергической, глутаматергической и холинергической систем [85].

Однако, несмотря на достаточный спектр лекарственных средств, предназначенных для лечения ЧМТ, убедительные доказательства их эффективности и безопасности практически отсутствуют [103]. В результате, выбор препарата для отдельных пациентов, доза лекарственного средства и продолжительность лечения, чаще проводится эмпирическим методом и не имеет стандартизованного подхода [54]. В связи с этим был проведен анализ имеющихся данных доклинических и клинических исследований лекарственных средств, которые потенциально могут применяться для

лечения ЧМТ, включающие как церебропротекторные, так и симптоматические препараты (список препаратов представлен в таблице 1) [54].

**Таблица 1. Лекарственные препараты, применяемые для терапии ЧМТ [54].**

<i>Лекарственный препарат</i>	<i>Принято к рассмотрению FDA</i>	<i>Доклинические испытания</i>	<i>Легкая ЧМТ</i>	<i>ЧМТ средней тяжести</i>	<i>Церебропротекция</i>	<i>Симптоматическое лечение</i>
Амантадин	✓	✓		*		*
Циклоспорин А	✓	✓	#	*	*	#
Донепезил	✓	✓	Δ	*	#	Δ
Эритропоэтин	✓	✓	#	#	#	
ФК-506 (такролимус)	✓	✓		*	*	
Глибенкламид	✓	✓	#	#	#	*
Литий	✓	✓		#	*	#
N-Ацетил Цистеин	✓	✓		*	*	
Ривастигмин	✓	✓		*		*
Симвастатин	✓	✓				
Цитиколин	✓	✓	*		*	
Холина альфосцерат	✓	✓	*		*	

Примечание: #- проведены только доклинические испытания; Δ- проведены только клинические испытания фазы II; \*- проведены доклинические и клинические испытания.

#### *Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (Ривастигмин, Донепезил)*

Первоначальные исследования ингибиторов ацетилхолинэстеразы в качестве средств для терапии ЧМТ, показали значительную эффективность препарата первого поколения – физостигмина. В последнее десятилетие было

проведено значительное число клинических испытаний, показывающих эффективность антихолинэстеразных средств второго поколения, имеющих более оптимальный профиль безопасности использования в сравнении с физостигмином. К числу таких препаратов отнесены донепезил и ривастигмин. Доказано, что ингибиторы антихолинэстеразы эффективны у пациентов с хронической формой ЧМТ, сопряженной с выраженным когнитивным дефицитом [155].

#### *Амантадин*

Амантадин имеет доказанную эффективность у пациентов с симптомами хронической ЧМТ. Два небольших рандомизированных исследования у пациентов с пост-травматическими расстройствами ЦНС показали умеренную эффективность амантадина. В другом многоцентровом плацебо-контролируемом исследовании показано, что применение амантадина в течении 16 недель улучшало вегетативный статус пациентов и уменьшало степень инвалидности, оцениваемой по регрессионной шкале оценки инвалидизации [156].

#### *Циклоспорин А/Такролимус*

Циклоспорин А и такролимус блокируют формирование митохондриальной поры переходной проницаемости, таким образом, восстанавливая митохондриальный мембранный потенциал. Значительное число экспериментальных исследований показало, что позитивное действие препаратов в условиях ЧМТ связано с сохранением функции митохондрий, инактивацией активных форм кислорода, ингибированием кальцинеина, что положительно влияло на обучаемость и память. Как доклинические, так и клинические исследования показывают, что наиболее подходящим способом практического использования циклоспорина А и такролимуса является лечение пациентов с тяжелой ЧМТ. Низкая биодоступность

препаратов может ограничить возможность отсроченного применения препаратов в терапии хронической формы ЧМТ [137].

### *Эритропоэтин*

Эритропоэтин – плеiotропный цитокин, регулирующий эритропоэз, оказывает положительное влияние на мозговую деятельность в условиях ЧМТ за счет снижения токсичности глутамата и «нитритного» стресса. В ряде работ доказано антиапоптотическое действие эритропоэтина, а также противовоспалительные и эндотелиопротекторные свойства препарата [28, 38].

Клиническая эффективность препаратов эритропоэтина доказана у пациентов с тяжелой ЧМТ. Кроме того, на основании результатов доклинических исследований можно предполагать целесообразность применения эритропоэтина в терапии ЧМТ средней степени тяжести [40].

### *Глибенкламид*

Глибенкламид является ингибитором кассетного АТФ транспортера Sur1, ассоциированного с калиевыми каналами. После ЧМТ применение глибенкламида способствует восстановлению эндотелиальной функции и ангиогенезу, ингибирует апоптоз. Доказана эффективность препарата в симптоматической терапии средне-тяжелой формы ЧМТ: в ряде клинических и доклинических исследований установлено, что применение глибекламида уменьшало число геморрагических осложнений ЧМТ и отек головного мозга [135].

### *Препараты лития*

Препараты лития являются средствами первой линии для лечения пациентов с биполярным расстройством. Средства, содержащие литий оказывают церебропротекторное действие путем уменьшения эксайтотоксичности и апоптоза. Другие аспекты церебропротекторного

действия препаратов лития включают уменьшение образования провоспалительных цитокинов, снижение экспрессии  $\beta$ -АПП-расщепляющего фермента-1 (BACE-1), накопления  $\beta$ -амилоида, активации микроглии, активности циклооксигеназы-2 и матриксной металлопротеиназы-9, а также сохранение целостности ГЭБ [159].

#### *N-ацетил-цистеин*

Как доклинические, так и клинические исследования показывают, что N-ацетил-цистеин обладает выраженной терапевтической эффективностью и низким уровнем системной токсичности и может быть использован для терапии умеренно-тяжелых форм ЧМТ, однако, малая величина терапевтического окна (не более 1ч. после травмы), ограничивает практическое использование препарата. Механизм церебропротективного действия N-ацетил-цистеина реализуется за счет уменьшения генерации свободных радикалов, увеличения уровня эндогенного глутатиона, а также снижения образования провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ ) [113].

#### *Статины (Симвастатин)*

Статины обладают доказанной клинической эффективностью при любой форме ЧМТ. Имеется ряд доклинических и клинических исследований показывающих благотворное воздействия статинов, на течение острых травматических процессов. Церебропротекторное действие статинов в условиях ЧМТ опосредуется снижением проницаемости ГЭБ и отека мозга, нормализацией церебральной гемодинамики, подавления реакций воспаления и модуляции апоптоза [93].

#### *Цитиколин/холина альфосцерат*

Механизм церебротективного действия цитиколина и холина альфосцерата связывают с восстановлением метаболических процессов в нейронах, уменьшением нейровоспаления и активности клеток глии,

подавлением апоптоза. Также, препараты оказывают антиоксидантное действие и стабилизируют холинергическую передачу в головном мозге после ЧМТ. Цитиколин и холина альфосцерат имеют достаточную величину терапевтического окна (от 15 мин. до 48 ч.), что в сочетании с высокой эффективностью делает данные средства препаратами первой линии в терапии ЧМТ различной этиологии и степени тяжести. Данные лекарственные препараты обладают доказанной терапевтической эффективностью в лечении легких и умеренно-тяжелых форм ЧМТ [161,44].

Несмотря на наличие значительного спектра лекарственных средств, имеющих определенную доказательную базу и которые успешно применяются в фармакотерапии ЧМТ, научные изыскания в области поиска и создания препаратов-церебропротекторов для лечения черепно-мозгового травматизма продолжаются. В настоящее время, как отечественными, так и зарубежными учеными ведется целенаправленный поиск эффективных, безопасных и экономически выгодных церебропротекторных средств для лечения ЧМТ, в результате которого в клиническую практику был внедрен ряд инновационных препаратов-церебропротекторов (табл.2). Однако данные фармакотерапевтические средства не лишены недостатков (инновационные лекарственные препараты-корректоры черепно мозгового травматизма и их характеристика представлены в табл.2).

**Таблица 2. Инновационные препараты-церебропротекторы, применяемые для терапии ЧМТ**

<b>Лекарственный препарат</b>	<b>Преимущества</b>	<b>Недостатки</b>
Анакинра (антагонист рецепторов ИЛ-1)	Предварительные клинические данные демонстрировали возможность применения препарата в качестве церебропротекторного средства. Препарат хорошо переносится пациентами	Эффективен только при длительном применении. Высокая стоимость лечения [75]
Ингибиторы кальпаина	Улучшают когнитивные функции после ЧМТ в экспериментах на животных	Не установлен точный механизм действия, высокая стоимость лечения [22].
Дексканабинол	Улучшает когнитивные функции и снижает неврологический дефицит. Данные эффекты доказаны, как в доклинических, так и клинических испытаниях	Эффективен только в течении первых 6 ч. после травмы. Вызывает лекарственную зависимость [71].
Дельтибант (антагонист рецепторов брадикинина)	Эффективен при любой форме ЧМТ (эксперименты на животных)	Значительный уровень токсичности (канцерогенен, оказывает тератогенный эффект) [20].
Этанерцепт	Хорошо изученный профиль безопасности	Высокая стоимость лечения [39].
Инсулиноподобный фактор роста-1	Эффективен в течении 48 ч. после травмы. Может применяться при любой форме ЧМТ.	Противопоказан при сахарном диабете. Высокая стоимость лечения [102].
PEG-SOD (пэгилированная супероксиддисмутаза)	Оптимальный профиль безопасности. Препарат эффективен при тяжелой ЧМТ	Препарат малодоступен. Высокая стоимость лечения. Малое терапевтическое окно (1-2 ч. после травмы) [26].

Исходя из представленных данных (табл.1, табл.2), спектр эффективных, безопасных и экономически выгодных препаратов - корректоров ЧМТ, ограничен, что предполагает актуальность разработки новых лекарственных средств, для лечения ЧМТ.

Необходимым сочетанием низкой системной токсичности применения, сопряженной с высокой терапевтической эффективностью и низкой стоимостью лечения, обладают производные пиримидина [50].

Производным пиримидина присущ обширный спектр фармакологической активности, включающий в себя: противоопухолевое [120], противовирусное [109], антимикробное [165], противовоспалительное [13], анальгетическое [24], антиоксидантное действие [27].

Кроме того, для дериватов пиримидина установлены антиапоптотические свойства, реализуемые посредством стабилизации митохондриальной мембраны и снижения релизинга апоптоз-индуцирующего фактора [82]. Также, производные пиримидина проявляют эндотелийпозитивное влияние [2], уменьшают процессы воспаления в мозговой ткани и способствуют сохранению целостности ГЭБ за счет наличия антицитокинового действия (снижают образование ФНО- $\alpha$ ) [164]. Немаловажно, что наличие в структуре соединений ядра пиримидина, обеспечивает общность метаболических путей с эндобиотиками, что практически исключает риск неблагоприятного лекарственного взаимодействия, в особенности у коморбидных пациентов в острой фазе ЧМТ, где требуется незамедлительная фармакокоррекция [66].

Таким образом, обширный спектр фармакологической активности, в сочетании с низкой системной токсичностью применения и оптимальным фармакокинетическим профилем делает производные пиримидина перспективными объектами для изучения, с целью создания на их основе средств для лечения ЧМТ.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Экспериментальные животные и их содержание

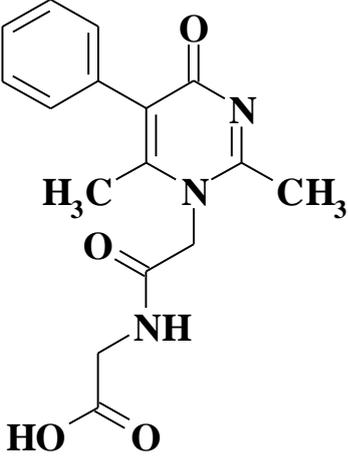
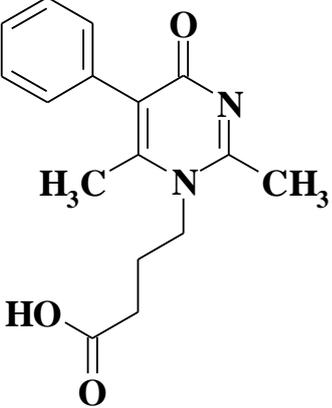
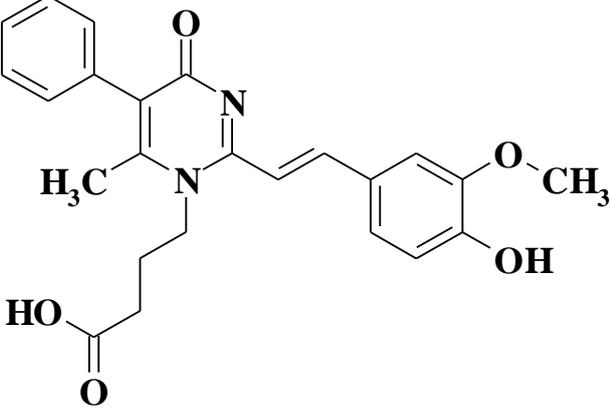
В качестве биологической модели в работе использовались 250 мышей-самцов линии Balb/c (половозрелые, массой 20-22 грамма) и 430 (половозрелые, массой 200-220 грамма) крыс - самцов линии Wistar. Экспериментальные животные были получены из лаборатории живых систем Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ.

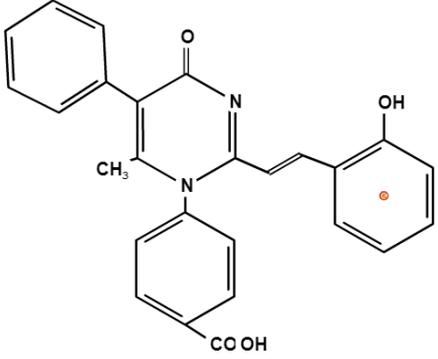
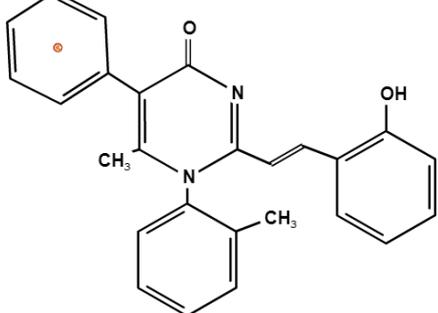
На время проведения эксперимента животные содержались в контролируемых условиях вивария: относительная влажность  $65\pm 5\%$ , температура воздуха  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , при условии естественной смены светотемнового режима. Для размещения мышей использовались макролоновые клетки Т-3/С, для содержания крыс применяли клетки Т-2 (макролон), где в качестве подстилки применяли гранулированную древесную фракцию с диаметром частиц  $5\pm 1\text{мм}$ . Подстил и приспособления для поения животных менялись еженедельно. Воду и корм животные получали *ad libitum*. Размещение, содержание и дальнейшие манипуляциями с животными соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998), а также Приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP), ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96.

### 2.2. Исследуемые объекты

Исследуемые производные пиримидина были получены на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ под руководством проф., д-ра фармацевт. н-к Оганесяна Э.Т. и д-ра фармацевт. н-к Кодониди И.П.. Структуры и свойства изучаемых объектов приведены в табл.3

Таблица 3. Структура и свойства изучаемых производных пиридина.

Шифр соединения	Структурная формула	Свойства соединения
PDMGG		<p>Вещество представляет собой белый кристаллический порошок, без запаха. Мало растворимо в спирте. Нерастворимо в диэтиловом эфире, этилацетате.</p>
PDMGLY		<p>Вещество представляет собой белый кристаллический порошок без запаха, растворимо в спирте, мало растворимо в воде, нерастворимо в диэтиловом эфире, ацетоне.</p>
P217		<p>Вещество представляет собой желтый кристаллический порошок без запаха, растворимо в спирте, мало растворимо в воде, нерастворимо в диэтиловом эфире.</p>

PDMD		Вещество представляет собой желтый кристаллический порошок без запаха, растворимо в спирте, мало растворимо в воде.
PDMS		Вещество представляет собой бледно-желтый кристаллический порошок без запаха, растворимо в спирте, мало растворимо в воде.

В качестве препарата-сравнения в работе использовали холина альфосцерат (Глатилин, Италфармако, Италия) в дозе 50 мг/кг [72]. Исследуемые соединения и препарат сравнения вводились внутривентриально (изучаемые вещества в виде тонкодисперсной суспензии) после воспроизведения ЧМТ ежедневно на протяжении 3 дней.

### 2.3. Методы определения «острой» токсичности

Оценку «острой» токсичности изучаемых веществ PDMGG, PDMGLY, P217, PDMD и PDMS проводили на мышах-самцах линии Balb/c, в диапазоне доз исследуемых соединений 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2500 мг/кг, 5000 мг/кг и 10000 мг/кг, введение веществ осуществлялось дробно. При изучении острой токсичности клиническое наблюдение за каждым животным проводилось в течение первого часа после введения веществ, в последующем ежедневно. Фиксировалось общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину

дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания и окраска мочи. Осмотр животных в клетках содержания, с целью выявления смертности или признаков отклонения в общем состоянии, производили ежедневно. Через 14 дней после введения выжившие животные подверглись эвтаназии путем декапитации под эфирным наркозом. Расчет LD<sub>50</sub> производили по методу Финни [59].

#### **2.4. Методы воспроизведения черепно-мозговой травмы**

Черепно-мозговую травму у животных (крыс) моделировали методом свободного падения груза массой 150 грамм с высоты 50 см. Предварительно наркотизированных животных (хлоралгидрат, 350 мг/кг, внутривенно) помещали в установку, представляющую собой полый цилиндр с подложкой, после чего голова животного фиксировалась и груз «сбрасывали» на теменную область головы крыс через полый цилиндр. При этом величина технического люфта между грузом и стенками цилиндра составляла не более 1 мм, что в совокупности с иммобилизацией животных, исключала не точное и вариабельное нанесение «удара». Время экспозиции после воспроизведения ЧМТ составляло 3 суток, в течении данного времени осуществлялась фармакологическая коррекция ЧМТ [3, 84].

#### *Методы изучения неврологического дефицита*

Для оценки степени развития неврологического дефицита на этапе фармакологического скрининга использовали психометрическую шкалу McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной. Анализируемые показатели представлены в таблице 4. При этом сумма баллов 0,5-2,0 соответствовала легкой степени неврологического дефицита; 2,5-5,0 – средней степени тяжести; 5,5-10 тяжелой степени неврологического дефицита, при этом степень неврологического дефицита определяли по сумме соответствующих баллов [7].

**Таблица 4. Психометрическая шкала оценки неврологического дефицита McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной**

<b>Параметр</b>	<b>Балл</b>
Вялость	0.5
Тремор	1
односторонний полуптоз	1
двухсторонний полуптоз	1.5
неспособность отдергивать конечность при ее удержании	1.5
односторонний птоз	1.5
двухсторонний птоз	1.5
манежные движения	2.0
парез 1-4 конечности	2-5
паралич 1-4 конечности	3-6
кома	7.0
летальный исход	10.0

Далее для углубленного изучения степени развития неврологического дефицита в условиях экспериментальной ЧМТ применяли психометрическую шкалу *mNSS* – (*modified neurological severity score*) – специфичную систему оценки неврологической симптоматики при наличии травматического поражения головного мозга. Согласно системе оценки *mNSS* о степени проявления неврологического дефицита можно судить по сумме соответствующих баллов (табл.5), при этом общий балл в диапазоне от баллов 1 - 6 указывает на наличие ЧМТ легкой степени тяжести, балл от 7 до 12 - ЧМТ средней тяжести, сумма баллов 13-18 указывает на развитие тяжелой ЧМТ [94].

**Таблица 5. Психометрическая шкала оценки неврологического дефицита mNSS.**

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

## **2.5. Методы оценки сенсомоторного дефицита**

Оценку сенсомоторного дефицита проводили на установке «BeamWalking» (НПК «Открытая наука», Россия). Установка представляла собой сужающуюся дорожку длиной 165 см с бортами для фиксации падения конечностей животных и темной камерой в конце дорожки. Точка старта животных освещалась ярким светом, мотивируя животное двигаться к конечной цели – темной камере. Предварительно (до воспроизведения ЧМТ) животных обучали процедуре тестирования на протяжении 4-х дней. После чего животных подвергали повторному тестированию с определением степени сенсомоторного дефицита, при этом регистрировалось число полных постановок конечностей на борт и количество соскальзываний. Сенсомоторный дефицит рассчитывали по формуле (1)

Сенсомоторный дефицит, % = (число полных постановок конечностей на борт  $\times$  1 + число соскальзываний  $\times$  0,5) / общее число шагов [132].

## **2.6. Методы оценки психоэмоционального статуса экспериментальных животных**

### *Тест «открытое поле»*

Установка открытое поле представляет собой круглую арену диаметром 97 см с высотой стенок 42 см и 13 отверстиями (диаметр каждого 2 см) [Установка НПК «Открытая наука», Россия]. Животное помещали в центр арены, время тестирования составляло 3 мин., при этом регистрируемыми параметрами являлись: время в центральном секторе, число пересеченных секторов, число дефекаций, число уринаций, число эпизодов груминга, число стоек, число заглядываний [130].

### *Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»*

Установка приподнятый крестообразный лабиринт представляет собой 4-х рукавную систему, где 2 рукава являются открытыми, 2-закрытыми с высотой стенок 30 см. Размеры рукавов (50 см\*14 см) позволяют животному

свободно перемещаться [Установка НПК «Открытая наука», Россия]. При тестировании животное помещали в центр установки хвостом к закрытому рукаву, время тестирования составляло 5 мин. Регистрируемыми параметрами являлись: время в закрытых, открытых рукавах, время в центральном секторе, число эпизодов груминга, число стоек и свешиваний.

## **2.7. Методы оценки конгитивного статуса экспериментальных животных**

### *Тест «Водный лабиринт Морриса»*

Установка Водный лабиринт Морриса представляет собой водную арену диаметром 150 см с высотой стенок 60 см с подвижной площадкой диаметром 10 см. [Установка НПК «Открытая наука», Россия]. В ходе исследования установка заполнялась водой до уровня 50 см, после чего воду подкрашивали пищевым красителем. До моделирования ЧМТ крыс обучали процедуре тестирования: в течении 2 мин. животным предоставлялась возможность самостоятельно найти площадку, при условии невыполнения задачи крыс перемещали на площадку на 10 сек. после чего тестирование повторяли. После воспроизведения ЧМТ в аналогичных условиях повторяли тестирование, при этом регистрировали латентный период достижения площадки в сек.

### *Тест «Условный рефлекс пассивного избегания – УРПИ»*

Установка состояла из 2-х смежных отсеков, освещенного габаритами 60x40 см и затемненного габаритами 15x15 см, снабженного электростимулирующей подложкой и соединенного с большой камерой квадратным ходом 16 см<sup>2</sup>. Процедура тестирования: крысу помещали на середину площадки освещенной камеры, хвостом к темному отсеку и в течение 2-х минут регистрировали латентный период первого захода в темный отсек, где животное получало электроболевое раздражение (3

импульса мощностью 40 В). Перед воспроизведением ЧМТ животных обучали процедуре тестирования.

#### *Тест «Экстраполяционного избавления-ТЭИ»*

Экспериментальная установка представляет собой полимерный цилиндр диаметром 35 см, заполненный водой (20<sup>0</sup> С). В центре цилиндра закреплен внутренний акриловый цилиндр диаметром 9 см, высотой 22 см, нижний край которого погружен в воду на глубину 2,5 см.

Процедура тестирования: животное помещали во внутренний цилиндр, регистрировали его поведение (число безуспешных попыток избегания) и латентное время выполнения задачи (подныривание) в течении 2–х минут.

#### **2.8. Методы оценки изменения линейной скорости кровотока**

Линейную скорость кровотока регистрировали доплерографическим методом с применением системы ультразвукового доплерографа датчиком УЗОП-010-01 (25МГц) и компьютерной программой ММ-Д-К-Minimax Doppler v.2.1, («Минимакс Допплер» (Санкт – Петербург, Россия)). Оценку уровня линейного кровотока производили в теменной области головного мозга животных в проекции средней мозговой артерии. Для чего в правой теменной кости животного бором проделывали трепанационное отверстие, периодически охлаждая поверхность раствором 0,9% натрия хлорида, после чего устанавливали датчик доплерографа. В качестве среды использовали контактный гель «УНИАгель».

#### **2.9. Методы определения потребления глюкозы головным мозгом**

Потребление глюкозы головным мозгом оценивали по артерио-венозной разнице концентрации глюкозы. Содержание глюкозы в сыворотке крови определяли ферментативным фотометрическим тестом с использованием набора реактивов «Ольвекс Диагностикум» с применением автоматического биохимического анализатора BS-380 (Mindray).

Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки.

#### **2.10. Методы определения содержания лактата в сыворотке крови**

Определение молочной кислоты в сыворотке крови осуществляли ферментативным колориметрическим методом с применением стандартного набора реактивов производства компании «Ольвекс Диагностикум». Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки.

#### **2.11. Методы определения величины отека ткани головного мозга**

С целью определения степени гидратации мозговой ткани головной мозг извлекали и определяли величину отека в навеске массой  $500 \pm 2$  мг. Навеску взвешивали и высушивали в сушильном шкафу до достижения постоянной массы при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ . Затем производили повторное взвешивание. Степень гидратации выражали в процентах от исходной массы навески.

#### **2.12. Методы определения проницаемости гемато-энцефалического барьера**

Степень проницаемости ГЭБ определяли по уровню экстравазации красителя «синий Эванса» после внутривенного введения. 2% раствор синего Эванса вводили в яремную вену, после 30 мин. экспозиции животное декапитировали извлекали головной мозг. Ткань головного мозга гомогенизировали в 1,1 мл HEPES и центрифугировали (30 мин, 15000 об/мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Далее аликвоту в 500 мкл смешивали с эквивалентным объемом 50% раствора ТХУ, термостатировали 12 ч и центрифугировали в вышеописанном режиме. Концентрацию синего Эванса определяли методом спектрофотометрии при 610 нм. против HEPES+ТХУ. Для расчета степени проницаемости ГЭБ использовали стандартную расчетную кривую зависимости «концентрация-проницаемость» [101].

### **2.13. Методы электроэнцефалографического исследования**

ЭЭГ-исследования осуществляли с применением системы энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» («Нейрософт», Россия). Животное фиксировали в рестейнере (исключая стрессогенность) со свободным доступом к голове животного, после чего подкожно имплантировали электроды по стандартной методике «10-20». Регистрировали среднюю мощность альфа, дельта, тета, бета-низкочастотных и бета-высокочастотных ритмов в отведениях *FP1-A1*; *FP2-A2*; *C3-A1*; *C4-A2*. В процедуре ЭЭГ-анализа применяли стандартным программный аналитический комплекс «Нейрон-Спектр».

### **2.14. Методы оценки активности креатинфосфокиназы-BB**

Активность КФК-BB определяли в сопряженной креатинкиназной-гексокиназной-глюкозо-6-фосфат дегидрогеназной реакции в присутствии НАДФ. Среда инкубации: имидазольный буфер (рН 6,7), АДФ 20 ммоль/л, НАДФ 20 ммоль/л, креатинфосфат 300 ммоль/л, Г6ФДГ 20000 U/L, гексокиназа 30000 U/L. Объем исследуемого образца 100 мкл. (набор «Ольвекс Диагностикум»). Экстинкцию проб определяли при 340 нм в течение 5 минут с интервалом регистрации в 1 минуту. Активность КФК рассчитывали по формуле:  $U/L = 4127 * \Delta E_{340} / \text{мин}$ . Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки.

