

На правах рукописи



ТИТОВИЧ ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**АНТИГИПОКСИЧЕСКАЯ И НООТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ЯНТАРНОЙ СОЛИ  
ФУМАРОВОГО ЭФИРА ДИЭТИЛАМИНОЭТАНОЛА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель: Болотова Вера Цезаревна** кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Звартау Эдвин Эдуардович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор Института фармакологии имени А.В. Вальдмана

**Зарубина Ирина Викторовна**, доктор биологических наук, профессор, старший преподаватель кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России)

Защита состоится «11» декабря 2018 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» по адресу 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» <http://www.toxicology.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор

Луковникова Любовь Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Гипоксия и ишемия головного мозга возникают при таких патологических состояниях, как, острые и хронические нарушения мозгового кровообращения, черепно-мозговые травмы, дыхательная и сердечная недостаточность, кровопотеря, выраженная гипотензия, шок и кома различной природы, отравления угарным газом и другими поражающими гемоглобин или дыхательные ферменты токсикантами, дефицит кислорода во вдыхаемом воздухе, гравитационные перегрузки, перегревание, переохлаждение и других неблагоприятных воздействиях [Катунина Н.П., 2011; Зарубина И. В., 2004]. При этом цереброваскулярные нарушения, в том числе мозговые инсульты, занимают ведущие место в мире по заболеваемости, инвалидизации и смертности [Парфенов В.А., 2014]. Это обуславливает высокую актуальность поиска новых способов фармакологической защиты мозга при гипоксии и ишемии.

**Степень разработанности темы.** Учитывая многокомпонентный характер нарушений, возникающих в мозге при ишемии и ЧМТ различного генеза, для решения задачи фармакопротекции нервной системы при травмах и повреждениях гипоксически-ишемического характера перспективным представляется использование производных диэтиламиноэтанола с дикарбоновыми кислотами. Можно предположить, что такие соединения будут обладать совокупностью полезных свойств своих структурных элементов, а именно, облегчать синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран, стимулировать холинергическую нейротрансмиссию, улучшать пластичность нейрональных мембран [Ansell G.B., 1971; Shingworth D.R., 1972; Jope R. S., 1979; Pomeroy A.R., 1972; Kostopoulos G.K., 1974; Karen E., 2012; Malanga G., 2012; Макарова Л.М., 2006], усиливать энергетические возможности нейронов за счет активации окисления сукцината в митохондриях [Лукьянова Л.Д., 1976; Лукьянова Л.Д., 2009; Lukyanova L.D., 2015]. В результате этого можно ожидать повышения концентрации внимания, запоминания и способности к воспроизведению полученной информации, оптимизации познавательных и поведенческих реакции, снижения неврологического дефицита и эмоциональной неустойчивости, регресса неврологической симптоматики при патологических состояниях [Шустов Е. Б., Болотова В.Ц., 2015].

**Цель диссертационной работы:** изучить антигипоксическую и ноотропную активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (ФДЭС) при гипоксически-ишемических повреждениях мозга.

**Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:**

1) Изучить антигипоксическую активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата на моделях острой нормобарической гипоксии, острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии;

2) Изучить влияние бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата на поведение животных, биохимические показатели крови и ткани мозга на модели длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии (ДИНГ);

3) Исследовать влияние бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата в условиях экспериментальной ишемии головного мозга;

4) Оценить влияние бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата на когнитивные функции животных.

**Научная новизна исследования.** Впервые оценена активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата в условиях острой гипоксии. Установлено, что исследуемое соединение обладает выраженным антигипоксическим действием на моделях острой нормобарической гипоксии, острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии в низком диапазоне доз, превосходящим таковое у препаратов сравнения.

Выявлено, что антигипоксическая активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата не является дозозависимой и проявляется в равной степени в диапазоне доз от 10 до 800 мг/кг, что позволяет исключить ведущую роль в ее проявлении субстратного механизма действия.

Разработана модель длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, на фоне которой развивался хронический гипоксический стресс у лабораторных животных, проявляющийся снижением двигательной и поисково-исследовательской активности, увеличением агрессивности и эмоциональной лабильности, повышением уровня лактата и глюкозы, угнетением активности глутатионпероксидазы.

Впервые изучена фармакологическая активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата при длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии. Установлено, что на фоне ДИНГ экспериментальный препарат предотвращает снижение двигательной и поисковой активности, увеличение агрессивности и эмоциональной лабильности.

Оценено влияние изучаемого соединения на выживаемость, координацию движений и поведение животных в тесте «Открытое поле» в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, вызванной двусторонней необратимой перевязкой общих сонных артерий. Установлено, что ФДЭС способствовал снижению смертности, улучшению ориентировочно-исследовательское поведение, уменьшению нарушения координации движений.

Установлено, что бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат способствует сохранению и воспроизведению полученной

информации, оказывает антиамнестический эффект и сопоставимый с препаратом сравнения пирацетамом.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработана модель длительной интермиттирующей гипоксии для оценки потенциальных нейропротекторных препаратов, валидированная по показателям правильность (точность) и сходимость. Модель воспроизводима вне зависимости от времени года по основным показателям.

Результаты исследования позволяют рекомендовать бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат для дальнейшего изучения в качестве потенциального корректора гипоксически-ишемических нарушений головного мозга.

Обнаруженные фармакологические свойства ФДЭС позволяют вести целенаправленный поиск эффективных антигипоксантов и ноотропов в этом ряду соединений.

Полученные в работе данные вошли в качестве самостоятельного раздела в отчет «Материалы доклинического изучения фармакологических свойств бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат, по выполнению государственного контракта Минобрнауки РФ №14.N08.12.0120.

Материалы исследования используются в учебном процессе на кафедре фармакологии и клинической фармакологии СПХФУ при изучении тем: «Антигипоксанты и антиоксиданты» и «Средства, возбуждающие ЦНС. Психостимуляторы, антидепрессанты, ноотропы, аналептики» для студентов 3 и 4 курса фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт внедрения от 20.11.2017). Экспериментальное обоснование антигипоксической и ноотропной активности янтарной соли фумарового эфира диэтиламиноэтанола было внедрено на кафедре фармации в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова» в курсе лекций и практических занятий по фармакологии для студентов по специальности 33.05.01 Фармация (акт внедрения от 10.02.2018).

**Методология и методы исследования.** Набор использованных методов исследования соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований. Примененные методы статистической обработки данных являются современными и отвечают поставленной цели и задачам исследования.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат оказывает антигипоксический эффект на моделях острой нормобарической гипоксии, острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии в широком диапазоне доз, однако наиболее выраженное действие наблюдается в дозах 10 и 75 мг/кг.

2. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат проявляет защитное действие в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, улучшая ориентировочно-исследовательское поведение, снижая эмоциональную лабильность и агрессивность. В условиях хронического гипоксического стресса уменьшает выраженность лактоацидоза, оксидативного стресса, активирует эритропоэз.