### **2.15. Методы оценки активности лактатдегидрогеназы**

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли кинетическим методом по способности катализировать реакцию образования лактата из пирувата в присутствии кофермента НАДН. Среда инкубации содержала: фосфатный буфер (рН 7,15), трис(гидроксиметил) –аминометан 50 ммоль/л, НАДН 0,9 ммоль/л. Объем исследуемого образца 100 мкл. (набор «Ольвекс Диагностикум»). Экстинкцию проб определяли при 340 нм в течение 5 минут с интервалом регистрации в 1 минуту. Активность ЛДГ рассчитывали по

формуле:  $U/L = 16030 \cdot \Delta E_{340} / \text{мин}$ . Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки.

### **2.16. Методы оценки концентрации гомоцистеина**

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

Оптическую плотность смеси регистрировали при 340 нм. Концентрацию гомоцистеина рассчитывали по кривой зависимости «оптическая плотность-концентрация» для стандартного образца гомоцистеина (DiaSyS) в диапазоне двукратных разведений. Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки.

### **2.17. Методы оценки эндотелиальной функции**

Вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия оценивали по изменению скорости церебрального кровотока в теменной области головного мозга крыс (см. «Методы оценки изменения скорости мозгового кровотока») в условиях введения модификаторов синтеза NO. В качестве таковых использовали: ацетилхолин (АЦХ) 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich), L-аргинин 150 мг/кг (Panreac), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L - NAME) 15 мг/кг (Sigma-Aldrich). Эндотелий-независимую вазодилатацию оценивали по реакции сосудов на введение нитроглицерина (НТГ, Биомед, Россия) 0,007 мг/кг. После проведения всех необходимых манипуляций животные выводились из эксперимента мгновенной декапитацией до выхода из наркоза

[17]. Антитромботическую функцию эндотелия сосудов оценивали по изменению степени и скорости агрегации тромбоцитов. Анализ производили на двухканальном лазерном агрегометре АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия), методом определения относительного среднего размера агрегатов. Ход анализа: в кювету анализатора вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37° С в течение 3-х минут. После инкубации добавляли индуктор агрегации - динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ, НПО «Ренам») в конечной концентрации 5 мкМ. Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали в течение пяти минут. По полученным агрегатограммам определяли степень и скорость агрегации кровяных пластинок [5]. Противовоспалительную функцию эндотелия сосудов оценивали по изменению концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови экспериментальных животных. В работе использовали стандартные наборы реактивов производства компании «Арбис+». Пробоподготовка и ход анализа соответствовал инструкции, включенной в набор.

## **2.18. Методы оценки антиоксидантной активности**

### *Оценка содержания белка по методу Фолина*

9 мл исследуемого материала вносили в центрифужную пробирку, добавляли 5 мл 20 % р-ра  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , после этого по каплям вливали 1 мл реактива Фолина, помещали на водяную баню при 37° С, затем на 30 мин оставляли при комнатной температуре и определяли оптическую плотность. Контрольная проба: 9 мл дистиллированной воды добавляют 5 мл 20 % р-ра  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 1 мл реактива Фолина [98].

### *Оценка содержания диеновых конъюгатов*

Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) в гомогенате (готовили в соотношении 1:7 на Трис-НСI буфере) головного мозга определяли спектрофотометрически при 233 нм. ДК извлекали смесью гептан:изопропанол (1:1). Количество ДК рассчитывали по молярному

коэффициенту экстинкции конъюгированных диенов при 233 нм  $2,2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  и выражали в нмоль /мг белка.

#### *Оценка содержания малонового диальдегида*

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) оценивали в гомогенате головного мозга спектрофотометрическим методом в реакции конденсации с 2-тиобарбитуровой кислотой, в ходе которой образующийся окрашенный комплекс имеет максимум поглощения при 532 нм. При этом окраска раствора пропорциональна концентрации малонового диальдегида. Количество МДА рассчитывали по величине молярного коэффициента экстинкции ( $1,56 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), полученные результаты выражали в нмоль/мг белка.

#### *Оценка активности каталазы*

Активность каталазы определяли в супернатанте (получали центрифугированием гомогената (см. выше) на холоду в режиме - 1000g/10 мин.) головного мозга спектрофотометрическим методом по скорости деструкции водорода пероксида. Количество пероксида водорода определяли в реакции с 4% раствором молибдата аммония. Интенсивность окраски продукта реакции оценивали при 410 нм. Активность каталазы рассчитывали по разности экстинкций опытной и холостой проб, используя коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода, равный  $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  и выражали в нмоль/мин/мг белка.

#### *Оценка активности супероксиддисмутазы*

Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали ксантиноксантинооксидазным методом, основанным на реакции дисмутации супероксидного радикала, образующегося в ходе окисления ксантина и восстановления 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорида. Среда инкубации содержала: ксантин 0,05 ммоль/л; 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия хлорид 0,025 ммоль/л; ЭДТА 0,94 ммоль/л, ксантиноксидаза 80 Ед/л, CAPS – 40 ммоль/л.

Оптическую плотность смеси регистрировали при 505 нм. Активность СОД выражали в ЕД/л.

#### *Оценка активности глутатионпероксидазы*

Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли в супернатанте гомогената головного мозга в сопряженной глутатионредуктазной реакции по убыли НАДФН. Среда инкубации содержала: 1 ммоль/л ЭДТА, 50мМ К,Na-фосфатный буфера, рН 7,4; 1 ед. акт./мл глутатиоредуктазы; 20 ммоль/л НАДФН; 1 ммоль/л GSH; 30-60 мкг белка на 1 мл среды. Оптическую плотность смеси регистрировали на КФК-3 при 340 нм. Реакцию начинали добавлением субстрата (гидропероксид кумола – 1,5 ммоль/л) и проводили при температуре 25<sup>0</sup>С. Активность ГП выражали в ед.акт /мг белка.

#### *Оценка активности глутатионредуктазы*

Принцип метода основан на способности глутатионредуктазы (ГР) катализировать реакцию восстановления глутатиона в присутствии НАДФН, убыль которого регистрируется спектрофотометрически при 340 нм. Активность фермента оценивали в супернатанте головного мозга. Среда инкубации содержала: калий-фосфатный буфер рН 7.3 – 250 ммоль/л; ЭДТА – 0,5 ммоль/л; GSSG – 2,2 ммоль/л; НАДФН – 0,17 ммоль/л. Оптическую плотность смеси регистрировали при 340 нм., активность ГР выражали в Ед/л.

#### *Оценка активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы*

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли в реакции убыли НАДФ+ в ходе энзиматической реакции в супернатанте головного мозга. Среда инкубации содержала: НАДФ+ - 0,34 ммоль/л; дигитонин – 0,8 ммоль/л; триэтаноламин – 31,7 ммоль/л; ЭДТА – 3,2 ммоль/л. рН среды составляла 7,6. Оптическую плотность смеси регистрировали при 340 нм. Активность фермента выражали в Ед/л.

## **2.19. Методы гистоморфологических исследований**

Гистоморфологическая оценка изменений мозговой ткани в условиях экспериментальной ЧМТ и ее фармакологической коррекции проводилась на кафедре морфологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, за что выражаем всем сотрудникам кафедры искреннюю благодарность. Гистологическое исследование реализовано с применением стандартных методик окрашивания: гематоксилин/эозин и окрашивания по Ниссля. Гистоморфологические изменения фиксировали с использованием лабораторного микроскопа LEICA DM 1000.

## **2.20. Методы иммуноферментного анализа**

Блок иммуноферментных исследований выполнен с применением системы микропланшетного ридера *Tecan «InfiniteF50»*. В работе использовали видоспецифичные наборы реактивов производства «Cloudclone» и стандартные протоколы ИФА анализа, прилагаемые к каждому набору. Сбор образцов сыворотки: образцы оставляли на 2 часа при комнатной температуре, затем центрифугировали при ускорении 1000 g, при использовании гомогенатов : ткани промывали в охлажденном фосфатно-солевом буфере, затем гомогенизировали в свежем лизис-буфере -1 мл лизис-буфера на 20-50 мг образца ткани, полученную суспензию обрабатывали ультразвуком до осветления и центрифугировали 5 минут при 10000 g. Дальнейший ход анализа выполняли в соответствии с рекомендациями производителя набора реактивов. При этом в сыворотке крови крыс определяли концентрацию: белка S100 $\beta$ , глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), нейрон-специфичной енолазы (NSE). В супернатанте головного мозга экспериментальных животных оценивали изменение содержания: апоптоз-индуцирующего фактора (AIF); каспазы -3 (CASP-3); c-Jun-концевой киназы (JNK), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), транспортера глюкозы 1 типа (GLUT-1) и концентрацию изоферментов

синтазы оксида азота (индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) и нейрональной изоформ (nNOS)).

### **2.21. Методы статистического анализа**

Результаты экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с применением возможностей программного комплекса «STATISTICA 6.0». Полученные данные подвергались тесту на нормальность распределения согласно критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения групп средних применяли параметрические методы- ANOVA с пост-тестом Ньюмена-Кейсла и непараметрические методы статического анализа – тест Краскела-Уоллиса. Отличия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **Глава 3. Изучение «острой» токсичности изучаемых соединений. Фармакологический скрининг**

### **3.1. Оценка «острой» токсичности изучаемых соединений**

Оценка «острой» токсичности вновь синтезируемых соединений является неотъемлемой частью экспериментальной фармакологии. На основании полученных в ходе данного этапа работы токсикометрических показателей можно судить о перспективе исследования синтезированного объекта: включение в дальнейший этап экспериментальной работы, либо исключение оцениваемого вещества из исследования в связи с высоким токсическим риском [11].

Оценку «острой» токсичности изучаемых веществ PDMGG, PDMGLY, P217, PDMD и PDMS проводили на мышах-самцах линии Balb/c, в диапазоне доз исследуемых соединений 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2500 мг/кг, 5000 мг/кг и 10000 мг/кг (n=10, каждая группа). В результате было установлено, что введение экспериментальным животным всех исследуемых соединений в дозовом интервале 500-5000 мг/кг не вызвало изменения поведения мышей. При введении изучаемых веществ в дозе 10000 мг/кг животные, после последнего введения, занимали боковое положения, визуально наблюдалось незначительное учащение дыхательных движений. При этом изменения состояния кожного и волосяного покровов, а также слизистых оболочек отмечено не было. Экспериментальные животные, на фоне введения исследуемых соединений в дозе 10000 мг/кг, на непродолжительное время (в среднем 0,5 часа) отказывались от приема пищи и воды, после чего пищевое поведение восстанавливалось, частота актов дефекации и мочеиспускания, а также характер каловых масс не менялся. Гибели животных отмечено не было.

Таким образом, при проведении оценки «острой» токсичности изучаемых соединений, значение LD<sub>50</sub> установить не удалось, т.к. в ходе

данного блока исследования гибели животных не наблюдалось и за показатель полуметальной дозы нами, для проведения дальнейших исследований, было выбрано значение максимально введенной дозы – 10000 мг/кг, а изучаемые производные пиримидин 4-(Н)-1она можно отнести к «практически не токсичным веществам» (5 класс токсичности по К.К. Сидорову) и 5-му классу опасности по СГС классификации ВОЗ [1,12].

### **3.2. Фармакологический скрининг**

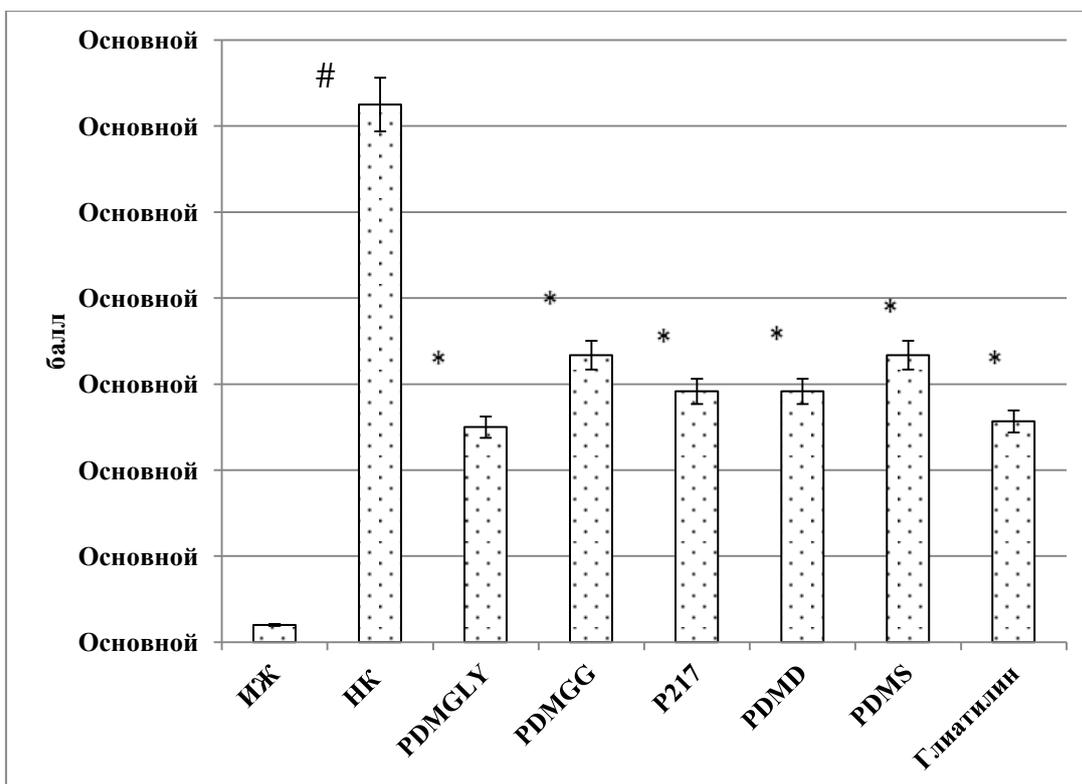
Скрининговое исследование фармакологической активности пептид-замещенных производных 1(Н)-пиримидин 4-она в условиях черепно-мозговой травмы проводилось посредством оценки влияния данных соединений на показатели неврологического и сенсомоторного дефицита, а также уровня мозгового кровотока экспериментальных животных (n=10, каждая группа).

Известно, что неврологический и сенсомоторный дефицит в условиях черепно-мозговой травмы играют существенную прогностическую роль и во многом позволяют определить тяжесть состояния [60], в то время как изменение уровня мозгового кровотока, способствует развитию вторичного каскада повреждения головного мозга, что усугубляет течение ЧМТ [81]. Таким образом, изучение влияния исследуемых соединений на показатели неврологического, сенсомоторного дефицита и уровень церебрального кровотока позволит выявить в ряду изучаемых объектов наиболее перспективное соединение, для дальнейшего углубленного изучения на предмет возможности его применения для терапии ЧМТ.

На данном этапе исследования все изучаемые объекты вводились в дозе 50 мг/кг (1/200 от LD<sub>50</sub>).

*Влияние исследуемых соединений на показатели неврологического дефицита экспериментальных животных в условиях ЧМТ*

Суммарный балл неврологического дефицита у группы животных НК составлял  $1,25 \pm 0,171$  ед. (рис.4). Применение глиатилина в условиях экспериментальной ЧМТ привело к уменьшению выраженности неврологического дефицита у крыс по отношению к группе животных НК в 2 раза ( $p < 0,05$ ).



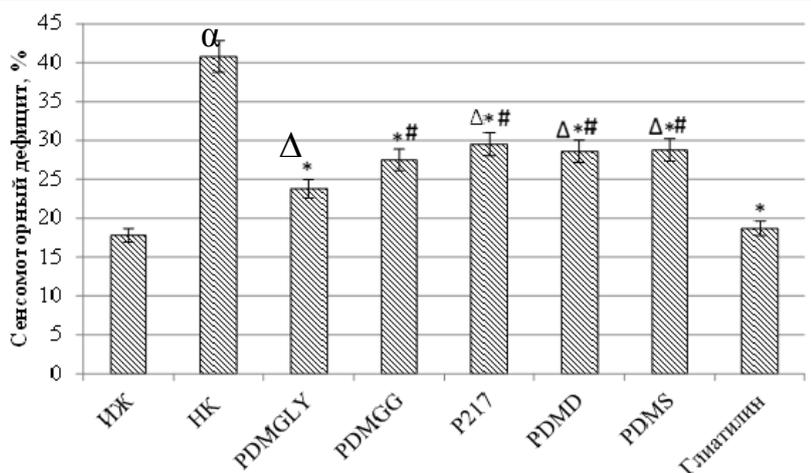
Обозначение: ИЖ – интактные животные; НК – группа крыс негативного контроля; PDMGLY – группа животных, получавшая соединение PDMGLY; PDMGG - группа животных, получавшая соединение PDMGG; P217 - группа животных, получавшая соединение P217; PDMD - группа животных, получавшая соединение PDMD; PDMS - группа животных, получавшая соединение PDMS; глиатилин - группа животных, получавшая соединение глиатилин; #- статистически значимо относительно группы животных ИЖ ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла); \*- статистически значимо относительно группы животных НК ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла).

**Рисунок 4. Изменение неврологического дефицита у крыс в условиях коррекции ЧМТ исследуемыми соединениями и глиатилином**

На фоне введения крысам исследуемых соединений PDMGLY, PDMGG, P217, PDMD и PDMS показатель неврологического дефицита относительно группы животных НК был ниже в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза; 2 ( $p < 0,05$ ) раза; 2,12 ( $p < 0,05$ ) раза; 2,13 ( $p < 0,05$ ) раза; 1,95 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. При этом статистически значимых отличий между группами животных, получавших исследуемые соединения и референтный препарат – глиатилин, установлено не было.

*Влияние исследуемых соединений на показатели сенсомоторного дефицита экспериментальных животных в условиях ЧМТ*

Сенсомоторный дефицит у группы крыс НК составлял  $40,8 \pm 2,191\%$ , что на 129,2% ( $p < 0,05$ ) превосходило показатель группы интактных животных (рис.5).



Обозначение:  $\alpha$ - статистически значимо относительно группы животных ИЖ ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла);

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

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

$\Delta$ - статистически значимо относительно группы животных, получавших PDMGLY ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла).

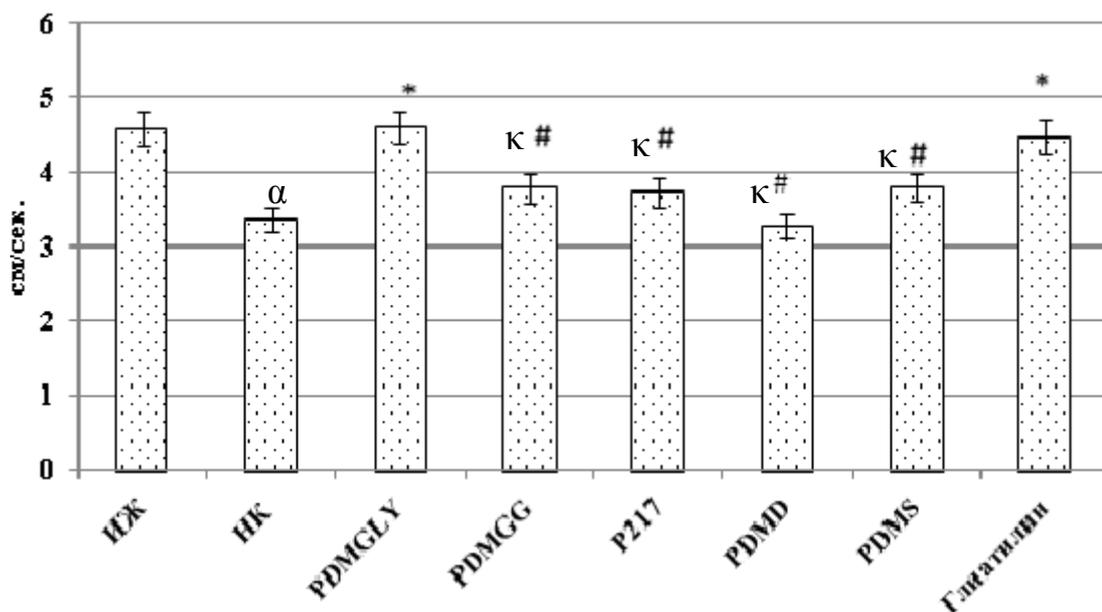
**Рисунок 5. Изменение сенсомоторного дефицита у крыс в условиях коррекции ЧМТ исследуемыми соединениями и глиатилином**

На фоне коррекции ЧМТ глиатилином и изучаемым объектом под лабораторным шифром PDMGLY сенсомоторный дефицит у крыс статистически значимо не отличался от аналогичного показателя группы интактных животных.

Также стоит отметить, что при применении соединения PDMGLY сенсомоторный дефицит был ниже относительно групп крыс, получавших соединения PDMGG, P217, PDMD, PDMS на 15,5% ( $p < 0,05$ ); 23,9% ( $p < 0,05$ ); 20,2% ( $p < 0,05$ ) и 21% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

*Влияние исследуемых соединений на изменение уровня линейной скорости кровотока крыс в условиях ЧМТ*

Линейная скорость кровотока у группы интактных животных составляла  $4,596 \pm 0,166$  см/сек. В условиях экспериментальной ЧМТ у крыс скорость церебрального кровотока снизилась относительно группы интактных животных на 36,1% ( $p < 0,05$ ) (рис.7).



Обозначение: α- статистически значимо относительно группы животных ИЖ ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла);

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

#- статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла).

к - статистически значимо относительно группы животных, получавших PDMGLY ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла).

**Рисунок 7. Изменение линейной скорости кровотока у крыс в условиях коррекции ЧМТ исследуемыми соединениями и глиатилином**

На фоне введения глиатилина и соединения PDMGLY (рис.7) линейная скорость кровотока статистически значимо не отличалась от аналогичного значения группы интактных крыс и превосходил показатель группы животных НК на 42,6% ( $p < 0,05$ ) и 36,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Применение соединений PDMD, PDMS, PDMGG и P217 значимого влияния на линейную скорость кровотока не оказало - статистически значимых отличий относительно группы крыс НК не установлено.

## Заключение

В ходе оценки «острой» токсичности новых пептид-замещенных производных 1(Н)-пиримидин 4-ОНа установлено, что данные соединения обладают низкой системной токсичностью применения, т.к. при проведении исследования, в виду отсутствия гибели экспериментальных животных значение  $LD_{50}$  установить не удалось, а максимально введенная доза изучаемых веществ составила 10000 мг/кг, что позволяет отнести исследуемые соединения к 5-му классу токсичности по СГС-классификации и классификации Сидорова К.К. и согласуется с литературными данными [14]. Проведенный в последствии фармакологический скрининг в ряду 5 производных пептид-замещенных производных 1(Н)-пиримидин 4-ОНа позволил установить, что по совокупности полученных данных объект под шифром PDMGLY обладает более выраженным цереброзащитным эффектом (применение данного соединения способствовало сохранению линейной скорости кровотока, уменьшало неврологический и сенсомоторный дефицит) в условиях экспериментальной ЧМТ нежели вещества P217, PDMGG, PDMD и PDMS. Следует отметить, что изучаемые показатели в группах животных, получавших референтный препарат глиатилин и исследуемое вещество PDMGLY, статистически значимо не отличались.

Таким образом, для проведения дальнейших исследований в качестве соединения–лидера нами был выбран изучаемый объект под шифром PDMGLY.

## **Глава 4. Изучение зависимости «доза-эффект» соединения-лидера – PDMGLY в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы**

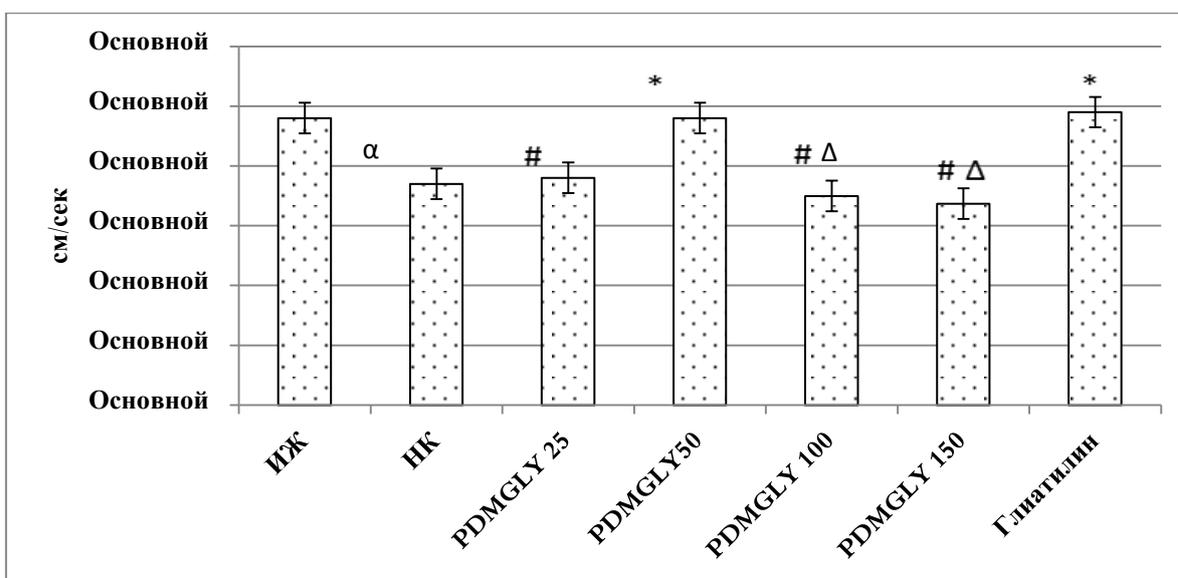
Известно, что оптимальный режим дозирования лекарственных средств во многом определяет эффективность проводимой фармакотерапии. Для многих препаратов существует сформированная зависимость величины фармакологического эффекта от дозы вводимого лекарственного средства [10]. При этом данная зависимость не всегда является линейной и с увеличением дозы препарата зачастую не наблюдается увеличение его терапевтической активности, но отмечается рост числа нежелательных реакций, вплоть до интоксикации организма [140].

Таким образом, оценка дозозависимого действия фармакологически активных субстанций является неотъемлемой и необходимой частью изучения новых лекарственных средств.

Оценка зависимости «доза-эффект» для соединения лидера проводилась в 4-х вариантах дозирования: 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100мг/кг, 150 мг/кг, посредством изучения влияния указанных доз соединений-лидера на изменение линейной скорости кровотока, сывороточной концентрации лактата и потребления глюкозы головным мозгом, а также специфического белка S100 $\beta$  методом ИФА в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы (n=10, каждая группа).

### **4.1. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение линейной скорости кровотока у крыс в условиях экспериментальной ЧМТ**

Линейная скорость кровотока у группы интактных животных (рис.8) составляла  $4,8 \pm 0,289$  см/сек. У группы крыс негативного контроля в условиях ЧМТ отмечено снижение линейной скорости кровотока на 29,7% ( $p < 0,05$ ).



Обозначение: ИЖ – группа интактных животных; НК – группа крыс негативного контроля; PDMGLY25 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 25 мг/кг; PDMGLY50 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг; PDMGLY100 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 100 мг/кг; PDMGLY150 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 150 мг/кг; Глиатилин – группа животных, получавшая глиатилин;

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

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

# - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ );

Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 8. Влияние различных доз соединения-лидера и препарата сравнения на линейный кровоток в условиях экспериментальной ЧМТ.**

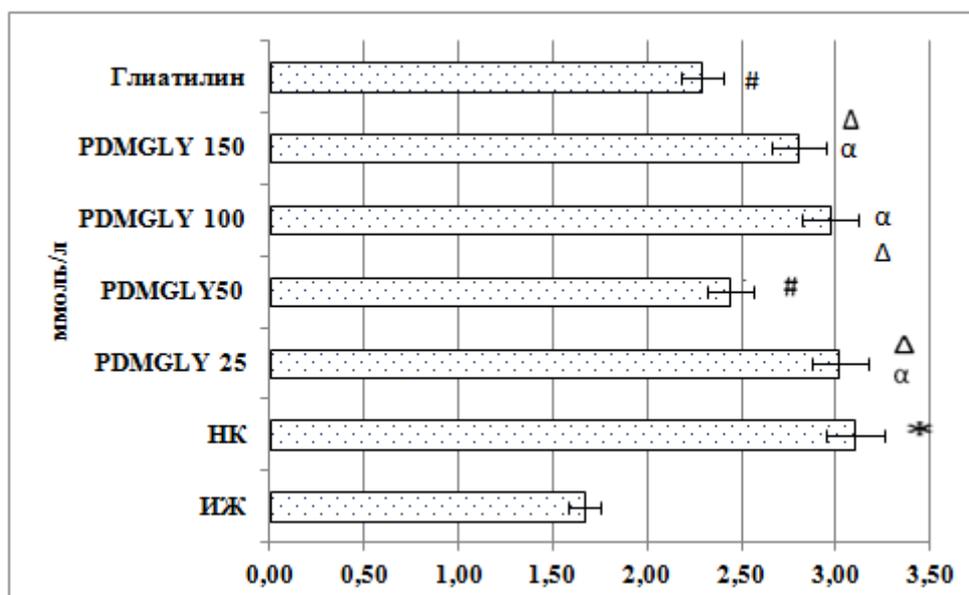
На фоне применения глиатилина (рис.8) линейная скорость кровотока статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя группы интактных крыс.

Введение экспериментальным животным соединения-лидера в дозах 25 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг значимого влияния на линейную скорость

кровотока в условиях ЧМТ не оказало (статистически значимых отличий по сравнению с группой крыс НК не установлено), в то время как применение соединения PDMGLY в дозе 50 мг/кг способствовало увеличению линейной скорости кровотока на 35% ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных НК, статистически значимых отличий между группами животных, получавших глиатилин и соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг, не установлено.

#### **4.2. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение сывороточной концентрации лактата в условиях экспериментальной ЧМТ**

У группы крыс НК в условиях экспериментальной ЧМТ концентрация лактата (рис.9) превосходила аналогичный показатель группы интактных животных ( $1,67 \pm 0,120$  ммоль/л) на 85,6% ( $p < 0,05$ ), что согласуется с литературными данными [24].



Обозначение: \* - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно ИЖ группы крыс ( $p < 0,05$ );

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

Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ( $p < 0,05$ );

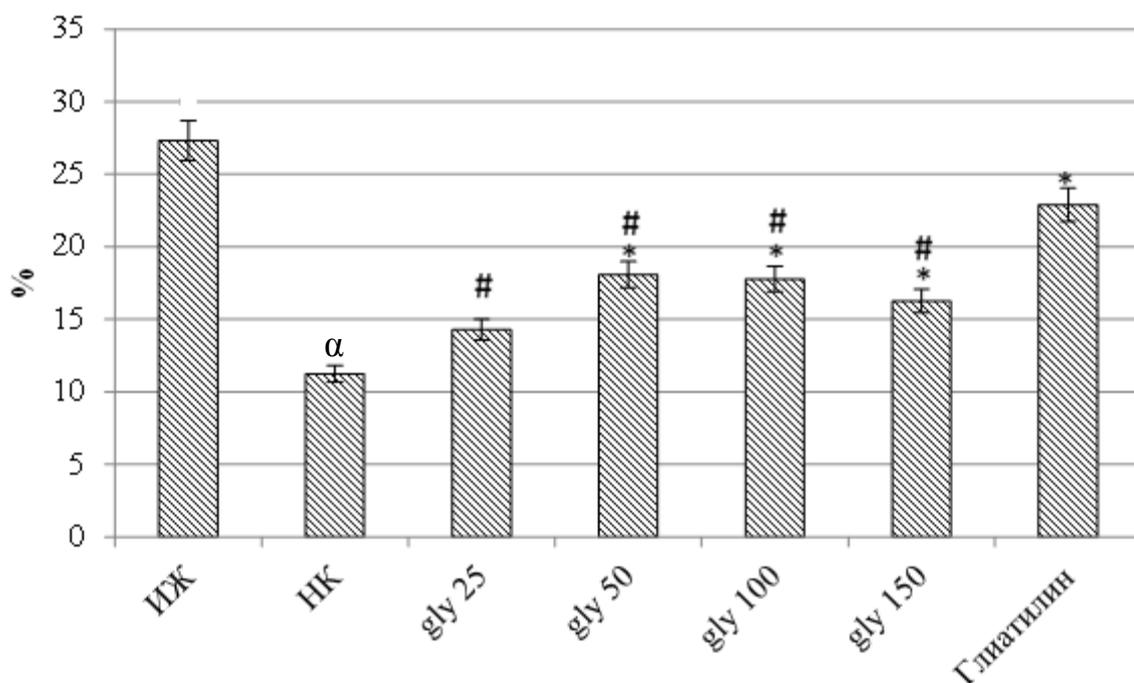
α - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших препарат глиатилин в дозе 50 мг/кг ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 9. Влияние различных доз соединения-лидера и препарата сравнения на изменение сывороточной концентрации лактата в условиях экспериментальной ЧМТ.**

При применении глиатилина и соединения-лидера в дозе 50 мг/кг содержание лактата по отношению к группе животных НК было ниже на 35,4% ( $p < 0,05$ ) и 27% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом введение доз соединения-лидера 25 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг значимого влияния на уровень лактата не оказало.

**4.3. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение уровня потребления глюкозы головным мозгом в условиях экспериментальной ЧМТ**

В условиях экспериментальной ЧМТ у группы крыс НК уровень потребления глюкозы головным мозгом был на 142,5% ( $p < 0,05$ ) ниже такового у группы интактных животных (рис.10).



Обозначение:  $\alpha$  - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно ИЖ группы крыс ( $p < 0,05$ )

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

# - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 10. Влияние различных доз соединения-лидера и препарата сравнения на изменение уровня потребления глюкозы головным мозгом крыс в условиях экспериментальной ЧМТ.**

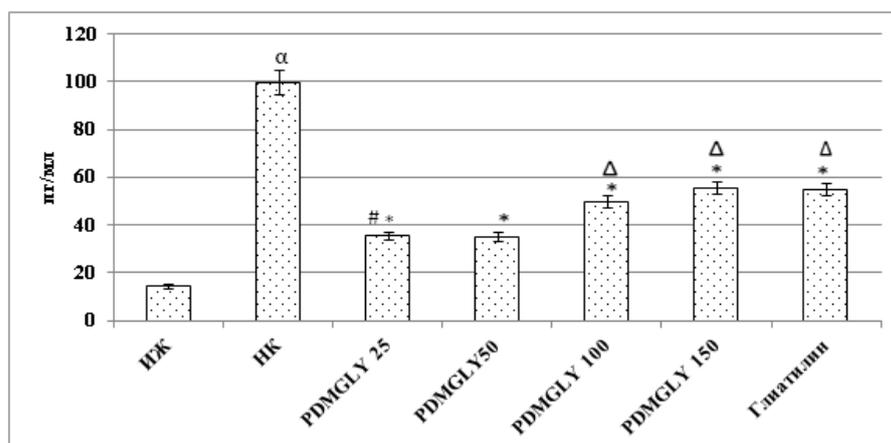
На фоне введения экспериментальным животным глиатилина потребление глюкозы головным мозгом превышало аналогичный показатель группы крыс НК на 103,3% ( $p < 0,05$ ).

Введение крысам изучаемого соединения PDMGLY в дозе 25 мг/кг значимого влияния на уровень потребления глюкозы головным мозгом не

оказало (статистически значимых отличий относительно группы животных НК не установлено), в то время как при применении данного соединения в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг потребление глюкозы головным мозгом крыс было выше на 60,6% ( $p < 0,05$ ); 57,8% ( $p < 0,05$ ) и 44,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем группы животных НК (рис.3).

#### 4.4. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение концентрации белка S100 $\beta$ в условиях экспериментальной ЧМТ

Концентрация цереброспецифичного белка S100 $\beta$  в сыворотке крови интактных крыс составляла  $14,58 \pm 1,136$  пг/мл (рис.11). У группы животных НК в условиях экспериментальной ЧМТ сывороточное содержание S100 $\beta$  была выше аналогичного показателя интактных крыс в 6,9 ( $p < 0,05$ ) раза.



Обозначение:  $\alpha$  - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс ИЖ ( $p < 0,05$ );

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

# - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ );

$\Delta$  - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 11. Влияние различных доз соединения-лидера и препарата сравнения на изменение сывороточной концентрации белка S100 $\beta$  в условиях экспериментальной ЧМТ.**

На фоне введения крысам глиатилина концентрация белка S100 $\beta$  по сравнению с группой животных НК была меньше в 1,72 ( $p < 0,05$ ) раза, но при этом была выше по отношению к группе крыс, получавших соединение-лидер в дозе 50 мг/кг в 1,53 ( $p < 0,05$ ) раза.

При применении изучаемого соединения-лидера в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг содержание S100 $\beta$  было ниже по отношению к группе крыс НК в 2,63 ( $p < 0,05$ ) раза; 2,65 ( $p < 0,05$ ) раза, в 1,81 ( $p < 0,05$ ) раза и в 1,75 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно.

### **Заключение**

Было установлено, что в условиях ЧМТ наблюдается ухудшение утилизации глюкозы на 142,5% ( $p < 0,05$ ), увеличение уровня лактата на 85,6 % ( $p < 0,05$ ), нарушение уровня церебрального кровотока на 29,7 % ( $p < 0,05$ ), а также увеличение концентрации цереброспецифичного белка S100 $\beta$  в 6,9 раз ( $p < 0,05$ ), по отношению к группе интактных животных. Введение референтного препарата способствовало улучшению утилизации глюкозы на 142,5 % ( $p < 0,05$ ), снижению концентрации лактата на 35,4 % ( $p < 0,05$ ), сохранению уровня церебрального кровотока по отношению к группе животных без фармакологической поддержки.

Проведенная оценка зависимости «доза-эффект» для соединения-лидера позволила установить, что наиболее выраженное церебротропное действие соединение PDMGLY оказывает в дозе 50 мг/кг. Данный факт подтверждается тем, что в условиях экспериментальной ЧМТ применение соединения-лидера в дозе 50 мг/кг позволило наиболее выражено скорректировать возникший лактат-ацидоз (снижение концентрации молочной кислоты по отношению к животным без фармакологической поддержки на 27% ( $p < 0,05$ )), энергодефицит (повышение уровня утилизации глюкозы головным мозгом на 60,6% ( $p < 0,05$ )), а также способствовало увеличению скорости церебрального кровотока (на 35% ( $p < 0,05$ )). Кроме

того, концентрация цереброспецифического белка S100 $\beta$ , позволяющего с достаточной точностью определить, как степень тяжести ЧМТ [124], так и эффективность проводимой фармакокоррекции данного состояния [145] была существенно ниже при применении соединения-лидера в дозе 50 мг/кг. Следует отметить, что концентрация белка S100 $\beta$  на фоне соединения-лидера в дозе 50 мг/кг была ниже по отношению к группе животных, получавших глиатилин. Такие показатели, как линейная скорость кровотока и концентрация лактата при введении соединения-лидера в дозе 50 мг/кг значимо не отличалась от животных, получавших референтный препарат.

Таким образом, для проведения дальнейшего углубленного изучения церебротропных свойств соединения PDMGLY в условиях экспериментальной ЧМТ по совокупности изученных показателей была выбрана доза 50 мг/кг.

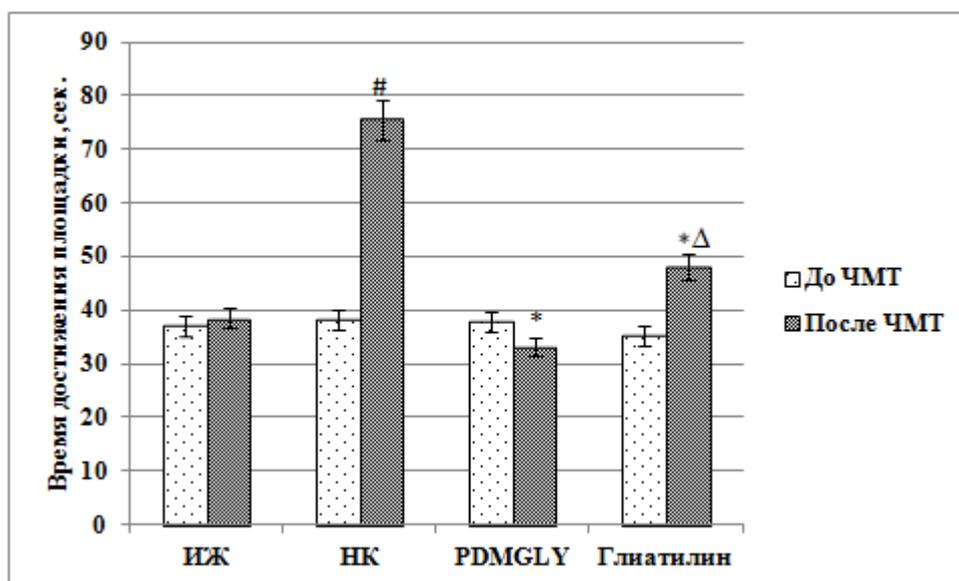
## **Глава 5. Оценка ноотропной активности и влияния соединения-лидера PDMGLY на психо-эмоциональный статус животных в условиях экспериментальной ЧМТ**

Известно, что последствием ЧМТ является кратко- и долгосрочный когнитивный дефицит, проявляющийся, как правило, в нарушении внимания, обучения, памяти и высших интегративных функций. Когнитивные нарушения возникают в наиболее уязвимых структурах головного мозга, таких как: префронтальная кора, гиппокамп, медиальные височные доли [151]. Немало важно, что развитие когнитивного дефицита коррелирует с тяжестью ЧМТ, так в 15% случаев легкой черепно-мозговой наблюдается развитие когнитивной дисфункции, тогда как средне-тяжелая ЧМТ способствует проявлению когнитивного дефицита в более чем 50% случаев [92]. Кроме того, повреждение, в результате ЧМТ, структур мозга, ответственных за эмоционально-мотивационный компонент деятельности (лимбическая система) ведет к нарушению психо-эмоционального фона и ухудшает течение ЧМТ, а также способствует проявлению ранних осложнений травмы мозга, таких как частые головные боли [152]. Таким образом, в условиях ЧМТ коррекция когнитивного дефицита, а также восстановление оптимального психо-эмоционального фона является неотъемлемой частью рациональной фармакотерапии, что предполагает наличие у препаратов-корректоров ЧМТ ноотропной активности и способности восстанавливать психо-эмоциональный статус в условиях травмы мозга.

### **5.1. Оценка ноотропной активности соединения-лидера**

Изучение ноотропной активности соединения-лидера проводили в тестах: «водный лабиринт Морриса», «УРПИ» и ТЭИ» (n=10, каждая группа). До воспроизведения ЧМТ животные были рандомизированы по поведению в вышеуказанных тестах.

Оценивая поведения животных в тесте «водный лабиринт Морриса» установлено, что после воспроизведения ЧМТ крысы группы НК тратили на «решение задачи» (поиск платформы) на 70,1 % ( $p < 0,05$ ) больше времени, чем интактные животные (рис.12). Применение соединения PDMGLY оказало положительное влияние на когнитивную функцию экспериментальных животных, что нашло отражение в уменьшении затраченного на поиск платформы времени, крысами, получавшими исследуемое вещество, на 58 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой животных НК, кроме того, установлено, что данный показатель был меньше в отношении группы животных, получавших глиатилин на 35 % ( $p < 0,05$ ).



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

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

Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY ( $p < 0,05$ ).

**Рисунок 12. Влияние соединения-лидера и глиатилина на скорость выполнения «задачи» в тесте «водный лабиринт Морриса».**

В тесте «УРПИ» (табл.6) у интактных животных при повторном воспроизведении испытания латентное время захода в темный отсек

превосходило исходное значение данной группы крыс на 79% ( $p < 0,05$ ).  
Остальные изучаемые показатели статистически значимо не изменились.

**Таблица 6. Влияние соединения-лидера и глиатилина на активность животных тесте «УРПИ».**

Группа	Латентное время захода в темный отсек, сек.	Время в темном отсеке, сек.	Время в светлом отсеке, сек.
	До ЧМТ (исходное значение)		
ИЖ	30±2,708	4,7±0,882	115,3±0,882
НК	33,4±4,817	5,3±0,76	114,7±0,76
PDMGLY	34,2±4,586	6±1,155	114±1,155
Глиатилин	30,8±2,104	5,8±1,352	114,2±1,352
После ЧМТ			
ИЖ (без ЧМТ)	53,7±2,418#	4,5±0,922	115,5±0,922
НК	25,5±2,693*	12±0,966*#	108±0,966
PDMGLY	45,7±3,084Δ#	8,7±0,803Δ	111,3±0,803
Глиатилин	35,2±2,989*	9,5±0,847*	110,5±0,847

Примечание: \*- статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

Δ- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

#- статистически значимо относительно исходного значения (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ )

В условиях ЧМТ у крыс группы НК при повторном тестировании время первого захода в темный отсек было меньше показателя интактной группы животных на 110,6% ( $p < 0,05$ ). Кроме того у группы крыс НК время пребывания в темном отсеке увеличилось на 140% ( $p < 0,05$ ) по отношению к исходному показателю данной группы животных и на 166,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным оцениваемым параметром интактной группы животных при повторном тестировании (табл.6).

Введение животным соединения-лидера способствовало увеличению времени первого захода в темный отсек на 33,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с первоначальным значением данной группы крыс и на 79,2% ( $p < 0,05$ )

относительно группы животных НК (табл.6). Кроме того, продолжительность нахождения крыс в темном отсеке на фоне введения соединения лидера было меньше такового у группы животных НК на 26,3% ( $p < 0,05$ ).

На фоне применения глиатилина значимых отличий по отношению к группе животных НК по изучаемым параметрам не наблюдалось.

В тесте «ТЭИ» у группы интактных животных время «подныривания» при повторном тестировании было на 57% ( $p < 0,05$ ) меньше исходного показателя данной группы крыс. У животных группы НК латентное время «избегания» превосходило таковое у интактных животных в 3,2 ( $p < 0,05$ ) раза и было выше первоначального показателя данной группы крыс на 90% ( $p < 0,05$ ). Также у животных группы НК наблюдалось увеличение количества неудачных попыток «избегания» по отношению к интактным крысам на 131,9% ( $p < 0,05$ ) и в 3,5 ( $p < 0,05$ ) раза относительно исходного значения группы животных НК (табл.7).

**Таблица 7. Влияние соединения-лидера и глиатилина на активность животных тесте «ТЭИ».**

Показатель	ИЖ	НК	PDMGLY	Глиатилин
	До ЧМТ (исходное значение)			
Латентное время подныривания, сек.	30,3±2,552	32±2,352	30,5±2,825	33,8±2,971
Число неудачных попыток избегания, ед.	9±1,39	7,5±1,025	8,3±1,145	7,3±1,563
После ЧМТ				
Латентное время подныривания, сек.	19,3±1,229#	60,8±1,682*#	43±3,337Δ	58,4±1,844*#
Число неудачных попыток избегания, ед.	11,3±1,282	26,2±1,222*#	13,3±0,919Δ	22,1±1,414*#

Примечание:

\*- статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

Δ- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

#- статистически значимо относительно исходного значения (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ )

На фоне применения глиатилина латентное время «подныривания» и число неудачных попыток избегания относительно группы крыс НК статистически значимо не изменилось.

Применение соединения-лидера в условиях ЧМТ способствовало снижению латентного периода «избегания» по отношению к крысам без фармакологической поддержки на 48,3% ( $p < 0,05$ ). Число безуспешных попыток «избегания» на фоне введения экспериментальным животным соединения-лидера также уменьшилось на 118,3% ( $p < 0,05$ ) относительно группы крыс НК.

## **5.2. Оценка влияния соединения-лидера на изменение психо-эмоционального статуса животных в условиях экспериментальной ЧМТ**

В данной серии экспериментов применялся комплексный подход к оценке психо-эмоционального статуса животных с изучением поведенческой активности крыс в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», позволяющих оценить целостность функциональной реакции ЦНС животных: уровень локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности и тревожности. Формирование экспериментальных групп осуществляли после предварительной рандомизации (первоначальный показатель) животных по уровню поведенческой активности в вышеперечисленных тестах.

В тесте «открытое поле» у животных группы НК после ЧМТ установлено снижение локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности, а также повышение уровня тревожности, о чем свидетельствует уменьшение количества пересеченных секторов, стоек и заглядываний у данной группы крыс по отношению к группе интактных животных на 92,8% ( $p < 0,05$ ), 100% ( $p < 0,05$ ) и 91,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а также повышение числа эпизодов груминга и времени пребывания в центральном секторе на

108,6% ( $p<0,05$ ) и 61,4% ( $p<0,05$ ) соответственно (табл.8). Остальные изучаемые параметры статистически значимо не изменились (табл.8).

**Таблица 8. Влияние соединения-лидера и глиятилина на активность животных в тесте «открытое поле».**

Группа	Время в центр. секторе, сек.	Число пересеченных секторов, ед.	Число дефекаций, ед.	Число уринаций, ед.	Грумминг, ед.	Число стоек, ед.	Число заглядываний, ед.
	до ЧМТ (исходные значения)						
ИЖ	2,6±0,523	12,9±1,323	1,7±0,714	0,5±0,522	3,8±1,03	4,1±0,612	3,2±0,4
НК	2,3±0,481	12,6±1,397	1,6±0,786	0,4±0,511	3,4±1,07	3,9±0,696	3,3±0,5
Глиатилин	2,6±0,258	13,1±1,314	1,4±0,374	0,1±0,214	3,7±0,217	4±0,115	3,6±0,217
PDMGL Y	2,5±0,244	12,5±0,774	1,5±0,569	0,2±0,337	3,5±0,299	3,7±0,697	3,7±0,259
После ЧМТ							
ИЖ	2,8±0,42	13,3±0,82	1,8±0,6	0,5±0,5	3,5±1,35	3,8±0,6	2,3±0,5
НК	4,5±0,112* #	6,9±0,391*#	1,6±0,5	0,1±0,3	7,3±0,67*#	1,9±0,829* #	1,2±0,563*#
Глиатилин	4,1±0,247	7,4±0,266*	2±0,147	0,6±0,127	6,7±0,369* #	2,4±0,257#	2,0±0,127*#
PDMGL Y	1,5±0,234Δ	10,4±0,288Δ	1,4±0,241	0,1±0,374	2,7±0,416 Δ	3,4±0,413Δ	3±0,234Δ

Примечание: \*- статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p<0,05$ );

Δ- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p<0,05$ );

#- статистически значимо относительно исходного значения (критерий Краскела-Уоллиса,  $p<0,05$ )

На фоне применения глиятилина у крыс в условиях ЧМТ число стоек, заглядываний, пересеченных секторов, грумминг, а также время в центральном секторе по отношению к группе животных НК значимо не изменилось.

У животных, получавших соединение-лидер в тесте «открытое поле» отмечено увеличение числа пройденных секторов, стоек и заглядываний по отношению к группе крыс НК на 50,7% ( $p<0,05$ ); 78,9% ( $p<0,05$ ) и 150% ( $p<0,05$ ) соответственно. Кроме того у животных на фоне введения соединения-лидера отмечено снижение уровня тревожности, о чем

свидетельствует уменьшение времени пребывания крыс в центральном секторе «открытого поля», а также количества эпизодов груминга у данной группы животных относительно группы крыс НК на 200 % ( $p < 0,05$ ) и 170,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (табл.9) у группы крыс НК после воспроизведения ЧМТ установлено снижение времени пребывания животных в открытых рукавах креста относительно группы интактных крыс на 176,2 % ( $p < 0,05$ ), а также увеличение числа эпизодов груминга на 138,7 % ( $p < 0,05$ ), уменьшение количества переходов и свешиваний на 81,1 % ( $p < 0,05$ ) и 220 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

**Таблица 9. Влияние соединения-лидера и глиагилина на активность животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».**

Группа	Время в откр.рукавах, сек.	Время в закр.рукавах,сек.к.	Время в центре,сек.	Груминг, ед.	Кол-во свешиваний, ед.	Кол-во переходов, ед.
	до ЧМТ (исходные значения)					
ИЖ	32,3±1,614	258,6±1,245	9,1±0,397	3,8±0,634	4,3±0,672	6,3±0,951
НК	33,8±3,3	254,7±12,1	11,5±0,245	3,3±0,48	4,2±0,630	6,8±0,92
Глиагилин	30,2±2,317	248,1±0,397	21,7±2,971	3,4±0,954	4,5±0,571	7±0,885
PDMGLY	34,5±0,247	247,6±1,971	17,9±1,264	3,6±1,244	4,2±1,021	6,5±0,446
После ЧМТ						
ИЖ	23,2±3,025	267,2±7,201	9,6±0,774	3,1±0,571	3,2±0,427	6,7±0,679
НК	8,4±1,953*#	280,2±3,418#	11,4±0,443	7,4±1,074* #	1±0,673*#	3,7±0,482* #
Глиагилин	8,6±1,274	275,3±2,322	16,1±2,782	6,5±0,652*	1,7±0,552*#	4,3±0,171* #
PDMGLY	20,9±1,175Δ	267,4±2,974	11,7±0,756	3,5±0,971Δ	4,7±0,844Δ	5,8±0,128Δ

Примечание: \*- статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

Δ- статистически значимо относительно группы животных НК (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ );

#- статистически значимо относительно исходного значения (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ ).

На фоне введения крысам соединения-лидера (табл.9) в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у животных отмечено увеличение времени пребывания в открытых рукавах креста, количества свешиваний и переходов по отношению к группе крыс НК на 148,8 % ( $p < 0,05$ ); в 4,7 ( $p < 0,05$ ) раза и на 56,8 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, при этом число событий груминга, напротив, уменьшилось на 114,4 % ( $p < 0,05$ ). Тогда как, применение глиатилина значимого влияния на выше перечисленные показатели не оказало.