3. На модели перманентной перевязки общих сонных артерий бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат способствует повышению выживаемости животных, снижению неврологического дефицита, выражающегося в улучшении координации движений и ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле».

4. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат способствует сохранению и воспроизведению полученной информации в тестах «Экстраляционное избавление» и «Т-Лабиринт», оказывает антиамнестический эффект в тесте «УРПИ».

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные результаты работы были обсуждены на V, VI и VII Всероссийских научных конференциях студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия, 2015, 2016, 2017), Российской научной конференции «Фармакология экстремальных состояний» посвященной 150-летию Н.П. Кравкова (Санкт-Петербург, Россия, 2015), III и IV Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, Россия, 2015, 2016), международной конференции «Emerging Trends in Drug Development» (Турку, Финляндия, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития», посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (Курск, Россия, 2016), III Всероссийской межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, Россия, 2017), XIII научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», (Светлые горы Московской области, Санкт-Петербург, Россия, 2017), заседании Санкт-Петербургского научного общества фармакологов (Санкт-Петербург, Россия,

2016, 2017).

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автор лично участвовал в планировании и постановке экспериментов, обработке и интерпретации получаемых данных, подготовке публикаций по результатам выполненной работы.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 165 страницах машинопечатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 277 источника, в том числе 76 на отечественных и 201 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 21 таблицей.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получен патент на изобретение № 2588365 «Нейропротекторное средство на основе бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата» [Оковитый С.В., Шустов Е.Б., Болотова В.Ц., Титович И.А., 2016].

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** проведен литературный анализ данных о механизмах повреждения нейронов на фоне гипоксически-ишемических нарушений и фармакологической коррекции.

**Глава 2** посвящена моделированию гипоксически-ишемических состояний, методам исследования, которые были использованы в работе для определения антигипоксической и ноотропной активности, и методам статистической обработки полученных данных.

В **главе 3** изложены результаты собственных исследований и их обсуждение.

В **заключении** подводятся итоги выполненных исследований, приведены **выводы и практические рекомендации**.

## МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования было выбрано соединение бис{2-[(2E)-4- гидрокси-4- оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (2:1) (ФДЭС) - синтезированный на кафедре органической химии СПХФУ. Новое фармакологическое средство состоит из этилового производного аминокэтанола к которому присоединены молекулы бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислот. Аминокетанол, являясь прекурсором холина, обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран и повышает биодоступность кислот в клетку [Freeman J.J., 1976].

Бутандиовая кислота реализует свои эффекты через специфические рецепторы (SUCNR1) на глиальных клетках, а также повышают устойчивость нейронов к гипоксии через

метаболические пути, в первую очередь, энергопродуцирующие [Оковитый С.В., 2015]. Кроме того, бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты способствуют восполнению фонда сукцината и фумарата в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках.

В качестве препаратов сравнения были выбраны цитофлавин (ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия) [Афанасьев В.В., 2010; Бульон В.В., 2004]; 1,2,4-тиадиазол-3,5-диамин (амтизол), ресинтезированный на кафедре органической химии СПХФУ [Лукьянова Л.Д., 1990]; цитиколин (Феррер Интернасьональ, С.А., Испания); холина альфосцерат (Italfarmaco S.p.A., Италия) [Amenta F., 2001] и пирацетам (UCB Pharma S.A., Бельгия) [Николаева И.Г., 2010]. Исследуемые объекты и их дозы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Объекты исследования и их дозы

Объекты исследования	Дозы, мг/кг
Амтизол	25, 50
Цитофлавин	10, 25, 50, 75, 130, 600
Цитиколин	500
Холина альфосцерат	100
Пирацетам	900
ФДЭС	10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800

Эксперименты проведены на 504 белых беспородных лабораторных мышах самцах массой 22-30 г и мышах самцах линии СВА массой 18-22 г, 196 белых крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г.

*Моделирование кратковременной гипоксии.* Для определения антигипоксической активности нового производного аминэтанола использовали модели острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии [Лукьянова Л.Д., 1990].

Для оценки антигипоксической активности косвенных или второстепенных по значимости показателей использовался индекс защиты (ИЗ), показывающий, какую часть негативных изменений показателей, вызванных внешним воздействием компенсирует применение данного препарата [Каркищенко Н.Н., 2017].

$$\text{ИЗ} = (\text{X}_{\text{пр}} - \text{X}_{\text{пл}}) / \text{X}_{\text{пл}}, \quad (1)$$

где X – относительная величина показателя после воздействия по отношению к исходному уровню, индексы «пр» и «пл» обозначают группы с приемом препарата или плацебо.

*Модель длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии (ДИНГ).* Длительную интермиттирующую нормобарическую гипоксию моделировали в гипоксикамере "БИО-НОВА-204" (ООО «НТО Био-Нова», Россия). В гипоксикамеру подавалась гипоксическая

газовая смесь, содержащая 6% кислорода. Животных помещали в камеру ежедневно на 6 часов, в течение 2-х недель.

*Модель перманентной перевязки общих сонных артерий.* Церебральную ишемию моделировали двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий [Pulsinelli W.A., 1987].

*Методы оценки поведения, координации и когнитивных функций животных.* Поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле» [Martin-Arenas F.J., 2014] и «Приподнятый крестообразный лабиринт» [Walf A.A. et al., 2007]. Для изучения влияния исследуемых препаратов на когнитивные функции были выбраны тесты «Условный рефлекс пассивного избегания»(УРПИ), тест «Экстраполяционное избегание»(ЭПИ), «Т-лабиринт». Тест «Ротарод» предназначен для оценки координации движений [Воронина Т.А., 1989; Бондаренко Н.А., 1990; Deacon R.M.J., 2006].

*Биохимические методы исследования крови.* С помощью портативного глюкометра Accu-ChekActive (RocheDiagnostics, Германия) в крови определяли содержание глюкозы сразу после гипоксического воздействия. С помощью портативного биохимического анализатора Accutrend Plus (Roche Diagnostics, Германия) в крови определяли содержание лактата сразу после гипоксического воздействия.

*Биохимические исследования ткани мозга*

*Определение активности глутатионпероксидазы и каталазы.* Ферментативную активность глутатионпероксидазы в головном мозге определяли по методике, разработанной Разыграевым А. В. [Разыграев А. В., 2016]. Активность каталазы определяли модифицированным методом, описанным в работе Beers R.F. [Beers R.F., 1952].

*Определение концентрации белка.* Концентрацию белка определяли турбидиметрическим методом, основанным на помутнении белкового раствора при добавлении к нему трихлоруксусной кислоты [Chesnokova, L.S., 1997].

*Гематологические исследования.* Взятие крови у мышей производили из ретроорбитального синуса с использованием пипеток Пастера. На автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (DIATRON, Австрия) определяли показатели гемограммы (число эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), средний объем эритроцита (MCV)).

*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении - с помощью непараметрического критерия

Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) ± ошибка среднего (m).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние ФДЭС на переносимость мышами острой гипоксии

*Модель острой нормобарической гипоксии.* На модели ОНГ было установлено, что в контрольной группе животные погибали при вдыхании ГГС, содержащей 4,2% кислорода.

В группе, которой вводили ФДЭС, антигипоксическое действие было обнаружено во всем диапазоне доз. Препарат значительно повышал устойчивость мышей к низким уровням кислорода (от 3,6% до 3,7%) во вдыхаемом воздухе в дозах 10 мг/кг, 75 мг/кг, 300 мг/кг, 600 мг/кг и 800 мг/кг. Установлено, что в группе, которой вводили ФДЭС в дозе 75 мг/кг, мыши погибали при вдыхании воздушной смеси, содержащей в 1,2 раза кислорода меньше по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ), а антигипоксический эффект его был сопоставим с таковым действием эталонного антигипоксанта амтизола (25 мг/кг).

Анализ рисунка 1 показывает, что ФДЭС в широком диапазоне доз (от 10 до 800 мг/кг) проявляет антигипоксическую активность, сопоставимую с активностью референсного препарата амтизол в дозе 25 мг/кг (Рисунок 1). В усредненном варианте по всему диапазону доз уровень антигипоксической активности препарата равен 0,94 амтизоловых единиц. [Каркищенко Н.Н., 2017].

На модели ОНГ установлено, что значимый антигипоксический эффект ФДЭС оказывает в диапазоне низких доз. Поэтому в дальнейших исследованиях был использован ФДЭС в диапазоне от 10 мг/кг до 75 мг/кг.

Цитофлавин не оказывал антигипоксического эффекта на модели ОНГ.

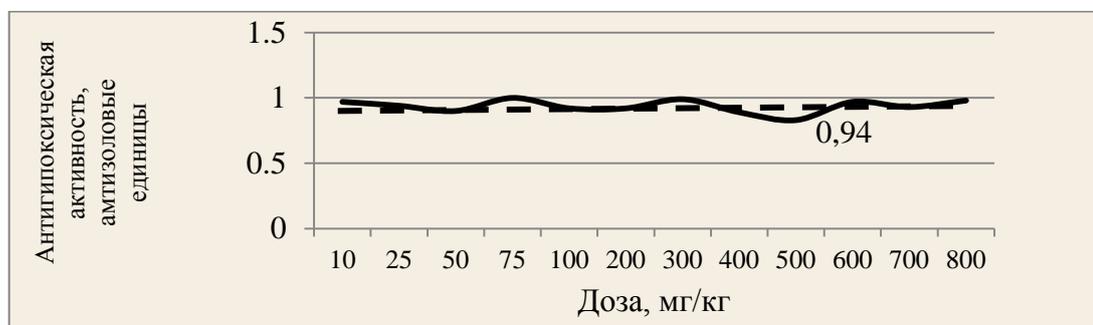


Рисунок 1 – Кривая «доза-Эффект» для ФДЭС на модели острой нормобарической гипоксии (амтизоловые единицы)

Отсутствие антигипоксической активности цитофлавина при критических степенях кислородного голодания позволяет исключить из антигипоксической активности ФДЭС

влияние сукцината, которое может проявляться при меньших степенях дефицита кислорода, в особенности – при хроническом гипоксическом воздействии.

*Модель острой гемической гипоксии.* На модели ОГемГ животные контрольной группы погибали через 16 минут после введения натрия нитрита (300 мг/кг).

В группе животных, которой вводили ФДЭС (75 мг/кг) наблюдали достоверное увеличение продолжительности жизни в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой. Антигипоксическая активность этой дозы ФДЭС превосходила эффективность амтизола в эффективной дозе 50 мг/кг на 20% ( $p < 0,05$ ). Сравнительная оценки антигипоксической активности ФДЭС и амтизола в дозе 50 мг/кг выполнена при пересчете антигипоксического эффекта ФДЭС на «амтизоловые единицы» (Рисунок 2) [Каркищенко Н.Н., 2017].

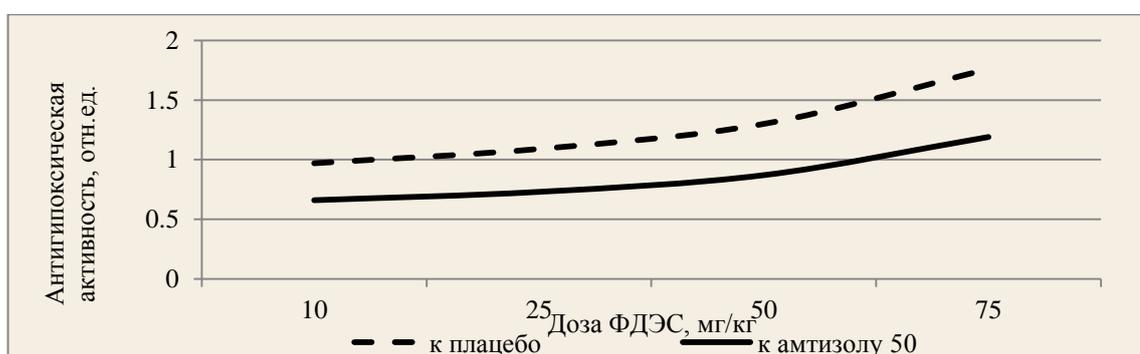


Рисунок 2 – Кривая «доза-эффект» для антигипоксической активности ФДЭС на модели гемической гипоксии

Анализ рисунка 2 показывает, что на модели гемической гипоксии антигипоксическая активность ФДЭС имеет прямой дозозависимый эффект (в отличие от модели острой нормобарической гипоксии). Следовательно, при гемической гипоксии проявляется не только рецепторное действие ФДЭС на нервную систему, которое было ведущим в антигипоксической активности при критических степенях дефицита кислорода во вдыхаемом воздухе, но и субстратное (энергетическое) действие, реализуемое на уровне митохондрий.

Цитофлавин на модели острой гемической гипоксии не оказывал достоверного антигипоксического эффекта. Амтизол в дозе 50 мг/кг проявлял статистически достоверную антигипоксическую активность на этой модели гипоксии, увеличивая время жизни животных по отношению к контролю в 1,5 раза. Более низкая доза амтизола (25 мг/кг) не обеспечивала достижение антигипоксического эффекта.

*Модель гистотоксической гипоксии.* На модели ОГтГ установлено, что после введения ингибитора тканевого дыхания - натрия нитропрусида (20 мг/кг) продолжительность жизни в контрольной группе составила около 10 минут. Амтизол в обеих исследованных дозах проявлял антигипоксическое действие на этой модели (+55% и +73% к эффекту плацебо соответственно,  $p < 0,05$ ).

На модели гистотоксической гипоксии ФДЭС показал умеренную дозозависимость, однако она явно непропорциональна росту дозы: при ее увеличении в 5 раз антигипоксическая активность повышалась по отношению к плацебо только на 30%, причем этот прирост не был статистически достоверным (Рисунок 3) [Каркищенко Н.Н., 2017] .