### **Заключение**

Известно, что в эксперименте и клинической практике ЧМТ сопровождается когнитивным дефицитом различной степени выраженности [143], а также ухудшением социальной адаптации и психо-эмоционального фона [43]. В ходе проведения исследования получены данные, согласующиеся с литературными источниками [134], и позволяющие предполагать наличие когнитивного дефицита, а также нарушение психо-эмоционального фона у животных, не получавших фармакологическую поддержку. При этом когнитивная дисфункция у крыс группы НК выражалась в ухудшении памятного следа, что подтверждалось в тестах «водный лабиринт Морриса», «УРПИ» и «ТЭИ». Сбой целостной реакции ЦНС у животных группы НК нашел отражение в снижении локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности, а также повышении уровня тревожности, что также согласуется с ранее проведенными исследованиями [147]. Применение исследуемого соединения-лидера способствовало устранению, как когнитивного дефицита, так и психо-эмоционального дисбаланса, превосходя фармакологическое действие глиатилина. При этом на фоне введения животным соединения PDMGLY отмечено восстановление памятного следа, снижение уровня тревожности, сохранение на оптимальном уровне локомоторной и ориентировочно-исследовательской видов активности. В совокупности полученные данные позволяют предполагать

наличие у соединения-лидера ноотропной активности, а также способности восстанавливать психо-эмоциональный фон экспериментальных животных в условиях ЧМТ.

## **Глава 6. Изучение церебропротекторной активности соединения-лидера и препарата сравнения в условиях экспериментальной ЧМТ**

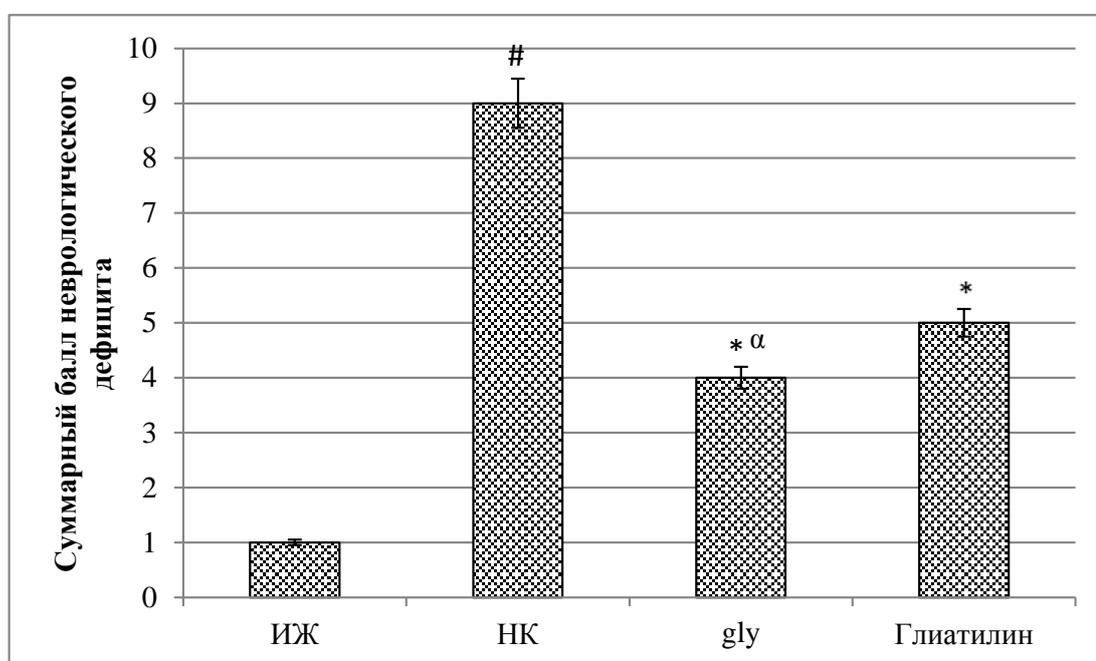
Исследование церебропротекторных свойств соединения-лидера и препарата сравнения в условиях экспериментальной ЧМТ проводили посредством оценки степени проявления неврологического дефицита по модифицированной шкале *NSS* (*mNSS* – *modified neurological severity score*), выраженности отека головного мозга и проницаемости ГЭБ, изменения концентрации специфических маркеров развития ЧМТ - нейрон-специфической енолазы (NSE) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), а также некоторых биохимических показателей (активность лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы-BB), также проводилось гистоморфологическое исследование ткани мозга экспериментальных животных. Кроме того, учитывая тот факт, что в условиях ЧМТ отмечается развитие электрофизиологических нарушений в головном мозге [121], нами оценивался его биоэлектрический потенциал в электроэнцефалографическом исследовании (n=10, каждая группа).

### **6.1. Влияние соединения-лидера *gly* и препарата сравнения на степень выраженности неврологического дефицита по шкале *mNSS***

Шкала *mNSS* является специфичным методом оценки посттравматических неврологических расстройств и предполагает наличие двигательных, сенсорных, балансовых и рефлекс-тестов. Общим критерием наличия неврологического дефицита служит балльная система оценки от 0 до 18 баллов, где общий балл в диапазоне от 13-18 указывает на развитие тяжелой ЧМТ, балл от 7 до 12 - ЧМТ средней тяжести, а сумма баллов 1 - 6 – ЧМТ легкой степени тяжести [162].

Оценивая степень развития неврологического дефицита у животных в условиях ЧМТ установлено, что у крыс группы НК суммарный балл неврологического дефицита составлял  $9 \pm 0,442$  усл.ед., превосходя в 9 раз

( $p < 0,05$ ) аналогичное значение ИЖ группы животных (рис.13), на основании чего можно предполагать развитие у крыс группы НК ЧМТ средней степени тяжести. Применение препарата сравнения способствовало уменьшению неврологической симптоматики в условиях экспериментальной ЧМТ, о чем свидетельствует снижение на 80% ( $p < 0,05$ ) суммарного балла шкалы mNSS у крыс, получавших глиатилин, по отношению к группе животных НК (рис.13). На фоне введения изучаемого соединения общий балл неврологического дефицита у животных был меньше по отношению к группе крыс НК на 125% ( $p < 0,05$ ) и на 26,8% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с животными, получавшими глиатилин.



Обозначение: #- статистически значимо по сравнению с группой крыс ИЖ (критерий Ньюмена-Кейсла, ( $p < 0,05$ ));

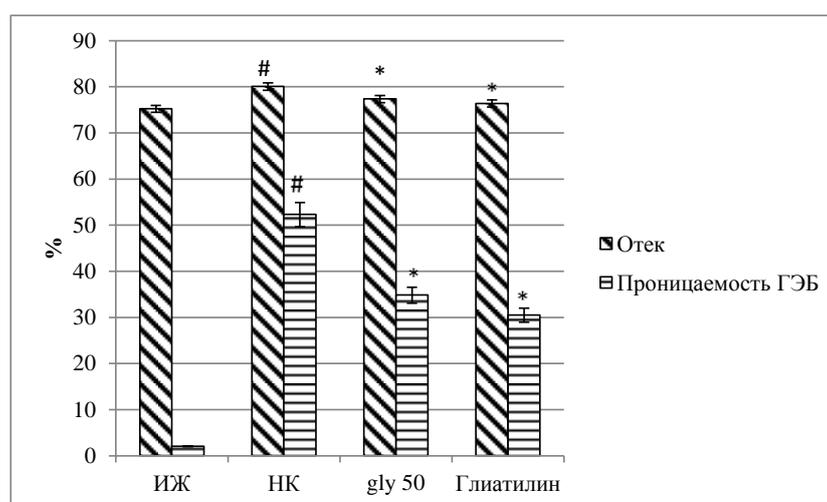
\*- статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Ньюмена-Кейсла, ( $p < 0,05$ ))

α - статистически значимо по сравнению с группой крыс, получавших глиатилин (критерий Ньюмена-Кейсла, ( $p < 0,05$ ))

**Рисунок 13. Изменение неврологической симптоматики по шкале mNSS у животных в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ соединением PDMGLY и препаратом сравнения.**

## 6.2. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на степень выраженности посттравматического отека головного мозга и проницаемость ГЭБ у животных в условиях экспериментальной ЧМТ

Оценивая изменение величины отека головного мозга в условиях экспериментальной ЧМТ установлено, что у крыс, лишенных фармакологической поддержки, степень гидратации головного мозга превышала аналогичное значение группы животных ИЖ на 6,4 % ( $p < 0,05$ ) (рис.14). На фоне введения глиатилина у крыс величина посттравматического отека головного мозга была ниже на 3,5 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных НК. Применение исследуемого соединения PDMGLY способствовало снижению степени гидратации головного мозга крыс в условиях ЧМТ относительно животных, лишенных фармакологической поддержки на 4,8 % ( $p < 0,05$ ).



Обозначение: #- статистически значимо по сравнению с ИЖ группой крыс (критерий Краскела-Уоллиса, ( $p < 0,05$ ));

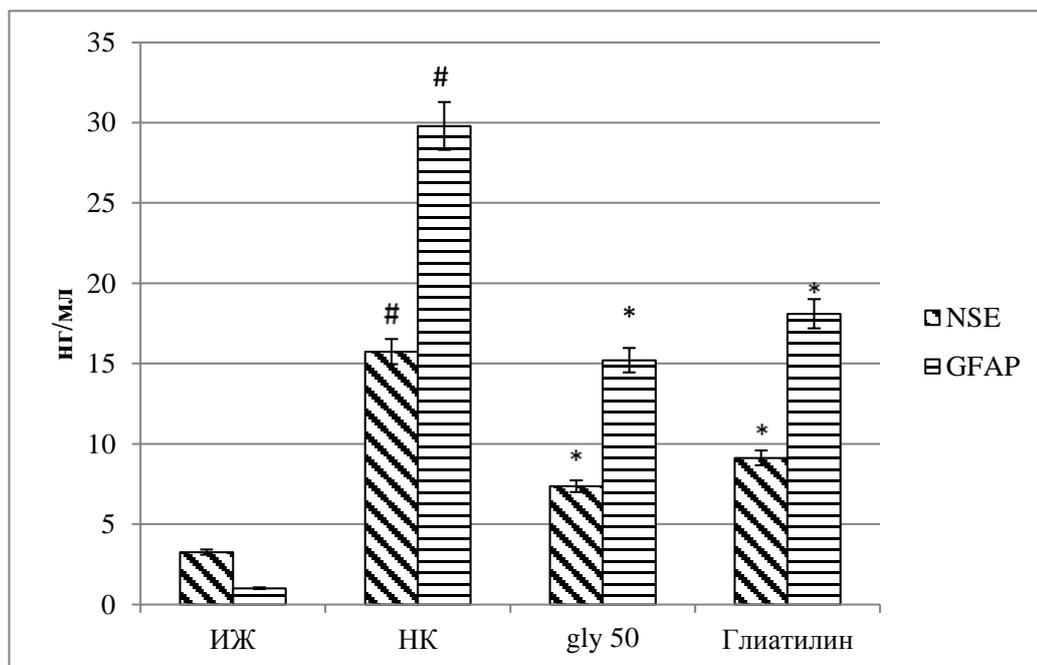
\*- статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Краскела-Уоллиса, ( $p < 0,05$ )).

**Рисунок 14. Изменение величины посттравматического отека и проницаемости ГЭБ у животных в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ соединением PDMGLY и препаратом сравнения.**

В условиях ЧМТ у животных группы НК отмечено повышение проницаемости ГЭБ по отношению к группе крыс ИЖ в 25,8 ( $p < 0,05$ ) раза (рис.14). У животных, получавших глиатилини соединение PDMGLY, проницаемость ГЭБ относительно группы крыс НК была снижена 74,5 % ( $p < 0,05$ ) и на 50,3 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой крыс, лишенных фармакологической поддержки. При этом статистически значимых отличий между группами животных, которым вводили соединение-лидер и препарат сравнения, не установлено.

### **6.3. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации нейрон-специфической энолазы и глиального фибриллярного кислого белка у животных в условиях экспериментальной ЧМТ**

Изменение концентрации нейрон-специфичной енолазы (NSE) является диагностическим маркером степени повреждения головного мозга и прямо коррелирует с величиной церебральной деструкции. NSE экспрессированна в астроцитах и олигодендроцитах, участвует в паракринной регуляции активности клеток глии, и нейронов. Повышенный уровень NSE оказывает токсическое действие на нейроны головного мозга, стимулируя образование провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ ) и индуцируя апоптоз в нейрональных клетках [74]. В ходе проведения данного блока исследований установлено повышение концентрации NSE у группы крыс НК по сравнению с группой животных ИЖ в 4,8 раза ( $p < 0,05$ ) (рис.4). У крыс, получавших глиатилин, концентрация NSE была на 113,9 % ( $p < 0,05$ ) ниже относительно группы животных НК, в то время как в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ введением исследуемого соединения PDMGLY содержание NSE у крыс было снижено по отношению к группе животных без фармакологической поддержки на 72,6 % ( $p < 0,05$ ).



Обозначение: ИЖ – группа интактных животных; НК – группа крыс негативного контроля; PDMGLY – группа животных, получавшая соединение PDMGLY; Глиатилин – группа животных, получавшая глиатилин;

#- статистически значимо по сравнению с ИЖ группой крыс (критерий Краскела-Уоллиса, ( $p < 0,05$ ));

\*- статистически значимо по сравнению с НК группой крыс (критерий Краскела-Уоллиса, ( $p < 0,05$ )).

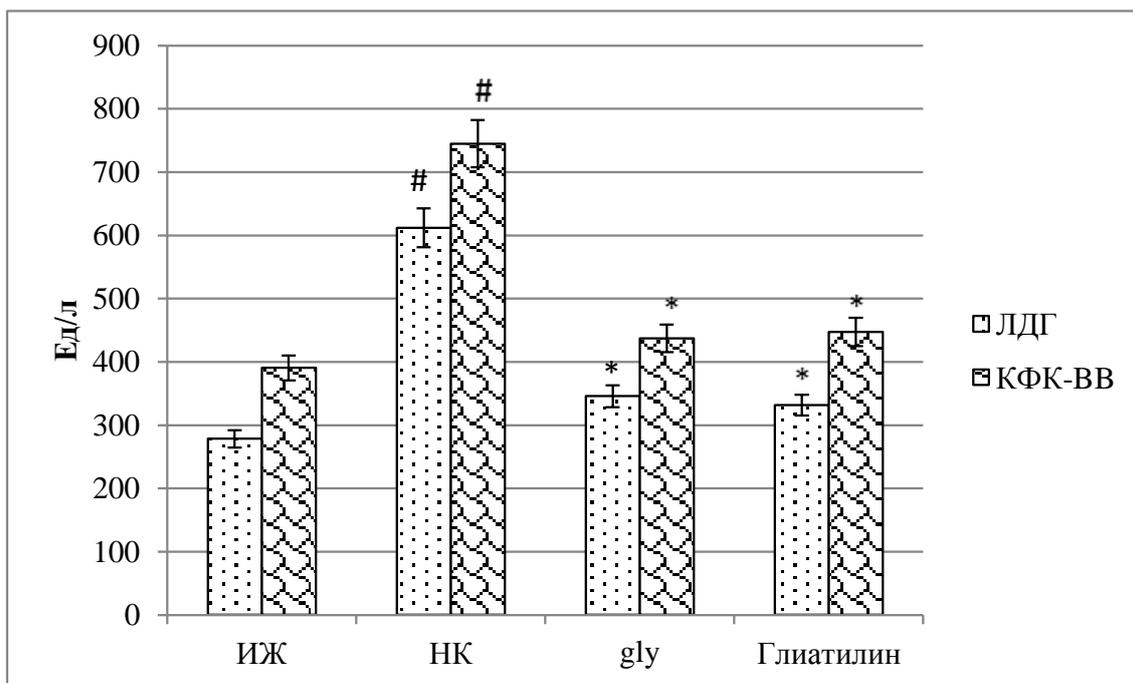
**Рисунок 16. Изменение сывороточной концентрации NSE и GFAP у животных в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ соединением PDMGLY и препаратом сравнения.**

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) представляет собой астроцитарный протеин, выполняющий структурную функцию. GFAP является характерным биомаркером нейрональной деструкции. Концентрация GFAP в сыворотке крови значительно повышается при травматическом повреждении головного мозга и непосредственно связана с тяжестью травмы [34]. У группы крыс НК в условиях экспериментальной ЧМТ установлено, повышение концентрации GFAP по отношению к группе животных ИЖ в 29,5 раза ( $p < 0,05$ ) (рис.16). На фоне применения глиатилина

и соединения-лидера PDMGLY сывороточное содержание GFAP относительно крыс, лишенных фармакологической поддержки, было ниже на 64,6 % ( $p < 0,05$ ) и 96,1 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Стоит отметить, что статистически значимых отличий между группами крыс, получавших препарат сравнения и исследуемое соединение-лидер, не установлено.

#### **6.4. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение активности ЛДГ и КФК-ВВ у животных в условиях экспериментальной ЧМТ**

У животных группы НК установлено повышение активности ЛДГ и КФК-ВВ (рис.17) в сыворотке крови относительно крыс группы ИЖ на 120,1 % ( $p < 0,05$ ) и 90,7 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Полученные результаты согласуются с литературными источниками, в которых отражены данные свидетельствующие о то, что повышение активности ЛДГ и КФК-ВВ в сыворотке крови является диагностическим признаком нейрональной деструкции, и в совокупности с изменением концентрации NSE и GFAP позволяет точнее диагностировать тяжесть ЧМТ [142].



Обозначение: # - статистически значимо по сравнению с группой крыс ИЖ (критерий Ньюмена-Кейсла, ( $p < 0,05$ ));

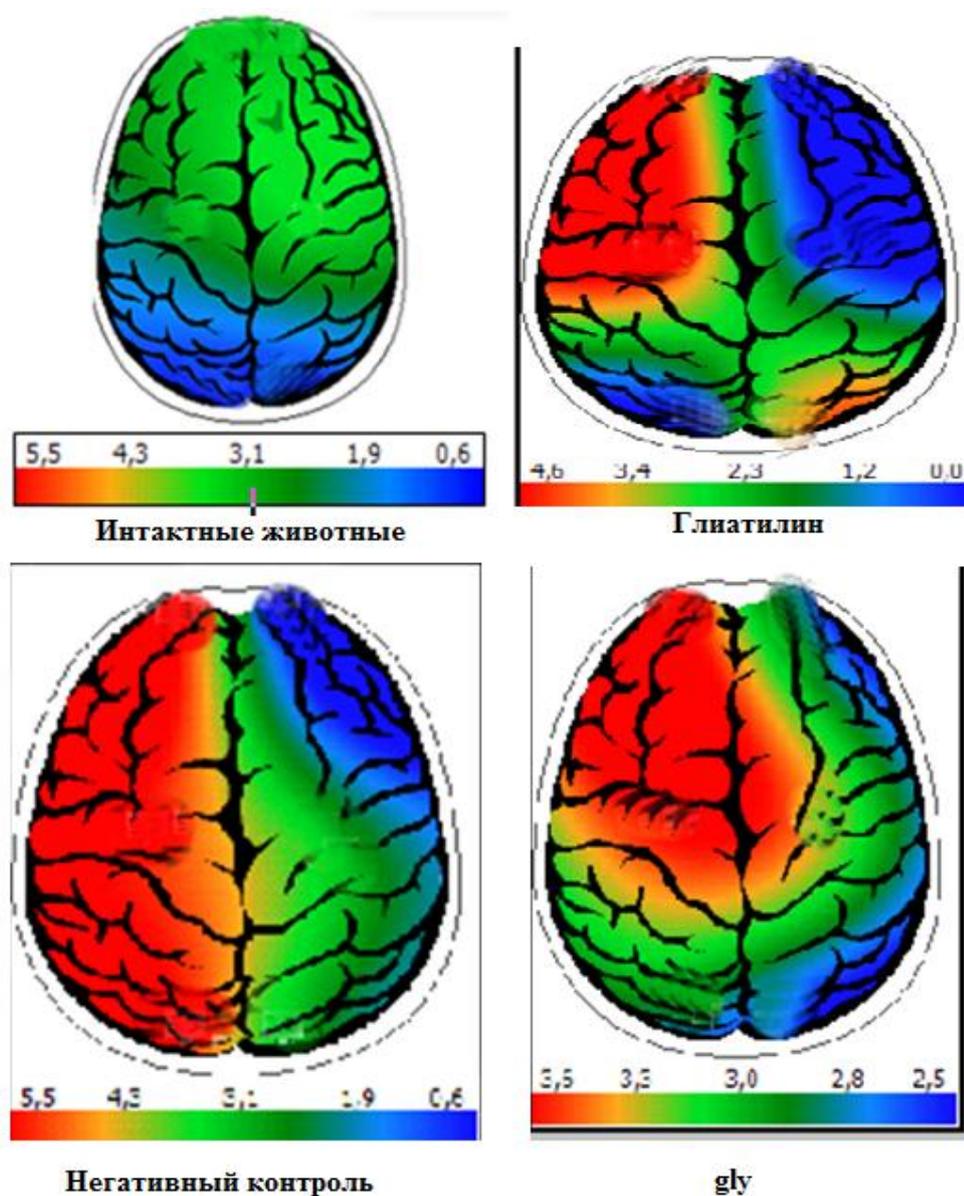
\* - статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Ньюмена-Кейсла, ( $p < 0,05$ )).

**Рисунок 17. Изменение активности ЛДГ и КФК-ВВ в сыворотке крови крыс в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ соединением PDMGLY и препаратом сравнения.**

На фоне введения крысам глиатилина активность ЛДГ была достоверно ниже по отношению к группе животных НК на 84,6 % ( $p < 0,05$ ), каталитическая способность КФК-ВВ также снизилась (на 66,4 % ( $p < 0,05$ ) в сравнении с группой крыс, без фармакологической поддержки). При применении исследуемого соединения-лидера активность ЛДГ и КФК-ВВ относительно группы животных НК была меньше на 77,1 % ( $p < 0,05$ ) и 70,3 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом показатели крыс, получавших соединение PDMGLY, статистически значимо не отличались от таковых у животных, которым вводили глиатилин (рис.17).

## **6.5. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение показателей электроэнцефалограммы у животных в условиях экспериментальной ЧМТ**

Патофизиологически ЧМТ представляет собой сложный процесс, приводящий к дисфункции нейронов, которая может проявляться в изменениях ЭЭГ, в периоде от нескольких часов до нескольких недель после травмы. При этом структурные изменения нервной ткани характеризуются диффузным аксональным повреждением, с вовлечением в патологический процесс белого вещества, а также нарушением архитектоники дендритных нейронов коркового серого вещества, что приводит к разным и зачастую «тонким» кортикальным изменениям, которые, как правило, могут не визуализироваться при томографическом исследовании головного мозга [29]. Подобные изменения могут быть обнаружены в ЭЭГ - исследовании головного мозга. Таким образом, оценка электрофизиологических особенностей нейрональной активности в условиях ЧМТ может являться важным диагностическим признаком [62]. Данные ЭЭГ интактных животных и картирование спектра ритмов данной группы крыс представлены в таблице 10 и на рисунке 18 соответственно.



Примечание: на рисунке отображена средняя мощность (амплитуда) спектров суммарной ЭЭГ в  $\mu\text{V}^2$

**Рисунок 18. Картирование спектров ЭЭГ крыс в условиях экспериментальной ЧМТ.**

У группы животных НК в условиях экспериментальной ЧМТ установлено повышение средней величины амплитуды дельта и тета ритмов, а также снижение амплитуды высокочастотных бета ритмов во всех анализируемых отведениях (табл.10, рис.19). При этом наиболее существенные отклонения электрофизиологических параметров работы

головного мозга отмечено в его теменной области, о чем свидетельствует повышение средней амплитуды дельта ритма у животных группы НК по отношению к группе крыс ИЖ в отведении С3-А1 в 5,5 раза ( $p < 0,05$ ), в отведении С4-А2 – в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). В данных отведениях амплитуда тета ритма у группы животных НК была выше (относительно группы крыс ИЖ) в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ). Амплитуда высокочастотного бета ритма у животных, лишенных фармакологической поддержки, по отношению к группе животных ИЖ в отведениях С3-А1 и С4-А2 уменьшилась в 2,75 ( $p < 0,05$ ) и 3,5 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. В совокупности полученные данные свидетельствуют о развитии у крыс группы НК ЧМТ средней степени тяжести [62].

**Таблица 10. Изменение параметров ЭЭГ у крыс в условиях коррекции ЧМТ соединением PDMGLY и глиатилином**

<b>ИЖ</b>					
<b>Отведение</b>	<b>Дельта ритм, мкВ<sup>2</sup></b>	<b>Тета ритм, мкВ<sup>2</sup></b>	<b>Альфа ритм, мкВ<sup>2</sup></b>	<b>Бета НЧ ритм, мкВ<sup>2</sup></b>	<b>Бета ВЧ ритм, мкВ<sup>2</sup></b>
FP1-A1	1,97±0,023	3,42±0,008	1,3±0,056	3,83±0,006	4,93±0,03
FP2-A2	1,87±0,006	2,97±0,09	1,4±0,0015	4,43±0,002	4,86±0,009
C3-A1	1,86±0,064	2,95±0,02	0,92±0,021	3,077±0,021	5,55±0,045
C4-A2	1,67±0,02	3,62±0,004	1,29±0,032	4,95±0,027	5,21±0,064
<b>НК</b>					
FP1-A1	5,42±0,024#	6,87±0,01#	1,2±0,012	3,57±0,03	2,05±0,022#
FP2-A2	4,04±0,001#	6,05±0,003#	1,02±0,001	2,04±0,003	2,06±0,002#
C3-A1	10,15±0,122#	9,1±0,073#	1,42±0,012	2,9±0,026	1,29±0,033#
C4-A2	7,38±0,013#	9,4±0,036#	0,37±0,009	4,87±0,002	1,49±0,001#
<b>PDMGLY</b>					
FP1-A1	2,31±0,006*	3,71±0,003*	1,09±0,039	3,81±0,006	3,54±0,004*
FP2-A2	2,01±0,005*	2,01±0,001*	2,01±0,0056	3,02±0,009	2,02±0,003*
C3-A1	3,59±0,003*	4,29±0,0034*	1,2±0,06	3,01±0,007	3,81±0,002*
C4-A2	1,37±0,006*	2,75±0,008*	2,6±0,003	4,99±0,012	3,64±0,045*
<b>Глиатилин</b>					
FP1-A1	2,5±1,232*	4,75±0,234*	1,47±0,126	4,34±0,2	3,89±0,297*
FP2-A2	1,92±1,288*	3,89±0,217*	2,49±0,038	4,35±0,238	3,8±0,253*
C3-A1	2,77±0,985*	3,04±0,941*	2,35±0,002	4,04±0,236	2,21±0,321*
C4-A2	2,32±0,318*	4,23±0,648*	2,72±0,054	4,97±0,69	3,97±0,26*

Примечание: #- статистически значимо по сравнению с группой крыс ИЖ (критерий Ньюмена-Кейсла, (p<0,05));

\*- статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Ньюмена-Кейсла, (p<0,05)).