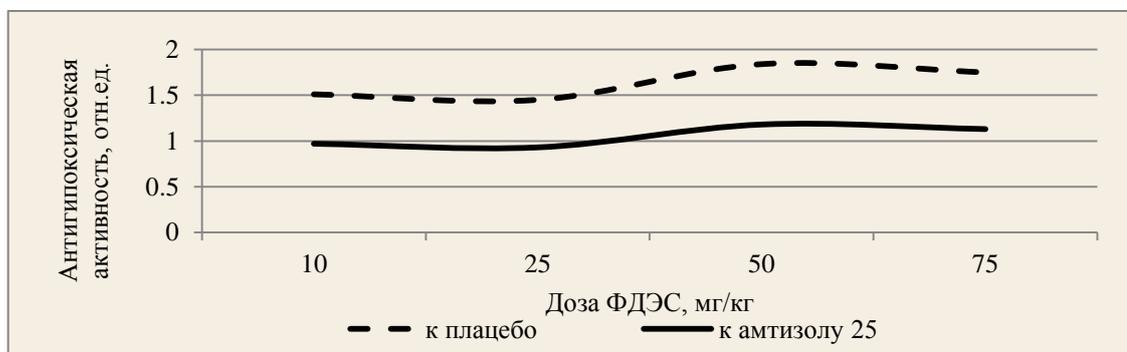


Рисунок 3 – Кривая «доза-эффект» для антигипоксической активности ФДЭС на модели гистотоксической гипоксии

В сопоставлении с амтизолом в дозе 25 мг/кг антигипоксическая активность ФДЭС близка к таковой референсных препаратов и колеблется для разных доз от 0,93 до 1,18 амтизоловых единиц. Дозовые кривые на моделях нормобарической и гистотоксической гипоксии для ФДЭС очень близки, что может свидетельствовать и о схожести молекулярных механизмов антигипоксического действия препарата.

Цитофлавин (600 мг/кг) повышал устойчивость мышей к воздействию острой гистотоксической гипоксии в 2,12 раза по сравнению с контрольной группой животных.

Очевидно, в реализации антигипоксической активности нового соединения аминоэтанола существенную роль играют как анионная часть (кислотный остаток), так и эфирное производное аминоэтанола и дикарбоновые кислоты, что было показано ранее для соединений сходной структуры [Шустов Е.Б., 2015].

### **Влияние ФДЭС на животных в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии**

*Влияние ФДЭС на поведение животных в тесте «Открытое поле».* В тесте «Открытое поле» в контрольной группе под воздействием ДИНГ общая двигательная активность снижалась в 1,15 раза по сравнению с интактными животными, увеличивалась агрессивность и эмоциональная лабильность (на 244% и 89% соответственно), что свидетельствует о наличии у животных признаков хронического стресса и формирующегося невротического состояния (астенизация + эмоциональная лабильность + агрессивность).

На фоне курсового применения исследуемого средства и препаратов сравнения отмечалось частичное восстановление поведенческих характеристик лабораторных животных, однако ни один из препаратов не обеспечивал полную защиту. На рисунках 4 и 5 представлены данные, характеризующие эффект ДИНГ на фоне курсового введения препаратов в отношении двух типичных показателей – общей двигательной активности и агрессивности (Рисунки 4, 5).

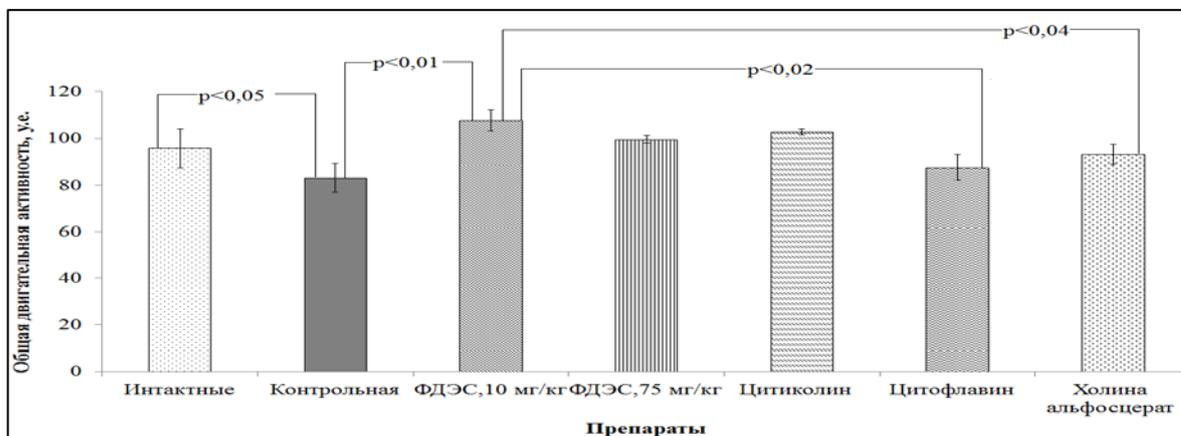


Рисунок 4 – Влияние исследуемых препаратов на общую двигательную активность в тест «Открытое поле» на фоне ДИНГ

Защитное действие в отношении хронического гипоксического стресса препарата ФДЭС проявлялось в дозе 10 мг/кг. При его курсовом приеме отмечалось снижение выраженности астенических проявлений (частичное восстановление общей двигательной и поисковой активности), но не эмоциональной лабильности. Увеличение дозы ФДЭС до 75 мг/кг при курсовом приеме приводило к ухудшению показателя эмоциональной лабильности, снижению защитных эффектов по показателям ОДА и ПИА.

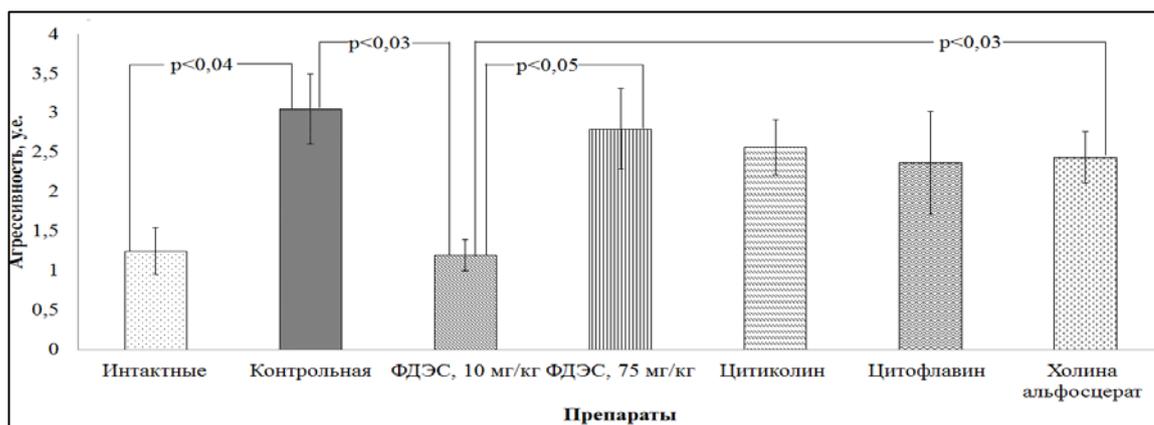


Рисунок 5 – Влияние ФДЭС на агрессивность в тесте «Открытое поле» на фоне ДИНГ

Наиболее сбалансированным защитным действием на модели ДИНГ обладал цитиколин, оказавший умеренное защитное действие по всем анализируемым показателям. Для холина альфосцерата наиболее отчетливые защитные эффекты проявлялись в отношении агрессивности и поисково-исследовательской активности.

Обращает на себя внимание определенная общность защитного действия ФДЭС (10 мг/кг), цитиколина и холина альфосцерата, что позволяет предположить существенную роль холинергической системы в реализации эффектов препарата.

*Влияние ФДЭС на поведение животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».* Под воздействием ДИНГ, в контрольной группе животных отмечали достоверное ( $p < 0,05$ ) уменьшение времени нахождения в открытом рукаве (в 4,25 раза), снижение количества заходов в открытый рукав (в 5 раз), увеличение времени нахождения в закрытом рукаве (в 5,7 раза), сокращалось количество заходов в открытый рукав (в 3 раза), а время нахождения на центральной площадке – в 2,5 раза, уменьшалась ориентировочная активность животных (в 4 раза), а их эмоциональная лабильность повышалась в 4 раза по сравнению с исходными значениями. Такая динамика может быть интерпретирована как выраженное тревожно-невротическое состояние.

В ходе проведённых исследований установлено, что у животных в условия ДИНГ, на фоне курсового применения ФДЭС и исследуемых препаратов, наблюдали снижение выраженности тревожно-невротического состояния (Рисунок 6).

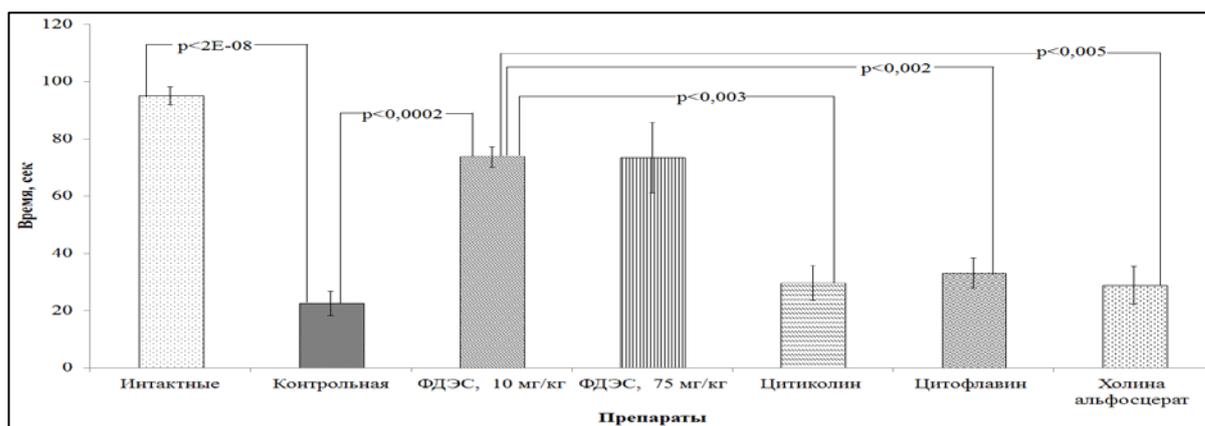


Рисунок 6 – Влияние ФДЭС на время нахождения в открытом рукаве в тесте «ПКЛ» на фоне ДИНГ

В тесте «ПКЛ» ФДЭС, в обеих исследованных дозах (10 и 75 мг/кг), проявляет на модели ДИНГ выраженное защитное действие в отношении показателей ВНОР, КЗОР, ЛППЗОР ( $ИЗ > 0,5$ ), и умеренное защитное действие в отношении показателей ВНЗР, ОА ( $0,30 < ИЗ < 0,50$ ). Для дозы 10 мг/кг также проявляется защитное действие в отношении показателей КЗЗР ( $ИЗ = 0,52$ ), ВНЦП ( $ИЗ = 0,46$ ) и ЭЛ ( $ИЗ = 0,70$ ), в то время как для дозы 75 мг/кг эти эффекты были выражены слабее.

Таким образом, полученные в тесте «ПКЛ» данные свидетельствуют о том, что на модели хронического гипоксического стресса, курсовое применение ФДЭС в оптимальной дозе (10 мг/кг) замедляло формирование и снижало выраженность тревожных, астено-невротических

проявлений и частично поддерживало ориентировочно-исследовательскую деятельность животных, что предполагает наличие у исследуемого вещества нейропротекторного действия.

Цитиколин способствовал снижению времени пребывания животных в закрытом рукаве на 50%, а также статистически достоверно увеличивал время нахождения на центральной площадке в 3 раза по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о противотревожном и антидепрессивном действии.

Холина альфосцерат при курсовом введении на фоне ДИНГ оказывал умеренное защитное действие в отношении показателя латентный период первого захода в открытый рукав, ориентировочной активности, времени нахождения в закрытом рукаве и эмоциональной лабильности. Такое изменение показателей на фоне хронического гипоксического стресса может характеризовать умеренную нейропротекторную активность этого препарата.

*Влияние ФДЭС на биохимические показатели в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии.* В контрольной группе животных отмечалось достоверное повышение уровня глюкозы и лактата в крови на 31% и 35% соответственно по отношению к интактным животным. Такая динамика подтверждает формирование гипоксического стресса в ответ на ДИНГ.

Ни один из исследуемых препаратов, не снижал уровень глюкозы. ФДЭС и цитофлавин усиливали гипергликемическую реакцию на ДИНГ. Установлено, достоверное повышение глюкозы в 1,15-1,22 раза по сравнению с контрольной группой животных, что может быть связано с активацией гликолитического пути образования макроэргов.

Цитиколин и холина альфосцерат, для которых ведущим является холинэргическое действие, не стимулировали дополнительное повышение уровня глюкозы в крови животных.

В отношении лактата крови ФДЭС в дозе 10 мг/кг оказывал достоверный защитный эффект ( $IЗ=0,74$ ,  $p<0,05$ ). В исследованиях Pieralisi G., была показана способность ДМАЭ тартрата и битартрата снижать выраженность лактацидоза по сравнению с плацебо [Pieralisi G., 1991].

Однако увеличение дозы ФДЭС до 75 мг/кг усиливало уровень лактатемии (+27% к влиянию плацебо), что вместе с гипергликемической реакцией, может свидетельствовать о выраженном усилении гликолитического ресинтеза АТФ на фоне приема высокой дозы препарата. Остальные исследованные препараты не оказывали на уровень лактата крови достоверного влияния.