На фоне введения глиатилина у крыс амплитуды дельта и тета ритмов были ниже, особенно в отведениях C4-A2 и C3-A1 по отношению к группе животных НК. Так амплитуда дельта ритма в отведении C3-A1 уменьшилась в 3,7 раза (p<0,05), а в отведении C4-A2 – в 3,2 (p<0,05) раза (табл.10). Мощность тета ритма была ниже в 3 раза (p<0,05) в отведении C3-A1 и в 2,2 раза (p<0,05) в отведении C4-A2. Амплитуда высокочастотного бета ритма при применении глиатилина, напротив, была достоверно выше (по сравнению с группой крыс НК) в 1,7 (p<0,05) раза в отведении C3-A1 и в 2,6

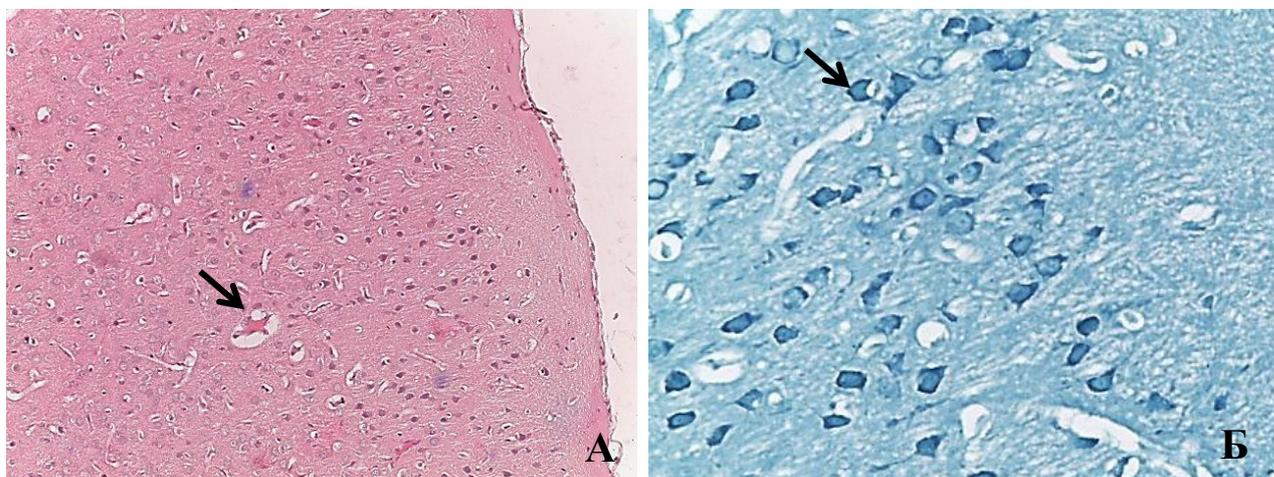
раза ( $p < 0,05$ ) в отведении С4-А2. Картирование спектра ЭЭГ животных, получавших глиатилин, представлено на рисунке 20.

В условиях коррекции ЧМТ исследуемым соединением PDMGLY у крыс при ЭЭГ исследовании в отведениях С3-А1 и С4-А2 наблюдалось уменьшение амплитуды дельта ритма по отношению к группе животных, лишенных фармакологической поддержки в 2,8 ( $p < 0,05$ ) раза и 5,4 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Также у данной группы крыс относительно животных НК мощности тета ритма были ниже в 2,1 ( $p < 0,05$ ) раза (отведение С3-А1) и в 5,4 ( $p < 0,05$ ) раза (отведение С4-А2), а амплитуда высокочастотного бета ритма в отведениях С3-А1 и С4-А2 достоверно выше в 3 ( $p < 0,05$ ) раза и 2,4 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. При этом статистически значимых отличий по отношению к группе животных, получавших глиатилин, не установлено. Картирование спектра ЭЭГ крыс, которым вводили соединение-лидер, представлено на рисунке 21.

#### **6.6. Гистологическое исследование ткани головного мозга экспериментальных животных в условиях коррекции ЧМТ исследуемым соединением-лидером и глиатилином**

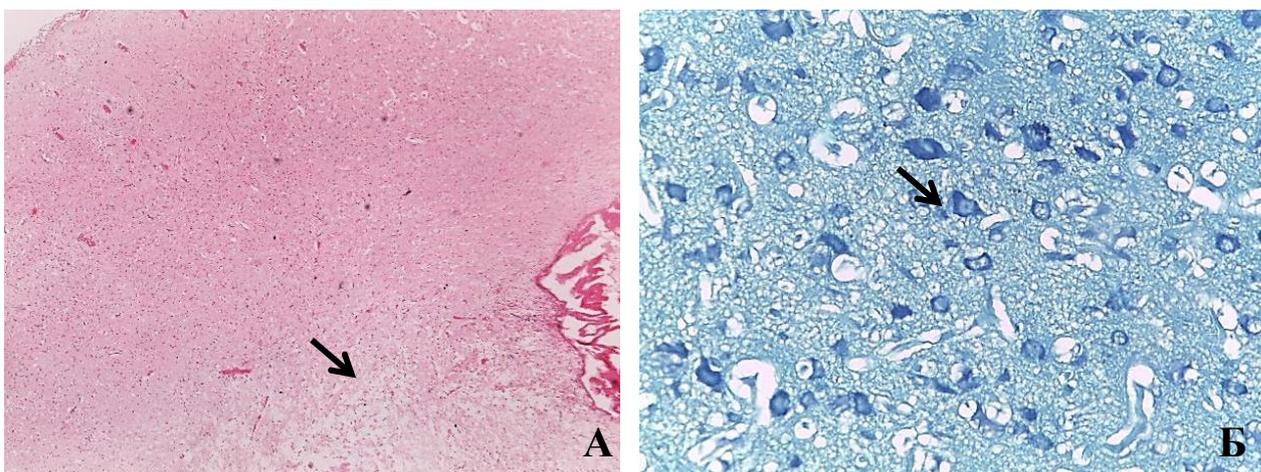
При гистологическом исследовании ткани головного мозга крыс, получавших глиатилин, было установлено, что в целом строение коры сохранялось, определялись её слои, где наиболее четко визуализировался слой больших и малых пирамидных клеток (рис.19 А). Остальные слои молекулярный, наружный и внутренний зернистые слои, а также слой полиморфных клеток определялись менее четко. Клетки глиии: астроциты и олигодендроциты были обычного строения. Сосуды мозговой оболочки были умеренного кровенаполнения. Следует отметить, что еще сохранялся незначительный периваскулярный отек отдельных капилляров ткани головного мозга. При окраске по Нисслию с целью определения сохранности белково-синтетических процессов в нейронах определялось «тигроидное»

вещество, расположенное по периферии перикариона, что соответствовало нормальному гистологическому строению клеток, а также сохранению функциональной активности за счет эндоплазматического ретикулула и достаточного количества РНК (рис.19 Б).



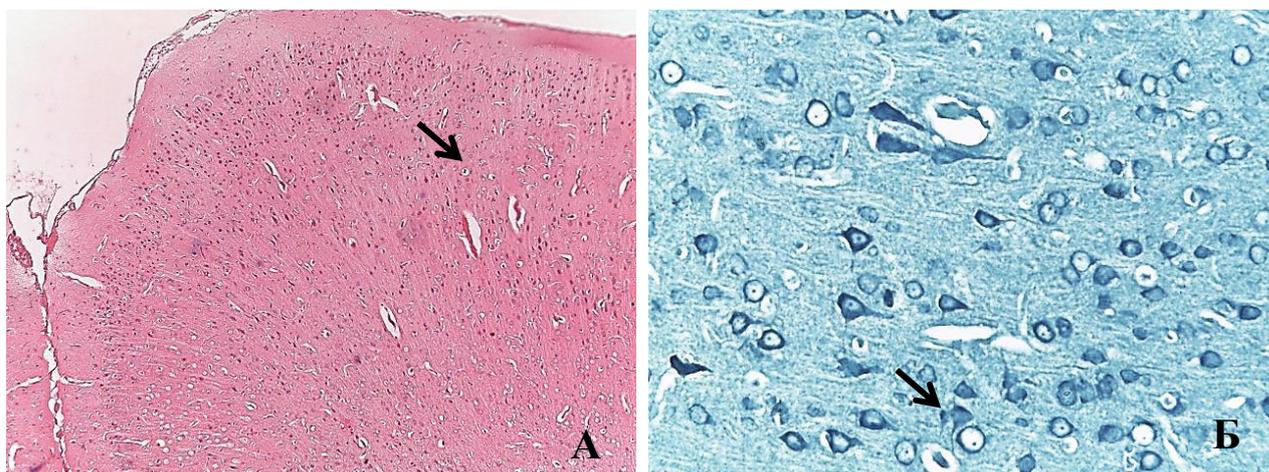
**Рисунок 19. Ткань головного мозга крыс, получавших глиатилин. А- незначительный периваскулярный отек отдельных капилляров (указан стрелкой). Б – сохранение тигроидной субстанции в перикарионе нейронов (указано стрелкой). Окр. гематоксилином и эозином, по Нислю. Ув.х20, ув.х40.**

При оценки состояния ткани головного мозга животных НК группы наблюдались выраженные морфологические изменения, которые характеризовались очаговой деструкцией вещества головного мозга, формированием некротических очагов, гибелью нейронов (рис. 20 А). По периферии наблюдались перичеллюлярный отек, стаз и сладж в сосудах микроциркуляторного русла, а также незначительная глиальная реакция, в то время как в центре капилляры заустевали. При окраске по Нислю в периферической зоне по отношению к очагу ишемии на фоне выраженного перичеллюлярного отека в некоторых нейронах наблюдался тигролиз, что свидетельствовало о повреждении эндоплазматического ретикулула (рис. 20 Б).



**Рисунок 20. Ткань головного мозга крыс НК группы А – зона некроза (указана стрелкой) с перичеллюлярным отеком по периферии и стазом в сосудах микроциркуляторного русла. Б – тигролиз в отдельных нейронах на фоне выраженного отека (указано стрелкой). Окр. гематоксилином и эозином, по Нислю. Ув.х4, ув.х40.**

При оценке морфологических изменений ткани головного мозга крыс, которым вводили исследуемое соединение-лидер, после ЧМТ наблюдалось сохранение гистоархитектоники коры, где просматривались все слои нерезко отграниченные друг от друга (рис.21 А). Сосуды микроциркуляторного русла были обычного кровенаполнения, однако сохранялся незначительный периваскулярный отек в более глубоких слоях. Несмотря на сохранение отека, белково-синтетические процессы в нейронах были сохранены о чем свидетельствовало наличие тигроидной субстанции при окраске по Нислю, которая располагалась у основания дендритов, что можно расценить как нейропротекторный эффект данного вещества (рис.21 Б).



**Рисунок 21. Ткань головного мозга крыс, получавших исследуемое соединение-лидер. А – незначительный периваскулярный отек (указан стрелкой), Б – тигроидная субстанция в нейронах головного мозга (указано стрелкой). Окр. гематоксилином и эозином, по Нисслю. Ув.х10, ув.х40.**

Результаты морфометрического анализа, представленные в табл.11, показывают, что у группы крыс НК в условиях экспериментальной ЧМТ в сравнении с ЛО группой животных отмечено уменьшение толщины интимы сосуда и увеличение соотношения комплекса интима/медиа на 22,8 % ( $p < 0,05$ ) и 61,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, а также снижение ядерно-цитоплазматического отношения эндотелиоцитов, и размера ядер в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом у группы животных НК по отношению к ЛО группе крыс наблюдался значительный отек, плазморрагия сосудистой стенки, тромбоз сосудов микроциркуляторного русла, увеличение проницаемости и пролиферации сосудистого эндотелия.

Применение глиатилина в условиях экспериментальной ЧМТ способствовало увеличению в сравнении с группой крыс НК толщины интимы и снижению соотношения комплекса интима/медиа на 12,8 % ( $p < 0,05$ ) и 31,5 % ( $p < 0,05$ ), в тоже время данные показатели на фоне введения животным соединения лидера были выше и достоверно ниже на 20,3 % ( $p < 0,05$ ) и 44,9 % ( $p < 0,05$ ) соответственно по отношению к группе животных

без фармакологической поддержки. Ядерно-цитоплазматическое отношение и размер ядер при применении глиатилина относительно группы крыс НК были выше в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,62 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. В тоже время на фоне введения животным соединения PDMGLY показатели ядерно-цитоплазматического отношения и размера ядер по отношению к группе крыс НК были достоверно выше в 3 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Следует отметить, что при применении глиатилина в условиях экспериментальной ЧМТ сохранялись признаки отек, плазморрагии и воспаления, в то время как на фоне введения крысам соединения - лидера данные патологические сдвиги отсутствовали (табл.11).

**Таблица 11. Результаты морфометрического анализа изменения гистоархитектоники головного мозга у крыс в условиях коррекции экспериментальной ЧМТ соединением PDMGLY и глиатилином**

Показатель	ЛО	НК	Глиатилин	PDMGLY
Толщина интимы сосуда, мкм	1,63±0,057	1,33±0,113 <sup>#</sup>	1,50±0,061*	1,60±0,114*
Соотношение комплекса интима/медиа	0,44±0,046	0,71±0,079 <sup>#</sup>	0,54±0,052*	0,49±0,074*
Отек, плазморрагия стенки сосуда	отсутствует	+++	+	отсутствует
Признаки воспаления	отсутствует	+++	+	отсутствует
Стаз, тромбоз	отсутствует	+++	+	+
Увеличение проницаемости эндотелия	отсутствует	+++	отсутствует	отсутствует
Пролиферация эндотелия	отсутствует	+++	+	+
Ядерно-цитоплазматическое отношение эндотелиоцитов	0,62±0,051	0,19±0,012 <sup>#</sup>	0,51±0,014*	0,58±0,016*
Размер ядер, мкм	3,21±0,016	1,43±0,236 <sup>#</sup>	2,32±0,156*	2,72±0,163*

Примечание: + - единичные элементы (до 5 в поле зрения), ++ - морфологические элементы от 5 до 10 в поле зрения; +++ - морфологические элементы более 10 в поле зрения; #- статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ ) относительно ЛО группы животных; \*- статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ ) относительно НК группы животных

## Заключение

Проведенная оценка церебропротекторных свойств соединения-лидера в условиях ЧМТ показала, что у животных группы НК отмечаются признаки ЧМТ средней степени тяжести, о чем свидетельствует наличие 9-ти балльного неврологического дефицита по шкале mNSS, а также увеличение сывороточной концентрации специфических и неспецифических маркеров нейрональной деструкции, подтверждаемых энцефалографическим и гистологическим исследованиями. Кроме того у крыс с ЧМТ и без фармакологической поддержки наблюдалось увеличение степени гидратации мозговой ткани и проницаемости ГЭБ.

Применение глиатилина способствовало восстановлению нейрональной активности в условиях ЧМТ, о чем свидетельствуют данные ЭЭГ-исследования. Также, (по отношению к группе крыс НК) концентрация NSE и GFAP была достоверно ниже на 72,3 % ( $p < 0,05$ ) и 64,6 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, кроме того, было отмечено снижение активности ЛДГ и КФК-ВВ (на 84,6 % ( $p < 0,05$ ) и 66,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно), отека и проницаемости ГЭБ. В то же время данные гистологического исследования, позволяют предполагать, редукцию процессов нейрональной деструкции при введении глиатилина, что свидетельствует о существенном церебропротекторном действии препарата сравнения, нашедшем проявление в виде уменьшения неврологической симптоматики, сопутствующей ЧМТ.

Применение исследуемого соединения-лидера PDMGLY в условиях ЧМТ способствовало сохранению структурно-функциональной целостности нервной ткани, практически в равной степени с глиатилином. Так, на фоне применения соединения PDMGLY, отмечалось снижение (относительно крыс, лишенных фармакологической поддержки) активности ЛДГ (на 77,1 % ( $p < 0,05$ )), КФК-ВВ (на 65 % ( $p < 0,05$ )), концентрации NSE и GFAP (на 113,9 % ( $p < 0,05$ ) и 96,1 % ( $p < 0,05$ ) соответственно), степени гидратации и проницаемости ГЭБ (подтверждаемые данными гистологического

исследования), а также восстановление биоэлектрического потенциала нейронов, уменьшение неврологического дефицита. Таким образом, на основании полученных данных можно предполагать эквивалентные церебропротекторные свойства исследуемого соединения PDMGLY и препарата сравнения – глиатилина.

## **Глава 7. Оценка возможных механизмов церебропротекторного действия соединения-лидера PDMGLY в условиях экспериментальной ЧМТ.**

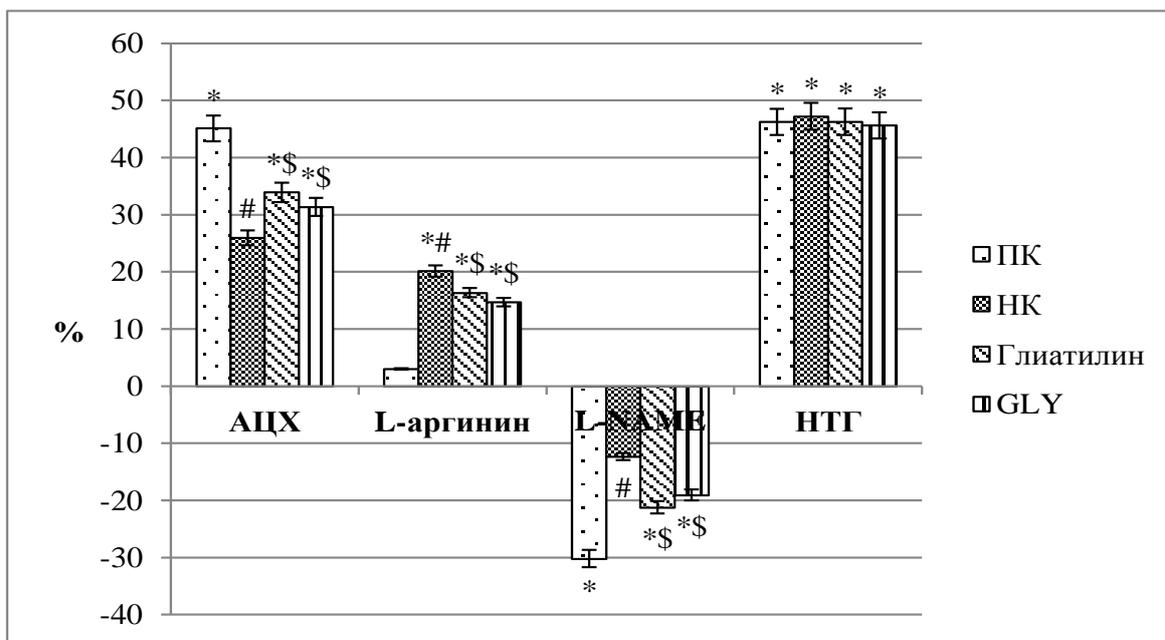
### **7.1. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на состояние эндотелиальной функции в условиях экспериментальной ЧМТ.**

Известно, что оптимальное состояние эндотелия сосудов играет одну из ключевых ролей в поддержании сосудистого тонуса, реологии крови, регуляции процессов местного воспаления и пролиферации. В условиях ЧМТ отмечается ухудшение функциональных свойств эндотелия сосудов, что может служить провокационным фактором для процессов вазоконстрикции, тромбоза, воспаления и пролиферации [160], что, несомненно, отягощает течение ЧМТ и способствует развитию негативных цереброваскулярных последствий ЧМТ, таких как снижение когнитивной функции. При этом, в условиях травматического повреждения головного мозга, существенно изменение активности ферментативных систем синтеза оксида азота – возрастает активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и снижается каталитическая способность эндотелиальной (eNOS) и нейрональной изоформ (nNOS), что в свою очередь снижает васкулярный адаптационный потенциал, ухудшает процессы нейропластичности и инициирует вторичный каскад окислительной модификации клеточных структур – «нитритный стресс» [151]. На данном этапе исследования было сформировано 4 экспериментальные группы крыс (n=10, каждая группа).

Оценивая состояние вазодилатирующей функции эндотелия сосудов у группы крыс ПК (рис.25), установлено повышение скорости мозгового кровотока в ответ на введение АЦХ данной группе животных на 45,1 % ( $p<0,05$ ) и ее снижение при введении L-NAME на 30,2 % ( $p<0,05$ ) относительно исходной скорости церебрального кровотока ( $4,3\pm 0,289$  см/сек) группы крыс ПК. Введение L-аргинина данной группе животных не привело

к значимому изменению скорости мозгового кровотока. Введение НТГ животным группы ПК способствовало увеличению скорости локального церебрального кровотока на 46,3 % ( $p < 0,05$ ). Полученные данные согласуются с литературными источниками [4].

У группы крыс НК в условиях ЧМТ, по сравнению с группой животных позитивного контроля отмечено ухудшение сосудистой реакции в ответ на введение АЦХ и L-NAME, что отражается в менее значимом увеличении/уменьшении скорости мозгового кровотока при введении данных анализаторов эндотелиальной функции (скорость церебрального кровотока изменилась на +26 % и -12,3 % соответственно от ее исходного уровня ( $3,7 \pm 0,618$  см/сек)). Кроме того у группы животных НК наблюдалось увеличение скорости церебрального кровотока в ответ на введение L-аргинина на 20,2 % ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о развитии у данной группы крыс феномена «L-аргининового парадокса» [126]. Следует отметить, что скорость локального мозгового кровотока при введении НТГ у всех групп животных с ЧМТ статистически значимо не отличалась от таковой у группы крыс ПК (рис.22).



Обозначение: #- статистически значимо относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла);

\$- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла).

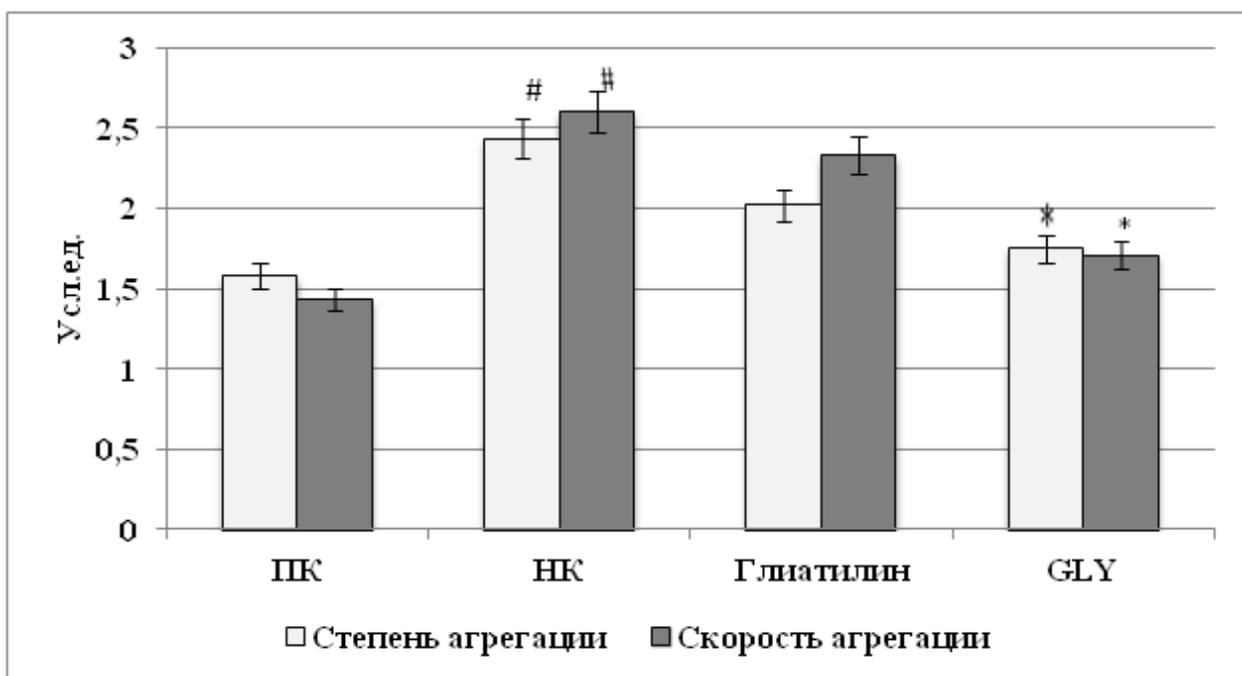
**Рисунок 22. Изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях коррекции ЧМТ глиатилином и изучаемым соединением PDMGLY**

У крыс с ЧМТ, получавших глиатилин, отмечено восстановление эндотелиальной функции, что отражается в более выраженной сосудистой реакции при введении АЦХ и L-NAME у данной группы животных, по сравнению с группой крыс НК на 30,4 % ( $p < 0,05$ ) и 72,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. В ответ на введение L-аргинина скорость церебрального кровотока у крыс, получавших глиатилин, увеличилась всего на 16,4 % ( $p < 0,05$ ) от ее исходного значения ( $4,9 \pm 0,255$  см/сек.), что было меньше аналогичного значения группы животных НК на 23,2 % ( $p < 0,05$ ).

В условиях коррекции ЧМТ изучаемым соединением PDMGLY (рис.22) скорость мозгового кровотока у крыс в ответ на введение АЦХ была выше на 31,4 % ( $p < 0,05$ ) относительно ее исходного значения ( $4,2 \pm 0,155$  см/сек.), в то время как при введении L-NAME данный показатель

уменьшился на 19 % ( $p < 0,05$ ). Введение L-аргинина данной группе животных привело к увеличению скорости локального церебрального кровотока на 14,7 % по сравнению с ее первоначальным значением. Следует отметить, что статистически значимых отличий между группами животных, получавших глиатилин и PDMGLY, установлено не было.

При оценке влияния соединения-лидера и референтного препарата глиатилина на агрегационную активность тромбоцитов, как составляющей антитромботической функции эндотелия сосудов, было установлено повышение степени и скорости агрегации тромбоцитов у животных НК группы по отношению к группе крыс ПК на 64 % ( $p < 0,05$ ) и 75,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис.23). Введение соединения-лидера PDMGLY способствовало уменьшению степени агрегации тромбоцитов на 48,8 % ( $p < 0,05$ ) относительно животных группы НК, при этом скорость агрегации кровяных пластинок, на фоне введения крысам соединения PDMGLY снизилась по отношению к животным без фармакологической поддержки на 66,5 % ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что применение референтного препарата значимого влияния агрегационный потенциал тромбоцитов в условиях ЧМТ не оказало (статистически значимых отличий относительно группы животных НК не установлено). В тоже время степень и скорость агрегации кровяных пластинок у крыс, получавших глиатилин, превосходили аналогичные показатели животных, которым вводили соединение-лидер на 19,2 % ( $p < 0,05$ ) и 51,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис.23).