Ранее было показано, что прерывистая гипоксия приводит к повышению симпатических влияний [Morgan, B. J., 2007], что проявляется опосредованным сужением сосудов скелетных мышц, снижением утилизации глюкозы клетками и повышением уровня глюкозы в крови. На экспериментальных моделях у животных установлено, что липолиз, усиливающийся в ответ на

воздействие хронической интермиттирующей гипоксии, приводит к активизации глюконеогенеза, и, в условиях недостатка кислорода, способствует увеличению уровня лактата в крови [Drager, L. F. et al., 2010].

В контрольной группе животных, под влиянием ДИНГ, в тканях мозга происходило статистически достоверное повышение активности каталазы на 44% и снижение активности глутатионпероксидазы на 20%, что отражает вызванную хроническим гипоксическим стрессом активацию перекисного окисления липидов и истощение резервов глутатионового звена антиоксидантной системы [Honchar O.O., Mankovska I.M., 2007; Maiti P. et al., 2006].

Известно, что каталаза является субстратактивируемым ферментом, и ее активность увеличивается при повышении уровня гидроперекисей водорода в среде, а активность глутатионпероксидазы снижается при дефиците восстановленного глутатиона. Полученные результаты согласуются с известными данными о влиянии острой гипоксической гипоксии и ишемии мозга на активность процессов ПОЛ и АОС [Addabbo F. et al., 2009; Shi H., 2009; Зарубина И.В., 2009; 2010].

ФДЭС в обеих исследованных дозах не оказывал никакого влияния на активность каталазы. Курсовое применение цитиколина, цитофлавина и холина альфосцерата приводило к активации каталазной активности (на 23-47%), однако выявленная динамика носила статистически достоверный характер только для холина альфосцерата.

Курсовое применение ФДЭС на фоне ДИНГ оказывало выраженный дозозависимый эффект на активность глутатионпероксидазы (+49% для дозы 10 мг/кг и +67% для дозы 75 мг/кг). Активность этого фермента не только полностью восстанавливалась до уровня интактных животных, но и статистически достоверно превышала его. Ранее было показано, что аминоксанолаы способны снижать процесс ПОЛ и вести себя как скэвенджеры гидроксильных радикалов (рис.7) [Karen., 2012; Nagy I. Z.,1986].

В проведенном исследовании установлено достоверное повышение уровня глутатионпероксидазы на фоне введения цитиколина (+32% к эффекту ДИНГ в контрольной группе,  $p < 0,05$ ).

В исследованиях Arakawa S. и др., цитиколин способствовал ослаблению свободнорадикального окисления и ПОЛ, снижению окислительного стресса, повышению активности эндогенной антиоксидантной системы клеток за счет стимуляции синтеза глутатиона - повышения активности глутатионредуктазы [Arakawa S., 2009].

На активность глутатионпероксидазы цитофлавин и холина альфосцерат не влияли.

*Влияние ФДЭС на показатели гемограммы на модели ДИНГ.* В ответ на хроническое гипоксическое воздействие у животных контрольной группы, по сравнению с интактными животными, статистически достоверно повышался уровень, как эритроцитов, так и гемоглобина

(на 7% и 15% соответственно), что является закономерной реакцией системы крови и может свидетельствовать о том, что увеличение этих показателей связано не с активацией эритропоэза и синтезом «юных» эритроцитов, а выбросом в кровоток «старых» эритроцитов из тканевых депо. Для ФДЭС в дозе 10 мг/кг и цитиколина характерно усиление этой реакции, цитофлавин практически не влиял на нее, а холина альфосцерат – несколько ослаблял выброс эритроцитов из тканевых депо.

Установлено, что гематологический ответ на ДИНГ при курсовом введении ФДЭС в дозе 75 мг/кг является достоверно более выраженным, чем в группе плацебо (+15% по уровню эритроцитов, +4,5% по уровню гемоглобина), и сопровождается снижением среднего объема эритроцитов (на 5% по сравнению с интактными животными), что является признаком стимуляции эритропоэза и появлением в крови «юных», незрелых форм эритроцитов. Возможно, входящая состав ФДЭС янтарная кислота, воздействуя на SUCNR1 рецепторы в гемопоэтических прогениторных клетках, индуцирует клеточную пролиферацию и защиту от апоптоза [Nakanishi M. et al., 2012; Robben J.H. et al., 2009; Xin X. et al., 2012].

### **Изучение нейропротекторной активности ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга**

*Влияние ФДЭС на выживаемость животных в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.* Установлено, что перманентная перевязка общих сонных артерий вызывает гибель животных, наиболее выраженную в первые сутки после операции и продолжающуюся до 72 часов. К 21-м суткам в живых осталось 33,3% контрольных крыс.

В группе цитиколина выживаемость составила 50% , однако она не достигала статистической достоверности. В исследовании, проведенном Önal Z. M. на модели фокальной ишемии, смертность в группе цитиколина была 41,7% на 4-е сутки после операции, что сопоставимо с результатами нашего исследования [Önal Z. M., 1997]. Цитофлавин (170 мг/кг) и холина альфосцерат (100 мг/кг) не оказывали влияния на летальность животных после перманентной перевязки обеих сонных артерий.

Введение ФДЭС перед операцией, позволило снизить летальность животных в послеоперационном периоде. ФДЭС в дозе 10 мг/кг обеспечивал увеличение доли выживших животных на 25%, а в дозе 75 мг/кг – на 33%, однако не было достигнуто статистической достоверности.

*Влияние ФДЭС на координацию движений в тесте «Ротарод» при ишемии головного мозга.* Ишемическое повреждение головного мозга приводило к нарушению координации движений. Так, в контрольной группе крыс время удержания на вращающемся стержне достоверно снизилось в 4,2 раза по сравнению с исходными значениями, в то время как в группах ФДЭС в обеих дозах этот показатель снизился в среднем в 1,5 раза, достоверно отличаясь от значений контрольной группы. Также отмечено частичное восстановление этого показателя при применении референсных препаратов.

Установлено, что введение ФДЭС перед созданием животным перманентной ишемии головного мозга характеризуется отчетливым и статистически достоверным нейропротекторным действием. Этот эффект был равным для обеих доз препарата, что делает полученные результаты сопоставимыми с оценкой их антигипоксической активности на модели острой нормобарической гипоксии. У цитиколина и холина альфосцерата такой эффект был выражен слабее. Ранее способность цитиколина уменьшать нарушения моторно-координационной функции были продемонстрированы на 21-й день после создания церебрального фототромбоза в тесте «Цилиндр» [Diedirich K., 2012].

*Влияния ФДЭС на поведение животных в тесте «Открытое поле» после перманентной перевязки общих сонных артерий.* У животных контрольной группы сформированная в результате операции по перевязке сонных артерий перманентная ишемия головного мозга характеризовалась в постоперационном периоде (21 день) отчетливыми нарушениями поведенческой активности. При этом ОДА снижалась в 6 раз, ПИА – в 5 раз, агрессивность животных увеличивалась в 2,6 раза, а эмоциональная лабильность – в 3,7 раза. Следовательно, тест «Открытое поле» является высокочувствительным для выявления хронических гипоксических нарушений поведения животных.

Цитиколин оказывал умеренное корригирующее действие в отношении показателей эмоциональной сферы животных (эмоциональная лабильность и агрессивность), цитофлавин не проявил защитного действия в этой модели, холина альфосцерат оказывал умеренное защитное действие в отношении эмоциональной лабильности. Следовательно, для препаратов с холинэргическим механизмом действия профилактическое их введение перед окклюзией сонных артерий реализовалось в определенной нейропротекции в эмоциогенных структурах мозга – лимбической системе и ядрах среднего мозга, но не в корковой зоне, с которой связаны такие поведенческие показатели, как общая двигательная и поисково-исследовательская активность.

ФДЭС в дозе 10 мг/кг е был более активен, чем препараты сравнения в отношении показателей эмоциональной сферы, но также оказывал защитное действие и в отношении собственно поведенческой активности (ОДА, ПИА).

### Влияния ФДЭС на когнитивные функции

Проведенными исследованиями установлено, что для изучаемых препаратов характерно влияние на когнитивные функции. Так, в тесте УРПИ, среди интактных животных, через 2 и 24 часа после обучения, памятный след сохранили соответственно 83 и 75%. Скополамин значительно ухудшал этот показатель, снижая число обученных крыс до 16 и 41% соответственно. Под влиянием пираретама происходило нивелирование отрицательного действия холиноблокатора и количество обученных животных через 2 и 24 часа составило 83 и 100% соответственно. ФДЭС в обеих дозах показал сопоставимый с препаратом сравнения эффект, увеличивая число крыс, сохранивших навык через 2 ч до 75% (обе дозы), а через 24 ч до 91% (10 мг/кг) и 83% (75 мг/кг) (рис.8).

На фоне предварительного введения скополамина в контрольной группе животных происходило снижение времени нахождения в светлой камере и увеличение времени нахождения в темной камере, что свидетельствует об угнетении процессов запоминания и воспроизведения информации. Также происходило резкое сокращение латентного периода первого захода в темный отсек, что свидетельствует о неустойчивости памятного следа.

Пираретам в дозе 900 мг/кг оказывал полную защиту процессов памяти от скополаминовой амнезии (ИЗ=1,0). ФДЭС в обеих дозах оказывал защитное влияние на процессы консолидации и воспроизведения памятного следа через 2 и 24 часа после введения скополамина (ИЗ= 1,36 и 1,25 для дозы 10 мг/кг и 1,0 и 1,22 для дозы 75 мг/кг). У животных этих групп время нахождения в светлой камере значительно преобладало над временем нахождения в темной камере, а заходы животных в темную камеру были ошибочными и на непродолжительный срок. Эффект ФДЭС был сопоставим с действием пираретама.

В тесте ЭПИ в контрольной группе животных время начала движения увеличивалось, что свидетельствует об отсутствии памятного следа о решении задачи, но наличии знания об относительной безопасности тестовых условий. Повторное предъявление теста крысам через 2 недели воспринималось животными как менее актуальная (и более трудная) задача, так как при отсутствии внешних воздействий время подныривания (то есть решения задачи) достоверно увеличивалось в 1,7 раза и на 10% уменьшалось количество крыс, решивших экстраполяционную задачу по сравнению с исходными данными. Возможно, это является проявлением феномена отрицательной интерференции памятных следов, описанный в ряде исследований [Бородкин Ю.С., 1982].

Обучение животных в тесте ЭПИ на фоне применения пираретама на 35% сокращало время решения задачи, а доля животных, успешно решивших данный тест, увеличивалась на

20% (с 70 до 90%), что свидетельствует о сохранении ранее выработанного в ходе обучения памятного следа.

ФДЭС, как и пираретам, способствовал более быстрому и качественному решению экстраполяционной задачи, что подтверждает наличие у исследуемого вещества отчетливого и статистически достоверного ноотропного действия. Значимые различия в эффектах разных доз ФДЭС практически отсутствовали. Специфической особенностью ФДЭС можно считать наличие дополнительного растормаживающего действия, которое проявлялось снижением латентного времени начала движения животных с 7,1 секунд в контрольной группе до 1,1 секунд в группе с приемом ФДЭС.

В тесте «Г-лабиринт» пираретам оказывал умеренное стимулирующее действие на процессы обучения животных и закрепление в памяти результатов обучения. Это может быть обусловлено увеличением биосинтеза ацетилхолина и повышением плотности М-холинорецепторов во фронтальной коре. [Pilch H., et all., 1988]. Также пираретам избирательно активирует АМРА подтип глутаматных рецепторов, не влияя на другие их подтипы [Pedata F., et all., 1984].

Введение ФДЭС в обеих исследованных дозах существенно повышало эффективность обучения, запоминания и воспроизведения информации у животных, что подтверждает установленное в тесте ЭПИ ноотропное действие этого соединения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования по изучению антигипоксической активности бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата в дозах 10 мг/кг и 75 мг/кг, показали, что ФДЭС обладает выраженным эффектом на различных моделях гипоксии: острой нормобарической гипоксии, острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии. По активности ФДЭС не уступал, а в ряде случаев и превосходил действие препаратов сравнения.

На фоне воздействия ДИНГ в тесте «Открытое поле» ФДЭС предотвращает снижение двигательной и поисковой активности, увеличение агрессивности и эмоциональной лабильности. В тесте ПКЛ наибольшую фармакологическую активность проявил ФДЭС (10 мг/кг), действие которого характеризуется уменьшением тревожности, при одновременном повышении ориентировочно-исследовательского поведения, что позволяет его рассматривать в качестве стресспротектора. Увеличение времени пребывания в открытой части лабиринта и на ЦП, а также уменьшение ЛППЗОР может говорить об уменьшении эмоциональной тревожности в условиях ДИНГ. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии возможного анксиолитического действия ФДЭС.

Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиот на модели ишемии головного мозга, вызванной двусторонней перманентной перевязкой общих сонных артерий у крыс, уменьшает выраженность неврологического дефицита и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения у крыс на фоне ишемии головного мозга, вызванной двусторонней необратимой перевязкой общих сонных артерий. Оптимальная нейротропная доза нового соединения при курсовом пероральном введении составляет 10 мг/кг. Фармакологически профиль ФДЭС сопоставим с таковым цитиколина, однако по эффективности он превосходит его действие.

ФДЭС оказывает положительное действие на кратковременную и долговременную память, способствуя сохранению и воспроизведению полученной информации. Выраженность антиамнестического действия ФДЭС сопоставима с таковой у пираретама.