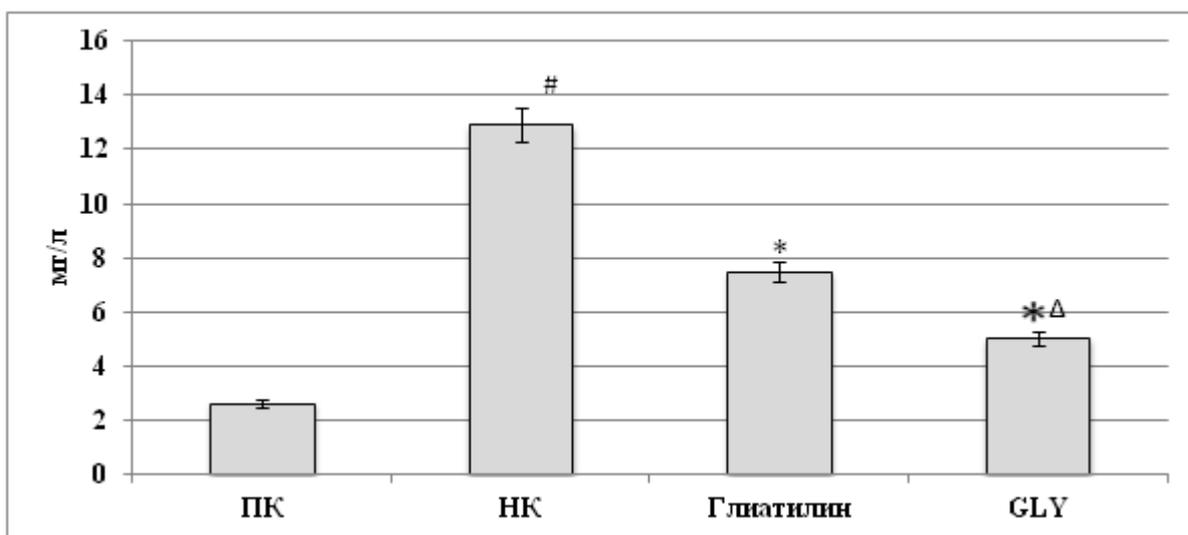


Обозначение: # - статистически значимо относительно ПК группы животных ( $p < 0,05$ , критерий Ньюмена-Кейсла);

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

**Рисунок 23. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной ЧМТ.**

При анализе влияния исследуемого соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов установлено, что у животных, лишенных фармакологической поддержки наблюдается повышение концентрации СРБ, относительно группы крыс ПК в 5,7 ( $p < 0,05$ ) раз (рис.24). При применении глиатилина и соединения PDMGLY плазменное содержание СРБ по отношению к показателю группы животных НК было ниже 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,4 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом у крыс, получавших соединение PDMGLY, концентрация СРБ была на 50% ( $p < 0,05$ ) ниже, нежели у животных, которым проводили коррекцию ЧМТ введением глиатилина (рис.24).



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

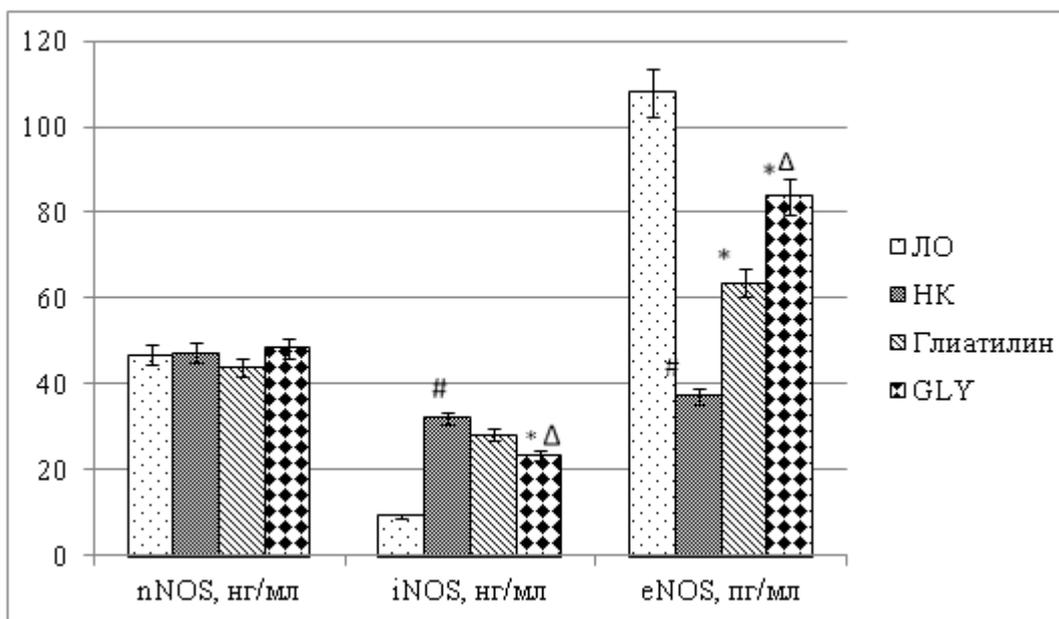
\* - статистически значимо относительно группы животных НК ( $p < 0,05$ ; критерий Ньюмена-Кейсла);

Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ ; критерий Ньюмена-Кейсла).

**Рисунок 24. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации СРБ в условиях экспериментальной ЧМТ**

Оценивая изменение концентрации изоферментов NOS в гомогенате головного мозга животных, установлено, что содержание nNOS во всех экспериментальных группах крыс статистически значимо не отличалось (рис.25). В то же время у животных группы НК отмечалось увеличение концентрации индуцибельной изоформы NO-синтазы и снижение содержания eNOS относительно группы крыс ПК в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис.25). Применение глиатилина способствовало статистически значимому в сравнении с группой крыс НК увеличению концентрации eNOS на 71,4 % ( $p < 0,05$ ), в то время как на фоне введения крысам соединения-лидера PDMGLY отмечалось, как увеличение содержания eNOS на 125,6 % ( $p < 0,05$ ), так и уменьшение концентрации iNOS

на 26,5 % ( $p < 0,05$ ) относительно группы животных, лишенных фармакологической поддержки (рис.25). Кроме того, содержание eNOS и iNOS на фоне введения крысам соединения-лидера было соответственно выше на 31,6 % ( $p < 0,05$ ) и ниже на 20,5 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных, получавших референтный препарат (рис.25).



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

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

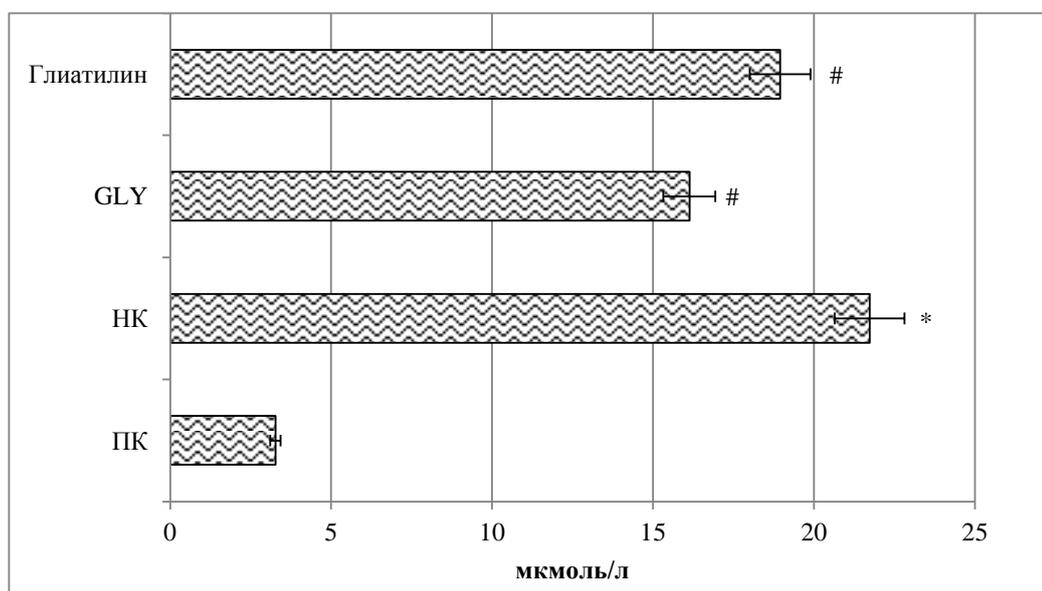
Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ ; критерий Ньюмена-Кейсла).

**Рисунок 25. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации изоферментов синтазы оксида азота в условиях экспериментальной ЧМТ.**

В ряде экспериментальных и клинических исследований приводятся данные, свидетельствующие о том, что для оптимального функционирования эндотелия сосудов и в частности NO-продуцирующих систем, необходим оптимальный состав аминокислотного пула, с редуцирующей концентрацией

метиленированных аминокислот, например гомоцистеина [64]. Известно, что повышенный уровень гомоцистеина оказывает ингибирующее действие на eNOS и, кроме того, ухудшает метаболические процессы в головном мозге, снижает уровень глутатиона и усиливает эксайтотоксический эффект глутамата [48].

Оценивая изменение концентрации гомоцистеина у крыс в условиях ЧМТ (рис.26), установлено повышение данного показателя у группы животных НК, относительно группы крыс позитивного контроля в 6,6 раза ( $p < 0,05$ ).



Обозначение: \*- статистически значимо относительно группы животных ПК (критерий Краскела-Уоллиса);

#- статистически значимо относительно группы животных НК (критерий Краскела-Уоллиса).

**Рисунок 26. Влияние глиатилина и соединения PDMGLY на изменение концентрации гомоцистеина в плазме крови крыс в условиях ЧМТ**

У крыс, получавших глиатилин и исследуемое соединение PDMGLY, содержание гомоцистеина было достоверно ниже относительно группы животных НК на 14 % ( $p < 0,05$ ) и 34,8 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

## **7.2. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на активность про/антиоксидантных систем в условиях экспериментальной ЧМТ**

Окислительный стресс играет существенную роль в патогенетическом течении ЧМТ. В отсутствие должной инактивации антиокислительной защитной системой клетки свободные радикалы кислорода оказывают прямое альтеративное действие на клетку по типу окислительной модификации. Однако, образуемые в избыточном количестве свободные радикалы кислорода, также являются инициаторами различных вторичных путей клеточной деструкции: модуляция проапоптотического сигнала, инфлюкс кальция, *down*-регуляция протеинкиназной активности, вторичный «нитритный» стресс, инактивация ключевых ферментов метаболического цикла (цитратсинтаза) [108].

Оценивая изменение про/антиоксидантного равновесия в условиях ЧМТ установлено, что у группы крыс НК отмечено увеличение образования МДА и ДК по отношению к ПК группе животных в 6,6 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл.12). Также у группы крыс НК по сравнению с группой животных ПК наблюдалось снижение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты СОД – в 3,04 ( $p < 0,05$ ) раза; ГП – 3,3 раза ( $p < 0,05$ ); каталазы – в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ); Г6Ф-ДГ – в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ) и ГР – в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 12. Влияние исследуемого соединения PDMGLY и препарата сравнения на состояние про/антиоксидантного баланса в условиях экспериментальной ЧМТ**

Группа	ПК	НК	PDMGLY	Глиатилин
Г6Ф-ДГ, Ед/л	4157,38±185,8 45	1141,01±39,79 2#	3032,13±285,21 6*	2477,13±267,17 1*
ГР, Ед/л	28,17±3,096	11,36±0,719#	19,59±1,594*	15,49±1,768*
СОД, Ед/л	289,5±5,239	95,2±2,314#	189,1±2,964*Δ	123,2±7,452*
ГП, Ед/л	590,3±2,861	180,3±9,674#	401,4±5,561*Δ	305,2±4,231*
Каталаза, мкат/л	0,765±0,0214	0,211±0,0361#	0,676±0,0221*	0,363±0,0451*
МДА, мкмоль/л	5,2±0,912	34,3±2,756#	15,3±2,276*	20,2±2,971*
ДК, мкмоль/л	11,1±1,237	25,2±2,317#	12,1±2,642*	18,3±3,124*

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

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

Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ( $p < 0,05$ ; критерий Ньюмена-Кейсла).

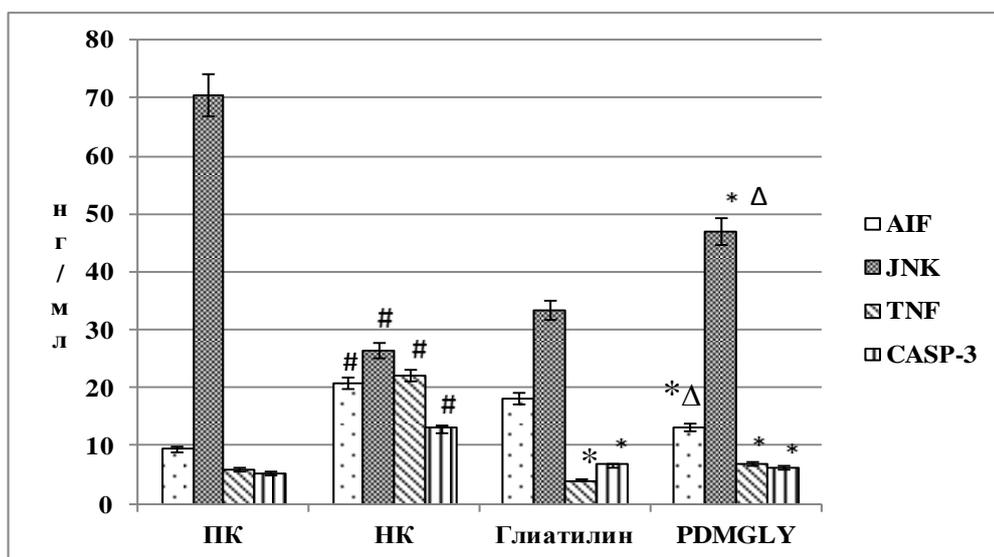
На фоне применения глиатилина (табл.12) концентрация МДА и ДК относительно группы крыс НК была снижена 69,8 % ( $p < 0,05$ ) и 37,7 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также при введении животным препарата сравнения отмечалось увеличение активности ферментов АОЗ СОД – на 29,4 % ( $p < 0,05$ ); ГП – 69,3 % ( $p < 0,05$ ); каталазы – на 72 % ( $p < 0,05$ ); Г6Ф-ДГ – в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) и ГР – на 36,3 % ( $p < 0,05$ ).

В условиях коррекции ЧМТ введением соединения-лидера содержание прооксидантов МДА и ДК по отношению к группе крыс НК было ниже в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность антиоксидантных ферментов на фоне применения соединения лидера, напротив, увеличилась (относительно группы животных НК) СОД – на 98,6 %

( $p < 0,05$ ); ГП – 2,3 ( $p < 0,05$ ) раза; каталазы – в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ); Г6Ф-ДГ – в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) и ГР – на 72,4 % ( $p < 0,05$ ). Кроме того активность СОД и ГП на фоне введения животным соединения-лидера превосходило аналогичные показатели животных, получавших референтный препарат на 53,4 % ( $p < 0,05$ ) и 31,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

### **7.3. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на активность апоптотических систем в условиях экспериментальной ЧМТ**

В условиях ЧМТ активация апоптотического сигнала является одним из ведущих механизмов ухудшения функционального состояния головного мозга. Увеличение степени деструкции нейронов, особенно в условиях ЧМТ тяжелой степени приводит к прогрессирующему когнитивному дефициту, снижению процессов нейрональной адаптации и нейропластичности, что может повлечь за собой отсроченные последствия ЧМТ, характеризующиеся как пост-травматический стресс и проявляющихся, как правило, в расстройствах поведения и восприятия, что в свою очередь, препятствует должной социальной адаптации лиц, перенесших ЧМТ [65]. Известно, что в интенсификации апоптоза в условиях ЧМТ, принимают участие, как вне-, так и внутриклеточные апоптотические сигнальные пути, в которых ведущую роль играют ФНО- $\alpha$  и каспаза-3 с одной стороны, а также АIF и регуляторный комплекс JNK с другой [58]. В ходе оценки влияния исследуемого соединения-лидера и препарата сравнения на активность систем апоптоза (рис.27) установлено, что у группы крыс НК наблюдалось увеличение (относительно группы животных ПК) концентрации проапоптотических мессенджеров АIF – в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), ФНО- $\alpha$  и каспазы-3 – в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также у группы животных, лишенных фармакологической поддержки отмечено снижение содержания антиапоптотического комплекса JNK, по отношению к крысам группы ПК в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ).



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

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

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

**Рисунок 27. Влияние исследуемого PDMGLY и референтного препарата на изменение концентрации апоптотических систем в условиях экспериментальной ЧМТ.**

При применении глиатилина у крыс по сравнению с группой животных НК концентрация ФНО- $\alpha$  и каспазы-3 была ниже в 5,4 раза ( $p < 0,05$ ) и на 92,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Содержание JNK и AIF на фоне введения глиатилина относительно группы крыс НК статистически значимо не изменилось (рис.27).

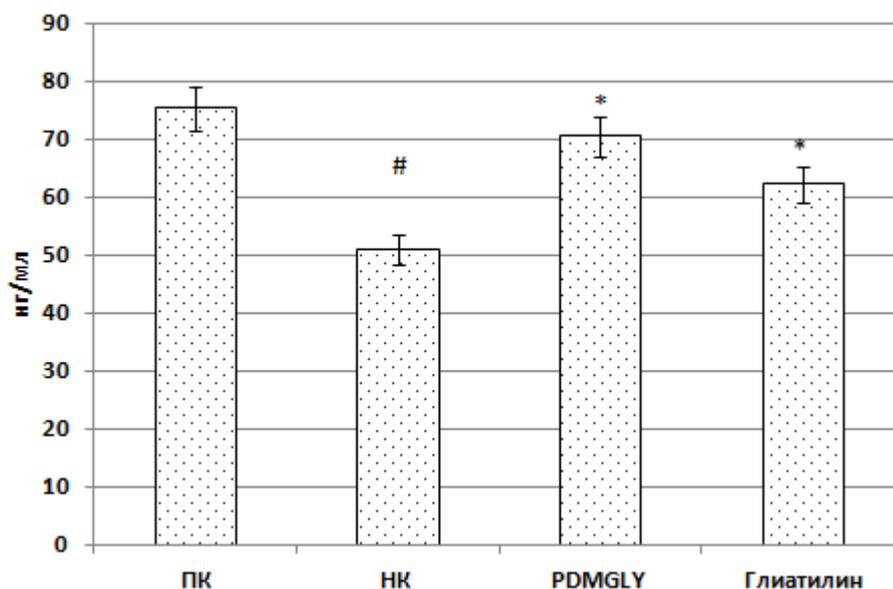
На фоне введения экспериментальным животным соединения-лидера PDMGLY, концентрации AIF, основного мессенджера, опосредующего инициацию внутреннего пути апоптоза, была ниже на 104,1% ( $p < 0,05$ ) относительно группы крыс НК и на 57,7 % ( $p < 0,05$ ) относительно группы животных, получавших глиатилин. Также у животных, получавших

соединение-лидер отмечено уменьшение, по отношению к группе крыс НК, содержания составляющих каспаза-зависимого пути апоптоза - ФНО- $\alpha$  и каспазы-3 – в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Концентрация JNK, напротив, была выше на 78,1 % ( $p < 0,05$ ) – относительно группы животных НК и на 40,2 % ( $p < 0,05$ ) в сравнении в крысами, получавшими референтный препарат глиатилин (рис.27).

#### **7.4. Влияние соединения PDMGLY и препарата сравнения на изменение концентрации GLUT1 в условиях экспериментальной ЧМТ**

Известно, что в условиях ЧМТ наблюдается дисфункция метаботропных транспортных систем, что лимитирует реакции синтеза субстратов окисления и уменьшает адаптационный резерв мозговой ткани. В этой связи системы, обеспечивающие их интрацеллюлярный транспорт, в частности специфичный для мозговой ткани транспортер GLUT1, могут являться перспективными фармакотерапевтическими мишенями церебротекторной фармакотерапии [145].

У животных группы НК в условиях ЧМТ отмечено снижение концентрации специфичного для мозговой ткани транспортера GLUT1 на 35 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными ПК.



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

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

**Рисунок 28. Влияние исследуемого PDMGLY и референтного препарата на изменение концентрации GLUT1 в условиях экспериментальной ЧМТ.**

На фоне введения глиатилина содержание транспортера глюкозы GLUT1 в гомогенате головного мозга экспериментальных животных было выше на 19,1 % ( $p < 0,05$ ), в тоже время при применении соединения – лидера PDMGLY на 28,6 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе крыс, лишенных фармакологической поддержки.

## Заключение

Основываясь на патогенетических особенностях ЧМТ и структуре изучаемого соединения-лидера нами было выдвинуто предположение, что вещество PDMGLY может проявлять антиоксидантные и антиапоптоические свойства. Так в ходе исследования потенциальных механизмов действия соединения-лидера установлено, что введение животным вещества PDMGLY в условиях ЧМТ способствовало восстановлению про/антиоксидантного равновесия, посредством уменьшения образования прооксидантов и восстановления активности эндогенных антиоксидантных ферментов. При этом немало важно, что каталитическая способность СОД и ГП у животных, которым вводили изучаемое соединение-лидер превосходило аналогичные показатели крыс, получавших референтный препарат на 53,4 % ( $p < 0,05$ ) и 31,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также введение соединения PDMGLY, по всей видимости, способствовало нивелированию проапоптоического сигнала, как по каспаз-зависимому, так и по каспаз-независимому сигнальным путям, о чем свидетельствовало уменьшение концентрации AIF – в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ); ФНО- $\alpha$  и каспазы-3 - в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно и, кроме того, повышение содержания JNK, в сравнении с группой животных НК. Тогда как, введение глиатилина оказало влияние только на каспаз-зависимый путь апоптоза.

Согласно анализу литературных данных производные пиримидина обладают положительным эндотелиотропным действием [2], что также может являться основанием для эндотелиального таргетинга и компонентом церебропротекторной активности соединения PDMGLY в условиях ЧМТ. В ходе проведения данного блока исследований было установлено, что применение соединения PDMGLY, в условиях травматического повреждения головного мозга, превосходило референтный препарат по величине эндотелиопротекторной активности и способствовало восстановлению вазодилатирующей, антитромботической и противовоспалительной функций

эндотелия сосудов, нивелировало разобщение NOS и уменьшало концентрацию гомоцистеина (на 34,8 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе крыс, лишенных фармакологической поддержки), что в свою очередь может положительно сказываться на кровоснабжении головного мозга.

Также, установлено, что применение соединения-лидера способствовало увеличению количества специфичного для мозговой ткани транспортера глюкозы GLUT1 на 28,6 % ( $p < 0,05$ ), относительно группы крыс НК, что может лежать в основе способности вещества PDMGLY улучшать течение метаболических процессов в головном мозге экспериментальных животных.

## Обсуждение результатов

Черепно-мозговой травматизм является одним из ведущих триггерных механизмов смертности и инвалидизации населения. Общемировая статистика ЧМТ показывает, что ежегодно от различных форм травмы мозга страдают до 17 млн. человек, из которых, приблизительно 500000 погибают в острой фазе заболевания [36]. Однако, определенную проблему для систем здравоохранения развитых и развивающихся стран представляет достоверный подсчет общего числа случаев ЧМТ, поскольку порядка 70-85 % эпизодов травмы головного мозга приходится на долю легкой формы ЧМТ, при этом пациенты часто пренебрегают квалифицированной медицинской помощью [57]. По различным данным от 14 % до 25 % лиц, из общего числа пострадавших в результате ЧМТ (включая легкую, средне-тяжелую и тяжелую формы ЧМТ), не обращаются в медицинский стационар и проводят «самолечение» без должной функциональной диагностики, либо исключают любое вмешательство (в том числе и фармакологическую коррекцию) в течение заболевания и ожидают саморазрешения патологического процесса [132]. В этой связи, повышается риск, как краткосрочных, так и отсроченных во времени осложнений ЧМТ, среди которых наиболее существенными являются хроническая травматическая энцефалопатия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, различные формы эпилепсии [67,107,141]. Существенно, что ЧМТ и последствия травматического поражения головного мозга наиболее часто отмечаются у лиц трудоспособного возраста (25-40 лет), что негативно сказывается на экономической составляющей деятельности населения [118, 90]. Таким образом, рациональная коррекция ЧМТ и ассоциированным с данным патологическим состоянием, представляет собой одну из значимых социально-экономических и медицинских проблем современного общества [33].

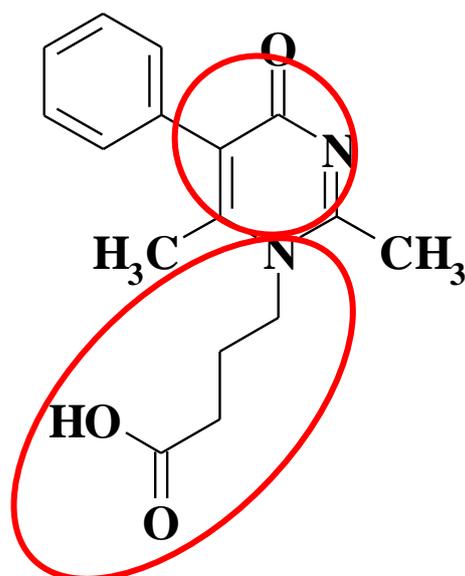
На сегодняшний день основным подходом к терапии ЧМТ является рациональное фармакологическое вмешательство, направленное на коррекцию вторичных механизмов повреждения головного мозга в условиях ЧМТ – нейрональный апоптоз, окислительный стресс, эндотелиальную дисфункцию, метаболические сдвиги и гипергидратацию мозговой ткани [34]. Спектр лекарственных препаратов, применяемых для лечения ЧМТ, представлен церебропротекторными и симптоматическими средствами [21]. Использование лекарственных препаратов, оказывающих церебротекторное действие, направлено на восстановление структурной целостности и функциональной активности мозговой ткани после ее повреждения, в то время как симптоматические средства применяются для коррекции отдаленных осложнений ЧМТ и нормализуют медиаторный обмен в головном мозге [111].

Однако, несмотря на существенные успехи, достигнутые в фармакотерапии ЧМТ, список эффективных, безопасных и экономически выгодных препаратов, оказывающих позитивный эффект в условиях травматического повреждения головного мозга, ограничен, что предполагает целесообразность поиска новых фармакологически активных соединений, с целью создания лекарственных препаратов для лечения ЧМТ [125]. В этой связи было проведено исследование, посвященное изучению возможности применения производных пиримидин 4(Н)-1ОНа для коррекции экспериментальной ЧМТ.

В работе оценено влияние новых дериватов пиримидина под лабораторными шифрами PDMGG, PDMGLY, P217, PDMD и PDMS на течение ЧМТ у крыс в условиях эксперимента. Предварительным этапом исследования являлась оценка «острой» токсичности изучаемых соединений, на котором было установлено, что все исследуемые вещества относятся к классу «практически не токсичные вещества» по классификации К.К. Сидорова и 5-му классу опасности по СГС классификации ВОЗ. Так, на фоне

введения изучаемых соединений в возрастающем диапазоне доз не вызвало гибели и существенного изменения поведения и общего состояния животных, при этом максимальная введенная доза исследуемых веществ составила 10000 мг/кг. Таким образом, результаты, полученные при оценке «острой» токсичности новых производных пириимидин 4(Н)-1ОНа согласуются с литературными данными и подтверждают потенциальный оптимальный профиль безопасности применения дериватов пириимидина [14]. Далее был проведен фармакологический скрининг в ряду исследуемых веществ с целью выявления соединения-лидера, оказывающего наиболее выраженное позитивное действие на изменение неврологического (шкала McGrow), сенсомоторного дефицита и линейную скорость кровотока у крыс в условиях ЧМТ. В ходе данного блока исследований изучаемые вещества вводились в дозе 50 мг/кг после воспроизведения ЧМТ на протяжении 3-х суток. В результате было установлено, что в ряду изучаемых соединений наиболее выраженным фармакологическим эффектом обладает объект под шифром PDMGLY, на фоне введения которого отмечена редукция неврологического, сенсомоторного дефицита в сравнении с группой животных негативного контроля на 150 % ( $p < 0,05$ ) и 71,4 % ( $p < 0,05$ ), а также сохранение линейной скорости кровотока. При этом существенно, что степень сенсомоторного дефицита была ниже по отношению к животным, получавшим соединения PDMGG, P217, PDMD, PDMS на 15,5 % ( $p < 0,05$ ); 23,9 % ( $p < 0,05$ ); 20,2 % ( $p < 0,05$ ) и 21 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Также линейная скорость кровотока у крыс, получавших соединение PDMGLY, была выше аналогичного показателя групп животных, которым вводили PDMGG, P217, PDMD, PDMS. Следует отметить, что соединение-лидер не уступало по изучаемым показателям референтному препарату. Таким образом, по совокупности полученных данных в качестве соединения-лидера, для проведения дальнейших исследований было выбрано вещество PDMGLY.

Для безопасного и эффективного применения лекарственных веществ необходимо знать зависимость между дозой и клиническим эффектом [147]. В связи с этим было изучено дозозависимое действие соединения-лидера. На данном этапе исследования вещество PDMGLY вводили в дозах 25 мг/кг; 50 мг/кг; 100 мг/кг и 150 мг/кг. Оцениваемыми параметрами служили: изменение уровня мозгового кровотока, сывороточной концентрации лактата и потребления глюкозы головным мозгом, а также изменение содержания цереброспецифичного белка S100 $\beta$ . В результате было установлено, что соединение-лидер оказывает наиболее выраженный эффект в условиях экспериментальной ЧМТ в дозе 50 мг/кг. Введение данной дозы вещества PDMGLY способствовало уменьшению концентрации лактата и белка S100 $\beta$  относительно группы животных НК на 27 % ( $p < 0,05$ ) и 63,4 % ( $p < 0,05$ ), также содержание S100 $\beta$  при применении соединения PDMGLY в дозе 50 мг/кг было ниже в сравнении с группами крыс, получавших соединение-лидер в дозах 100 мг/кг и 150 мг/кг и референтный препарат на 26 % ( $p < 0,05$ ), 32 % ( $p < 0,05$ ) и 57,1 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Кроме того, введение животным вещества PDMGLY в дозе 50 мг/кг по сравнению с другими вариантами дозирования способствовало более выраженному, восстановлению уровня церебрального кровотока и увеличению степени утилизации глюкозы головным мозгом. Таким образом, проведенная оценка зависимости «доза эффект» позволила установить, что наиболее оптимальной дозой соединения-лидера является доза 50 мг/кг. Характер дозозависимого действия вещества PDMGLY, по всей видимости, связан с наличием в структуре данного соединения аминокислотного фрагмента и сопряженных двойных связей (рис.29).



**Рисунок 29. Структурные особенности соединения-лидера, лежащие в основе характера зависимости «доза-эффект»**

Известно, что проникновение аминокислот-содержащих соединений в клетку обеспечивается кассетным ABC транспортером LAT-1, использующим энергию АТФ [49]. По мере «насыщения» трансмембранной транспортной системы LAT-1 гемато-энцефалического барьера, вероятно, уменьшается проникновение вещества PDMGLY через ГЭБ, и, таким образом, с увеличением вводимой дозы соединения-лидера не происходит увеличения фармакологического эффекта, а равновесная концентрация, обеспечивающая наиболее полную пенетрацию вещества PDMGLY достигается при введении исследуемого соединения-лидера в дозе 50 мг/кг, что, в свою очередь, согласуется с литературными данными, описывающие зависимость «доза-эффект» для веществ, содержащих в своей структуре фрагменты аминокислот [150]. Также характер дозозависимого действия соединения-лидера, вероятно, опосредован особенностями стереохимического лигандного взаимодействия производных пиримидина. Описано, что с увеличением концентрации соединения – производного пиримидина в среде лигандного взаимодействия, отмечается экранирование мишени заместителями в молекуле вещества (в структуре соединения-лидера

данную роль, по всей видимости, выполняет фенильный радикал), что уменьшает величину фармакологического эффекта [89, 139].

Учитывая значимую роль когнитивных осложнений в развитии последствий ЧМТ, была осуществлена оценка ноотропной активности соединения-лидера. В ходе проведения данного блока экспериментальной работы было установлено, что введение соединения-лидера в дозе 50 мг/кг способствовало сохранению памятного следа у животных в тестах УРПИ, ТЭИ и водный лабиринт Морриса. Кроме того, применение изучаемого соединения PDMGLY способствовало нормализации психо-эмоционального состояния животных, оцениваемом в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», превосходя по величине фармакологического эффекта препарат сравнения- глиатилин.

В дальнейшем была проведена углубленная оценка церебропротекторной активности соединения-лидера. На данном этапе исследования изучаемыми параметрами служили: степень проявления неврологического дефицита (шкала mNSS), выраженность отека головного мозга и проницаемость ГЭБ, изменения концентрации специфических маркеров развития ЧМТ - нейрон-специфической енолазы (NSE) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), биохимические показатели (активность лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы-BB), также проводилось гистоморфологическое и ЭЭГ исследование головного мозга экспериментальных животных. В ходе проведения данного блока исследований установлено, что применение соединения-лидера в дозе 50 мг/кг способствовало уменьшению степени проявления неврологического дефицита в сравнении с НК группой животных на 125 % ( $p < 0,05$ ), при этом по шкале mNSS – системе оценки неврологических изменений в эксперименте, которая наиболее приближена к практической медицине, у крыс, получавших соединение-лидер отмечена легкая форма ЧМТ, в то время как у животных группы НК отмечена средне-тяжелая ЧМТ, что согласуется с

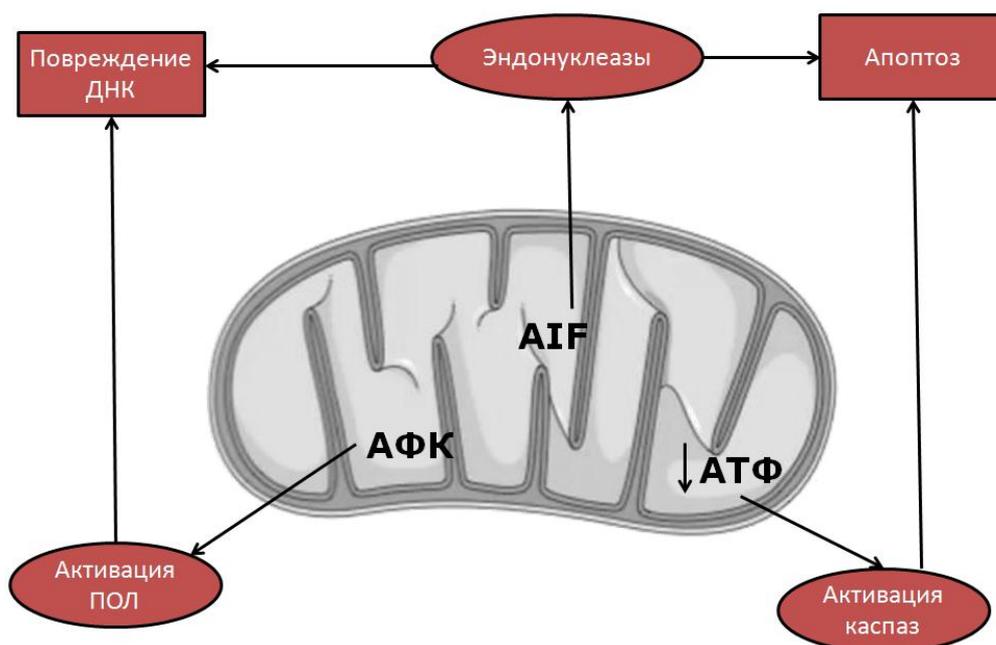
литературными данными [32]. Кроме того, на фоне введения изучаемого соединения PDMGLY (относительно группы крыс НК) концентрация в сыворотке крови специфических маркеров развития травмы мозга – NSE и GFAP была ниже на 72,6 % ( $p < 0,05$ ) и на 96,1 % ( $p < 0,05$ ). Также на фоне применения соединения-лидера отмечено снижение по сравнению с группой крыс, лишенных фармакологической поддержки, активности ЛДГ и КФК-BB на 77,1 % ( $p < 0,05$ ) и 70,3 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Величина отека головного мозга и степень проницаемости ГЭБ при применении соединения PDMGLY также уменьшились по отношению к группе животных НК на 4,8 % ( $p < 0,05$ ) и 50,3 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Немаловажно, что полученные данные подтверждались результатами гистоморфологического исследования. При изучении электроэнцефалограммы животных, получавших исследуемое соединение-лидер, отмечено восстановление электрофизиологических процессов в головном мозге после ЧМТ, о чем может свидетельствовать уменьшение мощности дельта и тета-ритмов, а также увеличение амплитуды высокочастотного бета ритма. При этом, по величине фармакологического эффекта исследуемое соединение-лидер не уступало препарату сравнения (статистически значимых отличий между группами животных, получавших вещество PDMGLY и глиатилин не установлено).

Оценивая потенциально возможные механизмы действия соединения-лидера установлено, что на фоне введения крысам вещества PDMGLY, отмечено восстановление эндотелиальной функции, выражаемое в улучшении вазомоторного и антитромботического потенциала эндотелия сосудов. Так в условиях коррекции ЧМТ соединением-лидером наблюдалось увеличение скорости мозгового кровотока в ответ на внутривенное введение АЦХ на 31,4 % ( $p < 0,05$ ), в тоже время при введении L-NAME скорость церебрального кровотока уменьшилась на 19 % ( $p < 0,05$ ), а проявление «L-аргининового парадокса» у животных, получавших вещество PDMGLY, носило менее выраженный характер по сравнению с группой крыс НК. Кроме

того, применение соединения-лидера способствовало снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов в сравнении с группой животных НК на 48,8 % ( $p < 0,05$ ) и 66,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, в то время как, введение референтного препарата значимого влияния на агрегационный потенциал кровяных пластинок не оказало. Также, на фоне введения крысам вещества PDMGLY концентрации СРБ и гомоцистеина была ниже в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ) и на 34,8 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, при этом содержание СРБ у животных, получавших соединение-лидер, было на 50 % ( $p < 0,05$ ) ниже в сравнении с крысами, которым вводили глиатилин. Немаловажно, что в условиях применения вещества PDMGLY отмечено снижение степени разобщения NO – синтазных систем, выражаемое в повышении активности eNOS и уменьшении активности iNOS и nNOS. При этом, восстановление эндотелиальной функции, при применении исследуемого соединения-лидера, вероятно, способствовало восстановлению целостности ГЭБ, уменьшению микроразрывов сосудов микроциркуляторного русла в следствие снижения тромбогенности крови, устранению вазоспазма и снижению величины гидратации головного мозга, что согласуется с литературными данными, отражающими роль структурно-функциональной целостности эндотелия сосудов в патогенезе ЧМТ [151]. В этой связи, целесообразным представляется оценить активность метаболитных транспортных систем, интегрированных в ГЭБ. К числу таких переносчиков можно отнести специфический транспортер глюкозы GLUT-1 [117]. В ходе исследования установлено, что при применении соединения-лидера концентрация GLUT-1 в головном мозге была выше относительно группы крыс НК на 28,6 % ( $p < 0,05$ ), что может лежать в основе повышения степени утилизации глюкозы головным мозгом, на фоне введения животным вещества PDMGLY, т.к. в условиях травмы мозга дисфункция транспортных систем и ограничение внутриклеточного инфлюкса субстратов окисления, является лимитирующим фактором нейронального метаболизма [30].

Кроме того, наблюдаемое повышение степени утилизации глюкозы головным мозгом, может положительно сказываться на функции митохондрий [100].

Являясь связующим звеном между окислительным стрессом, апоптозом и энергодефицитом, митохондрии и в особенности их повреждение, играет существенную роль в патогенезе ЧМТ, а также прогрессировании негативных последствий травмы мозга (рис.30) [88].



**Рисунок 30. Митохондриальные пути повреждения мозговой ткани в условиях ЧМТ**

По всей видимости, сохранение митохондриальной функции на должном уровне, способствует снижению дефицита субстратов для получения энергии в нейронах, с преобладанием энергетически выгодного аэробного метаболизма субстратов окисления, о чем может свидетельствовать снижение концентрации лактата, в условиях коррекции ЧМТ исследуемым соединением-лидером [129]. Кроме того, восстановление функции митохондрий, вероятно, препятствует активации программ

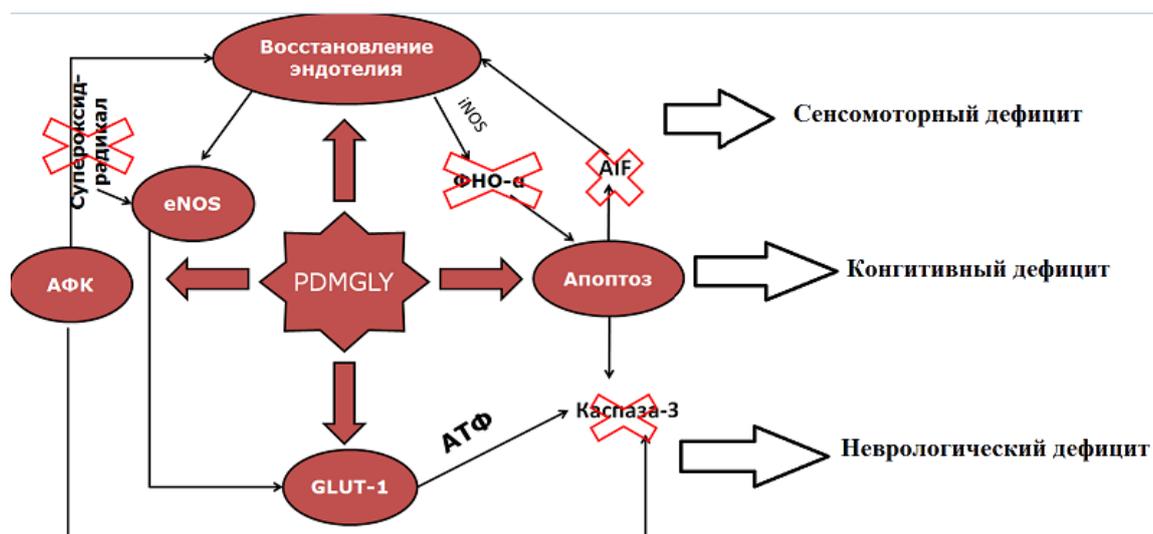
внутриклеточного пути апоптоза, как по каспаза-зависимому, так и каспаза-независимому механизмам [83]. При этом, терминация каспаза-зависимого апоптоза, на фоне введения животным соединения-лидера, возможна на его ранних этапах, как в силу восстановления пула субстратов окисления, так и снижения концентрации ФНО- $\alpha$  (в 2,1 раза ( $p < 0,05$ )) – одного из инициирующих факторов апоптотического сигнала, а также увеличения активности JNK (на 78,1 % ( $p < 0,05$ )), что в конечном счете способствовало уменьшению активности каспазы-3 в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ) [131]. В сложившихся условиях увеличение активности JNK, вероятно, опосредованно усилением каталитических свойств изофермента JNK2, оказывающего антиапоптотическое действие [116]. На молекулярном уровне подавление реакций апоптоза под влиянием JNK2 опосредуется уменьшением экспрессии проапоптотических генов, регулирующих образование ФНО- $\alpha$ , а также за счет прямого ингибирующего действия на эффекторные каспазы, например каспазу-3, уменьшение активности, которой также установлено в ходе данного исследования [154]. Введение глиатилина не оказало значимого влияния на антиапоптотический комплекс JNK.

Кроме того, при применении вещества PDMGLY отмечалось уменьшение концентрации AIF на 104,1 % ( $p < 0,05$ ), тогда как введение референтного препарата значимого влияния на изучаемый показатель не оказало. При этом снижение концентрации AIF может отражать снижение интенсивности реакций каспаза-независимого пути апоптоза.

Помимо подавления апоптотического сигнала, восстановление митохондриальной функции, вероятно, опосредует уменьшение интенсивности окислительного стресса, за счет уменьшения образования супероксид-радикал [53]. Однако, наличие в структуре соединения-лидера сопряженных двойных связей не исключает наличие прямых скэвенджерных свойств вещества PDMGLY в отношении активных форм кислорода [23]. В связи с этим, а также исходя из значимой роли окислительного стресса в

патогенезе ЧМТ, была проведена оценка антиоксидантных свойств соединения лидера, в ходе которой было установлено, что применение соединения-лидера, способствовало уменьшению интенсивности ПОЛ, о чем свидетельствует уменьшение содержания в головном мозге МДА и ДК в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно, а также восстановлении активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты: СОД, Г6Ф-ДГ, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и каталазы.

Подавление реакций апоптоза и окислительного стресса, при применении вещества PDMGLY, вероятно, положительно отражается на адаптивном потенциале мозговой ткани, способствуя уменьшению вторичной деструкции нейронов после ЧМТ, что отражает уменьшение концентрации NSE, GFAP, белка S100 $\beta$  и активности ЛДГ и КФК-ВВ [73]. В тоже время усиление процессов нейропластичности (адаптации) мозговой ткани ведет к редукции негативной симптоматики ЧМТ, проявляемой в виде неврологического, сенсомоторного и когнитивного дефицита [21]. Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что применение нового производного пиримидина – PDMGLY в условиях экспериментальной ЧМТ способствовало устранению неврологического, сенсомоторного и когнитивного дефицита (результаты подтверждались биохимическими, функциональными и гистоморфологическими тестами), нивелируя, тем самым, основные негативные прогностические факторы осложнений травмы мозга [149]. При этом, в основе положительного влияния соединения PDMGLY, на функциональное состояние головного мозга в условиях его травмы, может лежать устранение дефицита субстратов для получения энергии и нормализация обмена субстратов окисления, восстановление эндотелиальной функции, подавление реакций апоптоза и окислительного стресса, что можно представить в виде следующей схемы (рис.31).



**Рисунок 31. Эффекты соединения PDMGLY и возможные механизмы их развития в условиях экспериментальной ЧМТ**

Также, основываясь на полученных данных, можно предположить целесообразность дальнейшего изучения соединения PDMGLY с целью создания на его основе церебропротекторного средства для терапии ЧМТ.

## Общие выводы

1. Установлено, что изучаемые производные пиримидин-4-1(Н)-она относятся к 5-му классу токсичности по СГС-классификации, т.к. гибели животных не наблюдалось.

2. Скрининг производных пиримидин-4-1(Н)-она позволил установить, что наиболее выраженным церебропротекторным действием обладает соединение PDMGLY, что нашло свое отражение в снижении неврологического и сенсомоторного дефицита на 150 % ( $p < 0,05$ ) и 71,4% ( $p < 0,05$ ), также, введение данного соединения способствовало сохранению линейной скорости церебрального кровотока и было сопоставимо по фармакологической активности с препаратом сравнения.

3. Анализ зависимости «доза-эффект» позволил установить, что наиболее выраженное церебропротекторное действие соединение PDMGLY оказывает в дозе 50 мг/кг.

4. На фоне введения вещества PDMGLY в дозе 50 мг/ кг концентрация цереброспецифичного белка S100  $\beta$  была ниже в 1,53 ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных, получавших референтный препарат.

5. Применение соединения PDMGLY в дозе 50 мг/кг способствовало сохранению памятного следа и восстановлению эмоционального фона у животных в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы, в то время как препарат сравнения значимого влияния на данные показатели влияния не оказал.

6. Введение исследуемого объекта PDMGLY способствовало снижению (относительно крыс, лишенных фармакологической поддержки) активности ЛДГ (на 77,1% ( $p < 0,05$ )), КФК-ВВ (на 65% ( $p < 0,05$ )), концентрации NSE и GFAP (на 113,9% ( $p < 0,05$ ) и 96,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно), степени гидратации и проницаемости ГЭБ, а также восстановлению биоэлектрического потенциала нейронов, уменьшению неврологического дефицита и было сопоставимо с глиатилином.

7. На фоне введения животным соединения-лидера в дозе 50 мг/кг в условиях экспериментальной ЧМТ отмечено восстановление эндотелиальной функции, про/антиоксидантного баланса. Препарат сравнения оказал меньшее терапевтическое влияние на агрегацию тромбоцитов, противовоспалительную функцию эндотелия, а также на активность ферментов NOS по сравнению с исследуемым соединением PDMGLY

8. Применение соединения PDMGLY способствовало снижению AIF на 57,7 % ( $p < 0,05$ ) и повышению комплекса JNK на 40,2% ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных, получавших глиатилин. Кроме того, при введении соединения-лидера PDMGLY, концентрация транспортера глюкозы GLUT1 была выше на 28,6% ( $p < 0,05$ ) по отношению к животным, лишенным фармакологической поддержки и было сопоставимо по величине фармакологического эффекта с референтным препаратом.

### **Научно-практические рекомендации**

1. Следует продолжить дальнейшее исследование соединения PDMGLY с целью создания на его основе церебропротекторного лекарственного препарата для лечения черепно-мозговой травмы
2. Результаты экспериментальной работы позволяют рекомендовать химикам-синтетикам целенаправленный поиск и синтез в ряду пиримидинов, новых высоко активных соединений для коррекции церебральных нарушений различного генеза.

## **Список сокращений**

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ДТП – дорожно-транспортное происшествие

NOS – синтаза оксида азота

eNOS- эндотелиальная синтаза оксида азота

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ФНО – фактор некроза опухоли

ИФН – интерферон

ИЛ – интерлейкин

GLUT – транспортер глюкозы

АФК – активные формы кислорода

AIF – апоптоз-индуцирующий фактор

JNK - c-Jun-концевая киназа

PUMA – p53-зависимый регулятор апоптоза

BACE-1 -  $\beta$ -АПП-расщепляющий фермент-1

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

mNSS – (modified neurological severity score)

УРПИ - условный рефлекс пассивного избегания

ТЭИ - тест «экстраполяционного избавления»

ЭЭГ – электроэнцефалограмма

КФК-ВВ - креатинфосфокиназа-ВВ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

АЦХ – ацетилхолин

L - NAME - нитро-L—аргинин метиловый эфир

НТГ – нитроглицерин

ДК - диеновые конъюгаты

МДА - малоновый диальдегид

СОД - супероксиддисмутаза

ГП – глутатионпероксидаза

ГР - глутатионредуктаза

Г6Ф-ДГ- глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

NSE - нейрон-специфичная енолаза

CASP-3 - каспаза -3

ИЖ – интактные животные;

НК – группа крыс негативного контроля

## Библиографический список

1. Березовская И. В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях // Токсикологический вестник. – 2010. – № 5 (104). – С. 17–22.
2. Воронков А. В., Мамлеев А. В., Поздняков Д. И. Изучение влияния 2-стирилпроизводных пиримидин-4 (1Н)-она на состояние антитромботического потенциала, на фоне экспериментально вызванной недостаточности половых гормонов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18. – №. 2.,
3. Воронков А.В., Калашникова С.А., Хури Е.И., Поздняков Д.И. Моделирование черепно-мозговой травмы в условиях эксперименмета у крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5.;URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25242> (дата обращения: 18.03.2019).
4. Воронков А.В., Оганесян Э.Т., Поздняков Д.И., и др. Влияние флавоноидов: гесперидина и патулетина на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга экспериментальных животных на фоне его фокальной ишемии // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2017. - №19 (268). - С.186-194
5. Габбасов З.А. Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. // Лабораторное дело.-1989.- №10.-С.15-18.
6. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. –1983. - № 3. –С. 33 – 35.
7. Ганнушкина И. В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 2000. - № 9. - С. 22-27 .

8. Ковалев В.В. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе травматического повреждения головного мозга // Нейрохирургия. – 2005. – №. 1. – С. 32-35.
9. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. - № 1. –С. 16 – 19.
10. Манжуло И. В. Дозозависимый антиболевого эффект докозагексаеновой кислоты при экспериментальной периферической нейропатии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – №. 2 (52).- С.31-33.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая/Под ред. А.Н. Миронова.- М.: Гриф и К, 2012.-944 с.
12. Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ / Всемирная организация здравоохранения. Нью-Йорк-Женева, 2011.
13. Сочнев В. С. Поиск новых ингибиторов цог-2 в ряду сульфаниламидных производных 1н-пиримидин-4-она // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №. 11-5. – С. 694-695
14. Сочнев В.С. Синтез и изучение взаимосвязи "структура-активность" серосодержащих производных 1,3-диазинона-4: диссер. ... канд. фармацевт. н-к.: Волгоград, 2016.- 166 с.
15. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК // Современные методы в биохимии /под. ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977 – С. 44-46.
16. Суфианова Г. З., Суфианов А.А., Витик А.А., Немко А.Г., Кустов В.В. Новые перспективы нейропротекторной терапии ЧМТ // Медицинская наука и образование Урала. – 2014. – Т. 15. – №. 2. – С. 155-158.
17. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Доркина Е.Г. Влияние гесперидина и флавицина на печеночный кровоток в норме и в условиях стимуляции

- и блокады синтеза эндогенного оксида азота // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2006.- Т5, №3.- С.84-87.
18. Abdulghani J. El-Deiry WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics // *Expert Opin Ther Targets*. -2010.-№14.-P.1091–1108.
19. Agoston D.V., Sköld M.K. Editorial: When Physics Meets Biology; Biomechanics and Biology of Traumatic Brain Injury // *Front. Neurol.* - 2016.-№7.-P.91-111.
20. Albert-Weissenberger C., Mencl S., Hopp S., Kleinschnitz C., Sirén A.L. Role of the kallikrein-kinin system in traumatic brain injury // *Front Cell Neurosci.* – 2014.-№8.-P. 345-355.
21. Algattas H., Huang J.H. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury // *Int J Mol Sci.* - 2014.-№15(1).-P.309–341.
22. Alluri H., Grimsley M., Anasooya Shaji C. Attenuation of Blood-Brain Barrier Breakdown and Hyperpermeability by Calpain Inhibition // *J Biol Chem.* – 2016.-№291(53).-P.26958-26969.
23. Apostolova N, Victor V.M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications // *Antioxid Redox Signal.* -2015-№22(8).-P. 686-729.
24. Ashour H.M, Shaaban O.G, Rizk O.H, El-Ashmawy I.M. Synthesis and biological evaluation of thieno [2',3':4,5]pyrimido[1,2-b][1,2,4]triazines and thieno[2,3-d] [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines as anti-inflammatory and analgesic agents // *Eur J Med Chem.* – 2013.-№62.-P.341–351.
25. Badaut J., Ashwal S., Obenaus A. Aquaporins in cerebrovascular disease: A target for treatment of brain edema? // *Cerebrovasc Dis.*-2011.-№31.-P. 521–531.
26. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury // *Biochim Biophys Acta.* -2011-№1822(5).-P.675-84.