Таким образом, ФДЭС является оригинальным, фармакологически активным веществом, обладающим широким спектром фармакологической активности и перспективен для дальнейшего доклинического изучения, с последующим внедрением в клиническую практику рамках восстановительной неврологии.

## ВЫВОДЫ

1. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат оказывает выраженный антигипоксический эффект на моделях острой нормобарической гипоксии, острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии в диапазоне доз от 10 до 800 мг/кг, с максимумом действия в дозах 10 и 75 мг/кг.

2. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат проявляет защитное действие в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, выражающееся в улучшении ориентировочно-исследовательского поведения, снижении эмоциональной лабильности и агрессивности. В условиях хронического гипоксического стресса препарат уменьшает выраженность лактоацидоза, предотвращает образование активных форм кислорода и активизирует эритропоэз.

3. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат на фоне перманентной перевязки общих сонных артерий способствует повышению выживаемости животных и снижению неврологического дефицита, выражающегося в повышении координации движений в тесте Ротарод и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле».

4. Бис{2-[(2e)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат в дозах 10 мг/кг и 75 мг/кг оказывал антиамнестический эффект на модели амнезии,

вызванной скополамином и проявлял выраженное ноотропное действие в тестах ЭПИ и Т-лабиринт, не уступая по эффективности пирацетаму.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модель ДИНГ может быть использована в экспериментальной фармакологии для моделирования хронического гипоксического стресса.
2. Экспериментальная модель была валидирована по показателям правильность (точность) и сходимости. Модель воспроизводима вне зависимости от времени года по основным показателям.
3. Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат можно рекомендовать для проведения расширенных доклинических исследований.

### СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Титович И. А.**, Болотова В. Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола // Биомедицина. – 2016. – №2. – С. 77-83.
2. **Титович И.А.**, Сысоев Ю.И., Болотова В.Ц., Оковитый С.В. Нейротропная активность нового производного аминокэтанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. –2017. – Т. 80. –№5. – С. 3-6.
3. **Титович И.А.**, Радько С.В., Лисицкий Д.С., Оковитый С.В., Болотова В.Ц., Бельская А.В., Михайлова М.В., Сысоев Ю.И. Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных // Биомедицина. – 2017. – №3. – С. 102-110.

#### Патент

4. Нейропротекторное средство на основе бис-{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандионат: пат. № 2588365 Рос. Федерация: А61К 31/22 А61К 31/194, А61Р 25/00 /Оковитый С.В., Болотова В.Ц., Шустов Е.Б., **Титович И.А.**; заявители и патентообладатели ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России - 2015118789/15, заявл. 19.05.2015, опубл.: 27.06.2016, Бюл. № 18. - 2 с.

#### Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференции

1. **Титович И.А.**, Болотова В.Ц. Оценка антигипоксической активности нового производного диэтиламинокэтанола. Сборник материалов конференции «Молодая фармация-потенциал будущего» 20-21 апреля 2015г. Санкт-Петербург, 2015. – С. 501-504.
2. **Титович И.А.**, Болотова В.Ц. Изучение влияния длительной интермиттирующей гипоксической гипоксии на поведение и физическую работоспособность аутистических мышей.

Сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в здоровье нации», 10-11 ноября 2015 г. Санкт-Петербург, 2015. – С. 141-145.

3. **Титович И.А.**, Болотова В.Ц. Оценка антигипоксической активности нового соединения диэтиламиноэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами. Сборник материалов Всероссийская научная конференция «Фармакология экстремальных состояний», посвященная 150-летию Н.П. Кравкова Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 28 июня – 2 июля 2015 г. Санкт-Петербург, 2015. – С. 20.

4. **Титович И.А.**, Болотова В.Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности производного аминоэтанола. Сборник материалов конференции «Молодая фармация-потенциал будущего» 25-26 апреля 2016г. Санкт-Петербург, 2016. – С. 720-722.

5. **Титович И.А.**, Болотова В.Ц. Влияние нового производного аминоэтанола на поведение аутобредных мышей в условиях воздействия длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии. Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в здоровье нации», 9-10 ноября 2016 г. Санкт-Петербург, 2016. – С. 627-630.

6. Сысоев Ю.И., **Титович И.А.** Изучение нейропротекторной активности нового производного диэтиламиноэтанола в условиях ишемии головного мозга в тесте «Открытое поле». Сборник материалов конференции Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ, Курск, 2016. – С. 603-607.

7. Романюк А.С., **Титович И.А.** Изучение влияния нового нейропротекторного средства на основе (2e)-4-[2-(диэтиламино) этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоата на поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Сборник материалов конференции «Современное решение актуальных научных проблем медицины» 15-16 марта 2017 г. Нижний Новгород, 2017 – С. 325.

8. Загладкина Е.В., **Титович И.А.** Изучения влияния производного аминоэтанола на показатели гемограммы на фоне воздействия длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии. Сборник материалов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» 15-16 марта 2017 г. Нижний Новгород, 2017 – С. 317-318.

9. Шепелева Д.Ю., **Титович И.А.** Изучение влияния нейропротекторного средства на основе бис {2-[(2e)-4-гидрокси-4-оксобут-2еноилокси]- N,N диэтилэтанаминия} бутандионата в тесте «Экстраполяционное избавление». Сборник материалов конференции «Современное решение актуальных научных проблем медицины» 15-16 марта 2017 г. Нижний Новгород, 2017 – С. 332-333.

10. **Титович И.А.**, Сысоев Ю.И., Загладкина Е.В., Шепелева Д.Ю., Романюк Д.С. Изучение влияния нейропротекторного средства на основе на основе (2e)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоата в тесте «Условная реакция пассивного избегания болевого раздражения». Сборник материалов конференции «Молодая фармация-потенциал будущего» 24-25 апреля 2017 г. Санкт-Петербург, 2017 – С. 778-779.

11. Радько С.В., Морозова Ю.В., **Титович И.А.** Оценка влияния нового производного аминэтанол на когнитивные функции мышей в Т-лабиринте. Сборник материалов конференции «Молодая фармация-потенциал будущего» 24-25 апреля 2017 г. Санкт-Петербург, 2017 – С. 720-722.

12.

### **ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВНОР – время нахождения в открытом рукаве

ВНЗР – время нахождения в закрытом рукаве

ВНЦП – время нахождения на центральной площадке

ГГС – гипоксическая газовая смесь

ДИНГ – длительная интермиттирующая нормобарическая гипоксия

ИЗ – индекс защиты

КВР – количество выглядываний из рукавов

КЗОР – количество заходов в открытый рукав

КЗЗР – количество заходов в закрытый рукав

ЛППЗОР – латентный период первого захода в открытый рукав

ОГемГ – острая гемическая гипоксия

ОГтГ – острая гистотоксическая гипоксия

ОДА – общая двигательная активность

ОНГ – острая нормобарическая гипоксия

ПИА – поисково-исследовательская активность

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФДЭС – бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}

бутандиоат

ЦП – центральная площадка

ЭЛ – эмоциональная лабильность