27. Bhalgat C.M., Ali M.I., Ramesh B., Ramu G. Novel pyrimidine and its triazole fused derivatives: synthesis and investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity // Arab J Chem.- 2014.-№7.-P.986–993.
28. Bian X., Yuan X., and Qi C. Effect of recombinant human erythropoietin on serum S100B protein and interleukin-6 levels after traumatic brain injury in the rat // Neurol. Med. Chir. (Tokyo).-2010.-№50.- P. 361–366
29. Bigler E. D., Maxwell W. L. Neuroimaging and neuropathology of TBI // Neurorehabilitation.-2011.-№28.-P. 63–74.
30. Blázquez E., Velázquez E., Hurtado-Carneiro V., Ruiz-Albusac J.M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease // Front Endocrinol (Lausanne).- 2014.-№5.- P.161.
31. Bogoslovsky T., Gill J., Jeromin A., Davis C., Diaz-Arrastia R. Fluid Biomarkers of Traumatic Brain Injury and Intended Context of Use // Diagnostics (Basel). – 2016.-№ 6(4).-P.37-43.
32. Bondi C.O., Semple B.D., Noble-Haeusslein L.J. Found in translation: Understanding the biology and behavior of experimental traumatic brain injury // Neurosci Biobehav Rev. – 2014.-№58.-P.123-146.
33. Bragge P., Synnot A., Maas A.I. A State-of-the-Science Overview of Randomized Controlled Trials Evaluating Acute Management of Moderate-to-Severe Traumatic Brain Injury // J Neurotrauma. – 2016.-№ 33(16).- P.1461-1478.
34. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries // Neuroscience letters. -2014.- №565.-P.7-13.
35. Brown J.M., Deriso D.M., Tansey K.E. From contemporary rehabilitation to restorative neurology // Clin Neurol Neurosurg.-2012.-№ 114(5).-P.471–474.
36. CDC. Injury, Prevention, & Control: Traumatic Brain Injury. Center for Disease Control and Prevention; 2010

37. Centers for Disease, Control, Prevention. CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States // *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*- 2013.-№ 62(27).-P. 549–552.
38. Chauhan N.B., Gatto R. Synergistic benefits of erythropoietin and simvastatin after traumatic brain injury // *Brain Res.* 2010.-№1360.-P. 177–192
39. Cheong C.U, Chang C.P., Chao C.M., Cheng B.C. Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing brain TNF-  $\alpha$  contents and by stimulating newly formed neurogenesis // *Mediators Inflamm.*-2013.-№.2013.-e620837.
40. Cherian L., Goodman J.C., Robertson C. Improved cerebrovascular function and reduced histological damage with darbepoietin alfa administration after cortical impact injury in rats // *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 2011.- №337.-P. 451–456
41. Chiang Y.H., Chao D.P., Chu S.F. Early enteral nutrition and clinical outcomes of severe traumatic brain injury patients in acute stage: a multi-center cohort study // *J Neurotrauma.* – 2012.-№29(1).-P.75–80.
42. Chiarugi A. “Simple but not simpler”: toward a unified picture of energy requirements in cell death // *FASEB J.*- 2005.-№19.-P.1783–1788.
43. Chou A., Krukowski K., Jopson T. Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2017.-№114(31).-P.E6420-E6426.
44. Colucci L., Bosco M., Rosario Ziello A., Rea R. Effectiveness of nootropic drugs with cholinergic activity in treatment of cognitive deficit: a review // *J Exp Pharmacol.* – 2012.-№4.-P.163-172.
45. Courtney A., Courtney M. The complexity of biomechanics causing primary blast-induced traumatic brain injury: a review of potential mechanisms // *Front. Neurol.*- 2015.-№6.-P.221 - 242.

46. Daneshvar D.H., Nowinski C.J., McKee A.C. The epidemiology of sport-related concussion // *Clin Sports Med.* - 2011.-№30.-P.1–17.
47. Daneshvar D.H., Riley D.O., Nowinski C.J. Long-term consequences: effects on normal development profile after concussion // *Phys Med Rehabil Clin N Am.* – 2011.-№22.-P. 683–700.
48. Dash P.K., Hergenroeder G.W., Jeter C.B., Choi H.A. Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology // *Front Syst Neurosci.* - 2016.-№10.-P.36-42.
49. Del Amo E.M., Urtti A., Yliperttula M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2008ю.-№35.-P.161–174.
50. Deng Y., Zhou X., Kugel D.S. Synthesis and biological activity of a novel series of 6-substituted thieno[2,3-d]pyrimidine antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors over the reduced folate carrier and proton-coupled folate transporter for cellular entry // *J Med Chem.* – 2009.-№52(9).-P. 2940-2951.
51. Devraj K., Klinger M.E., Myers R.L., Mokashi A. GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation // *J Neurosci Res.* – 2011.-№89 (12).- P. 1913-1925.
52. Dhanasekaran D.N., Reddy E.P. JNK signaling in apoptosis // *Oncogene.* - 2008.-№27(48).-P.6245-6251.
53. Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016.-№2016.-P.e1245049
54. Diaz-Arrastia R., Kochanek P.M., Bergold P. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup // *J Neurotrauma.* – 2014.-№31(2).-P.135-58.
55. Escobar-Khondiker M., Hollerhage M., Muriel M.P. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons

- // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience – 2007.-№27.- P.7827–7837.
- 56.Fahlenkamp A.V., Coburn M., Czaplik M., Ryang Y.-M., Kipp M., Rossaint R., Beyer C. Expression analysis of the early chemokine response 4 h after in vitro traumatic brain injury // Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.- 2011.-№60.-P. 379–387.
- 57.Faul MD, Xu L. TBI in the United States: emergency department visits, hospitalizations, and deaths 2002–2006. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control; 2010.
- 58.Fehily B, Fitzgerald M. Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage // Cell Transplant. – 2017.-№26(7).-P.1131-1155.
- 59.Finney D.J. Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge University Press, London and New York, 1947.
- 60.Fortier CB, Amick MM, Grande L. The Boston Assessment of Traumatic Brain Injury–Lifetime (BAT-L) Semistructured Interview: Evidence of Research Utility and Validity // The Journal of head trauma rehabilitation. – 2014.-№29(1).-P.89-98.
- 61.Fortier C.B., Amick M.M., Kenna A., Milberg W.P. Correspondence of the Boston Assessment of Traumatic Brain Injury-Lifetime (BAT-L) clinical interview and the VA TBI screen // J Head Trauma Rehabil. – 2015.-№30(1).-P.1-7.
- 62.Gaetz M., Bernstein D. The current status of electrophysiologic procedures for the assessment of mild traumatic brain injury // J. Head Trauma Rehabil 2001.-№16.-P. 386–405.
- 63.Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M. Molecular definitions of cell death subroutines:recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // Cell Death Differ. – 2012.-№19.-P. 107–120.

64. Ganguly P., Alam S.F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease // *Nutr J.* – 2015.-№14.-P.6-10.
65. Gardner A.J., Griffiths J. Propranolol, post-traumatic stress disorder, and intensive care: incorporating new advances in psychiatry into the ICU // *Crit Care.* – 2014.-№18(6).- P.698-303.
66. Gerhardt V., Egert E. Cocrystals of 6-chlorouracil and 6-chloro-3-methyluracil: exploring their hydrogen-bond-based synthon motifs with several triazine and pyrimidine derivatives // *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials.* – 2015. – T. 71. – №. 2. – P. 209-220.
67. Gerson J., Castillo-Carranza D.L., Sengupta U. Tau Oligomers Derived from Traumatic Brain Injury Cause Cognitive Impairment and Accelerate Onset of Pathology in Htau Mice // *J Neurotrauma.* – 2016.-№33(22).-P. 2034-2043.
68. Glenn T.C., Martin N.A., Horning M.A. Lactate: brain fuel in human traumatic brain injury: a comparison with normal healthy control subjects // *J Neurotrauma.* – 2015.-№32(11).-P.820-832.
69. Goldberg D.M., Spooner RJ In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.V. Ed.) // Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fl 3rd edn. 1993.- T.3.-P. 258-265.
70. Graham D.I., Gennarelli T.A., McIntosh T.K. Trauma. In: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfield's Neuropathology.* Arnold; London: 2002. P. 823–898.
71. Gruenbaum S.E., Zlotnik A., Gruenbaum B.F., Hersey D., Bilotta F. Pharmacologic Neuroprotection for Functional Outcomes After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Clinical Literature // *CNS Drugs.* – 2016.-№30(9).-P. 791-806.
72. Guseva M.V., Hopkins D.M., Scheff S.W., Pauly J.R. Dietary choline supplementation improves behavioral, histological, and neurochemical

- outcomes in a rat model of traumatic brain injury // J Neurotrauma.- 2008.- №25(8).-P.975-983
- 73.Hagmeyer S., Cristóvão J.S., Mulvihill J.JE, Boeckers T.M., Gomes C.M., Grabrucker A.M. Zinc Binding to S100B Affords Regulation of Trace Metal Homeostasis and Excitotoxicity in the Brain // Front Mol Neurosci. – 2018.-№10.-P. e456.
- 74.Haque A., Ray S.K., Cox A., Banik N.L. Neuron specific enolase: a promising therapeutic target in acute spinal cord injury // Metabolic brain disease. – 2016.-№31(3).-P.487-495.
- 75.Helmy A., Guilfoyle M.R., Carpenter K.L., Pickard J.D., Menon D.K., Hutchinson P.J. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in severe traumatic brain injury: a phase II randomized control trial // J Cereb Blood Flow Metab. -2014.-№34(5).- P. 845-51.
- 76.Hoglinger G.U., Lannuzel A., Khondiker M.E., Michel P.P. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy / Journal of neurochemistry.- 2005.-№95.-P. 930–939.
- 77.<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- 78.Hukkelhoven C.W., Rampen A.J., Maas A.I. Some prognostic models for traumatic brain injury were not valid // J Clin Epidemiol.-2006.-№59.- P.132–143.
- 79.Hyder A.A., Wunderlich C.A., Puvanachandra P., Gururaj G., Kobusingye O.C. The impact of traumatic brain injuries: A global perspective // NeuroRehabilitation. – 2007.-№22.- P.341–353.
- 80.Izzy S., Muehlschlegel S. Cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and traumatic brain injury // Curr Treat Options Neurol.- 2014.-№16.-P.278-298.
- 81.Jullienne A., Obenaus A., Ichkova A., Savona-Baron C., Pearce W.J, Badaut J. Chronic cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury // Journal of neuroscience research.- 2016.-№94(7).-P.609-622.

82. Khutornenko A.A., Roudko V.V., Chernyak B.V., Vartapetian A.B., Chumakov P.M., Evstafieva A.G. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010.-№107(29).- P.12828-12833.
83. Knoblach S.M., Nikolaeva M., Huang X. Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome // *J Neurotrauma*. – 2002.-№19.-P. 1155– 1170.
84. Kochanek P.M. Cerebral blood flow at one year after controlled cortical impact in rats: assessment by magnetic resonance imaging. // *J Neurotrauma*. – 2002.-№19.-P. 1029–1037.
85. Kochanek P.M., Jackson T.C., Ferguson N.M. Emerging therapies in traumatic brain injury // *Semin Neurol*. – 2015.-№35(1).-P.83-100.
86. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // *Nat Rev Immunol*.-2013.-№13.-P. 159–175.
87. Krajewska M., You Z., Rong J. Neuronal deletion of caspase 8 protects against brain injury in mouse models of controlled cortical impact and kainic acid-induced excitotoxicity // *PLoS One*.-2011.№6,-P. e24341.
88. Kulbe J.R., Hill R.L., Singh I.N., Wang J.A., Hall E.D. Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A // *J Neurotrauma*. – 2017.-№34(7).-P.1291-1301.
89. Kumar R. Crouthamel M.C., Rominger D.H., Gontarek R.R., Tummino P.J., Levin R.A. Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase angiogenesis inhibitors // *Br J Cancer*. – 2009.-№ 101.-P.1717–1723
90. Langlois J.A., Rutland-Brown W., Wald M.M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview // *J. Head Trauma Rehabil*. – 2003.-№21.-P. 375–378.

91. Levin H.S., Diaz-Arrastia R.R. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury // *Lancet Neurol.* -2015.-№14.- P. 506–517.
92. Levin H.S., Robertson C.S. Mild Traumatic Brain Injury in Translation // *Journal of Neurotrauma.* – 2013.-№30(8).-P.610-617.
93. Li B., Mahmood A., Lu D., Wu H., Xiong Y., Qu C. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1 $\beta$  level after traumatic brain injury // *Neurosurgery.*-2009.-№ 65.-P. 179–186.
94. Liu W., Chen Y., Meng J. Ablation of caspase-1 protects against TBI-induced pyroptosis in vitro and in vivo // *J Neuroinflammation.* – 2018.-№15(1).-P.48-55.
95. Loane D.J., Stoica B.A., Faden A.I. Neuroprotection for traumatic brain injury // *Handb Clin Neurol.* – 2015.-№127.- P. 343-66.
96. Logsdon A.F., Lucke-Wold B.P., Turner R.C., Huber J.D. Role of Microvascular Disruption in Brain Damage from Traumatic Brain Injury // *Compr Physiol.* – 2015.-№5(3).-P.1147-60.
97. Lohr G.W., Waller H.D: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Edition - Verlag Chemie, Wehnhelm: 1974; P. 636.
98. Lowry O.H. Protein measurement with folin phenol reagent // *The Journal of Biological Chemistry.* -1951.-№ 193.- P. 265-275.
99. Lucke-Wold B.P., Logsdon A.F., Nguyen L. Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury // *Nutr Neurosci.* – 2016.-№21(2).-P.79-91.
100. MacDonald M.J., Ade L., Ntambi J.M., Ansari I.U., Stoker S.W. Characterization of phospholipids in insulin secretory granules and mitochondria in pancreatic beta cells and their changes with glucose stimulation // *J Biol Chem.* – 2015.-№290(17).-P.11075-11092.
101. Manaenko A., Chen H., Kammer J., Zhang J.H, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for

- measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model // *J Neurosci Methods*. – 2010.-№195(2).-P.206-10.
102. Mangiola A., Vigo V., Anile C., De Bonis P., Marziali G., Lofrese G. Role and Importance of IGF-1 in Traumatic Brain Injuries // *Biomed Res Int*.- 2015.-№2015.-P. e736104.
103. Margulies S., Hicks R., Combination Therapies for Traumatic Brain Injury Workshop Leaders. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations // *J Neurotrauma*. – 2009.-№26(6).-P.925-39.
104. Marion C.M., Radomski K.L., Cramer N.P., Galdzicki Z., Armstrong R.C. Experimental Traumatic Brain Injury Identifies Distinct Early and Late Phase Axonal Conduction Deficits of White Matter Pathophysiology, and Reveals Intervening Recovery // *J Neurosci*. – 2018.-№38(41).-P. 8723-8736.
105. McAllister T.W. Neurobiological consequences of traumatic brain injury // *Dialogues Clin Neurosci*. – 2011.-№13.-P 287–300.
106. Mckee A.C., Daneshvar D.H. The neuropathology of traumatic brain injury // *Handb Clin Neurol*. – 2015.-№127.-P. 45-66.
107. McKee A.C., Stern R.A., Nowinski C.J., Stein T.D., Alvarez V.E., Daneshvar D.H. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy // *Brain*. – 2013.-№136.-P.43–64
108. Mendes Arent A., de Souza L.F., Walz R., Dafre A.L. Perspectives on molecular biomarkers of oxidative stress and antioxidant strategies in traumatic brain injury // *Biomed Res Int*. – 2014.-№2014.-P.e723060.
109. Meneghesso S., Vanderlinden E., Stevaert A., McGuigan C., Balzarini J., Naesens L. Synthesis and biological evaluation of pyrimidine nucleoside monophosphate prodrugs targeted against influenza virus / *Antivir Res*. – 2012.-№94.-P.35–43.
110. Mutch C.A., Talbott J.F., Gean A. Imaging Evaluation of Acute Traumatic Brain Injury // *Neurosurg Clin N Am*. – 2016.-№27(4).-P.409-39.

111. Narayan R.K., Michel M.E., Ansell B. Clinical trials in head injury // *J Neurotrauma*. – 2002.-№19(5).-P.503–57
112. O'Connor W.T., Smyth A., Gilchrist M.D. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation // *Pharmacol. Ther.* – 2011.-№.130.-P. 106–113
113. Olive M.F., Cleva R.M., Kalivas P.W., and Malcolm R.J. Glutamatergic medications for the treatment of drug and behavioral addictions // *Pharmacol. Biochem. Behav.* -2012.- №100.-P. 801–810
114. Piao C.S., Loane D.J., Stoica B.A. Combined inhibition of cell death induced by apoptosis inducing factor and caspases provides additive neuroprotection in experimental traumatic brain injury // *Neurobiol Dis.* – 2012.-№46.-P.745–758.
115. Pierce S., Tappel A.L. Glutathione peroxidase activities from rat liver // *Biochim. et biophys. Acta.* - 1978. - № 1. – P. 27 – 36.
116. Pietkiewicz S., Sohn D., Piekorz R.P. Oppositional regulation of Noxa by JNK1 and JNK2 during apoptosis induced by proteasomal inhibitors // *PLoS One*. – 2013.-№8(4).-P. e61438.
117. Pirttimaki T.M., Sims R.E., Saunders G., Antonio S.A. Astrocyte-Mediated Neuronal Synchronization Properties Revealed by False Gliotransmitter Release // *J Neurosci.* – 2017.-№37(41).-P. 9859-9870.
118. Plassman B.L., Havlik R.J., Steffens D.C., Helms M.J. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias // *Neurology*.- 2000.-№55.- P. 1158–1166
119. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J Biol Chem.* – 2013.-№288(37).-P.26464-26472.
120. Rani J., Kumar S., Saini M., Mundlia J., Verma P.K. Biological potential of pyrimidine derivatives in a new era // *Res Chem Intermed.* – 2016.-№42.-P. 6777–6804.

121. Rapp P.E., Keyser D.O., Albano A. Traumatic Brain Injury Detection Using Electrophysiological Methods // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2015.-№9.-P.11. doi:10.3389/fnhum.2015.00011.
122. Reis C., Wang Y., Akyol O. What's New in Traumatic Brain Injury: Update on Tracking, Monitoring and Treatment // *Int J Mol Sci*. – 2015.-№16(6).-P.11903-11965.
123. Rodriguez U.A., Zeng Y., Deyo D. Effects of Mild Blast Traumatic Brain Injury on Cerebral Vascular, Histopathological, and Behavioral Outcomes in Rats // *J Neurotrauma*. – 2018.-№35(2).-P.375-392.
124. Romner B., Ingebrigtsen T., Kongstad P., Borgesen S.E. Traumatic brain damage: serum S-100 protein measurements related to neuroradiological findings // *J Neurotrauma*.- 2000.-№17.-P.641–647.
125. Roozenbeek B., Lingsma H.F., Maas A.I. New considerations in the design of clinical trials for traumatic brain injury // *Clin Investig (Lond)*.- 2012.-№2(2).-P. 153–162.
126. Roozenbeek B., Maas A.I.R, Menon D.K. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury // *Nat Rev Neurol*.-2013.-№9.-P.231–251.
127. Rubiano A.M., Carney N., Chesnut R., Puyana J.C. Global neurotrauma research challenges and opportunities // *Nature*. – 2015.-№527.-P. 193–197.
128. Salehi A., Zhang J.H., Obenaus A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2017.-№37(7).-P. 2320-2339.
129. Schurr A. Cerebral glycolysis: a century of persistent misunderstanding and misconception // *Front Neurosci*.- 2014.-№8.- P.360.
130. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide // *Interdisciplinary Toxicology Sep*.- 2013.-№6(3).- P. 126–135.

131. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases // *Cell Death Differ.* – 2014.-№22(4).- P.526-39.
132. Sheila M. Osunde R. Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease // *J Vis Exp.* – 2013.-№ 76.-P. 50303.
133. Shenton M.E., Hamoda H.M., Schneiderman J.S. A review of magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging findings in mild traumatic brain injury // *Brain Imaging Behav.* – 2012.-№6(2).-P.137-192.
134. Shi Z., Qiu W., Xiao G., Cheng J., Zhang N. Resveratrol Attenuates Cognitive Deficits of Traumatic Brain Injury by Activating p38 Signaling in the Brain. *Medical Science Monitor // International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* – 2018.-№24.-P.1097-1103.
135. Silver J., Koumaras B., Meng X., Potkin S.G., Reyes P.F. Long-term effects of rivastigmine capsules in patients with traumatic brain injury // *Brain Inj.* – 2009.-№23.-P. 123–132
136. Simon D.W., McGeachy M.J., Bayır H., Clark R.S. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury // *Nat Rev Neurol.* – 2017.-№13(3).-P.171-191.
137. Singleton R.H., Stone J.R., Okonkwo D.O., Pellicane A.J., and Povlishock J.T. The immunophilin ligand FK506 attenuates axonal injury in an impact-acceleration model of traumatic brain injury // *J. Neurotrauma.*- 2001.-№18.-P. 607–614
138. Somayaji M.R., Przekwas A.J., Gupta R.K. Combination Therapy for Multi-Target Manipulation of Secondary Brain Injury Mechanisms // *Curr Neuropharmacol.* – 2018.-№16(4).-P.484-504.
139. Song J., Yoo J., Kwon A. Structure-Activity Relationship of Indole-Tethered Pyrimidine Derivatives that Concurrently Inhibit Epidermal Growth Factor Receptor and Other Angiokinases // *PLoS One.* – 2015.-№10(9).-P.e0138823. Published 2015 Sep 24. doi:10.1371/journal.pone.0138823,

140. Stefano T. RAS inhibitors' dose-dependent efficacy: myth or reality? // *Current Medical Research and Opinion* .-2011.-№31.-P.1245-1256.
141. Stein T.D., Alvarez V.E., McKee A.C. Chronic traumatic encephalopathy: a spectrum of neuropathological changes following repetitive brain trauma in athletes and military personnel // *Alzheimers Res Ther.* - 2014.-№6.-P.4.
142. Stovell M.G., Yan J-L, Sleigh A. Assessing Metabolism and Injury in Acute Human Traumatic Brain Injury with Magnetic Resonance Spectroscopy: Current and Future Applications // *Frontiers in Neurology*.- 2017.-№8.-P.426.
143. Sun L., Zhao M., Zhang J. MiR-144 promotes  $\beta$ -amyloid accumulation-induced cognitive impairments by targeting ADAM10 following traumatic brain injury // *Oncotarget*. – 2017.-№8(35).-P.59181-59203.
144. Tagge C.A., Fisher A.M., Minaeva O.V. Concussion, microvascular injury, and early tauopathy in young athletes after impact head injury and an impact concussion mouse model // *Brain*. – 2018.-№141(2).-P.422-458.
145. Tang M., Gao G., Rueda C.B. Brain microvasculature defects and Glut1 deficiency syndrome averted by early repletion of the glucose transporter-1 protein // *Nat Commun*. – 2017.-№8.-P.e14152.
146. Thelin E.P., Nelson D.W., Bellander B-M. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury // *Acta Neurochirurgica*. – 2017.-№159(2).-P.209-225.
147. Titus D.J., Wilson N.M., Freund J.E. Chronic Cognitive Dysfunction after Traumatic Brain Injury Is Improved with a Phosphodiesterase 4B Inhibitor // *The Journal of Neuroscience*. – 2016.-№36(27).-P.7095-7108.
148. Toklu H.Z., Muller-Delp J., Yang Z. The functional and structural changes in the basilar artery due to overpressure blast injury // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2015.-№35(12).-P.1950-1956.

149. Toledo E., Lebel A., Bécerra L. The young brain and concussion: imaging as a biomarker for diagnosis and prognosis // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2012.-№36(6).-P.1510-31.
150. Vale N., Ferreira A., Matos J., Fresco P., Gouveia M.J. Amino Acids in the Development of Prodrugs // *Molecules.* – 2018.-№23(9).-P. 2318.
151. Villalba N., Sonkusare S.K., Longden T.A. Traumatic brain injury disrupts cerebrovascular tone through endothelial inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide gain of function // *J Am Heart Assoc.*- 2014.-№3(6).-P.e001474.
152. Walker K.R., Tesco G. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury // *Frontiers in Aging Neuroscience.* – 2013.-№5.-P.29.
153. Weber J.T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury // *Front Pharmacol.* – 2012.-№3.-P.60.
154. Weston C.R., Davis R.J. The JNK signal transduction pathway // *Curr Opin Cell Biol.*- 2007.-№19.-P. 142–149.
155. Wheaton P., Mathias J.L., Vink R. Impact of pharmacological treatments on cognitive and behavioral outcome in the postacute stages of adult traumatic brain injury: a meta-analysis // *J. Clin. Psychopharmacol.*- 2011.-№ 31.-P. 745–757
156. Whyte J., Katz D., Long D., DiPasquale M.C., Polansky M., Predictors of outcome in prolonged posttraumatic disorders of consciousness and assessment of medication effects: A multicenter study // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 2005.-№86.-P. 453–462
157. Woolliams J.A., Wiener G, Anderson P.H., McMurray C.H. SOD determination // *Research in Veterinary Science.*- 1983.-№ 34.-P. 253-256.
158. Xiong Y., Mahmood A., Zhang Y., Meng Y., Zhang Z.G., Qu C., Sager T.N. Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis

- and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury // *J. Neurosurg.*-2011.-№ 114.-P. 549–559.
159. Yu F., Wang Z., Tchantchou F., Chiu C.-T., Zhang Y., Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury // *J. Neurotrauma.*- 2012.-№ 29.-P. 362–374.
160. Yu G.X., Mueller M., Hawkins B.E., Traumatic brain injury in vivo and in vitro contributes to cerebral vascular dysfunction through impaired gap junction communication between vascular smooth muscle cells // *J Neurotrauma.*- 2014.-№31.-P.739-748.
161. Zafonte R., Friedewald W.T., Lee S.M. The citicoline brain injury treatment (COBRIT) trial: design and methods // *J Neurotrauma.* – 2009.-№26(12).-P.2207-2216.
162. Zeke A., Misheva M., Reményi A., Bogoyevitch M.A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2016.-№80(3).-P.793-835.
163. Zhang R., Liu Y., Yan K. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury // *Journal of Neuroinflammation.* – 2013.-№10.-P.106.
164. Zhang Y., Luo L., Han C. Design, Synthesis, and Biological Activity of Tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine Derivatives as Anti-Inflammatory Agents // *Molecules.* – 2017.-№22(11).-P.1960.
165. Zanutama B., Dinda S.C., Prasad Y.R., Rao A.V. Synthesis and antimicrobial activity of some new 2,4,6-trisubstituted pyrimidines. // *Int J Res Pharm Chem.* – 2012.-№2(2).-P.231–236.